

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie électrique et de génie informatique

SYSTÈME MICROFLUIDIQUE D'ANALYSE SANGUINE EN TEMPS RÉEL POUR
L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE CHEZ LE PETIT ANIMAL

Thèse de doctorat
Spécialité : génie électrique

Laurence CONVERT

Jury :
Vincent AIMEZ (directeur)
Paul CHARETTE (directeur)
Roger LECOMTE (directeur)
Yves BÉRUBÉ-LAUZIÈRE (rapporteur)
Maurice BOISSINOT (externe)
Frédéric SARRY (externe)

Sherbrooke (Québec) Canada

Août 2012

IV - 2230



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-89682-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-89682-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

De nouveaux radiotraceurs sont continuellement développés pour améliorer l'efficacité diagnostique en imagerie moléculaire, principalement en tomographie d'émission par positrons (TEP) et en tomographie d'émission monophotonique (TEM) dans les domaines de l'oncologie, de la cardiologie et de la neurologie. Avant de pouvoir être utilisés chez les humains, ces radiotraceurs doivent être caractérisés chez les petits animaux, principalement les rats et les souris. Pour cela, de nombreux échantillons sanguins doivent être prélevés et analysés (mesure de radioactivité, séparation de plasma, séparation d'espèces chimiques), ce qui représente un défi majeur chez les rongeurs à cause de leur très faible volume sanguin (~1,4 ml pour une souris). Des solutions fournissant une analyse partielle sont présentées dans la littérature, mais aucune ne permet d'effectuer toutes les opérations dans un même système. Les présents travaux de recherche s'insèrent dans le contexte global d'un projet visant à développer un système microfluidique d'analyse sanguine complète en temps réel pour la caractérisation des nouveaux radiotraceurs TEP et TEM.

Un cahier des charges a tout d'abord été établi et a permis de fixer des critères quantitatifs et qualitatifs à respecter pour chacune des fonctions de la puce. La fonction de détection microfluidique a ensuite été développée. Un état de l'art des travaux ayant déjà combiné la microfluidique et la détection de radioactivité a permis de souligner qu'aucune solution existante ne répondait aux critères du projet. Parmi les différentes technologies disponibles, des microcanaux en résine KMPR fabriqués sur des détecteurs semiconducteurs de type *p-i-n* ont été identifiés comme une solution technologique pour le projet. Des détecteurs *p-i-n* ont ensuite été fabriqués en utilisant un procédé standard. Les performances encourageantes obtenues ont mené à initier un projet de maîtrise pour leur optimisation. En parallèle, les travaux ont été poursuivis avec des détecteurs du commerce sous forme de gaufres non découpées.

Un premier dispositif intégrant des canaux en KMPR sur ces gaufres a permis de valider le concept démontrant le grand potentiel de ces choix technologiques et incitant à poursuivre les développements dans cette voie, notamment en envisageant des expériences animales. L'utilisation prolongée des canaux avec du sang non dilué est cependant particulièrement exigeante pour les matériaux artificiels. Une passivation à l'albumine a permis d'augmenter considérablement la compatibilité sanguine de la résine KMPR. Le concept initial, incluant la passivation des canaux, a ensuite été optimisé et intégré dans un système de mesure complet avec toute l'électronique et l'informatique de contrôle. Le système final a été validé chez le petit animal avec un radiotraceur connu.

Ces travaux ont donné lieu à la première démonstration d'un détecteur microfluidique de haute efficacité pour la TEP et la TEM. Cette première brique d'un projet plus global est déjà un outil innovant en soi qui permettra d'augmenter l'efficacité du développement d'outils diagnostiques plus spécifiques principalement pour l'oncologie, la cardiologie et la neurologie.

Mots clefs : imagerie moléculaire, tomographie d'émission par positrons (TEP), tomographie d'émission monophotonique (TEM), microfluidique, détecteur de radioactivité, KMPR, diodes *p-i-n*, hémocompatibilité.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les professeurs Vincent Aimez, Paul Charette et Roger Lecomte de m'avoir fourni l'opportunité et les moyens de travailler sur ce projet passionnant ainsi que pour leurs conseils, leur confiance et leurs encouragements tout au long du projet. Merci également aux membres de mon jury, Vincent Aimez, Yves Bérubé-Lauzière, Maurice Boissinot, Paul Charette, Roger Lecomte et Frédéric Sarry pour avoir relu avec attention mon manuscrit et apporté des remarques très constructives qui ont permis d'en améliorer grandement la qualité.

Je voudrais remercier Henri Dautet de la compagnie Excelitas Technologies pour m'avoir fourni les gaufres de détecteurs qui m'ont permis d'aller au bout de ce projet ainsi que le CRSNG, pour la bourse d'études ES D3 dont j'ai bénéficié pendant trois ans. Merci aussi à mes relecteurs, Pierre-Jean Zermatten, Catherine Pépin et ma mère, Josette Moreau, sans qui ce manuscrit serait beaucoup moins compréhensible et beaucoup plus riche en fautes d'orthographe.

Je tiens aussi à remercier Frédérique Girard Baril pour sa participation au projet, principalement sur la fabrication des détecteurs et leur encapsulation ainsi que pour son enthousiasme et son entrain tout au long de sa maîtrise. Merci aussi à Vincent Boisselle, pour ses deux stages qui ont mené à la carte analogique et à la mise à jour du logiciel de contrôle, et à Jean-Nicolas Mélançon qui prend la suite du projet et y apporte un regard neuf.

J'aimerais également remercier mes collègues qui ont participé activement à une partie ou une autre du projet et sont les co-auteurs des publications qui en ont découlé : Étienne Grondin, Abdelatif Jaouad et Alan Renaudin pour la fabrication en salles blanches, Vincent Chabot et Pierre-Jean Zermatten pour les guides d'ondes à gaine métallique, Jean-Pierre Cloarec et Raymond Hamel pour la modification de surfaces et Réjean Fontaine et Jean-François Pratte pour tout le support au niveau de l'électronique.

Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire de biophotonique, du laboratoire de TEP animale, du groupe de recherche en appareillage médical de Sherbrooke (GRAMS) et du laboratoire de Michel Grandbois et plus généralement du centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS), du CRN2 et du département de génie électrique et de génie informatique. Il serait trop long de nommer toutes les personnes avec qui j'ai interagi tant scientifiquement qu'humainement tout au long du projet et qui ont grandement contribué à sa réussite.

Enfin, je voudrais remercier ma famille et plus particulièrement mon conjoint, Miguel Marino, pour leur soutien et leurs encouragements qui m'ont aidés à mener ce projet à terme.

Merci à tous !

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1	INTRODUCTION	1
1.1	Mise en contexte.....	1
1.2	Problématique	2
1.3	Hypothèse de recherche	4
1.4	Objectifs du projet de recherche.....	5
1.5	Plan du document et contributions à l'avancement.....	6
CHAPITRE 2	ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE	9
2.1	Introduction.....	9
2.2	Principe de la TEP et de la TEM	9
2.3	Modélisation pharmacocinétique.....	11
2.4	Protocole standard	14
2.5	Contraintes sur les mesures	17
2.6	Conclusion	19
CHAPITRE 3	CAHIER DES CHARGES	21
3.1	Introduction.....	21
3.2	Système.....	21
3.3	Microcanaux	24
3.4	Détection de la radioactivité.....	26
3.5	Séparation de plasma	28
3.6	Micro échantillonnage	32
3.7	Conclusion	35
CHAPITRE 4	ÉTAT DE L'ART ET CHOIX TECHNOLOGIQUES.....	37
4.1	Introduction.....	37
4.2	Hypothèses initiales.....	37
4.3	Fabrication de canaux microfluidiques	39
4.4	Détection de radioactivité	42
4.5	Détection sur puce	46
4.6	Choix technologiques	50
4.7	Conclusion	53
CHAPITRE 5	FABRICATION D'UN DÉTECTEUR DE PARTICULES	55
5.1	Introduction.....	55
5.2	Fonctionnement d'une diode <i>p-i-n</i> en silicium.....	55
5.3	État de l'art pour la fabrication de diodes <i>p-i-n</i>	60
5.4	Éléments de conception des diodes et choix technologiques.....	61
5.5	Banc de tests et protocole de caractérisation	64

5.6	Résultats et discussion.....	68
5.7	Conclusion.....	73
CHAPITRE 6	MICROCANAUX SUR DÉTECTEUR DE PARTICULES.....	75
6.1	Avant-propos	75
6.2	Introduction	78
6.3	Materials and methods	79
6.4	Results and discussion.....	83
6.5	Conclusion and future work.....	86
6.6	Acknowledgments.....	86
CHAPITRE 7	MODIFICATION DE SURFACE DE LA KMPR.....	87
7.1	Avant-propos	87
7.2	Introduction	91
7.3	Materials and methods	93
7.4	Results and discussion.....	101
7.5	Conclusions	107
7.6	Acknowledgments.....	107
CHAPITRE 8	COMPTEUR SANGUIN MICROLUIDIQUE	109
8.1	Avant-propos	109
8.2	Introduction	113
8.3	Theoretical background.....	114
8.4	Prior art	116
8.5	Materials and methods	117
8.6	Results and discussion.....	127
8.7	Conclusion.....	135
8.8	Acknowledgments.....	135
CHAPITRE 9	DISCUSSION	137
9.1	Microcanaux	137
9.2	Détecteurs fabriqués à l’UdeS	139
9.3	Microcanaux sur le détecteur commercial	140
9.4	Perspectives commerciales	143
9.5	Compatibilité avec les fonctions futures.....	144
CHAPITRE 10	CONCLUSION	147
10.1	Rappel du contexte du projet	147
10.2	Résumé des accomplissements	147
10.3	Contributions à l’avancement	149
10.4	Perspectives	150
ANNEXE A	QUELQUES NOTIONS DE MICROFLUIDIQUE.....	151

A.1	Loi d'échelle dans les microsystèmes	151
A.2	Mécanique des fluides dans un microcanal	152
ANNEXE B	RADIOACTIVITÉ EN TEP ET EN TEM.....	155
B.1	Émission radioactive.....	155
B.2	Émission en TEP et en TEM.....	156
B.3	Interaction des particules chargées avec la matière	159
B.4	Interaction des photons avec la matière	161
ANNEXE C	PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA MICROFABRICATION.....	163
C.1	Salles blanches	163
C.2	Nettoyage.....	163
C.3	Photolithographie	164
C.4	Dépôt	165
C.5	Gravure.....	166
C.6	Soulèvement.....	167
C.7	Dopage.....	167
C.8	Collage.....	168
C.9	Réplication	169
ANNEXE D	DÉTECTION OPTIQUE ET DÉTECTION DE RADIOACTIVITÉ HORS PUCE	171
D.1	Détection optique pour la microfluidique	171
D.2	Détection de radioactivité hors puce.....	172
ANNEXE E	PROTOCOLE DE FABRICATION DES DIODES P-I-N	174
E.1	Dégraissage et nettoyage du substrat	174
E.2	Formation du masque d'implantation face avant.....	174
E.3	Dopage et activation des dopants	176
E.4	Métallisation face avant	177
E.5	Décapage de la face arrière	178
E.6	Métallisation face arrière	179
E.7	Passivation	180
E.8	Photomasques utilisés.....	181
ANNEXE F	BANC DE MESURE D'ANGLE DE CONTACT.....	183
ANNEXE G	ÉLECTRONIQUE ET INFORMATIQUE DE CONTRÔLE.....	186
G.1	Module de détection	186
G.2	Module principal	187
G.3	Logiciel de contrôle.....	188
ANNEXE H	SÉPARATION DE PLASMA	190
H.1	Séparation de plasma par hydrodynamique.....	190
H.2	Séparation de plasma par ondes acoustiques de surface	190

ANNEXE I	PROTOCOLE DE FABRICATION DE CANAUX AVEC ACCÈS DANS LE SILICIUM....	192
I.1	Préparation du substrat	192
I.2	Couche plancher	192
I.3	Couche murs.....	193
I.4	Gravure des accès dans le silicium.....	193
I.5	Préparation et collage du capot.....	194
I.6	Filtre i-line.....	195
ANNEXE J	AUTOFLUORESCENCE DE LA KMPR	197
	LISTE DES RÉFÉRENCES.....	198

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Exemples d'images corps entier par imagerie anatomique (A, tomodensitométrie) et par imagerie moléculaire (B, TEP, ^{18}F -MFES) [gracieuseté de Michel Paquette, CIMS].	1
Figure 1.2 : Compteur sanguin externe développé à l'Université de Sherbrooke, le CS μ [Convert, 2006].....	3
Figure 1.3 : Exemple de collecte automatique d'échantillons (adapté de [Wu et al., 2005]).	4
Figure 1.4 : Exemple de laboratoire sur puce pour l'analyse d'ADN [Burns et al., 1998].	5
Figure 2.1 : A. Principe de la détection en coïncidence dans une caméra TEP (adapté de http://www.bioteach.ubc.ca/Biomedicine/LookingInsideTheBody/) B. Principe de la détection avec collimateur dans une caméra TEM (adapté de [Singh et al., 2000]).	10
Figure 2.2 : Modélisation compartimentale du ^{18}F -FDG.	12
Figure 2.3 : Ratio en fonction du temps de l'activité du plasma par rapport au sang total pour le ^{18}F -FDG chez le rat. Injection à $t = 0$ (adapté de [Ashworth et al., 1996]).	13
Figure 2.4 : Photo d'une des caméras TEP précliniques en service au CIMS, le LabPET TM 4. Une souris est installée sur le lit et prête à être injectée.	15
Figure 2.5 : Fonction d'entrée typique. A. Forme idéale avec les trois régimes (1 : injection, 2 : captation par les tissus, 3 : équilibre des échanges). B. Forme dispersée telle que mesurée par un compteur sanguin en ligne.	16
Figure 3.1 : Schéma du système d'analyse et des différentes fonctions à remplir par la puce microfluidique ; non à l'échelle.	22
Figure 3.2 : Schéma de la fonction de transport de fluides par les microcanaux.	25
Figure 3.3 : Schéma de la fonction de détection de radiation.	26
Figure 3.4 : Efficacité de détection requise en fonction du volume de détection pour une activité minimale détectable de 15 Bq/ μl et un taux de comptage de bruit de fond de 5 cps. ...	27
Figure 3.5 : Schéma de la fonction de séparation de plasma.	28
Figure 3.6 : Schéma de la fonction de micro échantillonnage.	33
Figure 4.1: Effet de la distance sur l'angle solide de détection. Pour un même détecteur (section s identique), si la distance d augmente, l'angle solide Ω diminue.	38
Figure 4.2 : Principe de fabrication de microcanaux avec les technologies dures.	40
Figure 4.3 : Fabrication de canaux en PDMS (adaptée de http://www.elveflow.com/microfluidic/16-start-with-microfluidics).	41
Figure 4.4 : Fabrication de canaux polymères par photolithographie avec une fermeture par laminage (A, adaptée de [Abgrall et al., 2006]) ou par collage de verre (B, adapté de [Carlier et al., 2004]).	43
Figure 4.5 : Exemple d'un détecteur à semiconducteur : diode $p-i-n$ (adapté de [Kemmer, 1984]).	44

Figure 4.6 : Principe d'un détecteur à scintillation. Cas d'un TPM couplé à un scintillateur inorganique (adapté de [Cherry et al., 2003]).	45
Figure 4.7 : Détection de radioactivité avec capteur CCD dans une puce à ADN (A, adapté de [Eggers et al., 1993]) ou pour une puce à protéines (B, adapté de [Morozov et al., 2002]).	47
Figure 4.8 : Système d'analyse ADN avec détecteur de particules chargées intégré (adapté de [Burns et al., 1996]).	48
Figure 4.9 : A. Détection de radioactivité sur puce avec un scintillateur et un capteur CCD (adapté de [Cho et al., 2006]). B. Microcanaux remplis de liquide scintillateur pour la détection haute résolution de particules (adapté de [Mapelli et al., 2010]).	49
Figure 4.10 : Détection de particules chargées dans une puce microfluidique en PDMS pour l'imagerie cellulaire (adapté de [Vu et al., 2011]).	50
Figure 5.1 : A. Structure en diamant de la maille de silicium (Wikipedia). B. Orientations cristallines du silicium [Franssila, 2010].	56
Figure 5.2 : Les deux types de dopage du silicium (adapté de [Knoll, 2000]).	57
Figure 5.3 : Principe de la jonction <i>pn</i> (adapté de http://electronicslovers03.blogspot.ca/). A. Jonction non polarisée. B. Jonction polarisée.	58
Figure 5.4 : A. Principe de la photodiode (adapté de [Mathieu, 1998]). B. Courant généré dans la diode sans illumination (g_{op}) et avec trois intensités d'illumination croissantes (g_1 , g_2 et g_3) [Streetman et al., 2005].	58
Figure 5.5 : Structure d'une diode <i>p-i-n</i> (adapté de [Zhou et al., 1996]).	60
Figure 5.6 : Géométries initiales pour la détection de radioactivité. A : diode ronde, 1 et 2 mm de diamètre. B : diode rectangulaire allongée $3 \times 30 \text{ mm}^2$.	62
Figure 5.7 : Distribution des dopants après recuit d'activation (900 °C, 2 h 15) pour une implantation unique de bore à 35 keV (A) et après une double implantation à 10 keV et 35 keV (B) ($8.10^{12} \text{ cm}^{-2}$ pour chaque implantation).	63
Figure 5.8 : Photo d'une diode ronde (A) et d'une diode rectangulaire (B) encapsulées avec le schéma de connexion correspondant (C).	65
Figure 5.9 : Station sous pointe utilisée pour la caractérisation électrique des dispositifs fabriqués.	66
Figure 5.10 : Banc de test pour la mesure d'efficacité de détection des photodiodes. A. Schéma global. B. Photo du détecteur et de la carte de préamplification (la source était ici placée dans un microtube Eppendorf; pour les mesures présentées, la source était contenue dans une section de PE50). C. Schéma de la carte de préamplification.	67
Figure 5.11 : Photo de diodes en cours de fabrication (microscope optique, 10 X). A. Diode ronde après la première photolithographie. B. Coin d'une diode rectangulaire après la première gravure partielle au HF. C. Diode ronde à la fin du procédé de fabrication et après caractérisation électrique. Les traces sur l'aluminium sont dues au frottement des pointes. La caractérisation ayant été effectuée hors salles blanches, de la poussière est également visible sur la surface active.	69

Figure 5.12 : Courbes CV-IV des diodes fabriquées, exemple de la diode ronde 1 mm sur gaufre Topsil (courant en polarisation directe (A), courant en polarisation inverse (B), capacité en polarisation inverse (C)).	70
Figure 6.1: Picture of the microfluidic device.	79
Figure 6.2: Schematic cross-sectional view of the microfluidic device made out of existing photomasks for demonstration purposes (thicknesses not to scale).	80
Figure 6.3: Configurations used for geometrical detection efficiency simulations: microfluidic device (A) and conventional geometry (B). For the diodes used in the microfluidic device (C), the overall diode surface (2) was considered to better account for the active detection area than the implanted area (1).	81
Figure 6.4: Schematic of the acquisition setup. The Ortec MCA card was used only for the acquisition of energy spectra, and the Instech peristaltic pump was used only for input function simulation.	82
Figure 6.5: Energy spectra recorded for ^{68}Ga , ^{18}F and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ with the microfluidic device (5-50 kBq/ μL , 5-40 min acquisition).	84
Figure 6.6: Input function simulated by injecting 10 MBq of ^{18}F in 3 mL of water followed 1 min later by a 5:1 dilution. The curve was decay-corrected to time $t = 0$.	85
Figure 7.1 : Processus de formation d'un caillot sanguin [Ratner et al., 2004].	89
Figure 7.2: (A) MCWG, SPR and LR-SPR substrate structures; (B). modeled angular scans from the MCWG substrate for two cases yielding identical results: (1) two bulk liquid media with different RI and (2) constant bulk medium with the addition of a thin adlayer on the surface; (C) corresponding reflectance monitoring over time at 62.4° (aqueous sensing medium change at $t = 6$ min).	94
Figure 7.3: Schematic representation of the SPR system (Kreschmann configuration) used for BSA and fibrinogen adsorption measurements. Supports and motorized angle adjustments not shown. Micropipette and sample size not to scale.	95
Figure 7.4: Modeled and experimentally measured surface (A) and bulk (B) sensitivities for MCWG substrates, as a function of increasing KMPR film thickness (calculated according to Eq. 1 and 2).	101
Figure 7.5: Normalized reflectance measurements from angular scans with MCWG, SPR and LR-SPR substrates.	103
Figure 7.6: Modeled and experimentally measured surface (A) and bulk (B) sensitivities for each structure type capped with an identical Omnicoat film, calculated according to Eq. 1 and 2, respectively ($n = 4$, error bar = standard deviation).	103
Figure 7.7: Surface <i>rms</i> roughness measured by AFM and contact angle for increasing CAN- HNO_3 treatment durations on bare KMPR surfaces (error bar = standard deviation).	104
Figure 7.8: Fibrinogen adsorption kinetics on bare and BSA-passivated KMPR films, for both hydrophobic and hydrophilic surfaces. Fibrinogen injection at $t = 0$, PBS rinse after 20 min.	105

Figure 7.9: Comparison of bulk sensitivity and BSA passivation efficiency measurements for bare (control) and BSA-passivated (BSA) KMPR - “BSA US” indicates BSA-passivated samples washed in ultrasound before the fibrinogen experiment (n = 6, error bar = standard error of the mean). (A) Bulk reflectance change between DI-water and PBS, before fibrinogen solution injection, confirming that all substrates have similar bulk sensitivities. (B) Fibrinogen surface coverage Γ calculations (Eq. 3).....	106
Figure 8.1: Microfluidic blood counter connected to an animal for PET pharmacokinetic studies.	114
Figure 8.2: Schematic views of a cannula-based blood counter (A) and of the microfluidic blood counter (B, only one diode shown) (not to scale).....	118
Figure 8.3: A. Wall layer photomask. B. Picture of a section of the microchannel walls build on top of commercial unpackaged photodiodes (optical microscope, 2.5X).....	120
Figure 8.4: Simplified fabrication process diagram for the KMPR microfluidic radiation detector (only one diode shown, not to scale).....	123
Figure 8.5: Block diagram of the acquisition setup. The pump was used only for the dose-response curve and input function measurements. The agitating plate was used only for dose-response curve measurement.	125
Figure 8.6: A. Electron microscope view of the step coverage after evaporation with a rotating stage compared to a fixed stage (top view with 45° slope of the microscope stage). B. Cross sectional view of a 35- μ m deep microchannel wall on a Si substrate. The cross section was obtained by dicing the chip after cover bonding (Optical microscope, 10X).....	127
Figure 8.7: Photograph of the final chip after wire bonding.....	129
Figure 8.8: CV (A) and IV (B) measurements of one typical diode before processing, with the SiO ₂ /KMPR floor layer, and with the gold track and the complete microchannel.	130
Figure 8.9: A. Dose-response curve for a 5.2 kBq μ l ⁻¹ ¹⁸ F-FDG solution, after four successive 1:2 dilutions and switch back to non-radioactive water. This curve was corrected for detector efficiency, propagation delay and radioactive decay. No corrections were required for background count rate. B. Resulting mean plateau height for each dilution. C. Resulting plateau standard deviation (σ) compared to Poisson statistical variation (\sqrt{n}).	133
Figure 8.10 : Input function measured from a rat injected with 35 MBq of ¹⁸ F-FDG. The curve was corrected for detector efficiency, radioactive decay and averaged to reduce statistical noise (Savitzky-Golay method, 100 points).....	134
Figure 9.1 : Schéma d’une vue en coupe de la piste de métal assurant le contact à l’anode déposée sur la marche de KMPR dans la configuration actuelle (A) et dans la configuration proposée pour améliorer le rendement de fabrication (B).	141
Figure A.1 : Longueurs caractéristiques de la microfluidique par rapport à diverses entités biologiques (adapté de [Yeo et al., 2011])......	151
Figure A.2 : A. Écoulement laminaire (a) et turbulent (b) (Wikipédia). B. Profil de vitesse dans un écoulement de Poiseuille [Senturia, 2000].....	153
Figure B.1 : A. Spectre d’émission continue d’une particule bêta pour les isotopes TEP les plus courants (adapté de [Levin et al., 1999]). B. Spectre d’émission de raies pour la conversion	

interne d'un photon émis typiquement en TEM, exemple du ^{113m}In (adapté de [Knoll, 2000]).	157
Figure B.2 : A. Schéma des pertes d'énergie d'un électron dans la matière. B. Profondeur de pénétration pour un faisceau monoénergétique. C. Profil de dose déposée par une particule unique. D. Profil de dose déposée par un faisceau monoénergétique. E. Profil de dose déposée par un faisceau polyénergétique.	159
Figure B.3 : A. Différentes catégories d'interaction des photons avec la matière. B. Spectre d'absorption d'un photon de 511 keV (source de ^{68}Ge , LYSO couplé à une photodiode à avalanche) (Gracieuseté de C. M. Pepin, CIMS).	161
Figure C.1 : A. Principe de la photolithographie (adapté de http://ahshonorschemistry.wikispaces.com/A-Silicon+Wafer+Patterned). B. Étalement de résine par tournette (adapté de http://2009.igem.org/Team:HKU-HKBU/Protocols#Photolithography). C. Cordon d'étalement (même source).	164
Figure C.2 : A. Pulvérisation cathodique (adapté de Wikipedia). B. Déposition par vapeur chimique (adapté de http://accessscience.com/content/Chemical%20vapor%20deposition/800560).	165
Figure C.3 : Différents profils de gravure (adapté de [Franssila, 2010]).	166
Figure C.4 : A. Procédé de soulèvement. B. Profils de résines facilitant le soulèvement.	167
Figure C.5 : Différents types de collages (adapté de [Abgrall et al., 2007]).	168
Figure C.6 : Techniques de réplification (adapté de [Tabeling, 2006]).	169
Figure D.1 : Exemple de détection optique hors puce par un microscope confocal (adapté de [Gai et al., 2011]).	171
Figure D.2 : Exemple de détection optique sur puce avec une interface typique épaisse mais optiquement transparente (adapté de [Hofmann et al., 2005]).	171
Figure D.3 : Exemples de détection optique intégrée avec une interface compatible avec de la détection de radioactivité. A. Dispositif d'électrophorèse capillaire avec détecteur de fluorescence (adapté de [Webster et al., 2001]). B. Détecteur de chimiluminescence (adapté de [Jorgensen et al., 2003]).	172
Figure E.1 : Photomasques pour la fabrication des détecteurs de radioactivité. Exemple des diodes rondes.	181
Figure E.2 : Photomasques pour la fabrication des détecteurs de radioactivité. Motif complet.	182
Figure F.1 : Photographies du banc de mesure d'angle de contact.	183
Figure F.2 : Séquence d'images illustrant le dépôt d'une goutte d'eau sur de la KMPR non traitée.	184
Figure F.3 : Schéma du support à échantillon permettant un contrôle partiel de l'environnement de mesure de la goutte.	184
Figure F.4: Image d'une goutte d'eau sur de la KMPR non traitée après interpolation par le logiciel ImageJ.	185

Figure G.1 : Module de détection. A. Schéma de principe de la carte électronique. B. Photo du module.	186
Figure G.2 : Module principal. A. Schéma de principe de la carte électronique. B. Photo du module.	187
Figure G.3 : Aperçu du logiciel de contrôle (A) et de l'utilitaire Terminal USB (B).	189
Figure H.1 : Séparation de plasma par hydrodynamique. A. Effet Zweifach-Fung (adapté de [Yang et al., 2006]). B. Effet Fahraeus (adapté de [Jaggi et al., 2007]).	190
Figure H.2 : Séparation de plasma par ondes acoustiques stationnaires. A. Principe de séparation et de retrait séquentiel de cellules (adapté de [Lenshof et al., 2009]). B. Principe de collecte de plasma après plusieurs retraits successifs (adapté de [Lenshof et al., 2009]). C. Vue en coupe du dispositif utilisé par Lenshof et coll. (adapté de [Nilsson et al., 2004]). D. Illustration des ondes acoustiques de surface (adapté de [Ahmed et al., 2008]).	191
Figure I.1 : Spectre de l'aligneuse AOI 200 avec un masque standard en verre sodo-calcique (sans chrome) (Courtoisie de N. André, CRN2).	195
Figure I.2 : Spectre de l'aligneuse AOI 200 avec le filtre i-line passe-haut (A) et le filtre passe-bande (B) (Courtoisie de N. André, CRN2).	196
Figure J.1 : A. Histogrammes montrant la fluorescence de la KMPR pour différentes combinaisons de filtres d'excitation/émission. B. <i>Gauche</i> : profil d'intensité d'un microcanal de KMPR contenant des billes statiques marquées au CY5 pris suivant la ligne indiquée dans l'image de droite. <i>Droite</i> : image des microcanaux en question pour des temps d'intégration de 2 et 120 ms.	197

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Fraction de radioactivité ^{13}N présente sous la forme native de $^{13}\text{N-NH}_3$ dans le sang de rat suite à une injection en bolus à $t = 0$ (adapté de [Croteau et al., 2004]).	13
Tableau 2.2 : Contraintes générales pour l'analyse pharmacocinétique chez le petit animal.	20
Tableau 3.1 : Composition du sang (ϕ = nombre de cellules) [Charrin, 1991].	29
Tableau 3.2 : Spécifications du système global.	35
Tableau 3.3 : Spécifications de chacune des fonctions microfluidiques. Les facteurs les plus limitatifs ont été pris en compte et correspondent soit aux rats soit aux souris suivant le cas.	36
Tableau 5.1 : Corrections pour le calcul de l'efficacité intrinsèque.	68
Tableau 5.2 : Caractéristiques électriques des détecteurs fabriqués.	71
Tableau 5.3 : Efficacité de détection avec une source de ^{18}F pour les détecteurs encapsulés. L'efficacité absolue est mesurée, l'efficacité intrinsèque est calculée en fonction de la géométrie de détection. L'activité minimum détectable est calculée à partir de l'efficacité intrinsèque.	73
Table 6.1: Absolute detection efficiency for microfluidic device and reference detector measured for different isotopes (5-50 kBq/ μL). Only particle energies ≥ 60 keV and interaction probability $\geq 1\%$ were considered.	84
Table 7.1: KMPR film fabrication parameters used for MCWG fabrication. Resulting thicknesses are measured by ellipsometry (Fixed RI, see Table 7.2). The optimum film fabrication parameters selected for this study are indicated in bold and italic.	97
Table 7.2: Simulation parameters used for MCWG, SPR and LR-SPR structures: standard values, measurement by ellipsometry (635 nm) (*) or measurement by refractometry (589 nm assuming negligible dispersion for the fluids) (**).	97
Table 8.1: Electrical properties of tested devices (measured for bias = -30 V). The final microfluidic device consists of 8 diodes bonded in parallel on a PCB (* 8 diodes).	131
Table 8.2: Physical characteristics of tested devices (PE = polyethylene, Ep = epoxy, Ei = incident energy).	131
Table 8.3: Absolute detection efficiency, η , for microfluidic device and cannula-based detector measured for different isotopes (10 kBq μl^{-1} for ^{11}C and ^{18}F , 30 kBq μl^{-1} for $^{99\text{m}}\text{Tc}$).	132
Tableau A.1 : Loi d'échelle pour différentes grandeurs physiques [Tabeling, 2006].	152
Tableau B.1 : Émission des isotopes TEP et TEM courants ainsi que des isotopes utilisés pour la calibration au cours de ce projet [<i>A handbook of radioactivity measurements procedures</i> , 1984]. Seuls les éléments d'énergies supérieures à 45 keV et de probabilité d'émission supérieure à 1 % sont représentés. Toutes les énergies sont exprimées en keV.	158
Tableau G.1 : Protocole de communication avec le compteur.	188

LISTE DES ACRONYMES

CCD	: Dispositifs à transfert de charges (« charge-coupled device »)
CIMS	: Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke
CMOS	: métal-oxyde-semiconducteur complémentaire (« complementary metal-oxyde-semiconductor »)
COC	: Cycloolefin copolymère
CRN2	: Centre de recherche de nanofabrication et nanocaractérisation
CS μ	: Compteur sanguin microvolumétrique développé au CIMS
^{18}F -FDG	: ^{18}F -Fluorodésoxyglucose
GRAMS	: Groupe de recherche en appareillage médical de Sherbrooke
HPLC	: Chromatographe liquide haute performance (« high-performance liquid chromatography »)
KMPR	: Résine à base d'époxy commercialisée par la compagnie MicroChem
MMRGlu	: Taux métabolique d'entrée de glucose dans le myocarde (« myocardial metabolic rate of glucose »)
PC	: Polycarbonate
PCB	: Circuit imprimé (« printed circuit board »)
PDA	: Photodiodes avalanches
PDMS	: Polydiméthylsiloxane
PE10	: Tube polyéthylène commercialisé par la compagnie Becton Dickinson, de diamètre interne 0,28 mm et de diamètre externe 0,61 mm
PE50	: Tube polyéthylène commercialisé par la compagnie Becton Dickinson, de diamètre interne 0,58 mm et de diamètre externe 0,965 mm
PMMA	: Polyméthylméthacrylate
PS	: Polystyrène
RCA	: Nettoyage standard de gaufre tel qu'introduit par la compagnie Radio Corporation of America
SU-8	: Résine à base d'époxy commercialisée par la compagnie MicroChem
TAC	: Courbe temps-activité (« time activity curve »)
TEM	: Tomographie d'émission monophotonique
TEP	: Tomographie d'émission par positrons
TPM	: Tube photomultiplicateur

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

L'imagerie moléculaire est l'un des outils diagnostiques les plus prometteurs disponibles autant en clinique que pour la recherche chez l'humain et sur les modèles animaux. Elle permet d'explorer les anomalies moléculaires qui sont à la base de la maladie plutôt que de mesurer les effets anatomiques de ces altérations, généralement plus tardifs [Bonekamp et al., 2010] (figure 1.1). Il existe quatre principales catégories d'imagerie moléculaire : l'imagerie par ultrasons, l'imagerie optique, l'imagerie par résonance magnétique et les techniques d'imagerie nucléaire. Malgré l'exposition aux radiations et une résolution spatiale relativement faible comparée aux autres modalités, les techniques d'imagerie nucléaire sont les plus utilisées chez l'humain, principalement grâce à leur grande sensibilité. Les marqueurs peuvent en effet produire un très bon signal tout en étant injectés en très faibles concentrations (de l'ordre de la picomole), concentration trop faible pour noter un quelconque effet pharmacologique. Les techniques d'imagerie nucléaire permettent ainsi une étude *in situ* sans altérer les conditions normales de l'organe ou du tissu d'intérêt.

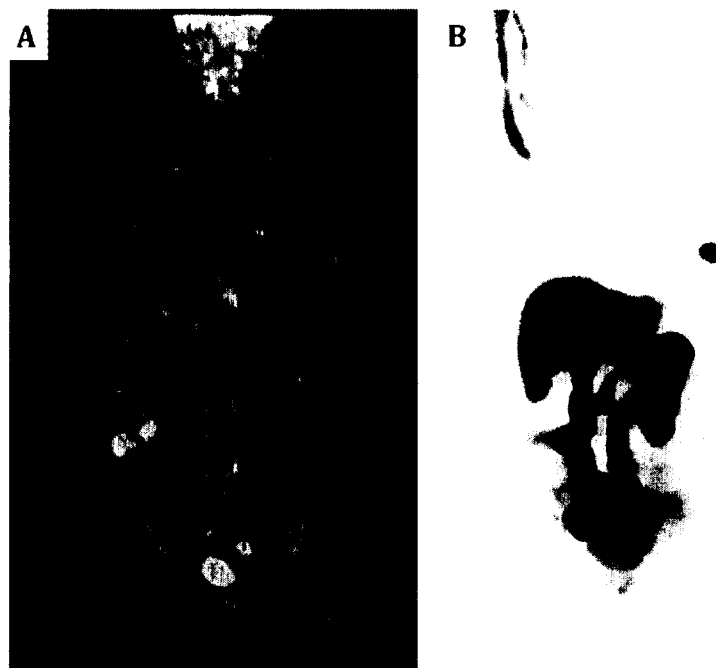


Figure 1.1 : Exemples d'images corps entier par imagerie anatomique (A, tomodensitométrie) et par imagerie moléculaire (B, TEP, ^{18}F -MFES) [gracieuseté de Michel Paquette, CIMS].

On distingue principalement deux techniques d'imagerie nucléaire : la tomographie d'émission par positrons (TEP) et la tomographie d'émission monophotonique (TEM) [Bonekamp et al., 2010; Rowland et al., 2008]. Toutes deux sont basées sur le suivi dans le corps du sujet d'une molécule d'intérêt biologique marquée d'un atome radioactif, le radiotracteur, et généralement injectée dans la circulation sanguine. Principalement utilisées dans les domaines de l'oncologie, la cardiologie et la neurologie, la TEP et la TEM sont devenues des outils de diagnostic et de suivi thérapeutique incontournables.

En recherche, la TEP et la TEM sur modèle animal permettent l'évaluation de nouveaux traitements et radiotraceurs avant leur transfert chez l'humain [Kagadis et al., 2010]. Les nouveaux traitements sont souvent évalués par leurs effets métaboliques sur une tumeur ou un organe avec des radiotraceurs connus. Ces derniers manquent cependant souvent de spécificité pour la maladie ciblée ce qui introduit des artéfacts sur l'image et diminue le rapport signal sur bruit. Afin d'améliorer la qualité et la fiabilité du diagnostic, de nouveaux radiotraceurs sont donc continuellement développés. Ces nouvelles molécules doivent être entièrement caractérisées sur modèle animal tant du point de vue de la toxicité et de l'efficacité que pour établir leur pharmacocinétique, c'est-à-dire leurs transformations biochimiques (métabolisation) dans le temps suivant l'injection. Pour cela, les concentrations plasmatiques et tissulaires en radiotracteur sont mesurées au cours du temps et introduites dans des modèles mathématiques. La concentration tissulaire est mesurée sur les images prises par la caméra alors que le suivi de la concentration plasmatique du radiotracteur requiert de nombreuses prises d'échantillons très rapprochées dans le temps, une mesure de leur concentration radioactive ainsi qu'une séparation de plasma et une analyse chimique des échantillons prélevés [Dupont et al., 2009; Serdons et al., 2009].

1.2 Problématique

Les rongeurs (rats, souris et cochons d'Inde) sont progressivement devenus les modèles animaux les plus utilisés en recherche biomédicale [Croft, 2002]. Ils ont l'avantage d'être des mammifères communs, d'avoir une croissance et une durée de vie courte et d'être souvent vus comme une nuisance. Plus particulièrement, la souris est le modèle de choix pour les manipulations génétiques, car son génome est entièrement séquencé et qu'il présente beaucoup de similitudes avec l'humain [Rowland et al., 2008]. Le rat quant à lui est très utilisé en

neurosciences [Chatziioannou, 2002] et forme un bon modèle pour les pathologies cardiaques [Depre, 1998]. Ces animaux ont cependant un haut métabolisme et un faible volume sanguin (~ 1,4 ml de volume sanguin total chez une souris) ce qui pose un véritable défi pour la prise d'échantillons à répétition et leur analyse. Ces manipulations impliquent également une exposition importante du personnel à la radioactivité et l'utilisation d'appareils encombrants et coûteux, principalement des microcentrifugeuses, radio-chromatographes en phase liquide haute performance (radio-HPLC, « high-performance liquid chromatography ») et compteurs de radioactivité de haute précision.

Toutes ces limitations rendent les analyses pharmacocinétiques très difficiles chez les petits animaux, particulièrement les souris. Ces dernières sont d'autant plus délicates à cause de la courte demi-vie de certains radiotraceurs qui requiert une mesure immédiate. Des solutions partielles ont été apportées dans la littérature [Laforest et al., 2005; Serdons et al., 2009] pour mesurer la radioactivité sanguine sur une région d'intérêt sur l'image ou avec une sonde implantée directement dans le vaisseau sanguin. Il est également possible, comme dans le cas du compteur sanguin microvolumétrique, le CS μ , développé à l'Université de Sherbrooke [Convert et al., 2007a], de mesurer la radioactivité sanguine dans un cathéter connecté à une artère de l'animal (figure 1.2).

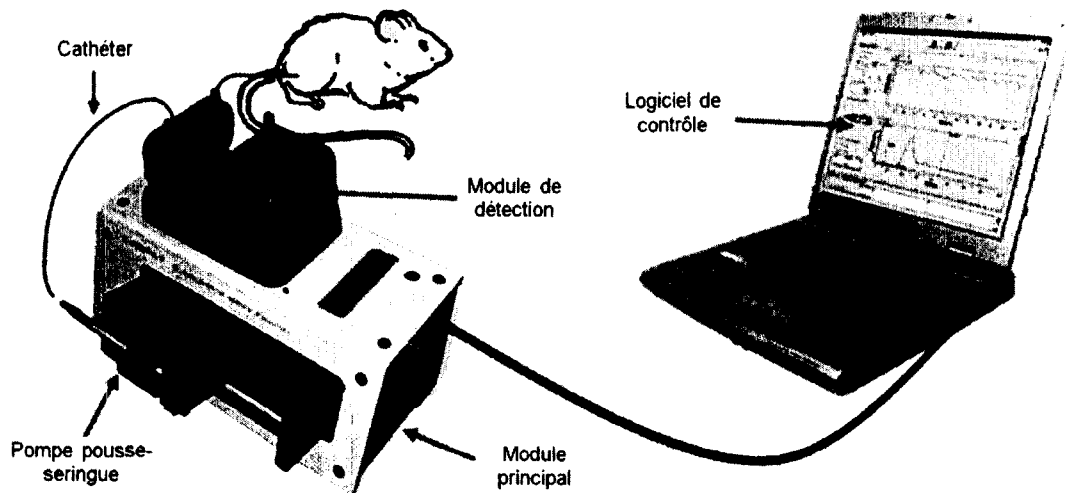


Figure 1.2 : Compteur sanguin externe développé à l'Université de Sherbrooke, le CS μ [Convert, 2006].

Ces solutions évaluent la radioactivité du sang total qui est très utile pour les radiotraceurs connus dont la pharmacocinétique est déjà établie. Elles ne mesurent cependant pas la

radioactivité de la fraction plasmatique et ne fournissent aucune possibilité d'analyse chimique. Elles ne sont donc pas adaptées à la caractérisation de nouveaux radiotraceurs où non seulement la radioactivité sanguine et plasmatique doit être déterminée, mais également la partition entre le radiotraceur natif et ses métabolites.

Des systèmes d'échantillonnage automatiques ont été développés pour permettre une analyse subséquente des échantillons [Wu et al., 2005], mais la mesure de radioactivité doit se faire en fin d'expérience, interdisant les études avec des radiotraceurs à très courte demi-vie (figure 1.3). De plus, l'analyse complète des radiotraceurs avec ce type de système requiert plusieurs manipulations *a posteriori* sur de très petits échantillons. Aucun système d'analyse sanguin intégré n'est disponible à ce jour.

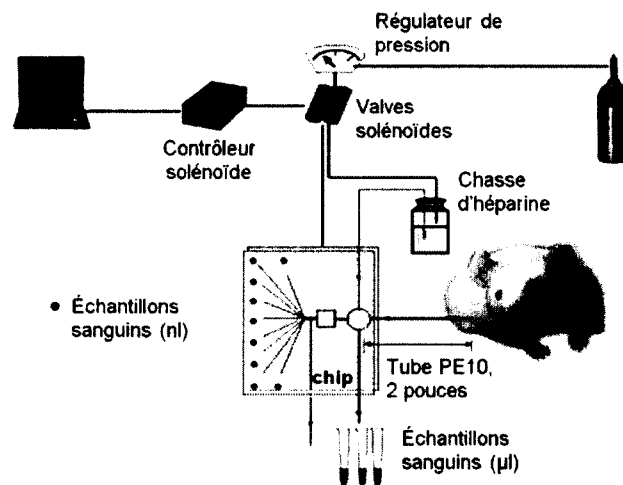


Figure 1.3 : Exemple de collecte automatique d'échantillons (adapté de [Wu et al., 2005]).

1.3 Hypothèse de recherche

La microfluidique est la science et la technologie de systèmes qui manipulent de petites quantités de liquide en utilisant des canaux ayant des dimensions de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres [Whitesides, 2006]. Ces canaux sont microfabriqués selon les mêmes principes que ceux développés pour la microélectronique. Ils peuvent d'ailleurs être couplés à de l'électronique pour former de véritables laboratoires sur puce. Par exemple, ils permettent de faire une analyse complète d'ADN sur puce incluant l'amplification par réaction en chaîne de la polymérase, la séparation par électrophorèse et la détection par fluorescence dans des canaux de 500 μm de large et 25 μm de haut (figure 1.4).

Les circuits microfluidiques offrent de nombreux avantages comme un faible coût, de faibles volumes, un temps de réaction court, et la possibilité d'effectuer automatiquement plusieurs opérations en cascade ou en parallèle [Kang et al., 2008; Whitesides, 2006]. Cette technologie apparaît donc comme une solution idéale pour résoudre les problèmes de l'analyse pharmacocinétique chez les petits animaux, c'est là l'hypothèse des présents travaux. Cependant, malgré un développement exponentiel depuis plus de dix ans, cette technologie n'en est qu'à l'adolescence [Whitesides, 2006]. Plusieurs fonctionnalités ont déjà été introduites, mais aucun vrai standard n'existe et les systèmes intégrés sont encore rares [Mark et al., 2010].

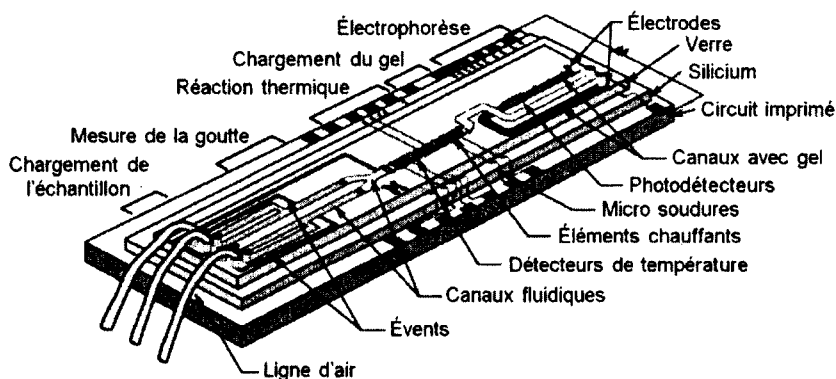


Figure 1.4 : Exemple de laboratoire sur puce pour l'analyse d'ADN [Burns et al., 1998].

1.4 Objectifs du projet de recherche

L'objectif global dans lequel s'insère ce projet de recherche est de fournir un nouvel outil pour faciliter la caractérisation des nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire chez le petit animal en utilisant une technologie de pointe encore en développement, la microfluidique. Directement relié à l'animal, un tel système permettra d'effectuer une analyse sanguine en temps réel parallèlement à une séquence d'imagerie par TEP ou TEM. Un ordinateur permettra de configurer l'acquisition, de visualiser celle-ci en temps réel ainsi que d'effectuer les corrections nécessaires sur les données acquises.

L'appareil permettra de faire une caractérisation complète intégrée des nouveaux radiotraceurs, limitant ainsi les interventions et l'exposition du personnel aux radiations tout en fournissant une mesure reproductible et en prélevant un minimum de sang à l'animal pour

conserver ses paramètres physiologiques. La puce comprendra plusieurs fonctions : le transport du sang dans des microcanaux, la mesure de radioactivité, la séparation de plasma et le micro échantillonnage. La séparation d'espèces chimiques ne sera ajoutée qu'à plus long terme. La puce microfluidique sera employée dans le cadre de projets de recherche biomédicale avec l'imagerie TEP et TEM au centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) pour faciliter le développement de nouveaux radiotraceurs et médicaments principalement pour l'oncologie et la cardiologie. À plus long terme, nous envisageons que cette technologie pourra être commercialisée et, en conséquence, les aspects pratiques de fabrication et d'exploitation dans un contexte de recherche biomédicale seront pris en considération dans l'élaboration du cahier des charges.

Le projet de recherche décrit dans le présent document représente le premier travail effectué sur la puce microfluidique qui vient d'être décrite. Il s'attache donc à définir le cadre général et à aborder les premières fonctionnalités. Plus spécifiquement, le présent projet de thèse vise à :

- Proposer une architecture pour l'analyse complète et établir un cahier des charges des différentes fonctions (excluant l'analyse chimique);
- Implanter la première fonction, soit : concevoir, fabriquer et tester des microcanaux compatibles avec les fonctions subséquentes et permettant de transporter du sang total;
- Implanter la seconde fonction, soit : concevoir, fabriquer et tester un détecteur de radioactivité;
- Intégrer les deux fonctions dans un compteur sanguin microfluidique permettant de mesurer la radioactivité du sang total en temps réel intégrant toute l'électronique et l'informatique de contrôle, le caractériser avec différentes solutions radioactives et le tester sur petit animal.

1.5 Plan du document et contributions à l'avancement

Afin de mieux définir l'analyse à effectuer par la puce microfluidique, les études pharmacocinétiques pour la TEP et la TEM seront tout d'abord décrites plus en détail. Un protocole standard sera ensuite donné et permettra d'établir une liste de contraintes à respecter (CHAPITRE 2).

Ces éléments serviront de base pour définir plus précisément les différentes fonctions à intégrer à la puce et permettront de discuter des volumes, débits et concentrations en entrée et en sortie, ainsi que des méthodes analytiques de référence pour évaluer leurs performances (CHAPITRE 3).

Un état de l'art pour les deux premières fonctions et leur intégration permettra ensuite de dégager les déficiences dans la littérature et les pistes de solutions les plus adaptées au présent projet de recherche (CHAPITRE 4).

Un protocole de fabrication de détecteur de radioactivité exploitant les ressources disponibles au centre de recherche en nanofabrication et nanocaractérisation (CRN2) de l'Université de Sherbrooke sera ensuite décrit. Un prototype sera fabriqué et testé (CHAPITRE 5).

Des microcanaux seront ensuite intégrés sur un détecteur de radioactivité non encapsulé. Le prototype sera caractérisé aux niveaux électrique et fonctionnel avec des solutions radioactives. Le protocole de fabrication préliminaire et les résultats du détecteur de radioactivité microfluidique ont été publiés dans la revue *Nuclear Instrumentation and Methods in Physic Research A* (CHAPITRE 6). Cet article donne la première démonstration d'un détecteur microfluidique haute efficacité pour la mesure de radioactivité sanguine en TEP et TEM. Il démontre également l'utilisation de la KMPR pour la fabrication de canaux microfluidiques, un matériau robuste, d'utilisation simple et compatible avec l'industrie. Ce matériau était déjà utilisé en microfabrication, mais aucune référence n'avait été faite dans la littérature sur son utilisation en microfluidique.

Avant d'effectuer des expériences animales, la biocompatibilité des microcanaux sera évaluée et rehaussée. Pour cela, un outil de caractérisation basé sur un système de mesure par Résonance par Plasmons de Surface disponible au laboratoire de Biophotonique et Optoélectronique de l'Université de Sherbrooke sera adapté. L'optimisation de cet outil pour caractériser la surface de la KMPR ainsi que les premiers résultats de passivation de ce matériau ont été acceptés pour publication dans la revue *Sensors and Actuators B: Chemical* (CHAPITRE 7).

Le détecteur de radioactivité microfluidique sera ensuite optimisé pour mieux répondre aux besoins du projet, traité pour rehausser sa biocompatibilité et intégré dans un système

complet incluant la puce microfluidique, l'électronique de traitement et un logiciel de contrôle. Le protocole de fabrication ainsi qu'une caractérisation préliminaire de la puce microfluidique et une première expérience animale ont été acceptés pour publication dans la revue *Lab on a Chip* (CHAPITRE 8). Cet article donne les détails du procédé de fabrication optimisé des canaux en KMPR pouvant être utile à d'autres applications. L'article démontre également les avantages du procédé pour la détection des radiations par rapport aux méthodes macroscopiques ainsi que l'amélioration obtenue par rapport au premier prototype.

Un dernier chapitre discutera des différents résultats obtenus, des difficultés rencontrées et des perspectives du projet (CHAPITRE 9). Enfin, une conclusion fera la synthèse de ce travail (CHAPITRE 10).

CHAPITRE 2 ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE

2.1 Introduction

Au chapitre précédent, les défis de la caractérisation des nouveaux radiotraceurs TEP et TEM chez le petit animal et l'absence de solution intégrée pour relever ces défis dans la littérature ont été soulignés. Une puce microfluidique d'analyse sanguine a été retenue comme une solution technologique permettant de combler cette lacune. Avant de pouvoir établir les divers éléments de conception de la puce, il est nécessaire de définir les exigences de la caractérisation de nouveaux radiotraceurs plus en détail. Pour cela, le présent chapitre donne en premier lieu les principes généraux de la TEP et de la TEM. La modélisation pharmacocinétique est ensuite décrite en prenant l'exemple du radiotracer TEP le plus courant, le ^{18}F -Fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG). Un protocole d'analyse pharmacocinétique standard sur petit animal est donné. Enfin, un récapitulatif des contraintes inhérentes à ce type de mesure conclut ce chapitre.

2.2 Principe de la TEP et de la TEM

La TEP et la TEM sont des modalités d'imagerie moléculaire basées sur la détection de radiotraceurs injectés dans le système circulatoire du patient [Cherry et al., 2003]. Dans le cas de la TEP, les radiotraceurs sont marqués avec des atomes radioactifs émetteurs de positrons, isotopes d'atomes communs, comme le ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O ou ^{64}Cu . Ils ont l'avantage d'être facilement incorporables dans les molécules biologiques et d'avoir une courte demi-vie (2 min à 13 h, temps pendant lequel la moitié des noyaux radioactifs d'un échantillon se sont désintégrés), mais nécessitent un cyclotron pour leur production (sur place ou géographiquement proche étant donné la courte demi-vie des radiotraceurs). Les positrons émis (énergies maximales entre 0,6 et 1,7 MeV) perdent rapidement leur énergie cinétique dans les tissus, sur quelques millimètres, puis s'annihilent avec un électron du milieu pour former deux photons d'annihilation de 511 keV émis simultanément (à 180° l'un de l'autre). La caméra TEP, généralement formée d'un anneau de détecteurs, utilise la coïncidence de deux interactions opposées pour situer spatialement l'évènement et reconstruire une image tridimensionnelle (figure 2.1A). La TEP est principalement utilisée en oncologie pour la

détection et le suivi thérapeutique [Bonekamp et al., 2010; Cherry et al., 2003]. En cardiologie, elle permet d'évaluer la viabilité du myocarde, de caractériser la fonction cardiaque, de mesurer les effets d'un infarctus ou de la transplantation de cellules cardiaques. En neurologie, elle est utilisée principalement pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

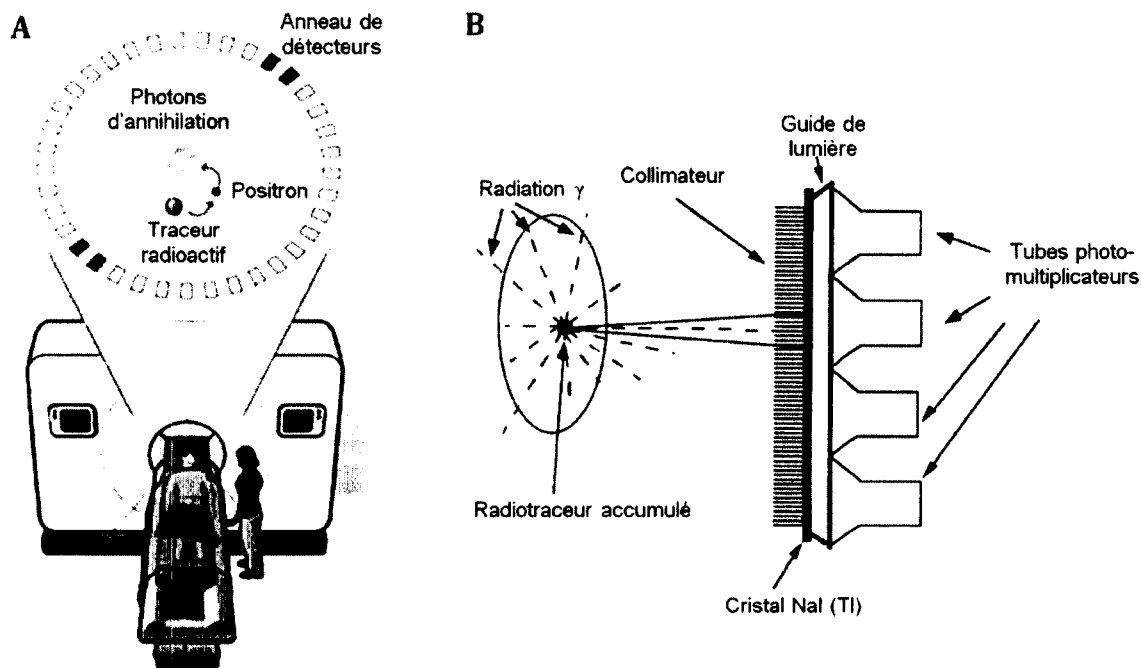


Figure 2.1 : A. Principe de la détection en coïncidence dans une caméra TEP (adapté de <http://www.bioteach.ubc.ca/Biomedicine/LookingInsideTheBody/>) B. Principe de la détection avec collimateur dans une caméra TEM (adapté de [Singh et al., 2000]).

Les isotopes TEM sont principalement des radioéléments ayant une demi-vie de quelques heures à quelques jours comme le ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I et ^{201}Tl . Le ^{99m}Tc , l'isotope le plus utilisé en TEM, est élué à partir d'un générateur et ne requiert donc pas d'installation lourde comme un cyclotron pour sa production. La TEM est donc souvent vue comme plus accessible que la TEP. Les isotopes TEM émettent directement des rayons gamma d'énergie entre 60 et 250 keV. Ces derniers sont détectés par une ou deux têtes de détection rotatives, voire un anneau complet de détecteurs pour améliorer la sensibilité et accélérer l'acquisition des images. Cependant, sans la possibilité de faire une détection en coïncidence, la TEM doit utiliser des collimateurs pour localiser spatialement les événements, ce qui réduit sa résolution et sa sensibilité (figure 2.1B). Elle permet par contre d'imager simultanément deux radiotraceurs émettant des rayons gamma d'énergies différentes, ce qui est impossible en TEP.

Les champs d'application de la TEM sont globalement les mêmes que la TEP (cardiologie, neurologie et oncologie). La TEM est cependant plus accessible et moins coûteuse, donc beaucoup plus répandue que la TEP. Cette dernière offre par contre une sensibilité et une résolution nettement accrues pour les applications cliniques. Une autre différence réside dans la chimie de marquage des molécules, qui peut être plus avantageuse pour un isotope TEP ou TEM suivant le cas. Enfin, l'étude de processus rapides se prête très bien aux isotopes TEP de courte demi-vie alors que l'étude de processus plus lents est facilitée avec les isotopes TEM de plus longue demi-vie.

La TEP et la TEM sont utilisées en clinique, mais également en recherche pour le développement de nouveaux traitements ou de nouveaux radiotraceurs. La recherche sur les petits animaux nécessite cependant des appareils d'imagerie dédiés de meilleure résolution spatiale que leurs pendants cliniques [Chatziioannou, 2002; Meikle et al., 2005]. Un cœur de souris par exemple à un diamètre d'environ 8 mm alors que la résolution des appareils TEP cliniques actuels est de l'ordre de 5 mm [Rowland et al., 2008]. Il serait alors impossible de distinguer les différentes parties du cœur d'une souris avec un appareil clinique.

2.3 Modélisation pharmacocinétique

La grande variété d'applications de la TEP et de la TEM implique un grand nombre de radiotraceurs différents. Chaque radiotraceur est une molécule biologique distincte permettant d'aller cibler une maladie particulière. Par exemple, le ^{18}F -FDG, de loin le radiotraceur TEP le plus courant en clinique, est un analogue du glucose très utilisé en oncologie. Les tumeurs étant des cellules en stade de prolifération intense, elles consomment beaucoup de glucose et sont donc des sites privilégiés d'accumulation de ce radiotraceur.

Le glucose est également très utilisé pour étudier la viabilité des cellules cardiaques. En effet, une cellule cardiaque saine consomme du glucose pour assurer sa fonction de contraction alors qu'une cellule morte n'en consomme plus. Les études au ^{18}F -FDG permettent donc de visualiser l'étendue des lésions suite à un infarctus. Pour pouvoir quantifier les dommages, une étude pharmacocinétique est nécessaire. Pour cela, les transformations biochimiques du ^{18}F -FDG dans l'organisme du patient sont représentées par

un modèle pharmacocinétique à trois compartiments et quatre constantes d'échange [Phelps et al., 1979] (figure 2.2).

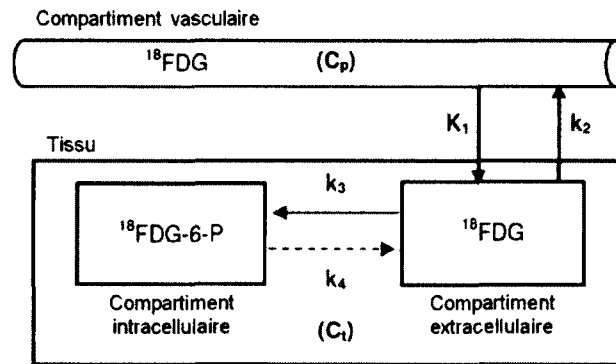


Figure 2.2 : Modélisation compartimentale du ^{18}F -FDG.

Le ^{18}F -FDG pénètre dans la cellule à l'aide des mêmes transporteurs que le glucose et subit la première étape de la glycolyse, soit la phosphorylation. Cependant, contrairement au glucose-6-phosphate, le ^{18}F FDG-6-phosphate ne subit aucune action subséquente et est piégé dans la cellule. Son accumulation caractérise l'état des cellules myocardiques puisqu'elle constitue un reflet fidèle du taux métabolique d'entrée de glucose dans le myocarde, $MMRGl u$ (« myocardial metabolic rate of glucose »), suivant l'équation [Patlak et al., 1983]

$$MMRGl u = K \times \frac{g}{LC} \text{ avec } K = \frac{K_1 \times k_3}{k_2 + k_3} \text{ obtenu par } C_t(t) = K \times \int_0^t C_p(s) ds + FC_p(t), \quad (2.1)$$

où K_1 , k_2 , k_3 et k_4 sont les constantes d'échanges entre les différents compartiments, $C_p(t)$ représente la concentration plasmatique en ^{18}F -FDG, $C_t(t)$ la concentration tissulaire, F est reliée à la fraction du volume sanguin dans le tissu, g est la glycémie et LC est un facteur de normalisation représentant la sélection du ^{18}F -FDG par rapport à son analogue, le glucose, pour l'entrée et la sortie dans les cellules ainsi que pour la participation au cycle métabolique (généralement unitaire). Pour calculer $MMRGl u$, il est donc nécessaire de mesurer $C_p(t)$ et $C_t(t)$. Ces fonctions sont appelées courbes temps-activité (TAC, « time activity curve ») et $C_p(t)$ est également nommée fonction d'entrée. La concentration tissulaire est obtenue en traçant une région d'intérêt sur les images TEP alors que la fonction d'entrée nécessite le plus souvent une analyse sanguine externe.

Plus précisément, $C_p(t)$ représente la concentration sanguine de radiotracer libre de pénétrer dans les tissus. Donc, tout radiotracer piégé dans les cellules sanguines est à exclure de la mesure, d'où le terme de concentration plasmatique. La différence de concentration plasmatique vs sang total peut être assez importante et doit être corrigée (figure 2.3).

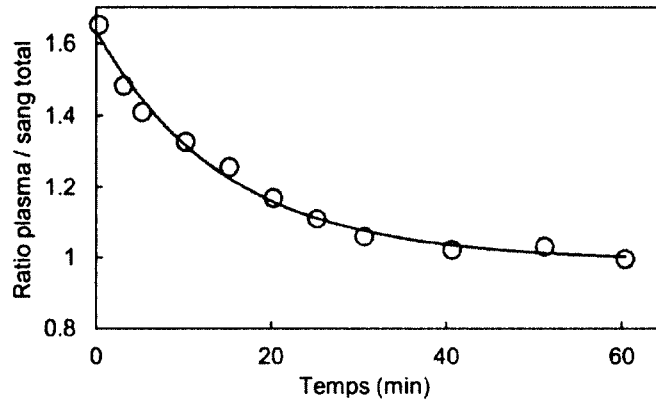


Figure 2.3 : Ratio en fonction du temps de l'activité du plasma par rapport au sang total pour le ^{18}F -FDG chez le rat. Injection à $t = 0$ (adapté de [Ashworth et al., 1996]).

De plus, certains radiotraceurs peuvent être métabolisés par les tissus puis réinjectés dans la circulation sous une forme radioactive différente de la forme d'origine. Comme ils ne peuvent plus participer aux voies métaboliques du radiotracer d'origine, ces métabolites radioactifs sont donc également à exclure de la fonction d'entrée. Comme pour le ratio plasma/sang total, la proportion de métabolites plasmatiques varie en fonction du temps après injection (tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Fraction de radioactivité ^{13}N présente sous la forme native de $^{13}\text{N-NH}_3$ dans le sang de rat suite à une injection en bolus à $t = 0$ (adapté de [Croteau et al., 2004]).

Temps (s)	Fraction de $^{13}\text{N-NH}_3$
30	$0,86 \pm 0,01$
60	$0,67 \pm 0,02$
120	$0,35 \pm 0,01$
180	$0,17 \pm 0,01$
300	$0,10 \pm 0,01$

Pour les radiotraceurs courants, les ratios plasma/sang total et radiotraceur/métabolites ont déjà été établis. Une simple mesure sur sang total peut donc être corrigée et fournir une fonction d'entrée précise aux modèles pharmacocinétiques. Pour les nouveaux radiotraceurs, ces proportions sont à déterminer ce qui nécessite une analyse sanguine complète.

2.4 Protocole standard

Pour une étude pharmacocinétique standard telle que pratiquée en routine au CIMS, l'animal est anesthésié puis canulé dans une veine pour l'injection et dans une artère pour le prélèvement sanguin. De la saline contenant 50 unités d'héparine par millilitre est injectée dans les canules avant leur insertion dans l'animal. En plus d'éviter l'injection d'air à l'animal, le passage de cette solution ralentit la coagulation dans la canule.

Comme aucun dispositif intégré n'est encore disponible, deux types d'expériences distinctes sont pratiqués : (1) des prélèvements manuels pour une analyse chimique sur de nouveaux radiotraceurs, (2) un prélèvement automatique et une mesure de radioactivité sur le sang total par le CS μ (figure 1.2) pour des radiotraceurs connus. Dans le cas d'une étude avec le CS μ , la canule artérielle est prévue assez longue (50 à 60 cm) pour pouvoir être insérée dans le compteur et atteindre la pompe pousse-seringue servant au prélèvement. Dans le cas d'une étude avec prélèvements manuels, la canule est reliée à une valve maintenue en position fermée jusqu'au moment de chaque prélèvement.

L'animal est ensuite installé sur le lit de la caméra (figure 2.4) et, pour les études avec le CS μ , la canule artérielle est insérée dans le compteur. Des sondes permettant de surveiller la température de l'animal, son rythme cardiaque et sa respiration sont installées. La température de l'animal est maintenue soit par un système de résistances chauffantes intégrées dans le lit de la caméra, soit par un système à air chaud. L'animal est également maintenu sous anesthésie gazeuse en plaçant sa tête dans un cône présent au bout du lit et alimenté en Isoflurane. De plus, certaines expériences nécessitent un système d'évacuation du CO₂ radioactif expiré par l'animal.

Le lit de l'animal est ensuite avancé dans la caméra pour placer l'organe d'intérêt dans le champ de vue. Pour les études avec le CS μ , la pompe tirant le sang via le compteur est mise en marche. Une fois le débit établi, l'acquisition est démarrée à la fois sur la caméra et sur le

compteur. Le radiotracer est injecté 30 s après le début de l'acquisition. La quantité injectée varie en fonction du type d'animal, du radiotracer et du protocole utilisé. En général, elle est de 10 à 50 MBq en TEP (Bq = Becquerel = nombre d'émissions radioactives par seconde). En raison de la plus faible sensibilité des caméras TEM, les quantités injectées peuvent être plus importantes qu'en TEP, jusqu'à 150 MBq. De telles doses ne sont cependant pas anodines pour l'animal et les protocoles récents visent à limiter les doses injectées en TEM aux mêmes valeurs qu'en TEP. Les concentrations typiques en TEP seront donc prises comme modèle. L'image de l'animal et la radioactivité sanguine sont généralement enregistrées pendant 10 à 30 min, voire plus suivant le protocole.

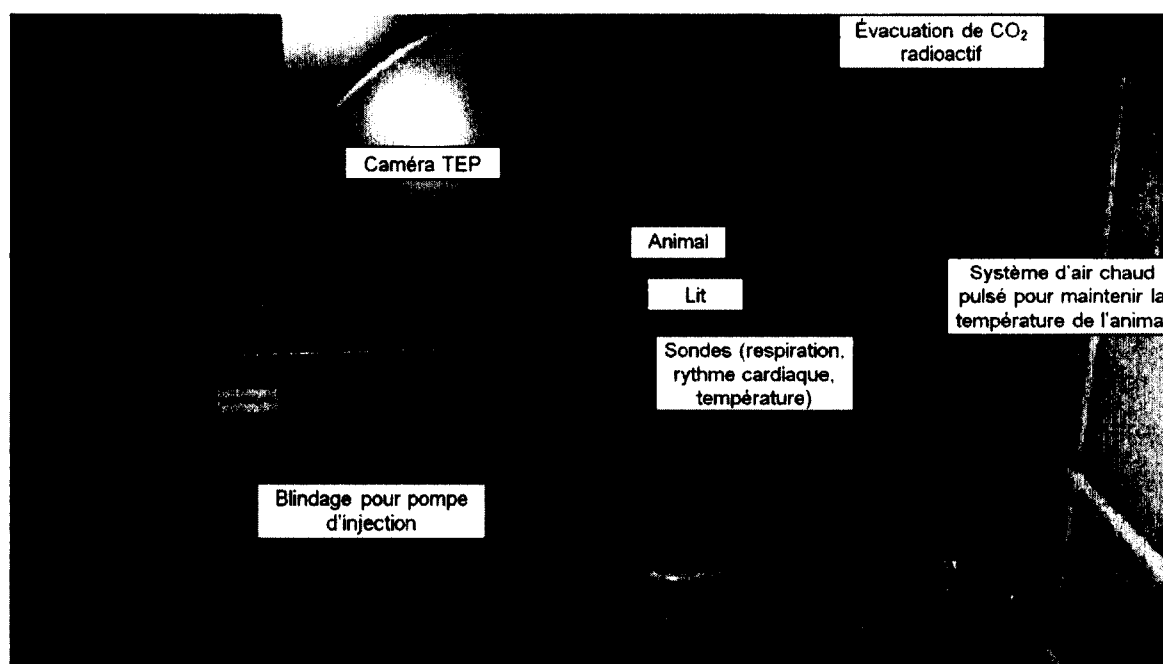


Figure 2.4 : Photo d'une des caméras TEP précliniques en service au CIMS, le LabPET™ 4. Une souris est installée sur le lit et prête à être injectée.

Lors des études avec prélèvements manuels, la valve est ouverte pour chaque prélèvement afin de laisser couler quelques gouttes dans un microtube Eppendorf. Ces derniers sont ensuite placés dans une centrifugeuse pour séparer le plasma du sang total. La fraction plasmatique de chaque échantillon est prélevée et placée dans d'autres tubes qui sont insérés dans un compteur à haute sensibilité. Cette mesure permet d'établir une courbe de radioactivité plasmatique en fonction du temps. Les échantillons sont ensuite passés un à un dans un radio-HPLC ayant deux types de détecteurs en sortie de la colonne de séparation : un détecteur à UV

qui perçoit chaque fraction séparée et un détecteur de radioactivité qui distingue les fractions qui sont radioactives. La proportion de métabolites en fonction du temps peut ainsi être calculée et utilisée pour corriger la fonction d'entrée.

La forme idéale de la fonction d'entrée de l'animal est illustrée à la figure 2.5A. Pendant l'injection, la concentration de radioactivité dans le sang augmente rapidement pour atteindre un maximum. Le radiotracer passe ensuite dans les tissus, faisant redescendre la concentration sanguine. Enfin, il s'établit un échange entre le sang et les tissus, stabilisant la concentration sanguine en radiotracer. La fonction d'entrée est donc composée d'un pic puis d'un plateau.

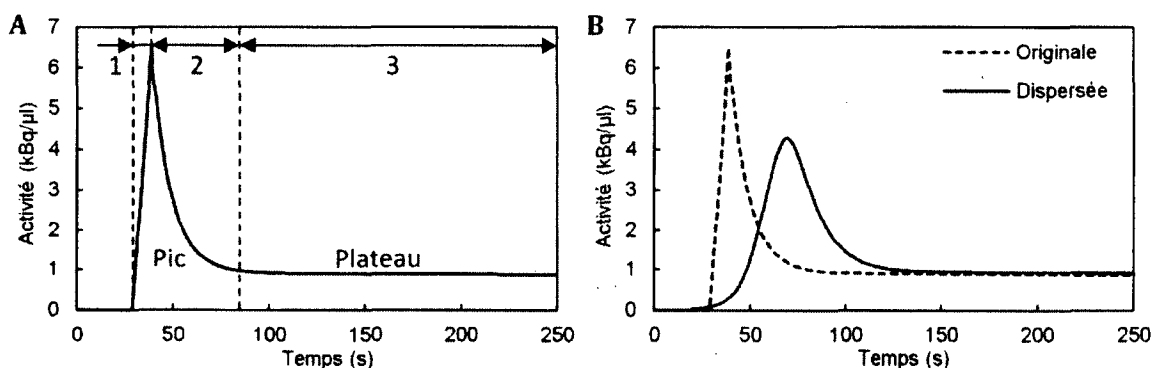


Figure 2.5 : Fonction d'entrée typique. A. Forme idéale avec les trois régimes (1 : injection, 2 : captation par les tissus, 3 : équilibre des échanges). B. Forme dispersée telle que mesurée par un compteur sanguin en ligne.

La mesure par un compteur sanguin en ligne tel que le CS μ diffère cependant de la courbe théorique. En effet, le pic subit un certain étalement appelé dispersion (figure 2.5B) dû à (1) la diffusion moléculaire du radiotracer pendant son acheminement au compteur et (2) au volume de détection du compteur. Cet étalement doit être corrigé avant d'utiliser la fonction d'entrée dans un modèle pharmacocinétique [Munk et al., 2008]. Cette correction peut se faire par un traitement mathématique après acquisition. Il est également possible de minimiser la dispersion en tirant du sang plus rapidement dans les premières minutes.

2.5 Contraintes sur les mesures

Le protocole standard qui vient d'être décrit implique un certain nombre de contraintes pour l'analyse sanguine en termes de volumes sanguins disponibles, concentrations radioactives minimales et maximales, résolution temporelle du signal à mesurer et débits typiques.

2.5.1 *Volumes disponibles*

Le volume sanguin d'un rat est de 64 ml/kg soit 16 ml pour un animal de taille moyenne (250 g) [Diehl et al., 2001]. Les rats peuvent cependant atteindre un poids allant jusqu'à 500 g soit 32 ml de sang. Ce volume est de 72 ml/kg pour une souris, soit 1,4 ml pour un animal de taille moyenne (20 g). Sachant qu'un prélèvement maximum de 10 % du volume sanguin par expérimentation est recommandé pour une période de récupération de deux semaines, le volume sanguin total disponible pour les prélèvements n'est alors que de 1,6 ml pour un rat et 140 μ l pour une souris de taille moyenne. Afin de conserver l'homéostasie (conditions physiologiques) des animaux pendant toute la durée de l'expérience, ces valeurs doivent être considérées comme des maximums.

2.5.2 *Concentrations radioactives*

Dans le cas d'une injection de 10 MBq, les concentrations pic sont de 0,6 kBq/ μ l pour un rat (250 g, 16 ml de sang) et 7,1 kBq/ μ l pour une souris (20 g, 1,4 ml de sang). Le plateau peut être considéré comme cinq à dix fois moins concentré que le pic de la fonction d'entrée soit 60 Bq/ μ l pour un rat et 710 Bq/ μ l pour une souris dans le cas le plus exigeant. La concentration sanguine d'un rat en fin d'expérience représente donc la concentration minimale à détecter par le système. Comme il est possible d'imager des rats pesant jusqu'à 500 g, et que les isotopes de courte demi-vie (^{11}C , ^{13}N) peuvent perdre la moitié de leur radioactivité dans le temps d'une expérience, une concentration minimale de 15 Bq/ μ l est retenue pour les spécifications.

Dans le cas d'une injection de 50 MBq, les concentrations maximales sont de 3,1 kBq/ μ l pour un rat et 35,7 kBq/ μ l pour une souris. Même s'il est rare d'injecter une dose aussi importante à une souris, une concentration maximale de 36 kBq/ μ l est retenue pour les spécifications du système.

2.5.3 Résolution temporelle

La résolution temporelle est particulièrement importante dans la portion du pic de radioactivité suivant immédiatement l'injection. La dispersion rend le pic de radioactivité plus ou moins étalé dans le temps. Lorsqu'elle est minimale, la montée s'étale sur seulement quelques secondes (~ 5 s) pour des injections rapides alors que la descente dure quelques dizaines de secondes (~ 20 s). Pour une dispersion standard, les fronts sont chacun d'une durée de 20 s à 1 min pour les radiotraceurs à captation courte. Pour les radiotraceurs à captation lente, le front descendant peut être beaucoup plus long (plusieurs dizaines de minutes).

2.5.4 Débits typiques

Le débit avec lequel le sang est prélevé à l'animal dépend du volume sanguin total disponible, de la durée de l'expérience et de la résolution temporelle recherchée. Pour une expérience à débit constant de 30 min, le débit maximum chez une souris de 20 g sera alors de 5 μ l/min. Pour un rat de 250 g, il sera de 53 μ l/min. Pour une expérience de 10 min, les débits peuvent monter jusqu'à 14 μ l/min pour une souris et 160 μ l/min pour un rat. Dans les expériences qui requièrent une dispersion minimale du pic, il est possible d'avoir une plus grande vitesse de prélèvement en début d'expérience. Il est alors d'usage courant de diviser le volume sanguin disponible par deux et de prélever la première moitié dans les trois premières minutes et la seconde moitié dans le temps restant de l'expérience. Pour une expérience de 30 min, le débit est alors de 23 μ l/min puis 2,6 μ l/min pour une souris et 267 μ l/min puis 30 μ l/min pour un rat. Cependant, il faut s'assurer de maintenir un débit minimum en bas duquel le sang risque de coaguler même dans les cathéters en polyéthylènes utilisés pour canuler l'animal. Une valeur raisonnable d'après les expérimentations menées couramment au CIMS est de 5 μ l/min. Le débit en début d'expérience doit alors être ajusté en conséquence. Les expériences de plus de 30 min sont tout à fait envisageables chez le rat, mais difficiles chez la souris à moins d'augmenter le pourcentage de sang prélevé au cours de l'expérience.

2.5.5 Environnement de mesure

Avec le blindage et les divers appareils de surveillance et de contrôle des paramètres physiologiques de l'animale, l'espace à proximité de la caméra est très encombré (figure 2.4). De plus, tous ces appareils, ainsi que la caméra TEP elle-même, émettent de la pollution électromagnétique pouvant perturber l'usage d'un dispositif ultra-sensible tel qu'un compteur de radioactivité sanguine. Enfin, la seringue contenant le radiotracer à injecter puis l'animal lui-même sont deux sources d'émissions radioactives qui peuvent également influencer la mesure faite sur le sang.

2.6 Conclusion

Après un exposé de principes généraux de l'imagerie TEP et TEM, la modélisation pharmacocinétique a été décrite. Il a notamment été souligné que la mesure à effectuer sur le sang pour utiliser ces modèles est la concentration plasmatique en radiotraceurs sous leur forme chimique initiale. Les cellules sanguines et les métabolites sont donc à exclure de cette mesure. Il a également été souligné que les proportions plasma/sang total et radiotraceurs/métabolites étaient connues pour les radiotraceurs courants, mais qu'elles devaient être caractérisées pour les radiotraceurs en développement. Ce sont donc ces éléments que la puce microfluidique devra mesurer. La description d'un protocole d'étude pharmacocinétique standard au CIMS a ensuite permis d'établir les différentes contraintes entourant cette mesure. Ces contraintes sont résumées au tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Contraintes générales pour l'analyse pharmacocinétique chez le petit animal.

Caractéristique	Contrainte
Liquide à analyser	Sang total prélevé en continu
Durée de l'expérience	10 à 30 min en général, potentiellement plus
Volume maximal disponible	En moyenne 1,6 ml pour un rat et 140 µl pour une souris
Débits typiques	Variable de 5 à 270 µl/min
Concentration sanguine minimale	15 Bq/µl
Concentration sanguine maximale	36 kBq/µl
Taux de variation du signal	Front montant de 5 s à 1 min Front descendant de 20 s à 1 min (radiotraceurs rapides) Plateau de 9 à 29 min
Environnement de mesure	Surchargé (peu d'espace), émissions électromagnétiques et radioactives

CHAPITRE 3 CAHIER DES CHARGES

3.1 Introduction

Au chapitre précédent, les différents éléments à mesurer lors d'une étude pharmacocinétique ainsi que les contraintes entourant une telle étude chez les petits animaux ont été détaillés. Dans le présent chapitre, ces différents éléments servent de base pour répondre au premier objectif du présent projet de recherche, qui est d'établir un cahier des charges pour la puce microfluidique. Les spécifications sont d'abord abordées pour le système de mesure dans son ensemble. Avant d'aboutir à un dispositif intégré, chaque fonction est cependant développée indépendamment. Dans la suite de ce chapitre, chacune des fonctions est donc détaillée séparément, soit le microcanal, la détection de radioactivité, la séparation de plasma et le micro échantillonnage. Plus précisément, les tâches à remplir, les spécifications quantitatives ou qualitatives à rencontrer et leur compatibilité avec les outils de validation disponibles sont discutées. De plus, tel que mentionné en introduction, la séparation d'espèces chimiques ne sera ajoutée au projet qu'à plus long terme. Elle n'est donc pas abordée dans ce chapitre. En conclusion, un tableau récapitulatif des différentes spécifications résume le cahier des charges du projet global.

3.2 Système

L'objectif général de ce projet étant de fournir un outil pour faciliter le développement de nouveaux radiotraceurs, ce système doit être simple à utiliser et permettre un usage transparent et ergonomique. Il devra donc intégrer une puce microfluidique d'analyse, un système de pompage du sang ainsi que toute l'électronique et l'informatique de contrôle. Pour remplir sa fonction, la puce devra comprendre (figure 3.1) :

- des microcanaux permettant la circulation du sang de l'animal dans la puce (F1);
- une mesure en temps réel de la radioactivité du sang total de l'animal (F2) pour établir le rapport de radioactivité plasma/sang total
- une séparation plasma/cellules sanguines afin d'effectuer les analyses subséquentes sur le plasma et non sur le sang total (F3);

- une mesure en temps réel de la radioactivité plasmatique de l'animal comme fonction d'entrée des modèles pharmacocinétiques (F4);
- une séparation d'échantillons plasmatiques à des temps programmables pour une analyse radiochimique subséquente (F5).

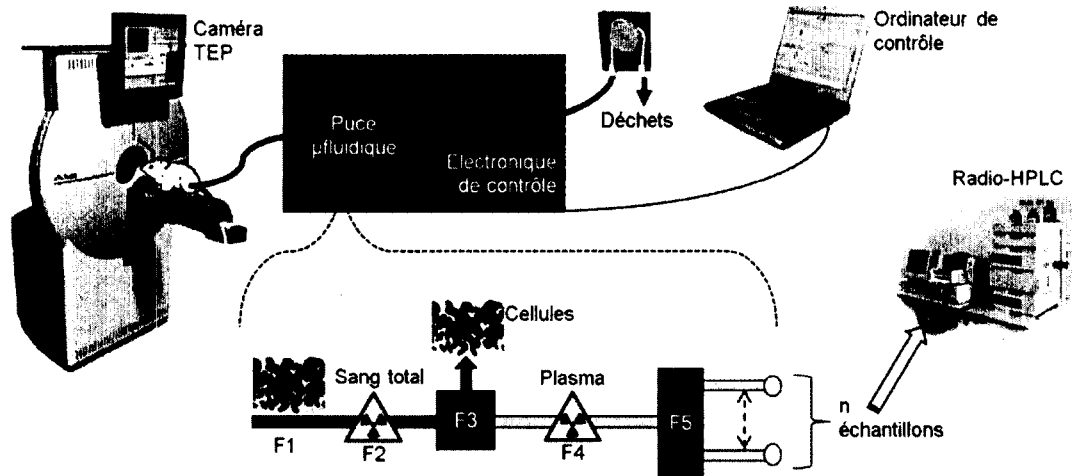


Figure 3.1 : Schéma du système d'analyse et des différentes fonctions à remplir par la puce microfluidique ; non à l'échelle.

Les contraintes du système imposées par l'application pour laquelle il est conçu ont été résumées au tableau 2.2. D'après ce tableau, le système devra en premier lieu permettre une utilisation avec du sang total prélevé à faible vitesse pendant au moins 30 min sans engendrer de coagulation. Pour cela, tous les matériaux transportant du sang doivent être hémocompatibles. Il faut de plus limiter les jonctions. Les cathéters utilisés pour canuler l'animal serviront donc idéalement à relier directement la puce microfluidique à l'animal. De plus, il faut concevoir les jonctions pour limiter le plus possible les turbulences. En effet, toute zone de turbulence laisse des portions de sang stagnant et sans présence d'un anticoagulant, tout sang stagnant finit par coaguler.

Afin de minimiser le volume prélevé et de limiter la dispersion, le volume mort entre l'animal et la puce microfluidique devra être maintenu au minimum. Les animaux sont généralement canulés avec des tubes en polyéthylène, du PE10 (Intramedic PE10, Becton Dickinson) pour les souris et du PE50 (Intramedic PE50, Becton Dickinson) pour les rats. Ces tubes ont un diamètre interne de 0,28 et 0,58 mm respectivement, ce qui donne un volume de 0,6 et 2,6 $\mu\text{l}/\text{cm}$. Un volume mort de 5 % du volume total disponible pour prélèvement

autorise donc une distance entre l'animal et la puce microfluidique de 12 cm pour une souris et 31 cm pour un rat de taille moyenne.

Pour limiter le volume mort, l'appareil, ou du moins la portion contenant la puce microfluidique, devra être disposée près de l'animal, sur le lit lui-même ou juste à l'entrée de l'anneau de la caméra. Ses dimensions devront être choisies en conséquence. À titre indicatif, les lits des caméras TEP et TEM précliniques sont généralement de forme allongée et ont 3 à 4 cm de large pour une souris et 5 à 7 cm pour un rat avec une longueur d'environ 30 cm (une souris occupe environ 8 cm sur le lit et un rat environ 20 cm).

À court terme, il n'est pas prévu de microfabriquer la pompe reliée au circuit fluidique principal, le système devra par contre contrôler une pompe externe adaptée aux débits en jeu. De plus, l'environnement étant surchargé, le système devra être le plus compact possible, incluant l'électronique de contrôle et la pompe. Il devra aussi être protégé de l'environnement électromagnétique présent autour des caméras. Pour cela, une attention particulière devra être portée à la conception des cartes électroniques et du boîtier pour limiter les boucles de masse et former une bonne cage de Faraday. Le système devra également blinder la partie détectrice de radioactivité vis-à-vis de l'extérieur pour ne pas détecter la radioactivité présente dans l'animal ou la seringue d'injection. Une source de 50 MBq placée à quelques centimètres de la puce ne devra donc pas produire de signal significatif. L'électronique, le boîtier et le logiciel de contrôle du CS μ [Convert et al., 2007a, 2007b] serviront de base pour le développement du système de contrôle de la puce microfluidique. Il serait cependant souhaitable de changer la pompe pousse seringue par une pompe moins encombrante, de modifier la connexion RS232 par une connexion USB plus moderne et d'adapter l'électronique pour une acquisition sur plusieurs canaux en parallèle.

Destinée à être utilisée chez le petit animal et non chez l'humain, et ne nécessitant pas de retourner le sang prélevé à l'animal, la puce microfluidique n'a pas besoin d'être stérile et jetable. Elle pourra être nettoyée entre deux expérimentations. Par contre, comme elle est en contact avec du sang, il est probable qu'elle constituera une pièce de rechange dont la fréquence de remplacement dépendra des caractéristiques finales du dispositif.

Il n'est pas prévu de contrôler et mesurer les températures dans la puce microfluidique. Une réfrigération pourrait être nécessaire pour le stockage à moyen terme des échantillons sanguins avant analyse. Cependant, les expériences animales sont de durée généralement inférieure à une heure. De plus, la présence d'isotopes à relativement courte demi-vie dans les échantillons impose une analyse immédiate. La réfrigération n'est donc pas jugée indispensable. Les diverses technologies utilisées pour chaque fonction pourraient augmenter localement la température de l'échantillon. La dénaturation des échantillons sera évaluée par analyse externe. Si elle dépasse 1 %, le dispositif sera modifié pour générer moins de chaleur. Une fois cette preuve faite, la température ne sera plus prise en considération.

Enfin, la puce microfluidique comportant différentes fonctions, chacune de ces fonctions devra être compatible avec la précédente et la suivante aussi bien du point de vue de la technologie utilisée pour la fabrication que des volumes et débits en entrée et sortie. D'un point de vue de l'agencement des fonctions, la mesure de radioactivité se fera à plusieurs endroits sur la puce. De plus, pour limiter la portion de canal devant transporter du sang total et simplifier la séparation d'échantillons, cette dernière sera idéalement placée après la séparation de plasma.

3.3 Microcanaux

3.3.1 Tâches

Les microcanaux ont pour but de transporter le sang, ou une de ses fractions, d'une fonction à l'autre dans la puce microfluidique, ce qui représente en soi un défi majeur puisque le sang est un fluide très visqueux et difficile à contrôler dans les microsystèmes [Sollier et al., 2009]. Cette fonction comporte donc une entrée et une sortie microfluidique avec un système pour faire l'interface avec le monde macroscopique en entrée et en sortie (figure 3.2).

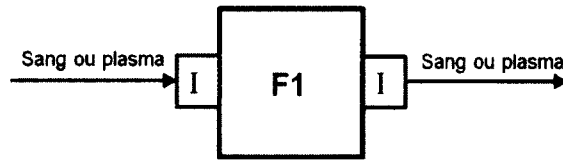


Figure 3.2 : Schéma de la fonction de transport de fluides par les microcanaux.

3.3.2 *Spécifications*

Les canaux doivent répondre aux mêmes exigences de biocompatibilité que le système global, soit de manière intrinsèque ou suite à un traitement de surface. Pour cela, il est donc souhaitable d'avoir un même matériau sur toutes les surfaces du canal.

De plus, les canaux doivent être radiotransparents, c'est-à-dire transparents à la radioactivité, ou du moins ne pas atténuer le signal de manière significative. Il est également souhaitable qu'ils soient transparents optiquement, au moins sur une face, pour permettre à la fois une visualisation à des fins de validation en phase de prototypage et une détection de micro caillots en utilisation normale.

Ils doivent en outre être capables de supporter la pression engendrée par le passage du sang jusqu'à $270 \mu\text{l}/\text{min}$. Ce débit engendrera des vitesses différentes de fluide dans les microcanaux suivant leur section (voir ANNEXE A.2 pour les bases de mécanique des fluides et de calculs de pression dans un microcanal). La pression dans un microcanal étant dépendante de cette vitesse, il est difficile de donner une valeur maximum à atteindre. Pour un usage avec du sang, il faudra de plus veiller à limiter les vitesses d'écoulement dans les microcanaux (vitesse de cisaillement inférieure à 1000 s^{-1}). En effet, le sang étant un liquide non newtonien, sa viscosité augmente avec la vitesse à laquelle il passe dans un conduit.

Enfin, pour faciliter la fabrication des canaux au CRN2, elle devra faire appel à des techniques les plus standards possibles.

3.3.3 *Validation*

La validation des microcanaux se fait par des mesures de tenue en pression ainsi que par des tests de biocompatibilité. Comme elle sera détaillée dans les prochains chapitres, cette validation ne sera pas abordée ici.

3.4 Détection de la radioactivité

3.4.1 Tâche

Cette fonction a pour objectif de mesurer la concentration radioactive d'un fluide en temps réel. Elle comporte une entrée et une sortie fluide ainsi qu'une entrée et une sortie électrique (figure 3.3). Du point de vue fluide, la sortie est identique à l'entrée et le liquide à mesurer est du sang total ou du plasma. Le dispositif sera préalablement caractérisé avec de l'eau ou de la solution saline.

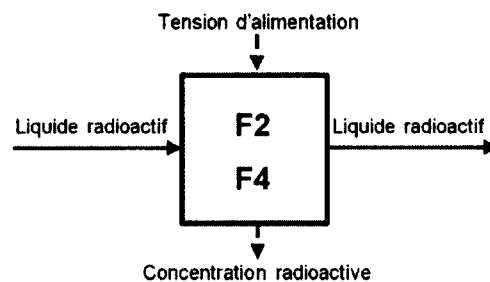


Figure 3.3 : Schéma de la fonction de détection de radiation.

3.4.2 Spécifications

Pour reproduire fidèlement la forme du pic de la fonction d'entrée dans le cas le plus demandant (sans dispersion), il est souhaitable d'avoir une mesure de radioactivité chaque seconde. La sortie électrique devra donc correspondre à un nombre de désintégrations radioactives intégré sur 1 s, soit des comptes par secondes (cps). Le nombre d'évènements enregistrés doit être proportionnel à la concentration de radioactivité présente dans le volume de fluide vis-à-vis du détecteur. Le détecteur doit de plus être compatible avec les concentrations minimales et maximales dans le fluide à mesurer. Pour le sang total, la fourchette est de 15 Bq/ μ l à 36 kBq/ μ l (tableau 2.2). Pour le plasma, le ratio par rapport au sang total varie d'un radiotracer à l'autre. Pour le ^{18}F -FDG il est de 1,6 en début d'expérience et diminue progressivement pour atteindre l'unité en fin d'expérience (figure 2.3). La concentration plasmatique est donc moins restrictive que la mesure sur sang total du point de vue de la sensibilité requise.

L'efficacité d'un détecteur est exprimée en pourcentage des radiations émises qui sont enregistrées par le détecteur. Pour une mesure statistiquement significative ($\pm 5\%$), l'efficacité K (cps/Bq) est reliée à la concentration minimale à détecter A_{min} (Bq/ μ l) par la formule [Knoll, 2000]

$$A_{min} = \frac{(4,653 \times \sqrt{n} + 2,706)}{K \times V}, \quad (3.1)$$

où n (cps) est le taux de comptage issu du bruit de fond (bruit électronique et/ou radiations venant de l'extérieur) et V (μ l) est le volume de détection. En supposant un bruit de fond de 5 cps (réglage typique permettant de s'assurer du bon fonctionnement du compteur et d'optimiser l'efficacité de détection), et une activité minimale de détection de 15 Bq/ μ l (concentration sanguine minimale), l'efficacité de détection est donc reliée au volume de détection par

$$K \times V = 0,87. \quad (3.2)$$

En dessous de 1 μ l de volume de détection, l'efficacité requise augmente très rapidement (figure 3.4).

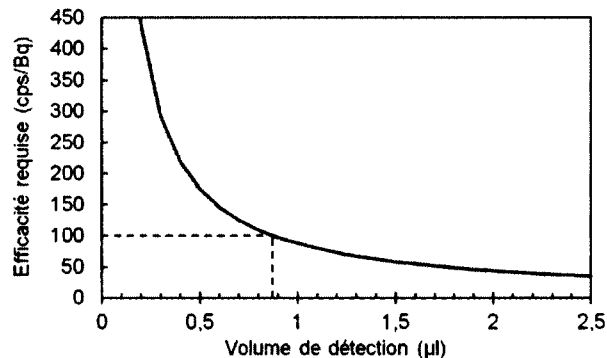


Figure 3.4 : Efficacité de détection requise en fonction du volume de détection pour une activité minimale détectable de 15 Bq/ μ l et un taux de comptage de bruit de fond de 5 cps.

Le volume minimum de détection pour cette concentration est donc de 870 nl ($K = 100\%$) et doit monter à 4,4 μ l pour 20% d'efficacité. Pour un volume de détection de 1 μ l, l'efficacité requise est de 87%. Afin de pouvoir diminuer le volume de détection, il est donc primordial de maximiser l'efficacité du détecteur.

La concentration maximale à détecter nous permet d'établir une plage dans laquelle la réponse du détecteur doit être linéaire et autant que possible exempte de temps mort (durée pendant laquelle le système traite un évènement et ne peut en enregistrer un autre, causant des pertes d'évènements dues à des interactions trop rapprochées dans le temps). Dans le cas contraire, les corrections adéquates devront être appliquées.

3.4.3 Validation

La validation de la fonction de détection se fait par caractérisation électrique, mesure d'efficacité, et de linéarité. Comme elle sera détaillée dans les prochains chapitres, cette validation ne sera pas abordée ici.

3.5 Séparation de plasma

3.5.1 Tâche

Cette fonction a pour objectif de séparer le plasma des cellules sanguines afin d'éliminer un contaminant dans la mesure de la fonction d'entrée. Elle comporte une entrée et deux sorties fluidiques avec éventuellement une entrée électrique pour le contrôle (figure 3.5).

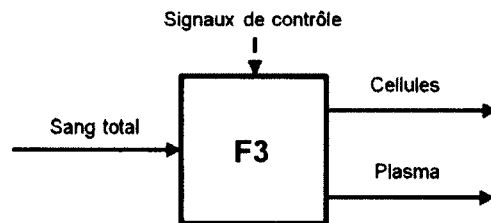


Figure 3.5 : Schéma de la fonction de séparation de plasma.

Avant de détailler les spécificités de cette fonction, il est nécessaire de faire un bref rappel concernant la composition du sang.

3.5.2 Composition du sang

Le sang est un tissu composé de trois types de cellules et d'une substance interstitielle, le plasma [Charrin, 1991]. Ce dernier est un liquide limpide, jaune clair, contenant des sels minéraux et des substances organiques (protéines, glucose, lipides et déchets azotés) et

représente environ 60 % du volume sanguin total. Il contient principalement trois types de protéines. L'albumine représente environ 60 % des protéines plasmatiques, soit 35 à 50 g/l chez l'homme. Elle permet de maintenir la pression osmotique et agit comme transporteur de certaines hormones et de certains acides gras. Les immunoglobulines représentent 18 % des protéines sanguines et font partie du système immunitaire. Enfin, le fibrinogène représente 4 % des protéines sanguines et est un élément clef dans le processus de coagulation.

Les cellules sanguines les plus abondantes sont les érythrocytes, ou globules rouges. Il s'agit de cellules anucléées chargées de transporter les gaz du sang. Elles sont hautement déformables et peuvent s'agréger, ce qui fait du sang un liquide non newtonien. Les leucocytes, ou globules blancs sont des cellules nucléées chargées des défenses de l'organisme. Les plaquettes sont anucléées et sont à la base du processus de coagulation. Les concentrations et tailles de chaque élément du sang sont résumées au tableau 3.1 (moyennes chez l'humain). Les concentrations des différents éléments du sang peuvent varier d'un individu à l'autre. L'hématocrite est défini comme le volume occupé par les érythrocytes par rapport au volume sanguin total. Il varie de 38 à 54 % et est en général d'environ 45 %.

Avec sa grande concentration en cellules, la viscosité de sang est assez élevée. Elle varie de 2 à 60 mPa.s suivant l'hématocrite (10 à 50 %, cisaillement $> 1000 \text{ s}^{-1}$) et de 4 à 100 mPa.s suivant la vitesse de cisaillement (1000 à $0,01 \text{ s}^{-1}$) [Skalak et al., 1989]. Une moyenne raisonnable est de 3,5 mPa.s [Pirofsky, 1953] soit 3,5 fois plus que l'eau.

Tableau 3.1 : Composition du sang (ϕ = nombre de cellules) [Charrin, 1991].

	Aspect et dimension	Concentration
Plasma	Liquide	$46 \pm 4 \text{ ml/kg}$
<i>Sels minéraux</i>		$7 \text{ à } 10 \text{ g/l}$
<i>Substances organiques</i>	$0,8 \text{ à } 4 \text{ nm}$	$76 \text{ à } 88 \text{ g/l}$
Érythrocytes ou globules rouges	Disque biconcave de $7 \mu\text{m}$ de diamètre et de $2 \mu\text{m}$ d'épaisseur Volume : 80 à 100 fl	$27,5 \pm 3 \text{ ml/kg}$ $4 \text{ à } 5,5 \cdot 10^{12} \phi/l$
Leucocytes ou globules blancs	Forme arrondie $7 \text{ à } 30 \mu\text{m}$ de diamètre	$4 \text{ à } 10 \cdot 10^9 \phi/l$
Plaquettes	Forme lenticulaire de $2 \text{ à } 3 \mu\text{m}$ de diamètre et $1 \mu\text{m}$ d'épaisseur	$200 \text{ à } 400 \cdot 10^9 \phi/l$

3.5.3 *Spécifications*

Pour les modèles mathématiques utilisés en pharmacocinétique, seules les molécules libres dans le plasma et capables de pénétrer dans les tissus doivent être prises en compte. Cela exclut celles qui sont présentes dans les cellules sanguines ou liées à des protéines sanguines. La qualité du plasma nécessaire pour une bonne mesure dépend donc du radiotracteur. Par exemple, les érythrocytes et leucocytes possèdent des transporteurs pour le glucose et donc le ^{18}F -FDG. Par contre, les plaquettes n'en ont pas. D'un point de vue qualitatif, pour une étude au ^{18}F -FDG, les plaquettes peuvent donc être tolérées dans le plasma. Il en est de même pour de nombreux radiotraceurs. De plus, les érythrocytes étant présents dans le sang total à une concentration mille fois plus élevée que les leucocytes, il apparaît raisonnable de concentrer les efforts de séparation de ce projet sur les érythrocytes. Même limitée aux érythrocytes, une séparation de plasma reste un défi majeur puisque ces derniers représentent presque la moitié du volume sanguin, soit environ $5 \cdot 10^6 \text{ } \mu\text{l}$. Une autre difficulté est de réduire la concentration d'érythrocytes à la sortie plasma sans toutefois perdre ou altérer la concentration du plasma en radiotracteur.

Il est à noter que le sang humain contient de 38 à 48 g/l d'albumine qui peut se lier au radiotracteur et l'empêcher de pénétrer dans les tissus. Il serait donc intéressant de pouvoir l'éliminer avant les mesures. Pour un premier prototype, il apparaît cependant difficile de viser une séparation de l'albumine.

Toujours d'un point de vue qualitatif, lors de la séparation du plasma, il est important de conserver un bon environnement pour ne pas contaminer les analyses subséquentes. En effet, d'une part, un stress excessif sur les érythrocytes risque de les lyser et d'en libérer le contenu, d'autre part, l'activation des leucocytes altère l'expression de gènes et de protéines [Sollier et al., 2009]. Il est également primordial d'éviter l'activation des plaquettes sous peine d'entraîner la coagulation et l'obturation du dispositif.

Dans la même optique, diluer le sang ne donne pas des échantillons très représentatifs, voire même inutilisables cliniquement [Lenshof et al., 2009]. De plus, une dilution risque de faire descendre la concentration de marqueur en dessous de la limite de détection du système, surtout si les volumes disponibles sont faibles.

D'un point de vue quantitatif, la contamination du plasma, C^* (%), peut s'exprimer comme le rapport de la concentration en érythrocytes du plasma purifié, C_{Sp} (ϕ/l), et de celle du sang total en entrée du dispositif, C_E (ϕ/l), soit

$$C^* = \frac{C_{Sp}}{C_E}. \quad (3.3)$$

La méthode de référence pour séparer le plasma du sang total est la centrifugation. Elle permet d'obtenir une contamination mesurée par certains auteurs à environ 1 % [Sollier et al., 2009]. Si l'on se réfère à la qualité de plasma conseillée pour une transfusion par le Conseil Européen, la concentration plasmatique en érythrocytes est de $6,0 \cdot 10^9 \phi/l$ [*Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*, 2007; Lenshof et al., 2009], soit une contamination d'environ 0,1 %. Pour une première preuve de concept, un objectif de 1 % de contamination est cependant plus réaliste.

Le volume maximum de plasma disponible est de 60 % du volume sanguin prélevé soit 84 μl pour une souris et 960 μl pour un rat de poids moyen. On peut définir l'efficacité de séparation comme le pourcentage de volume de plasma séparé par rapport au volume maximum disponible. Pour un volume de sortie de 45 μl (nécessaire pour la prise d'échantillons, voir section 3.6.2), l'efficacité de séparation devra donc être d'environ 50 % pour une souris.

3.5.4 Validation

La validation de la séparation de plasma peut se faire de plusieurs manières. Une première approche nécessite une observation au microscope de la zone de séparation avec un comptage de cellules. Pour permettre une quantification aux vitesses de passage des éléments dans des microcanaux, il est souhaitable d'utiliser un microscope à épi fluorescence. De plus, pour éviter l'utilisation d'échantillons sanguins à répétition en phase de développement, des billes de verre, de silice ou de polymère marquées avec un fluorophore et de la taille des cellules sanguines peuvent être utilisées. Pour mieux reproduire la déformabilité des cellules vivantes, il est également possible d'utiliser du pollen à la place des billes. Ce type de validation nécessite une compatibilité des canaux avec les éléments choisis : les billes ou pollen utilisés ne doivent pas adhérer aux parois, le canal doit avoir une face transparente dans le visible et le

matériau constituant les canaux ne doit pas autofluorescer dans la bande de longueurs d'onde d'émission du fluorophore choisi. De plus, la quantification nécessite un logiciel comptant les particules dans chaque partie de l'échantillon. Un microscope à épi fluorescence est disponible au CNR2 (Olympus IX70). Il s'agit par contre d'un microscope inversé, l'accès fluide des échantillons doit donc se trouver sur la face arrière du dispositif. De plus, la distance focale des objectifs étant limitée à quelques centaines de micromètres, la face transparente devra avoir une épaisseur réduite.

Pour les tests avec du sang total, la concentration de cellules est telle qu'il n'est pas possible d'utiliser ce type de validation. Un compteur de cellules est alors requis. Un appareil de type Coulter (Coulter Counter ZM, Coulter Electronic Inc) est disponible au CIMS. Le volume minimum des échantillons est de 500 μ l. Ce type d'appareil a cependant très peu de bruit de fond. Le comptage de plusieurs millilitres de solution saline ne donne que quelques événements. Il sera alors possible de diluer un échantillon beaucoup plus petit. Ce type de validation n'apporte donc pas de contrainte supplémentaire.

Enfin, une validation sur modèle animal avec une mesure de la radioactivité du sang total et du plasma avec un radiotracer connu, comme le ^{18}F -FDG, devrait permettre de retrouver les courbes de rapport plasma/sang total publiées dans la littérature.

3.6 Micro échantillonnage

3.6.1 Tâche

Cette fonction a pour objectif de séparer des microéchantillons de plasma afin de permettre une analyse chimique à différents temps après injection. Elle comporte une entrée, une dizaine de sorties fluidiques correspondant aux échantillons et une sortie pour le volume de plasma non utilisé, avec éventuellement les signaux de contrôles associés (figure 3.6).

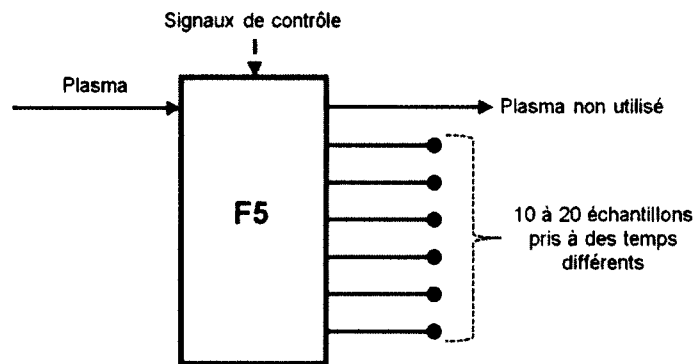


Figure 3.6 : Schéma de la fonction de micro échantillonnage.

3.6.2 *Spécifications*

Étant donné les volumes et les concentrations en jeu, une prise d'échantillon chaque seconde n'est pas envisageable. Pour une représentation plus approximative de la fonction d'entrée, au moins trois points sont nécessaires par front ainsi que trois points dans le plateau, soit un minimum de neuf échantillons au total. Il est cependant souhaitable de pouvoir prélever jusqu'à 20 échantillons pour une meilleure résolution ou des expériences avec des radiotraceurs à cinétique lente. La fréquence de prise de mesure dans le pic est de l'ordre de 5 s (dispersion standard) et elle monte à 5 min dans le plateau. Afin de s'adapter aux différents protocoles, la prise d'échantillons doit être programmable.

Le volume nécessaire pour chaque échantillon dépend de l'analyse subséquente, soit la séparation d'espèces chimiques. Cette analyse est faite par radio-HPLC. L'échantillon est injecté dans une colonne remplie d'une résine qui retient plus ou moins les molécules en fonction de leurs propriétés (taille, charge, polarité...). Les colonnes ont une taille typique de 1 à 10 mm de diamètre interne pour 15 à 250 mm de long. Les volumes d'échantillons sont de 5 à 30 μl avec un volume mort d'environ 1 μl . Il est donc raisonnable d'envisager de travailler avec des échantillons de 5 μl , ce qui pour neuf échantillons donne un volume prélevé total de 45 μl . Il faut cependant être conscient que si le volume total prélevé n'excède pas cette valeur, les échantillons pris dans la portion du plateau représenteront une mesure moyennée sur toute la durée depuis le dernier échantillon (environ 5 min). Si des échantillons plus petits s'avèrent nécessaires (pour un plus grand nombre d'échantillons par exemple), il faudra alors avoir recourt à un système micro-HPLC. Plus spécialisé, ce type d'appareil peut travailler avec des

échantillons de 50 nl à 0,5 μ l. Ils ne sont cependant pas disponibles dans tous les centres et n'ont pas la précision des appareils travaillant à plus grands volumes.

Dans un premier temps, la puce de micro échantillonnage pourra être utilisée de manière indépendante sur du sang total. Le volume de chaque échantillon doit alors prendre en compte le volume nécessaire pour effectuer la séparation de plasma sur une centrifugeuse. Des appareils de type centrifugeuse capillaire (par exemple StatSpin CritSpin de la compagnie Iris International Inc.) permettent de traiter des échantillons de 10 μ l contenus dans des capillaires. Le volume sanguin minimum de chaque échantillon doit donc être de 10 μ l dans ce cas.

Le débit dans la branche principale est assuré par la pompe externe, le débit pour acheminer chaque échantillon au réservoir devra être intégré à cette fonction pour minimiser le nombre de pompes requises et l'encombrement global du système.

Les réservoirs doivent permettre le stockage des échantillons jusqu'à la fin de l'expérience sans coagulation, ce qui ne pose pas de problème avec le plasma, mais sera à considérer pour le sang total. De plus, la surface de chaque réservoir exposée à l'air doit être maintenue au minimale pour limiter les phénomènes d'évaporation.

3.6.3 Validation

La fonction de séparation d'échantillons peut être évaluée avec deux méthodes. En phase de développement, une simple pesée permettra de valider que les échantillons ont bien le volume requis. Un échantillon de 5 μ l de sang pèse environ 5,3 mg. Les balances de précision telles que celles disponibles au CIMS et au CRN2 ont typiquement une résolution de 0,1 mg et sont donc compatibles avec ce type d'échantillons.

Pour évaluer la fréquence d'échantillonnage, des solutions fluorescentes ou radioactives pourront être utilisées. La concentration en entrée du système sera variée entre chaque prise d'échantillon. L'intensité fluorescente des échantillons pourra ensuite être validée par un spectrofluoromètre. Pour la radioactivité, l'appareil de validation est un compteur gamma à haute sensibilité. Ce moyen de validation n'ajoute donc pas de contrainte au système puisque si la taille des échantillons ou leur concentration diminue trop, il est toujours possible d'augmenter le temps de la mesure.

Enfin, une expérience animale avec prise d'échantillons de sang ou de plasma devrait permettre de retrouver des fractions radiotraceurs/métabolites connues.

3.7 Conclusion

Pour remplir sa fonction, le système global ainsi que chacune des fonctions doit donc répondre aux spécifications résumées aux tableaux 3.2 et 3.3.

Tableau 3.2 : Spécifications du système global.

Fonction	Contrainte	Spécification qualitative ou quantitative
Système	Utilisation avec du sang total à faible vitesse pendant 30 min	Matériaux hémocompatibles Nombre de jonctions réduites, la canule (PE10/PE50) est utilisée pour relier l'animal à la puce Jonctions sans turbulences
	Volume disponible : 140 µl (souris)	Volume mort minimum 5 % du volume total (7 µl) = 12 cm de PE10
	Environnement de mesure surchargé	Système embarqué Blindage électromagnétique Blindage contre les radiations : source de 50 MBq à quelques cm → signal négligeable Encombrement minimum
	Débits de 5 à 270 µl/min	Pompe externe contrôlée par le système
	Réutilisation	Nombre limité d'expérimentations
	Isotopes à courte demi-vie	Analyse rapide des échantillons Pas de contrôle de température nécessaire
	Utilisateurs non spécialistes	Appareil ergonomique

Tableau 3.3 : Spécifications de chacune des fonctions microfluidiques. Les facteurs les plus limitatifs ont été pris en compte et correspondent soit aux rats soit aux souris suivant le cas.

Fonction	Contrainte	Spécification qualitative ou quantitative
Microcanaux	Matériaux du microcanal	Hémocompatible, radiotransparent, transparent Même matériau sur toutes les surfaces
	Pression maximale Techniques de micro fabrication	Sang total à 270 µl/min Standards
Détection	Fréquence de mesure	Intégration sur 1 s
	Sensibilité	15 Bq/µl
	Linéarité	Jusqu'à 36 kBq/µl
Séparation plasma	Éléments qualitatifs	Éviter la lyse des cellules et l'activation des plaquettes/leucocytes Pas de dilution
	Cible principale	Érythrocytes, 7 µm × 2 µm, 5.10 ⁶ φ/µl initial
	Contamination	1 % soit 5.10 ⁴ φ/µl à la sortie de plasma purifié
	Efficacité de séparation	~50 % du volume disponible récupéré
Micro échantillonnage	Fréquence d'échantillonnage	5 s à 5 min, programmable
	Nombre minimum d'échantillons	9
	Volume par échantillon	5 µl
	Volume total nécessaire	45 µl
	Débit des échantillons	Assuré par la fonction
	Réservoirs	Accessibles de l'extérieur Limitent l'évaporation

CHAPITRE 4 ÉTAT DE L'ART ET CHOIX TECHNOLOGIQUES

4.1 Introduction

Au chapitre précédent, les différentes fonctions microfluidiques à remplir par la puce ont été définies menant à une liste d'objectifs qualitatifs ou quantitatifs à atteindre. Le présent chapitre établit un état de l'art pour les deux fonctions qui ont été développées lors de ce projet de recherche (F1 et F2). Après l'établissement de quelques hypothèses initiales, les principes généraux de fabrication de canaux microfluidiques et de détection de radioactivité sont exposés. Une revue est ensuite faite des différentes solutions apportées dans la littérature pour coupler la microfluidique à un détecteur de radiation. Les différentes possibilités identifiées et les limitations des solutions existantes sont alors mises dans le contexte du présent projet pour dégager des choix technologiques.

4.2 Hypothèses initiales

Le cahier des charges établi au chapitre précédent stipule que les canaux doivent être faits d'un même matériau hémocompatible, radiotransparent et transparent sur toutes ses surfaces, qu'il doit supporter des pressions assez fortes (sang à 270 $\mu\text{l}/\text{min}$) et être fabriqué avec des techniques standard dans l'industrie de la microfabrication (tableau 3.3). Pour la détection, le système doit permettre une mesure en temps réel (cps), être linéaire pour les bas taux de comptages (jusqu'à 36 $\text{kBq}/\mu\text{l}$) et de haute efficacité (15 $\text{Bq}/\mu\text{l}$, soit 87 % pour 1 μl de volume de détection).

L'efficacité de détection dépend de plusieurs facteurs. On définit principalement trois types d'efficacité, l'efficacité intrinsèque, ou efficacité quantique, l'efficacité géométrique et l'efficacité absolue. L'efficacité intrinsèque, ε_{im} , est le rapport entre le nombre d'évènements enregistrés et le nombre de quanta incidents sur le détecteur. Elle dépend du matériau et de l'épaisseur du détecteur ainsi que du type de rayonnement incident et de son énergie.

L'efficacité géométrique prend en considération l'angle solide Ω sous lequel le détecteur voit la source. Les radiations sont en effet émises sur 4π stéradians et plus le détecteur est loin de la source, moins le pourcentage de radiations l'atteignant est grand (figure 4.1).

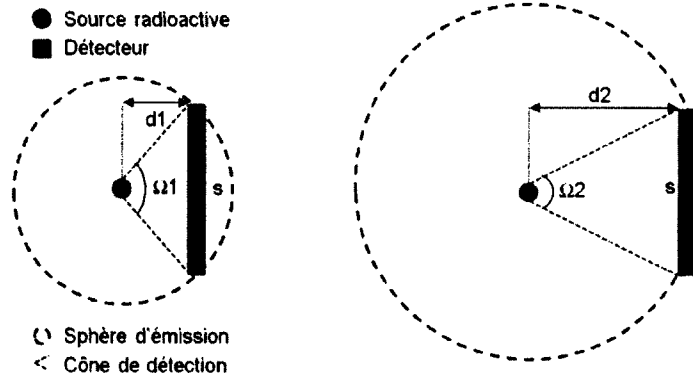


Figure 4.1: Effet de la distance sur l'angle solide de détection. Pour un même détecteur (section s identique), si la distance d augmente, l'angle solide Ω diminue.

Pour une source ponctuelle et un détecteur cylindrique, l'angle solide varie en A/d^2 , A étant l'aire de détection et d la distance source – détecteur [Knoll, 2000]. Une estimation approximative en deux dimensions de cet angle solide, Ω (radian), peut être obtenue par un simple calcul trigonométrique selon

$$\Omega = 2 \times \tan^{-1} \left(\frac{s}{2 \times d} \right), \quad (4.1)$$

où s est la section linéaire du détecteur et d est la distance entre le détecteur et la source ponctuelle. L'efficacité géométrique de détection ε_{geo} correspond à $\Omega/2\pi$.

L'efficacité absolue, ε_{abs} , est le rapport entre le nombre d'évènements enregistrés par le détecteur et les quanta de radiations émises par la source. Elle dépend donc de ε_{int} et de ε_{geo} , mais également de toute absorption sur le trajet entre la source et le détecteur. Soit t le pourcentage de radiations du cône de détection traversant toute interface entre la source et le détecteur, ε_{abs} s'exprime alors

$$\varepsilon_{abs} = \varepsilon_{int} \times \varepsilon_{geo} \times t. \quad (4.2)$$

Pour maximiser l'efficacité de détection, il faudra donc choisir un détecteur efficace et s'assurer à la fois de minimiser les pertes d'énergie avant d'atteindre le détecteur et de maximiser l'angle solide de détection par rapport à la source.

La distance source/détecteur devra donc être minimisée. Les pertes d'énergie entre la source et le détecteur dépendent du type de rayonnement détecté. Dans le cadre de ce projet, les radiotraceurs TEP émettent des positrons puis des photons d'annihilation et les radiotraceurs TEM émettent des rayons gamma et des électrons de conversions (ANNEXE B.2). La détection des gammas ou photons d'annihilation requiert un détecteur de quelques centimètres d'épaisseur (ANNEXE B.4) et n'est donc pas envisageable dans le cadre d'une détection intégrée à une puce microfluidique. La détection des particules chargées (positron ou électron de conversion) est donc retenue. L'absorption est cependant un problème pour les particules chargées qui perdent leur énergie tout au long de leur trajectoire et sont complètement arrêtées en quelques millimètres (ANNEXE B.3). L'épaisseur de l'interface entre la source et le détecteur est d'autant plus critique pour les positrons. En effet, ses derniers sont émis avec un spectre polyénergétique (ANNEXE B.2), ils peuvent donc avoir une énergie entre 0 et $E_{\beta_{\max}}$ (énergie maximale caractéristique de chaque isotope). Les particules de plus faible énergie peuvent donc être arrêtées par seulement quelques dizaines de micromètres et ne jamais atteindre le détecteur. L'épaisseur et la densité de l'interface entre la source et le détecteur sont donc particulièrement à minimiser dans le cadre de ce projet.

4.3 Fabrication de canaux microfluidiques

Les techniques de fabrication de microcanaux peuvent être réparties en deux grandes classes suivant les matériaux qui forment le canal, soit un matériau dur (silicium ou verre), soit un polymère. Elles sont basées sur les techniques de fabrication standards décrites en ANNEXE C.

4.3.1 Canaux en silicium et en verre

Historiquement, les premières puces microfluidiques étaient basées sur du silicium, du verre ou sur un mélange des deux. Dans ce type de puces, les canaux sont formés dans une première gaufre par photolithographie puis gravure dans le substrat lui-même. Une seconde gaufre est ensuite collée sur la première formant ainsi des canaux Si/Si, verre/verre ou Si/verre

(figure 4.2). Ce type d'usinage se nomme usinage de volume, puisque les structures sont gravées dans le substrat lui-même. On parle également de technologies « dures » puisque les matériaux en jeu sont du silicium ou du verre. Ce principe a l'avantage de reposer sur les techniques de microfabrication de base de la microélectronique qui sont très bien établies. Le silicium peut contenir de l'électronique et le verre est optiquement transparent. De plus, les canaux peuvent être définis avec une grande précision. Par contre, la fabrication requiert des salles blanches, le collage des deux gaufres demande une grande planéité et de hautes températures [Becker et al., 2000]. À cause de son opacité et de ses propriétés de surfaces peu adéquates, le silicium est très peu utilisé pour les applications biologiques [Holmes et al., 2010]. Le verre reste par contre dominant pour les applications d'électrophorèses capillaires grâce à ses propriétés de surface et à sa grande résistance chimique. Les canaux polymères dominent pour toutes les autres applications.

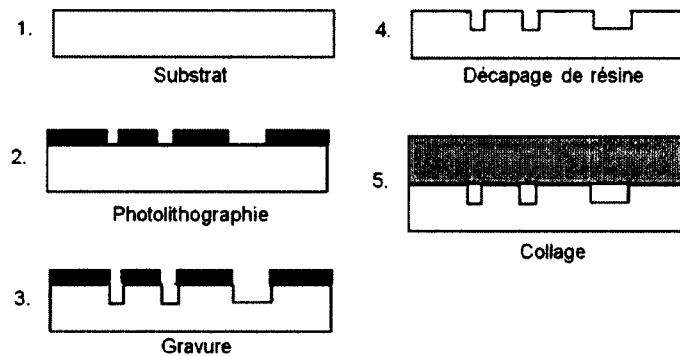


Figure 4.2 : Principe de fabrication de microcanaux avec les technologies dures.

4.3.2 Canaux en polymères

Les technologies à base de polymère ont vu le jour plus récemment. Elles prennent de plus en plus d'importance en microfluidique [Pan et al., 2011], mais sont moins matures que les technologies dures. Les polymères sont des substances macromoléculaires dont la polymérisation peut être induite par une substance d'initiation, la pression, lumière ou la température. Liquides à température élevée, ils ont un point de transition vitreuse au-dessous duquel ils se solidifient et, pour certains, deviennent aussi durs et cassants que du verre. Les polymères sont divisés en quatre classes : les thermoplastiques, les duroplastiques, les élastomères et les photorésines.

Les thermoplastiques et duroplastiques se prêtent aux techniques de production de masse (impression à chaud, injection, gravure plasma), ainsi qu'aux technologies de prototypage rapide (micro usinage laser, micro stéréo lithographie). Les plus populaires sont le polyméthacrylate (PMMA) et le polycarbonate (PC), mais on y retrouve aussi le polystyrène (PS) et le cycloolefin copolymère (COC). Chaque polymère a des propriétés différentes, appropriées pour un type d'application, le COC par exemple est réputé pour son excellente transparence optique. Les dispositifs en thermoplastiques et duroplastiques représentent un bon choix pour la fabrication de puces microfluidiques jetables n'ayant aucun système de détection intégré. En effet, les techniques d'impression à chaud et d'injection permettent d'obtenir de nombreux dispositifs à très faible coût. Le moule est cependant obligatoirement à l'échelle un. Il peut donc coûter très cher et les défauts sont reproduits à l'échelle un. De plus, les équipements requis sont non standards pour l'industrie de la microélectronique.

Les élastomères se prêtent au prototypage rapide (moulage) hors salles blanches. Le plus populaire est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Les canaux en PDMS sont formés par moulage puis collage sur une autre pellicule de PDMS ou plus généralement sur du verre (figure 4.3).

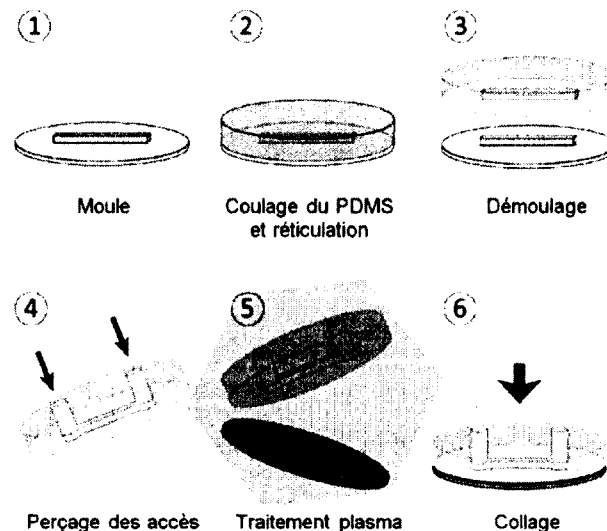


Figure 4.3 : Fabrication de canaux en PDMS (adaptée de <http://www.elveflow.com/microfluidic/16-start-with-microfluidics>).

Le PDMS est optiquement transparent, il est également souple et autoadhésif sur le verre ou sur lui-même. Il peut aussi être utilisé pour former des valves et des pompes. Il s'agit donc d'un matériau de prédilection pour les dispositifs intégrés à grande échelle comprenant de nombreuses fonctions en parallèle ou en série [Mark et al., 2010]. Par contre, le PDMS est poreux, peu résistant chimiquement, peu stable dans le temps, et sa souplesse le rend inutilisable pour des canaux ayant des rapports d'aspects supérieurs à 1/10 [Tabeling, 2006]. Enfin, à cause de problèmes d'adhérence et de la température typique de dépôt, il est impossible d'évaporer du métal sur du PDMS.

Les photorésines épaisses se prêtent à la fabrication de masse et au prototypage (photolithographie). Les plus utilisées sont la SU-8 (lithographie UV) et le PMMA (lithographie électronique) [Becker et al., 2000]. Ce type de fabrication est nommé « usinage de surface » puisque les structures sont rajoutées sur le substrat. La photolithographie nécessite des appareils assez coûteux et est effectuée en salles blanches. Par contre, elle est inscrite dans les processus de fabrication standard de la microélectronique, ce qui en fait une excellente candidate pour l'intégration de microcanaux sur de l'électronique. Le plancher et les murs du canal sont formés par simple photolithographie et peuvent inclure des pistes métalliques. Les canaux peuvent ensuite être fermés par laminage ou par collage d'un capot en verre ou en polymère (figure 4.4). Le procédé de laminage a pour avantage de pouvoir être répété pour former des structures en trois dimensions.

4.4 Détection de radioactivité

Les différents détecteurs permettant de mesurer les radiations sont les détecteurs à gaz, les semiconducteurs et les scintillateurs [Knoll, 2000].

4.4.1 Détecteur à gaz

Les premiers détecteurs développés sont des détecteurs à gaz. Ils sont formés d'une chambre polarisée contenant un gaz, la chambre à ionisation. Quand une radiation ionisante la traverse, elle crée des électrons et des ions positifs qui sont collectés par les électrodes et forment un pulse de courant. Le pouvoir d'arrêt des gaz étant très faible, ces détecteurs ont cependant une sensibilité très limitée et doivent avoir un volume très important. Ce n'est donc pas un type de détecteur envisageable pour le présent projet.

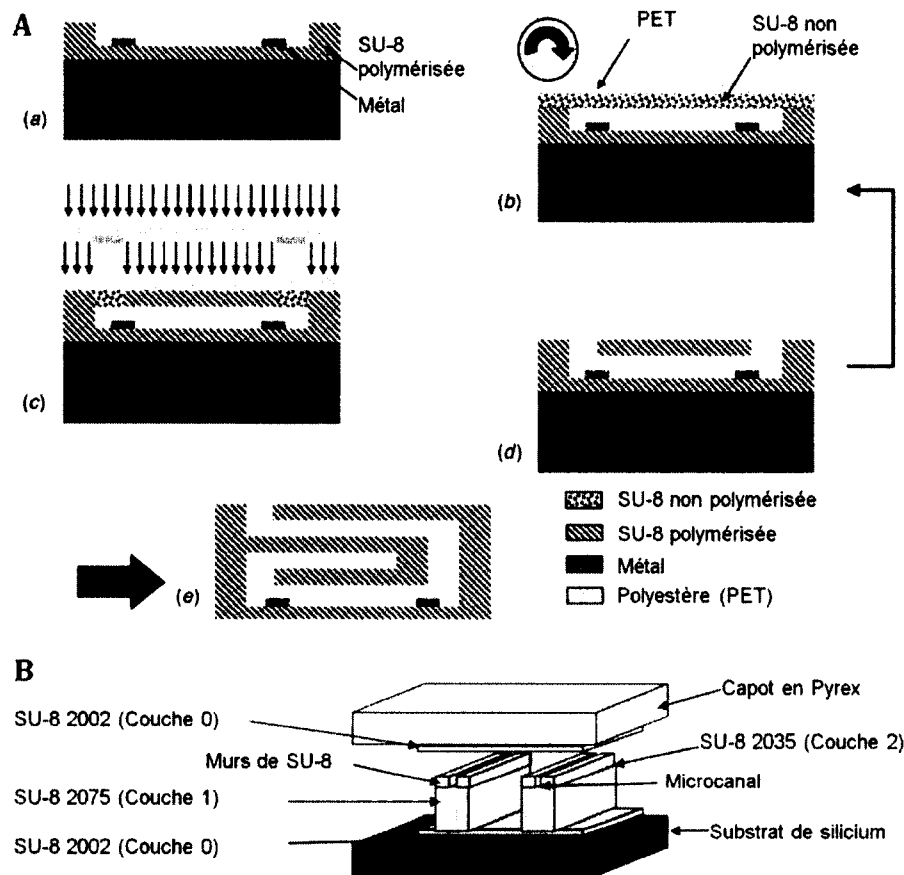


Figure 4.4 : Fabrication de canaux polymères par photolithographie avec une fermeture par laminage (A, adaptée de [Abgrall et al., 2006]) ou par collage de verre (B, adapté de [Carlier et al., 2004]).

4.4.2 Détecteurs semiconducteurs

Pour des applications comme la médecine nucléaire, où la sensibilité est souvent importante, les détecteurs à semiconducteurs, principalement Si et Ge, sont d'usage plus courant. Ils sont basés sur le même principe que les détecteurs à gaz, mais sont 5000 fois plus denses (figure 4.5). Leur propriété de semiconducteur leur permet de conduire les charges créées par une ionisation sans laisser passer trop de courant à l'état de repos. Si la tension d'alimentation est grande, les charges créées par la radiation incidente ont suffisamment d'énergie pour engendrer à leur tour d'autres ionisations, augmentant le gain du détecteur. Il s'agit du mode avalanche (gain de 10^2 à 10^3). Si la tension est encore augmentée, l'avalanche s'emballe et le gain peut aller jusqu'à 10^6 (Mode Geiger).

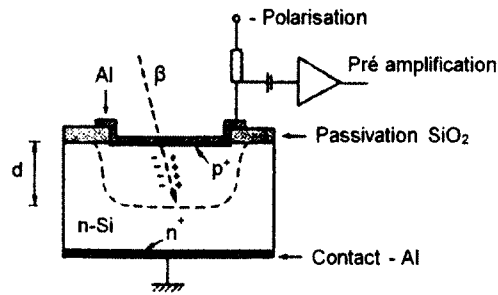


Figure 4.5 : Exemple d'un détecteur à semiconducteur : diode *p-i-n* (adapté de [Kemmer, 1984]).

En plus de leur densité, les semiconducteurs ont une énergie d'ionisation très faible (3 à 5 eV). Le signal est donc assez important pour permettre le comptage des particules incidentes. De plus, le grand nombre de charges générées par particule incidente diminue les variations statistiques et augmente la résolution en énergie. Les détecteurs à semiconducteur sont d'ailleurs réputés pour être les détecteurs fournissant la meilleure résolution en énergie. Ils sont également compacts et très rapides. En effet, le temps de collecte de charges est en général de quelques nanosecondes. Par contre, la faible énergie d'ionisation implique un plus grand bruit thermique. De plus, les impuretés présentes dans le volume de détection sont des trappes pour les charges créées par ionisation et réduisent l'efficacité. Ce phénomène limite l'épaisseur du détecteur à environ 1 cm, ce qui rend la détection de photons γ de haute énergie plus difficile.

4.4.3 Détecteurs à scintillation

Les détecteurs à scintillation sont de loin les plus utilisés en médecine nucléaire, principalement en imagerie. Ils sont composés d'un scintillateur qui produit de la lumière visible à la suite de l'arrêt d'une radiation ionisante. Les scintillateurs sont couplés à un détecteur de photons visibles, un tube photomultiplicateur (TPM) ou une photodiode semiconductrice (figure 4.6).

Deux gammes de scintillateurs existent : les scintillateurs organiques et inorganiques. Les scintillateurs inorganiques sont des cristaux contenant des impuretés. Ces impuretés causent des distorsions dans la structure cristalline qui sont responsables de la scintillation. Les scintillateurs organiques sont sous une forme liquide ou polymère dans laquelle est incorporée une molécule responsable de la scintillation.

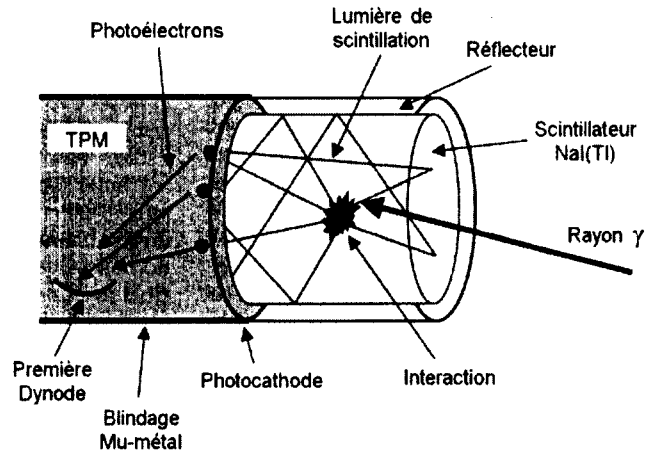


Figure 4.6 : Principe d'un détecteur à scintillation. Cas d'un TPM couplé à un scintillateur inorganique (adapté de [Cherry et al., 2003]).

Les cristaux ont en général un bon pouvoir d'arrêt et sont donc indiqués pour la détection de radiations pénétrantes. Les scintillateurs organiques sont une alternative peu onéreuse par rapport aux cristaux et sont disponibles dans une grande variété de géométries. Leur pouvoir d'arrêt est cependant moins bon et ces scintillateurs sont plus indiqués pour la détection de particules chargées que de rayons gamma ou de photons d'annihilation.

La quantité de lumière générée dans le cristal est proportionnelle à l'énergie qui y est déposée, mais est très faible. L'efficacité de scintillation est en effet d'environ un photon pour 30 eV, soit dix fois moins que les détecteurs semiconducteurs. De plus, une partie de la lumière émise est perdue dans le couplage optique avec le photodétecteur. Ce dernier doit donc être très efficace et à fort gain. Deux types de détecteurs sont principalement utilisés : des TPM ou des photodiodes avalanches (PDA). Les TPM contiennent une substance photoémissive qui génère des photoélectrons ensuite multipliés par un système de dynodes (figure 4.6). Le gain est très grand (10^6 à 10^7), mais ce type de détecteur est trop encombrant pour pouvoir être utilisé dans un système microfluidique intégré. Le problème d'encombrement est réglé avec l'utilisation de PDA qui ont par contre un gain plus faible (10^2 à 10^3).

4.5 Détection sur puce

4.5.1 Type de couplage

Des détecteurs, principalement des détecteurs optiques, électrochimiques et de spectrométrie de masse, ont été couplés à des puces microfluidiques depuis plus de vingt ans [Gai et al., 2011; Kuswandi et al., 2007]. Les détecteurs optiques ont notamment reçu beaucoup d'intérêt pour leur sensibilité, leur rapidité de réponse et leur potentiel d'intégration. La littérature concernant la détection optique est beaucoup plus vaste que celle concernant la détection de radiation et certaines problématiques sont identiques (couplage microfluidique/détecteur, angle solide de détection, faible concentration de l'analyte). La différence majeure entre les systèmes de détection intégrés pour l'optique et pour la radioactivité réside dans le critère de transparence de l'interface. En optique, l'interface peut avoir plusieurs centaines de microns d'épais et rester transparente à la longueur d'onde impliquée. La plupart des systèmes de détection optique sur puce ont donc une interface optiquement transparente de quelques dizaines de microns à quelques millimètres d'épais [Gai et al., 2011; Kuswandi et al., 2007] (ANNEXE D.1). Pour la radioactivité, une interface même peu dense (polymère) de quelques centaines de microns peut arrêter complètement un électron de conversion ou couper une grande partie du spectre d'émission bêta (ANNEXE B.3). Dans le présent projet, la sensibilité de détection serait alors insuffisante. Même si certaines géométries de détecteurs optiques microfluidiques pourraient être plus adaptées que d'autres (ANNEXE D.1), la présente revue se concentrera sur les systèmes microfluidiques couplés à des détecteurs de radioactivité.

À l'image des systèmes optiques, les dispositifs microfluidiques de détection de radioactivité peuvent être répartis en deux grandes classes : les systèmes de détection hors puce et les systèmes sur puce [Gai et al., 2011; Kuswandi et al., 2007]. Les premiers sont les technologies les plus anciennes et les plus établies. Ils impliquent une séparation totale du dispositif microfluidique et du système de détection. Pour une plus grande portabilité, les développements récents visent à intégrer la détection sur puce. Les systèmes intégrés sont cependant moins matures et souvent l'intégration n'est encore que partielle.

Comme l'objectif du présent projet est d'intégrer les canaux et les détecteurs sur la même puce, la présente revue se limitera à des systèmes complètement ou partiellement intégrés. Quelques exemples de systèmes hors puces sont présentés en ANNEXE D.2.

4.5.2 Détection de radioactivité sur puce

Dans les balbutiements des puces à ADN, quelques démonstrations de systèmes de détection sur puce ont été faites en utilisant des atomes radioactifs comme marqueurs. Eggers et coll. démontrent en 1993 l'utilisation de dispositifs à transfert de charges (CCD, « charge-coupled device ») pour détecter l'hybridation de sondes ADN [Eggers et al., 1993]. Ces détecteurs sont en fait une matrice de détecteurs semiconducteurs lus en ligne et colonne. Les sondes sont marquées avec du ^{32}P ($E_{\beta\text{max}} = 1,7 \text{ MeV}$) et les cibles sont attachées directement sur la surface du capteur (figure 4.7A). Devant le coût du consommable, cette solution a cependant vite été remplacée par l'accroche des sondes sur une lamelle de verre séchée puis posée face hydridée contre le détecteur. L'efficacité de collecte du système microfabriqué est calculée comme étant dix fois plus grande qu'un système macroscopique à lentille. L'efficacité de détection du ^{32}P est mesurée comme quasi parfaite, soit 45 à 50 % des particules émises isotropiquement pour un détecteur placé seulement d'un côté [Lamture et al., 1994]. Ce type de détecteur permet de faire une image et de compter le nombre d'hybridations. Cependant, à cause du mode de lecture, une partie de l'information est perdue, ce qui n'est pas un problème pour une source fixe, mais serait dommageable dans le cadre du présent projet. De plus, aucun système fluïdique n'est inclus dans ce dispositif.

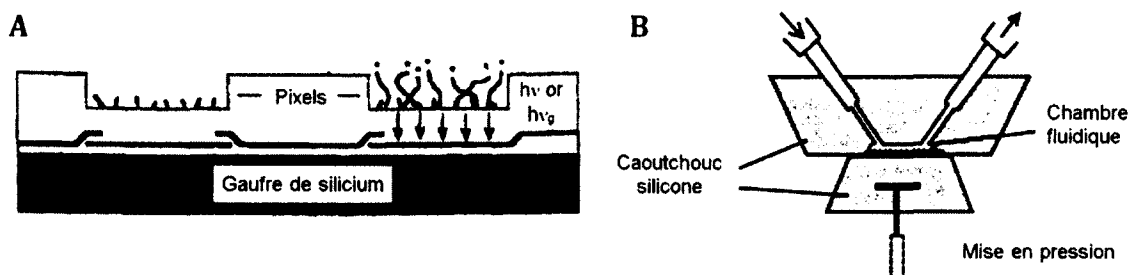


Figure 4.7 : Détection de radioactivité avec capteur CCD dans une puce à ADN (A, adapté de [Eggers et al., 1993]) ou pour une puce à protéines (B, adapté de [Morozov et al., 2002]).

Le même type de détecteur a été utilisé en 2002 par Morozov et coll. dans une puce de détection de protéines marquées au ^{14}C ($E_{\beta\text{max}} = 157 \text{ keV}$) [Morozov et al., 2002]. Dans ce cas, un capteur vidéo faible coût du commerce est adapté pour la détection de particules chargées. La vitre de protection est enlevée et la surface du capteur est protégée par un mince film de Mylar ($5\text{-}8 \mu\text{m}$ d'épais). Le capteur a là encore une très bonne efficacité de détection, soit 35 à 40 %. Les auteurs soulignent cependant la faible résistance des pixels aux dommages causés par les radiations. De plus, la fluidique est assurée par une chambre pressée contre le détecteur (figure 4.7B). Elle n'est donc pas intégrée et le système n'est pas portable.

En 1989, Schooneveld et coll. introduisent un détecteur silicium à bandes pour la détection de particules chargées imprégnées sur un film de chromatographie placé contre la surface du détecteur [Schooneveld et al., 1989]. Ce type de détecteurs est en fait une série de détecteurs *p-i-n* permettant de former une image linéaire. Le fait de placer le film contre le détecteur permet ici d'augmenter la résolution de l'image obtenue. La sensibilité est mesurée à plus de 25 % avec du ^{14}C . En 1996, Burns et coll. posent les premières briques d'un système microfabriqué d'analyse d'ADN incluant le détecteur de Schooneveld et coll. [Burns et al., 1996] (figure 4.8). Des microcanaux usinés dans une gaufre de verre sont alors collés par un adhésif optique à une gaufre de silicium contenant les détecteurs.

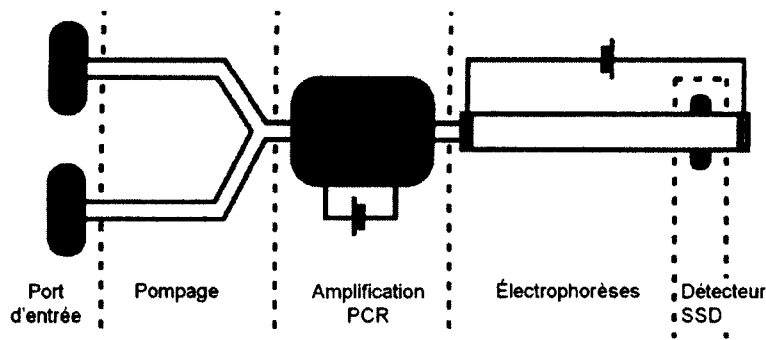


Figure 4.8 : Système d'analyse ADN avec détecteur de particules chargées intégré (adapté de [Burns et al., 1996]).

Cependant, l'intégration ne sera effectuée que deux ans plus tard [Burns et al., 1998] avec des sondes fluorescentes à la place des sondes radioactives. En plus de limiter l'exposition du personnel aux radiations, le détecteur optimisé pour la fluorescence serait plusieurs ordres de grandeur plus sensible que sa contrepartie radioactive.

Un système hybride basé sur une puce en PDMS et un scintillateur a été introduit en 2006 par Cho et coll. pour de la détection de positrons [Cho et al., 2006] (figure 4.9A). Le système permet de faire l'image d'une puce complète pour mesurer la radioactivité dans diverses sections du canal. Les applications visées sont la surveillance de radiosynthèse chimique sur puce et la culture cellulaire. La distance entre la source de positrons et le scintillateur n'est que de 40 μm , limitant les pertes dues à l'interface. Le détecteur n'est cependant pas embarqué et a besoin d'être refroidi à $-10\text{ }^\circ\text{C}$. De plus, la sensibilité est limitée par le rendement lumineux du scintillateur, le couplage optique avec une lentille et l'efficacité quantique du CCD. Une sensibilité de 5 nCi/mm^2 est annoncée, soit 185 Bq/mm^2 , mais requiert une acquisition de 5 min d'une source immobile. Le système a été modifié en 2008 pour tirer parti du phénomène des radiations Cherenkov et s'affranchir du scintillateur [Cho et al., 2009]. Il s'agit d'une lumière visible produite par un matériau transparent quand il est traversé par une particule chargée de vitesse supérieure à la vitesse de la lumière dans ce matériau, c'est-à-dire 204 keV pour le PDMS. Une grande partie des particules incidentes est donc perdue, et ce type de technologie ne serait pas compatible avec le présent projet.

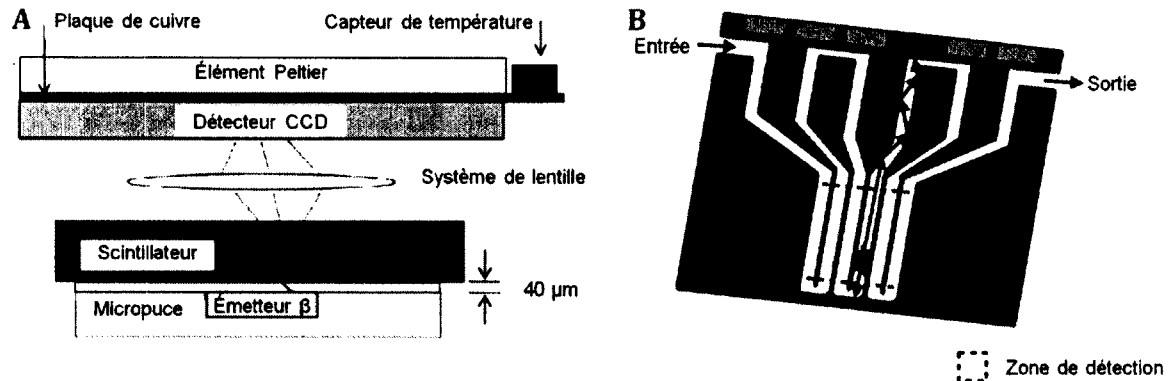


Figure 4.9 : A. Détection de radioactivité sur puce avec un scintillateur et un capteur CCD (adapté de [Cho et al., 2006]). B. Microcanaux remplis de liquide scintillateur pour la détection haute résolution de particules (adapté de [Mapelli et al., 2010]).

Mapelli et coll. ont introduit en 2010 une puce microfluidique dont les canaux en SU-8 sont remplis d'un scintillateur liquide [Mapelli et al., 2010]. Les microcanaux apportent une grande résolution spatiale, une grande robustesse aux radiations et agissent comme guides d'ondes pour la lumière de scintillation (figure 4.9B). La source de radioactivité et le détecteur ne sont cependant pas embarqués. Blanco Carbello et coll. introduisent en 2008 une puce en

technologie métal-oxyde-semiconducteur complémentaire (CMOS, « complementary metal-oxyde-semiconductor ») incluant une grille supportée par des piliers en SU-8 pour la détection d'ionisations produites dans un détecteur de radiation à gaz. Il n'est pas question ici de microfluidique, mais l'auteur souligne la robustesse de la SU-8 aux dommages dus aux radiations. Cette propriété est également mise en valeur par d'autres auteurs [Key, 2004; Zacheo et al., 2011].

La seule véritable démonstration de détection de radioactivité sur puce a été faite par Vu et coll. en 2006 [Vu et al., 2006]. Des microcanaux en PDMS ont été couplés à une diode avalanche sensible en position pour fournir une image d'une culture cellulaire contenue dans les microcanaux (figure 4.10). L'optique ici n'est cependant pas de faire une mesure en temps réel. La puce contient des valves en PDMS pour l'apport de différentes solutions de culture et est supportée par une lame de verre. L'interface résultante limite l'efficacité de détection du ^{18}F -FDG à 6 %, ce qui serait insuffisant pour la mesure en temps réel impliquée dans le présent projet.

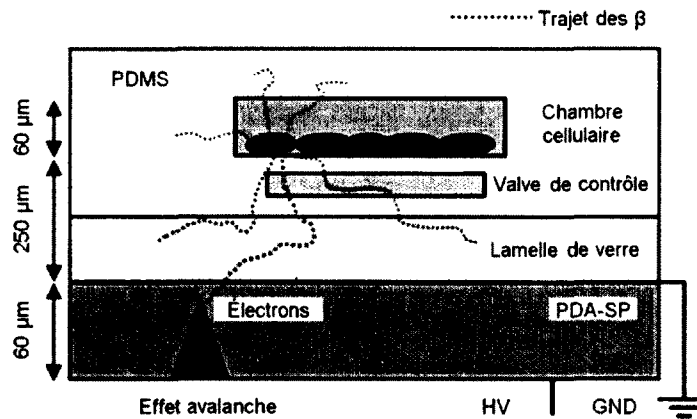


Figure 4.10 : Détection de particules chargées dans une puce microfluidique en PDMS pour l'imagerie cellulaire (adapté de [Vu et al., 2011]).

4.6 Choix technologiques

Aucun dispositif microfluidique de détection de radiation n'a donc été trouvé dans la littérature qui réponde aux exigences d'efficacité du présent projet de recherche. Parmi les technologies existantes de fabrication de canaux, les canaux en photorésine semblent un bon candidat pour le projet. Ils permettent d'intégrer des canaux sur de l'électronique, notamment

des détecteurs de radioactivité, avec des techniques de fabrication standards et en gardant une interface minimale entre la source et le détecteur. De plus, la souplesse des polymères permet l'intégration de nombreuses fonctionnalités sur puce. Les canaux en polymères évitent également les collages à haute température qui peuvent être dommageables à l'électronique sous-jacente. Plus particulièrement, la SU-8, une photorésine négative à base d'époxy, est un choix populaire pour sa résistance chimique et ses bonnes propriétés optiques et mécaniques [Pan et al., 2011]. Elle permet également de former des couches d'épaisseurs très variées et son utilisation sur de l'électronique a déjà été démontrée [Peng et al., 2006]. Elle est également jugée biocompatible [Kotzar et al., 2002; Voskerician et al., 2003] et montre une bonne résistance aux radiations [Key, 2004; Salm et al., 2008; Zacheo et al., 2011]. Enfin, elle peut être utilisée pour former les quatre parois du microcanal et les canaux en SU-8 supportent des pressions élevées [Carlier et al., 2006].

La SU-8 répond donc bien au cahier des charges fixé pour ce projet. Les paramètres de photolithographie doivent cependant être contrôlés de manière particulièrement précise pour éviter les stress internes inhérents à cette résine [Johnson et al., 2001] et les fissures résultantes peuvent induire des fuites. Plus récemment, la KMPR, une autre photorésine époxy, a été introduite. Elle permet de limiter les stress internes et donc d'avoir une plus grande résistance aux fissures [Ou et al., 2008]. Cette résine est principalement utilisée dans la littérature comme alternative à la SU-8 pour former des moules pour l'électroplaquage [Lee et al., 2008]. L'avantage de la KMPR pour cette application est que sans recuit dur, elle est plus facile à décaper que la SU-8. Dans le présent projet, elle a été utilisée pour fabriquer des canaux microfluidiques en éliminant les difficultés de fabrication de la SU-8 tout en gardant les mêmes avantages.

Pour la détection de particules chargées, un détecteur à scintillateur plastique ou un détecteur semiconducteur pourrait être utilisé. Un rapide calcul d'énergie captée permet de comparer ces deux technologies soit : (1) l'anthracène (scintillateur organique le plus courant) couplé à un détecteur semiconducteur de gain unitaire et (2) un détecteur semiconducteur seul, également de gain unitaire. Les scintillateurs organiques étant disponibles dans des épaisseurs très variées, ils seront ici considérés suffisamment épais pour arrêter la particule incidente. Le détecteur semiconducteur sera lui considéré comme ayant l'épaisseur standard d'une gaufre de 4 pouces soit 300 μm . Un scintillateur à base d'anthracène ne convertit que 5 % de l'énergie

incidente en lumière (efficacité intrinsèque du scintillateur pour la détection de rayons gamma, [Clark, 1974]). En considérant une absorption d'énergie similaire pour une particule chargée, une efficacité de collecte de lumière d'environ 60 % et une efficacité quantique parfaite du détecteur semiconducteur couplé au scintillateur, seulement 3 % de l'énergie incidente sera convertie en signal utile. Pour une particule incidente de 250 keV, seulement 7,5 keV généreront donc un signal utile. Dans le cas du détecteur semiconducteur, l'équation (B.7) donne un dépôt d'énergie de 182 keV soit 24 fois plus de signal que le scintillateur. En plus de s'affranchir d'un scintillateur de quelques millimètres d'épaisseur fait d'un matériau non standard en microfabrication, le détecteur semiconducteur permet donc une détection plus efficace. Ce gain d'efficacité est primordial pour les faibles concentrations impliquées dans ce projet.

Parmi les détecteurs semiconducteurs, les diodes en mode Geiger ont l'inconvénient d'avoir un taux de comptage de bruit de fond élevé. Elles ne sont donc pas adaptées aux faibles concentrations impliquées dans ce projet. Les diodes avalanches ont un fort gain, mais très variable avec la tension d'alimentation et la température. Elles sont également délicates à optimiser et requièrent une tension d'alimentation élevée. De plus, leur zone de détection est généralement assez fine, réduisant le signal utile. Des diodes à gain unitaire sont donc préférées pour le présent projet, et plus particulièrement, des diodes de type *p-i-n* reconnues comme étant simples, robustes, peu coûteuses et efficaces pour la détection de radiations [Knoll, 2000]. Elles ont de plus une zone de détection très épaisse compensant le manque d'amplification. Même sans gain, le signal généré par une particule chargée reste donc très significatif. À titre d'exemple, la particule incidente de 250 keV qui dépose 182 keV dans 300 μm de silicium génère $5 \cdot 10^4$ électrons (équation (B.8)), ce qui correspond à une impulsion de charges de $8 \cdot 10^{-15}$ C. Ce signal est deux ordres de grandeur au-dessus du bruit RMS d'un préamplificateur de charges typiquement utilisé pour traiter ce type de signal ($3 \cdot 10^{-17}$ C, CR-110, Cremat Inc.).

La solution de canaux en KMPR sur diodes *p-i-n* apparaît donc comme une solution technologique viable permettant d'offrir une mesure en temps réel de très haute efficacité.

4.7 Conclusion

Une revue de littérature des systèmes de détection de radioactivité microfluidique a mis en évidence l'absence d'un système à haute efficacité pour la mesure en temps réel requise pour ce projet. Parmi les différentes technologies disponibles pour réaliser chacune des fonctions, des canaux en KMPR sur diodes *p-i-n* apparaissent comme une solution technologique innovante permettant de répondre aux besoins du présent projet.

CHAPITRE 5 FABRICATION D'UN DÉTECTEUR DE PARTICULES

5.1 Introduction

Au chapitre précédent, des microcanaux en KMPR fabriqués directement sur des diodes *p-i-n* ont été identifiés comme la solution technologique répondant le mieux aux spécifications du projet et permettant d'améliorer l'efficacité de détection par rapport aux systèmes existants dans la littérature. Le présent chapitre donne une preuve de concept de fabrication de diodes *p-i-n* avec les infrastructures du CRN2 dans le but de pouvoir assurer la fabrication complète d'un dispositif intégré et d'obtenir une géométrie de détection entièrement adaptée aux besoins du projet. L'optimisation d'un tel détecteur étant tout un projet en soi, elle ne fait cependant pas l'objet du présent projet. Un bref rappel théorique sur le fonctionnement des diodes *p-i-n* en silicium est tout d'abord donné. Un état de l'art établit ensuite les principes généraux de fabrication de ce type de diode. Les éléments ayant guidé la conception et les divers choix technologiques de fabrication des premiers prototypes sont ensuite donnés. Le protocole complet de fabrication est présenté en ANNEXE E. Après la description des bancs de tests et de caractérisation utilisés pour qualifier les premiers prototypes, les résultats obtenus sont présentés. Les performances électriques permettent de valider le succès de la fabrication et de comparer les performances des détecteurs à ceux trouvés dans la littérature. Des mesures sous irradiation permettent ensuite de calculer l'efficacité de détection de cette première itération pour la comparer au cahier des charges. Une dernière section conclut ce chapitre et donne des recommandations pour la suite de ce projet.

5.2 Fonctionnement d'une diode *p-i-n* en silicium

Un bref rappel de la structure du silicium et du principe du dopage permettra d'aborder le fonctionnement général d'une jonction *p-n* puis le cas particulier de la diode *p-i-n*. Enfin, les principaux éléments générant du bruit dans ce type de détecteurs seront donnés comme point de départ pour l'état de l'art et les éléments de conception.

5.2.1 Silicium

Le silicium est le substrat de base en microélectronique, mais c'est également l'élément le plus abondant dans la croûte terrestre après l'oxygène. Sous forme solide, il est organisé en cristal avec une maille de type diamant et une forme cubique à faces centrées (figure 5.1A). Pour la microélectronique, il est produit sous forme de gaufres de diamètre 50 à 400 mm et d'épaisseur de 100 μm à 1 mm avec une orientation cristalline de type (100), (110) ou (111). En effet, ces gaufres peuvent être fabriquées pour exposer un plan cristallin à la surface qui correspond à différents plans de coupe de la maille cubique (figure 5.1B). Chaque orientation a des propriétés électriques, chimiques et mécaniques qui lui sont propres.

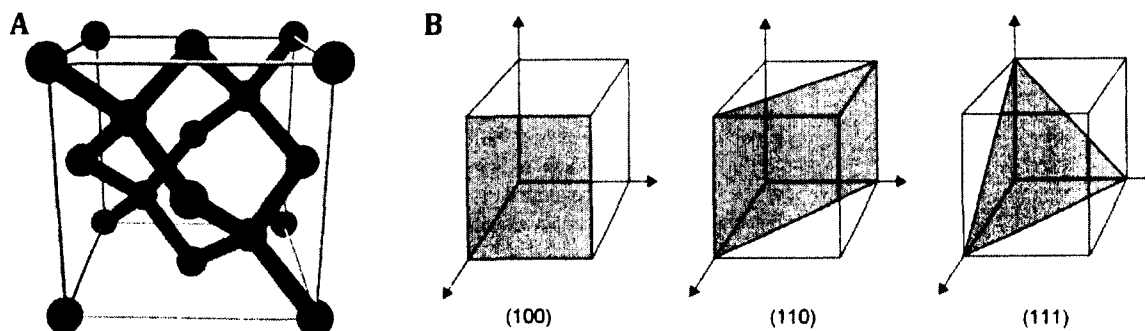


Figure 5.1 : A. Structure en diamant de la maille de silicium (Wikipedia). B. Orientations cristallines du silicium [Franssila, 2010].

Le silicium est un semiconducteur ayant quatre électrons dans sa bande de valence. Sa densité atomique est de $5,10^{22}$ atomes/ cm^3 . Sous sa forme intrinsèque, il comprend des impuretés à une concentration de $1,38.10^{10}$ atomes/ cm^3 ce qui lui donne une résistivité de $2,3.10^5$ ohm.cm. Ces taux de pureté sont cependant très difficiles à atteindre et le silicium est plus généralement fabriqué avec des impuretés de l'ordre de 10^{14} atomes/ cm^3 (~ 20 ohm.cm). Pour des applications spécifiques, comme certains détecteurs, il est possible de descendre jusqu'à 10^{12} atomes/ cm^3 (~ 10 kohm.cm). Les impuretés sont des atomes ayant trois ou cinq électrons dans leur bande de valence, créant ainsi un manque, ou « trou » (dopage *p*), ou bien un électron (dopage *n*) surnuméraire dans la structure cristalline (figure 5.2). Ces électrons ou ces trous sont libres de circuler et diminuent la résistivité du silicium, mais au repos, ils n'introduisent pas de charge nette. De plus, pour être électriquement active, une impureté doit prendre la place d'un atome de silicium dans la maille cristalline, ce qui requiert un apport de chaleur, généralement au-dessus de 900 °C.

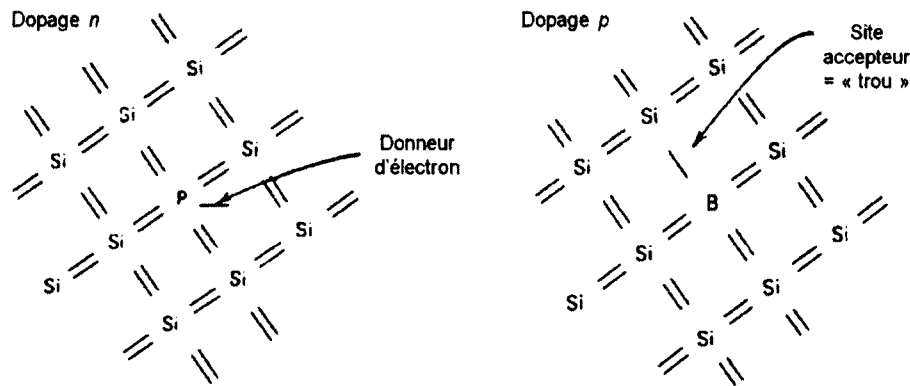


Figure 5.2 : Les deux types de dopage du silicium (adapté de [Knoll, 2000]).

5.2.2 Jonction p-n

Lorsque deux semiconducteurs de type p et n sont mis en contact, un important gradient de porteurs existe entre les deux côtés, induisant une diffusion des certains électrons libres du côté donneur (type n) pour aller combler les trous du côté accepteur (type p) [Mathieu, 1998]. Ces électrons laissent ainsi derrière eux des ions positifs du côté donneur et viennent créer des ions négatifs du côté accepteur. Un champ électrique apparait ainsi faisant migrer les trous en direction inverse. Deux courants sont donc créés en sens opposés et s'équilibrent, laissant une portion centrale sans porteurs de charges et soumise à un champ électrique intrinsèque, la région désertée (figure 5.3A). Lorsque la diode est polarisée en direct, cette zone rétrécit jusqu'à permettre la libre circulation des porteurs. La diode fonctionne alors comme une résistance. Lorsqu'elle est polarisée en inverse, la zone désertée devient plus large, interdisant toute circulation de courant (figure 5.3B). La diode fonctionne alors comme un condensateur. Pour de très fortes tensions de polarisation inverse, le champ électrique créé aux bornes de la région désertée devient si intense que les porteurs de charges peuvent traverser la jonction. Il y a alors claquage (figure 5.3B).

C'est dans le mode de polarisation inverse que les diodes sont utilisées comme détecteur. Toute radiation, que ce soit un photon, une particule bêta ou alpha, va perdre de l'énergie dans le semiconducteur en créant des paires électron/trou. Les paires créées dans la zone désertée sont accélérées par le champ électrique et sont rapidement collectées (figure 5.4A). Elles forment un courant proportionnel à l'intensité d'excitation qui vient s'ajouter au courant de fuite (figure 5.4B). C'est donc cette zone qui est dite « sensible ».

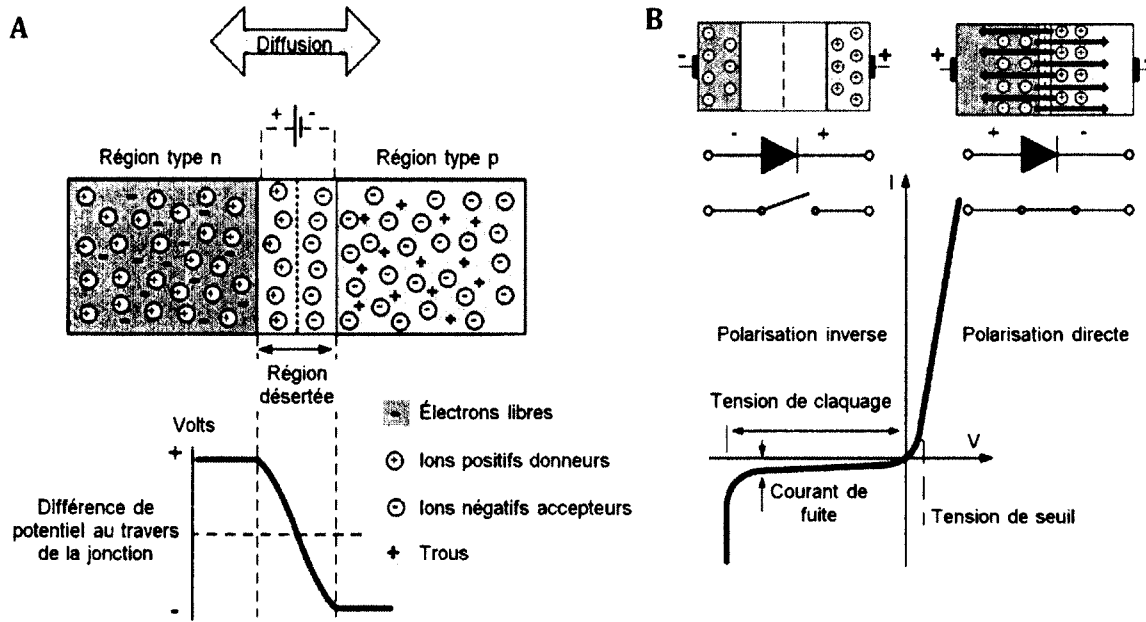


Figure 5.3 : Principe de la jonction pn (adapté de <http://electronicslovers03.blogspot.ca/>). A. Jonction non polarisée. B. Jonction polarisée.

Dans les zones p et n , le champ électrique est nul et le taux d'impuretés est grand. Les paires créées sont donc le plus souvent recombinées. Ainsi, elles ne participent pas au signal et ces zones sont dites zones « mortes ». La profondeur et la largeur de la zone sensible permettent d'ajuster la sensibilité de la photodiode à des photons d'une longueur d'onde précise.

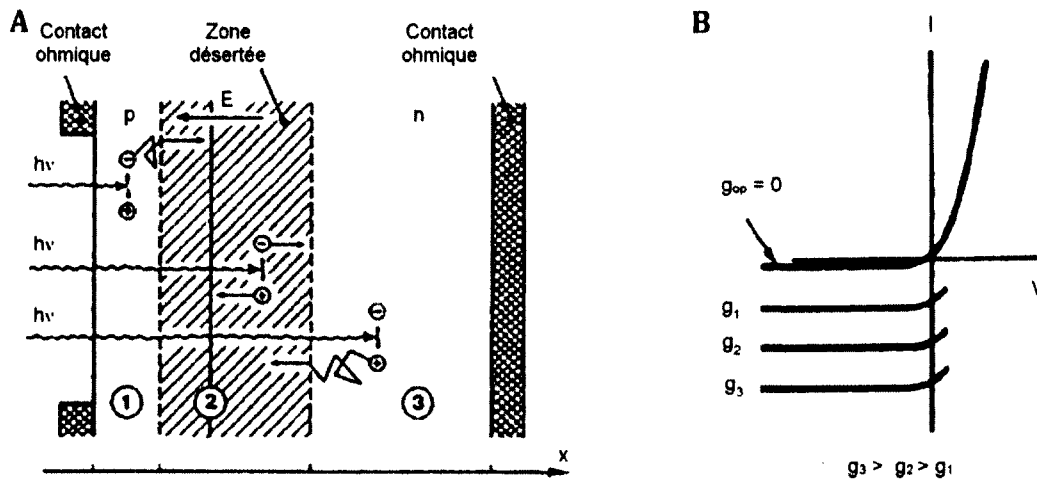


Figure 5.4 : A. Principe de la photodiode (adapté de [Mathieu, 1998]). B. Courant généré dans la diode sans illumination (g_{op}) et avec trois intensités d'illumination croissantes (g_1 , g_2 et g_3) [Streetman et al., 2005].

5.2.3 Diode *p-i-n*

Pour détecter des particules bêta ou des électrons de conversion avec une grande efficacité, la zone sensible doit être très profonde. Ces derniers perdent en effet leur charge tout au long de leur trajectoire qui s'étend de quelques dizaines de micromètres à quelques millimètres (ANNEXE B.3). Donc, plus la zone sensible est profonde, plus le nombre de charges créées est grand et plus le signal ressort du bruit électronique. Une zone intrinsèque non dopée est donc insérée entre les zones *p* et *n*, formant ainsi une diode *p-i-n*. La zone sensible est donc considérablement agrandie avec des tensions de polarisation faible, de l'ordre de quelques dizaines de volts. Ce type de diode est dite « totalement désertée » lorsque la tension est telle que la zone désertée s'agrandit jusqu'à couvrir toute la région intrinsèque. La capacité de la jonction est alors stable et la sensibilité est maximale.

5.2.4 Bruit d'une diode *p-i-n* en polarisation inverse

Pour maximiser l'efficacité de détection d'un faisceau de particules chargées polyénergétique, il est important de minimiser le courant de fuite de la diode en polarisation inverse. Ce dernier est principalement dû à une composante de surface et une composante de volume [Kemmer, 1984]. La composante de surface est due aux états de surfaces (liaisons pendantes) donc à l'orientation du substrat ainsi qu'aux impuretés en surface. En effet, l'orientation cristalline du silicium influence le nombre d'atomes présents en surface et le nombre de liaisons pendantes ou d'impuretés qui peuvent s'y greffer. L'orientation <100> est donc préférée à l'orientation <111>. Le courant de surface diminue avec une passivation adéquate, un anneau de garde et un minimum d'impuretés. La composante de volume est due aux porteurs majoritaires générés dans la région intrinsèque ou aux porteurs minoritaires qui diffusent jusqu'à la jonction. Ce courant s'exprime [Kemmer, 1984]

$$i_g = q \frac{n_i}{2\tau} A d, \quad (5.1)$$

où q est la charge élémentaire de l'électron, n_i est la concentration en porteurs de la région intrinsèque, τ est la durée de vie des porteurs minoritaires, A est l'aire du détecteur et d est la profondeur de la zone désertée. Ce courant augmente lorsque la concentration en porteurs de la région intrinsèque (donc la pureté du substrat), la surface de la région active et l'épaisseur de la région intrinsèque augmentent ainsi que lorsque la durée de vie des porteurs diminue.

5.3 État de l'art pour la fabrication de diodes $p-i-n$

Dans la littérature, la fabrication d'une diode $p-i-n$ est généralement effectuée avec des techniques de fabrication de surface standard [Knoll, 2000] aboutissant à la structure planaire illustrée à la figure 5.5 (voir ANNEXE C pour les principes généraux de microfabrication). L'anode est structurée sur la face avant de la gaufre alors que tout l'arrière de la gaufre forme une cathode commune. La différence principale avec les procédés CMOS standard réside dans le substrat et le traitement de la face arrière. Les gaufres utilisées comme substrat ont une résistivité beaucoup plus grande qu'une gaufre CMOS standard (3 à 10 kohm.cm contre ~ 20 ohm.cm). De plus, à part une métallisation en face arrière, le procédé CMOS standard n'effectue d'opérations que sur la face avant de la gaufre alors que la fabrication d'une diode $p-i-n$ peut comporter plusieurs opérations en face arrière.

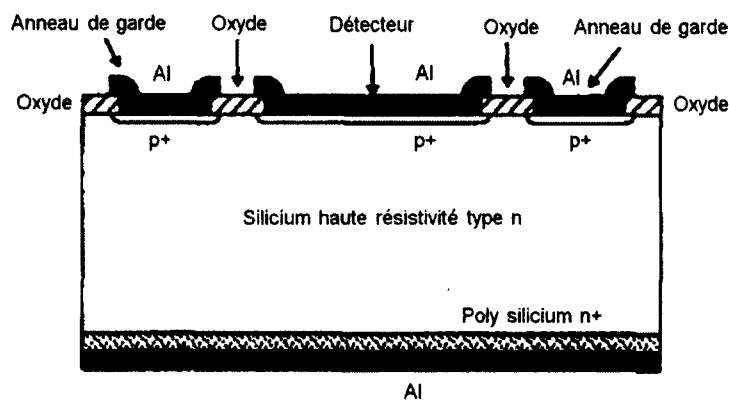


Figure 5.5 : Structure d'une diode $p-i-n$ (adapté de [Zhou et al., 1996]).

Les étapes principales du procédé de fabrication d'une diode $p-i-n$ de type planaire sont les suivantes [Kemmer, 1984] :

- Substrat haute pureté (500 ohm.cm à 10 kohm.cm) type n ;
- Passivation par croissance d'oxyde de silicium;
- Ouverture des fenêtres de détection sur la face avant;
- Implantation ionique type p sur la face avant et type n sur la face arrière;
- Activation des dopants;
- Métallisation face avant (aluminium) puis gravure sélective;
- Métallisation face arrière (aluminium);
- Recuit d'aluminium pour les deux faces.

Différentes variantes se retrouvent dans la littérature avec la présence ou non d'une couche de polysilicium comme piège à défauts en face arrière, le dopage par diffusion ou implantation, la température du recuit et la géométrie, plus précisément la forme des détecteurs et la présence d'un anneau de garde. Ce dernier entoure le détecteur pour capter toute génération de paires électron/trou hors de la région active et limiter ainsi les courants de fuite de surface. Chaque optimisation a pour but de diminuer le courant de fuite de la diode. Les détecteurs les plus performants, tels que celui décrit par Kemmer [Kemmer, 1984], génèrent des courants de fuite de l'ordre de 1 nA/cm^2 par $100 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur de zone désertée.

5.4 Éléments de conception des diodes et choix technologiques

Pour cette première preuve de concept, le protocole standard de fabrication des diodes *p-i-n* décrit à la section précédente a été adapté aux infrastructures du CRN2 et aux exigences du projet, principalement en termes d'efficacité de détection. L'implantation pratique du protocole a nécessité le choix d'un substrat, la définition de la géométrie de détecteur, des paramètres d'implantation ainsi que la détermination de l'épaisseur requise pour le masque d'implantation. Ces divers éléments seront présentés dans cette section. La bande passante des détecteurs n'est pas prise en compte puisque les taux de comptages impliqués dans ce projet sont très faibles ($< 30 \text{ kHz}$).

5.4.1 Substrat

La fabrication a été lancée sur deux types de gaufres de haute résistivité disponibles au CRN2 : une gaufre de la marque Atomergic (non dopée, $\langle 111 \rangle$, polie sur deux faces, résistivité inconnue, 3", #SSE : C067) et une gaufre de la marque Topsil (type *n*, $\langle 111 \rangle$, polie sur une face, $15 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}$, 3", #SSE : C359). La résistivité de la gaufre Atomergic n'étant pas connue, elle a été calculée grâce aux mesures électriques sur les dispositifs fabriqués. Ces gaufres ont donc une résistivité adéquate pour le type de détecteur visé, mais n'ont pas l'orientation cristalline optimale. L'impact de l'orientation du substrat sur les performances finales des dispositifs étant faible en comparaison des autres éléments impliqués dans la conception et la fabrication de ce type de détecteur, les substrats utilisés permettront de faire la preuve de concept visée par le présent projet même s'ils n'ont pas l'orientation idéale. Pour

des résultats optimaux, la fabrication des dispositifs finaux devra se faire sur des substrats d'orientation <100>.

5.4.2 Géométrie

Les géométries de ce premier prototype ont été choisies afin de pouvoir comparer les performances des détecteurs fabriqués avec celles des détecteurs couramment rencontrés dans la littérature, soit des diodes circulaires de 1 et 2 mm de diamètre (figure 5.6A). Des diodes rectangulaires de forme allongée plus adaptées au projet ont également été réalisées (figure 5.6B). Des dimensions de $3 \times 30 \text{ mm}^2$ ont été adoptées pour pouvoir comparer les détecteurs fabriqués avec le détecteur de référence utilisé dans le compteur sanguin $\text{CS}\mu$ de l'Université de Sherbrooke (S3588-08, Hamamatsu). Un anneau de garde d'une largeur de $250 \mu\text{m}$ a été placé à $25 \mu\text{m}$ de la région active. Le contact à la région active a été réalisé par un anneau de $50 \mu\text{m}$ de large. Le masque a été conçu pour répéter un motif tenant sur un quart de gaufre et comprenant quatre diodes rondes de chaque dimension ainsi que trois diodes rectangulaires (ANNEXE E.8).

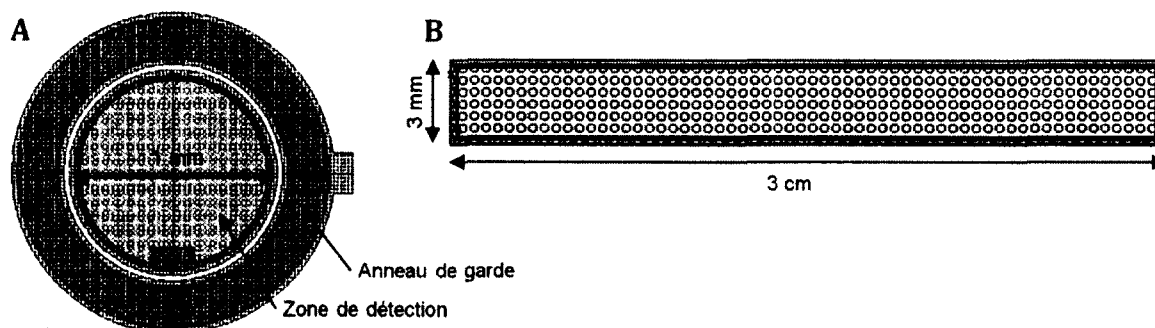


Figure 5.6 : Géométries initiales pour la détection de radioactivité. A : diode ronde, 1 et 2 mm de diamètre. B : diode rectangulaire allongée $3 \times 30 \text{ mm}^2$.

5.4.3 Paramètres d'implantation

Les paramètres ajustables lors d'une implantation ionique sont l'énergie d'implantation et le nombre d'atomes implantés par unité de surface ou dose d'implantation. Ils sont choisis en fonction du dopage désiré (nombre d'atomes par unité de volume) et de la profondeur à doper. Dans le présent projet, un dopage typique de $1.10^{18} \text{ atomes/cm}^3$ et une profondeur d'implantation de 300 nm ont été adoptés sur les deux faces. Un dopage important permet

d'avoir un champ électrique élevé dans la zone désertée et de maximiser le nombre de charges collectées. Une épaisseur de contact de 300 nm permet de s'affranchir de certains problèmes de fabrication (diffusion de l'aluminium jusqu'à la zone intrinsèque) sans compromettre l'efficacité de détection. En effet, un électron ou positron de 250 keV ne perd que 0,5 keV dans 300 nm de silicium (équation (B.7)), ce qui est négligeable. Lorsque les détecteurs sont destinés à la mesure de particules de très faible énergie, ou de particules lourdes, cette épaisseur est beaucoup plus critique.

Le dopage doit donc viser à implanter une concentration d'environ 1.10^{18} atomes/cm³ avec un maximum de concentration en surface du silicium et une épaisseur de jonction d'environ 300 nm. Une double implantation de 10 keV puis 35 keV a donc été adoptée pour le bore et de 35 keV et 90 keV pour le phosphore (le phosphore étant plus lourd, il pénètre moins loin à énergie équivalente que le bore). Le logiciel Microtech 3.0 (Siborg) a été utilisé pour simuler ces implantations et la distribution d'atomes résultante après recuit d'activation. Il a permis de valider qu'une double implantation était nécessaire pour un dopage de surface et que l'épaisseur de jonction était respectée (figure 5.7). De plus, il a permis de calculer la dose d'implantation nécessaire soit 8.10^{12} cm⁻² pour les deux dopages.

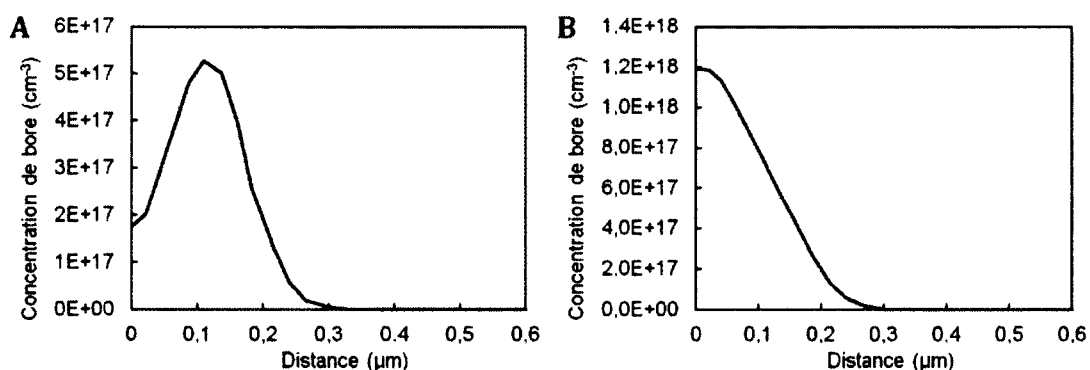


Figure 5.7 : Distribution des dopants après recuit d'activation (900 °C, 2 h 15) pour une implantation unique de bore à 35 keV (A) et après une double implantation à 10 keV et 35 keV (B) (8.10^{12} cm⁻² pour chaque implantation).

5.4.4 Épaisseur du masque d'implantation

La cathode étant commune pour toutes les diodes, aucun motif n'a été réalisé en face arrière. Par conséquent, aucun masque d'implantation n'était nécessaire sur cette face. Pour la face avant, les simulations précédentes montrent une profondeur de dopage maximum de

300 nm dans le silicium après recuit, ce dernier est légèrement supérieur dans l'oxyde de silicium. Une épaisseur de masque de deux fois la profondeur de dopage est adoptée, soit 700 nm.

Le masque d'implantation est généralement l'oxyde de champ servant à isoler les divers dispositifs sur une même gaufre. La qualité de cet oxyde n'étant pas de première importance, il est généralement déposé par croissance humide. Une épaisseur de 700 nm requiert une oxydation humide de 70 min à 1050 °C [Perozziello, n.d.].

5.4.5 Passivation

La surface d'une photodiode est très sensible et doit être protégée. En effet, toute impureté risque de générer des courants de surface, et d'augmenter le courant de fuite. Une partie des échantillons ont subi une passivation au nitrure de silicium. Le nitrure donne une dureté, une isolation à l'environnement (ions, contaminants organiques, humidité) et une stabilité à long terme [Kemmer, 1984].

5.5 Banc de tests et protocole de caractérisation

5.5.1 Fabrication

En cours de fabrication, la conformité des structures avec le protocole de fabrication a été validée à l'aide d'un microscope optique, d'un ellipsomètre et d'un profilomètre. Le microscope optique a permis de mesurer la taille des dispositifs, de vérifier l'alignement des différentes couches et la qualité de gravure. L'ellipsomètre effectue une mesure optique de l'épaisseur des couches et de leurs indices de réfraction sur une surface d'environ 1 mm². Dans le cadre de ce projet, il a permis de valider les épaisseurs des couches crues ou déposées. Le profilomètre effectue une mesure mécanique du relief d'un échantillon en le balayant avec une pointe micrométrique. Il a été utilisé pour mesurer l'épaisseur de structures trop petites pour permettre l'utilisation de l'ellipsomètre.

Certains détecteurs ont été encapsulés pour pouvoir être utilisés sous irradiation. Pour cela, une diode ronde de chaque diamètre et une diode rectangulaire ont été découpées d'une gaufre Topsisil à la scie au diamant. Les diodes rondes ont été collées dans un boîtier plaqué or standard à l'aide de laque d'argent pour assurer le contact arrière. Aucun boîtier standard

n'étant disponible pour la diode rectangulaire, elle a été collée sur un circuit imprimé (PCB, « printed circuit board ») avec deux pistes en cuivre fabriqué spécialement à cet effet. Pour chaque diode, le contact d'anode a ensuite été connecté à une des pistes de sorties par microsoudure. L'anneau de garde a été laissé flottant. Pour les diodes circulaires, le fond du boîtier était relié intrinsèquement à une broche du boîtier utilisée comme cathode. La piste correspondant à la cathode sur le PCB du détecteur rectangulaire a été connectée par microsoudure.

Une lamelle de verre de 150 μm d'épais a ensuite été mise en place pour protéger les détecteurs. Les boîtiers contenant les détecteurs circulaires ont été soudés sur un morceau de circuit imprimé avec un connecteur rectangulaire puis reliés à la carte de préamplification par un fil torsadé d'environ 3 cm de long. L'encapsulation résultante est illustrée à la figure 5.8. Des mesures CV et IV ont été effectuées sur les diodes encapsulées et comparées avec la diode de référence (S3588-08, Hamamatsu).

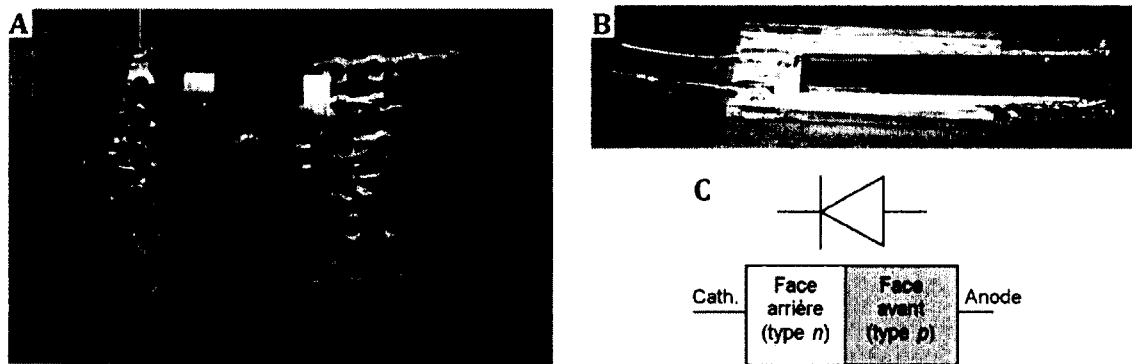


Figure 5.8 : Photo d'une diode ronde (A) et d'une diode rectangulaire (B) encapsulées avec le schéma de connexion correspondant (C).

5.5.2 Mesures électriques

Une fois la fabrication terminée, les performances électriques des diodes ont été mesurées avec une station sous pointes sans illumination ou irradiation (figure 5.9). Les dispositifs ont été placés sur un support et maintenus en place par succion. Le système comprenant l'échantillon, les pointes et le microscope était inclus dans une boîte agissant comme cage de Faraday et bloquant toute lumière provenant de l'extérieur. L'anode et la cathode ont été reliées électriquement à une unité d'analyse à la source (SMU 4200, Keithley) qui a permis de

mesurer la capacité et le courant traversant la diode en fonction de la tension de polarisation. Les mesures de courant ont été faites entre 0 et 4 V en polarisation directe et entre 0 et -30 V en polarisation inverse avec une limite de courant à 10 mA en direct et 100 mA en inverse. Les mesures de capacité ont été faites en polarisation inverse entre 0 et -30 V à 1 MHz.

Pour les détecteurs non encapsulés, une pointe de précision a été placée sur l'anode de la face avant à l'aide d'un microscope. L'anneau de garde a été laissé flottant. Le contact avec la cathode a été effectué par le support à échantillon (figure 5.9). Pour les détecteurs encapsulés, deux pointes ont été placées sur les broches de sortie des dispositifs.

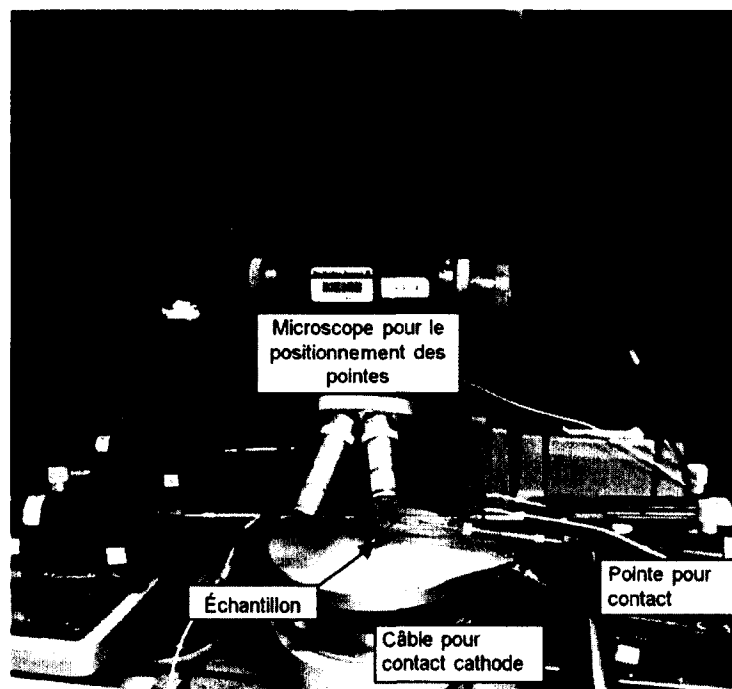


Figure 5.9 : Station sous pointe utilisée pour la caractérisation électrique des dispositifs fabriqués.

L'allure des courbes mesurées a été utilisée pour déterminer si le dispositif avait effectivement un comportement de diode. Le courant de fuite (I_{fuite}) et la capacité des dispositifs ont également été mesurés. De plus, l'épaisseur de la zone désertée W (m) et la concentration en porteurs minoritaires N (cm^{-3}) ont été calculées à partir des équations [Streetman et al., 2005]

$$W = \frac{\epsilon_{Si} \times S}{C} \text{ et} \quad (5.2)$$

$$N = \frac{2}{q \times \epsilon_{Si} \times \alpha'} \quad (5.3)$$

où $\epsilon_{Si} = 1.10^{-10}$ F/m est la permittivité absolue du silicium, S (m^2) est la surface de la diode, C (F) est la capacité de la diode en inversion (valeur prise ici à -30 V), $q = -1,6.10^{-19}$ C est la charge de l'électron et α est la pente de la courbe $(S/C)^2$ prise entre -5 et -15 V (zone la plus stable).

5.5.3 Mesures sous irradiation

Pour la mesure sous irradiation, le détecteur a été relié à une carte de préamplification du commerce (CR-150, Cremat Inc.) puis à un module d'amplification et de mise en forme ($\tau = 500$ ns, gain = 200; 579, Ortec) et enfin à un compteur (770, Ortec) et un oscilloscope numérique (TDS 784A, Tektronix) (figure 5.10A et figure 5.10B).

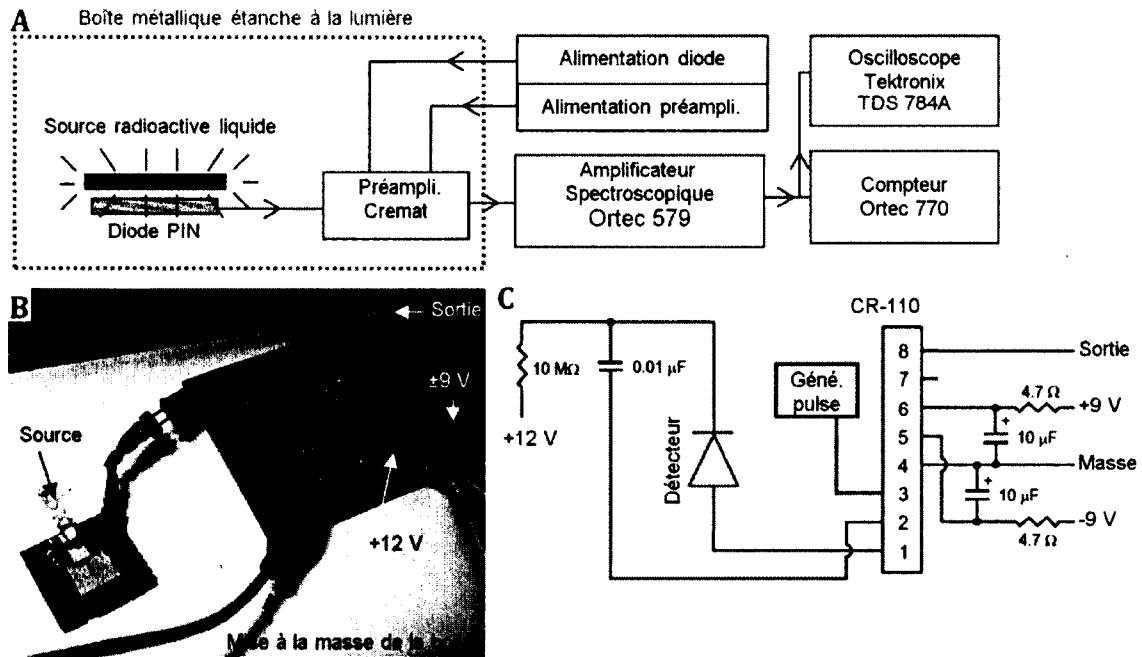


Figure 5.10 : Banc de test pour la mesure d'efficacité de détection des photodiodes. A. Schéma global. B. Photo du détecteur et de la carte de préamplification (la source était ici placée dans un microtube Eppendorf; pour les mesures présentées, la source était contenue dans une section de PE50). C. Schéma de la carte de préamplification.

Le détecteur a été couplé au préamplificateur via une capacité (couplage AC) et alimenté séparément avec une tension de 12 V (figure 5.10C). Une source de 59,2 kBq/ μ l de 18 F-FDG contenue dans une section de PE50 a été placée sur la lamelle de protection du détecteur.

L'efficacité de détection absolue a été mesurée en utilisant le compteur. L'efficacité intrinsèque (section 4.2) ainsi que l'activité minimum détectable (équation (3.1)), ont ensuite été calculées.

Pour le calcul de l'efficacité intrinsèque, la géométrie de détection et la transmission au travers de l'interface entre la source et le détecteur ont été prises en compte. L'angle solide a été estimé suivant l'équation (4.1) et est présenté au tableau 5.1 sous forme de pourcentage par rapport à l'émission sur 4π (ϵ_{geo}). La perte d'énergie dans l'interface a été estimée suivant l'équation (B.7). Dans le cas du détecteur commercial, l'interface était constituée de 0,29 mm de sang (la moitié du diamètre interne du PE50), 0,19 mm de polyéthylène (paroi du PE50) et 0,5 mm d'époxy (couche de protection du détecteur commercial). Pour les détecteurs fabriqués, l'époxy a été remplacée par 0,15 mm de verre. La transmission t est présentée au tableau 5.1 sous forme du pourcentage du spectre du ^{18}F perdu (énergie minimale requise pour traverser l'interface calculée par l'équation (B.7)). Les corrections à apporter à l'efficacité absolue mesurée résultant du facteur géométrique et de transmission ($\epsilon_{\text{geo}} \times t$) sont résumées au tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Corrections pour le calcul de l'efficacité intrinsèque.

	Diode ronde 1 mm	Diode ronde 2 mm	Diode rectangulaire	Diode de référence
ϵ_{geo} (cps/Bq)	0,25	0,35	0,40	0,40
E_{min} (keV)	300	300	300	350
t (%)	0,35	0,35	0,35	0,24
$\epsilon_{\text{geo}} \times t$ (%)	0,09	0,12	0,14	0,10

5.6 Résultats et discussion

5.6.1 Fabrication

Le protocole de fabrication complet est donné en ANNEXE E. L'épaisseur de l'oxyde de champ déposé par croissance humide a été mesurée par ellipsométrie à 700 nm, soit exactement la consigne. Une observation au microscope optique après la première lithographie a permis de vérifier la qualité de cette étape et la conformité des dimensions avec le photomasque (figure 5.11A). Un problème est survenu lors de la gravure de cet oxyde initialement effectuée avec du HF : H₂O (1 : 1). Malgré une bonne définition du motif, la

résine a rapidement décollé après immersion dans la solution de gravure. Après décapage de la résine, une image a été prise au microscope optique et montre un dégradé de couleur sur les bords des motifs, indicateur d'un gradient d'épaisseur (figure 5.11B). Une mesure à l'ellipsomètre dans la région active a permis de déterminer qu'il restait 350 nm d'oxyde à graver sur les 700 nm initiaux. Une seconde photolithographie a donc été effectuée sur les échantillons décapés avec une couche de promoteur d'adhésion sous la résine (HMDS). Les échantillons ont ensuite été gravés avec une solution de BOE au lieu de la solution au HF. Une mesure au profilomètre après décapage de la résine a permis de vérifier que l'épaisseur de l'oxyde de champ était comprise entre 600 et 700 nm, épaisseur suffisante pour le masque d'implantation. Une image du dispositif final est présentée à la figure 5.11C.

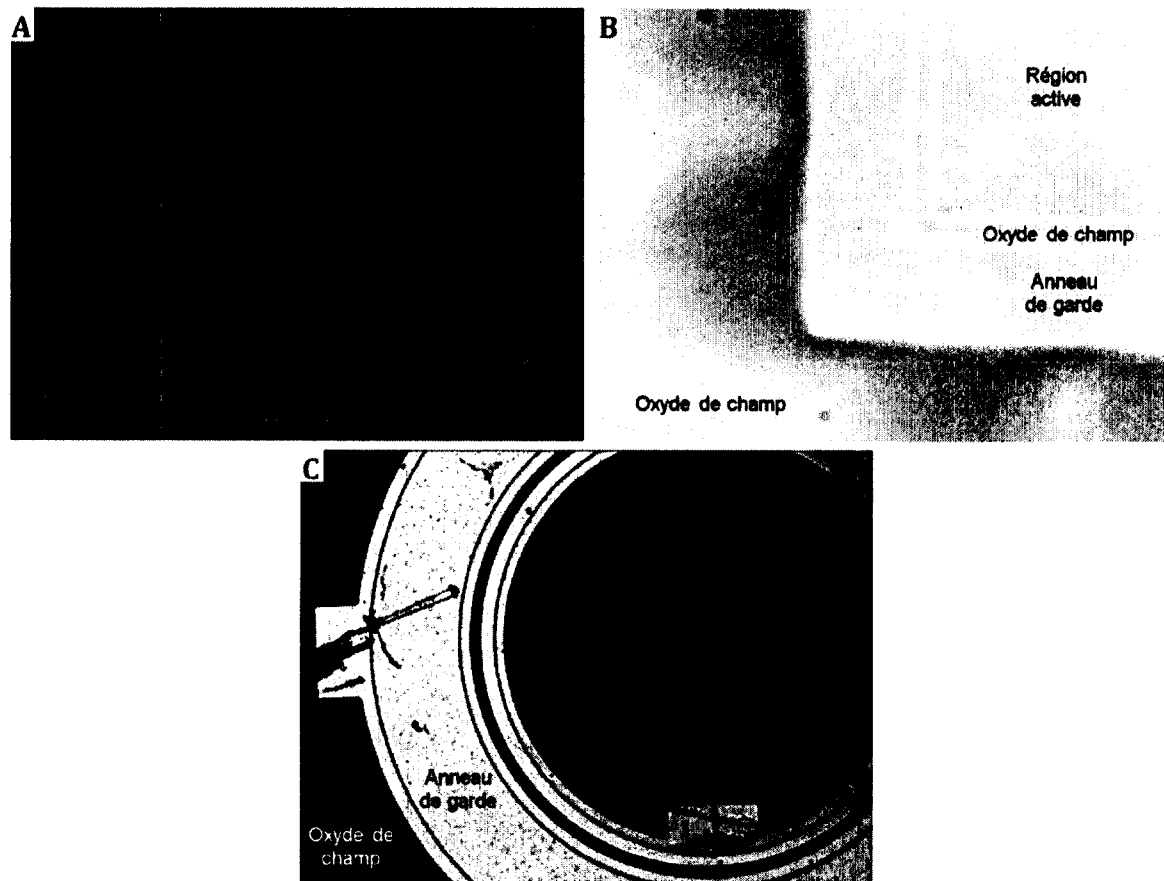


Figure 5.11 : Photo de diodes en cours de fabrication (microscope optique, 10 X). A. Diode ronde après la première photolithographie. B. Coin d'une diode rectangulaire après la première gravure partielle au HF. C. Diode ronde à la fin du procédé de fabrication et après caractérisation électrique. Les traces sur l'aluminium sont dues au frottement des pointes. La caractérisation ayant été effectuée hors salles blanches, de la poussière est également visible sur la surface active.

De nombreux échantillons ont été perdus à cause d'un dysfonctionnement du déchargement automatique en sortie de l'implanteur (gaufre C067 cassée). D'autres ont été perdus suite à un court nettoyage dans du HF avant les mesures électriques (gravure de l'aluminium de contact). Les échantillons disponibles pour les mesures électriques étaient donc :

- Un dispositif de chaque géométrie non passivé et encapsulé (gaufre Topsil);
- Deux diodes rondes 1 mm (gaufre Topsil);
- Une diode ronde 1 mm et deux diodes rondes 2 mm passivées au nitrure (gaufre Atomergique);
- Une diode ronde de 1 mm (gaufre Atomergique).

5.6.1 Mesures électriques

Les courbes CV et IV mesurées sur les différents détecteurs ont un comportement de diode, indiquant que les dispositifs fabriqués sont fonctionnels (figure 5.12).

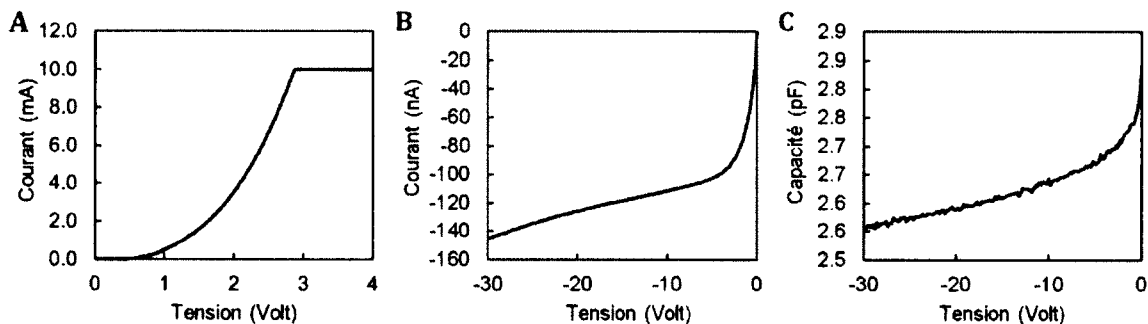


Figure 5.12 : Courbes CV-IV des diodes fabriquées, exemple de la diode ronde 1 mm sur gaufre Topsil (courant en polarisation directe (A), courant en polarisation inverse (B), capacité en polarisation inverse (C)).

Les différentes caractéristiques électriques mesurées sur les détecteurs non encapsulés et encapsulés sont résumées au tableau 5.2. Les calculs d'épaisseur de zone désertée et de densité de porteurs dans la zone intrinsèque n'ont pas été faits pour les détecteurs encapsulés puisque l'encapsulation modifie la capacité. Dues aux pertes en cours de fabrication, ces valeurs sont des mesures sur des diodes uniques et non des moyennes sur plusieurs détecteurs d'un même type.

Ces résultats démontrent que les deux substrats testés ont une pureté équivalente (N) et que la zone désertée a une profondeur d'environ 100 μm à -30 V. De plus, le détecteur de

référence a un courant de fuite comparable aux valeurs trouvées dans la littérature ($\sim 1 \text{ nA/cm}^2$). Les détecteurs fabriqués non encapsulés ont un courant de fuite deux à quatre ordres de grandeur plus important que la valeur de référence (I_{fuite}/S), le détecteur le plus performant étant celui provenant de la gaufre Atomergic. Comme la résistivité semble comparable à celle de la gaufre Topsil, la performance de la diode Atomergic est peut-être imputable au polissage de la face arrière. Il est cependant difficile de tirer des conclusions sur un nombre aussi limité d'échantillons.

Tableau 5.2 : Caractéristiques électriques des détecteurs fabriqués.

	C (pF) (-30 V)	W (μm) (-30 V)	N (cm^{-3})	S (cm^2)	I_{fuite} (nA) (-30 V)	I_{fuite}/S (nA/ cm^2) (-30 V)
Non encapsulées						
Atomergic Ronde 1 mm	2,99	104	$5,05 \cdot 10^{13}$	$7,85 \cdot 10^{-3}$	4,5	$5,73 \cdot 10^2$
Atomergic Ronde 1 mm passivée	3,12			$7,85 \cdot 10^{-3}$	14,5	$1,85 \cdot 10^3$
Topsil Ronde 1 mm	2,55	121	$2,01 \cdot 10^{13}$	$7,85 \cdot 10^{-3}$	146	$1,86 \cdot 10^4$
Encapsulées						
Topsil Ronde 1 mm	3,38			$7,85 \cdot 10^{-3}$	$1,74 \cdot 10^4$	$2,22 \cdot 10^6$
Topsil Ronde 2 mm	4,42			$3,14 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^5$	$3,47 \cdot 10^6$
Topsil Rectangulaire	40,8			0,9	$4,49 \cdot 10^7$	$4,99 \cdot 10^7$
Référence Rectangulaire	52,8			0,9	1,33	1,36

Le meilleur des détecteurs fabriqués est donc deux ordres de grandeur plus bruyant que le détecteur de référence. Plusieurs solutions pour diminuer le bruit sont proposées dans la littérature :

- Utiliser un substrat $\langle 100 \rangle$ plutôt que $\langle 111 \rangle$ pour diviser par deux le courant de fuite [Holland, 1989; Kemmer, 1984];
- Utiliser une oxydation sèche plutôt qu'humide pour améliorer la qualité de l'oxyde de champ;

- Limiter les contaminants lors de la fabrication pour limiter le nombre de défauts dans la région active (principalement la propreté du four de recuits, mais aussi celle des béciers de nettoyage, des pinces, des supports d'étalement et d'exposition de résine);
- Augmenter les doses d'implantation des zones p+ et n+ afin d'obtenir un champ électrique plus important et de meilleurs contacts (1.10^{19} atomes/cm³). Un recuit à plus haute température permettrait également de mieux réparer les dommages dus à l'implantation et d'activer une plus grande partie des dopants.
- Utiliser une couche de polysilicium dopée *in situ* au phosphore comme contact arrière pour former une couche de récupération de défauts (porteurs minoritaires) hors de la région active [Holland, 1989]. Cette couche permet de limiter le courant de fuite de trois à cinq ordres de grandeur. Le dopage *in situ* n'est cependant pas disponible au CRN2, il serait par contre possible de déposer une couche de polysilicium et de la doper par implantation ionique.

Le tableau 5.2 montre également que l'encapsulation très rudimentaire de ces premiers prototypes augmente le bruit de fond d'un facteur cent pour les diodes rondes. Elle sera donc à revoir pour les prochains prototypes. De plus, la passivation au nitrure n'a pas été efficace, elle semble au contraire augmenter le bruit. Cette dernière n'ayant pas été faite immédiatement après la fabrication des dispositifs, d'autres tests seront à prévoir. Une passivation au SiO₂ pourrait donner une meilleure qualité d'interface. La passivation au nitrure serait alors faite par-dessus le SiO₂. Une passivation chimique par un nettoyage standard de type RCA (Radio Corporation of America) peut également être envisagée avant un dépôt d'aluminium sur toute la région active, ce qui permettrait de couper les photons visibles. Une couche supplémentaire de nitrure donnerait la dureté et la stabilité requise.

5.6.2 Mesures sous irradiation

Toutes les diodes testées ont permis de détecter avec succès la source de ¹⁸F. L'efficacité absolue de détection mesurée pour les trois géométries fabriquées est un à deux ordres de grandeur plus faible que pour le détecteur de référence (tableau 5.3). En faisant abstraction de la géométrie, l'efficacité intrinsèque des diodes est diminuée d'un facteur 15 à 32 pour les diodes rondes par rapport au détecteur de référence et d'un facteur 319 pour la diode

rectangulaire. Cette différence d'efficacité est imputable à la fois au détecteur lui-même et à l'encapsulation. Des optimisations sont donc à prévoir pour ces deux paramètres. Il est à noter que le bruit de la chaîne de mesure est responsable d'une partie des pertes. Ce bruit est cependant le même pour tous les détecteurs.

Tableau 5.3 : Efficacité de détection avec une source de ^{18}F pour les détecteurs encapsulés. L'efficacité absolue est mesurée, l'efficacité intrinsèque est calculée en fonction de la géométrie de détection. L'activité minimum détectable est calculée à partir de l'efficacité intrinsèque.

	Diode ronde 1 mm	Diode ronde 2 mm	Diode rectangulaire	Diode de référence
Volume de détection (μl)	0,26	0,53	7,93	7,93
ϵ_{geo} (cps/Bq)	0,21	0,14	0,02	3,19
ϵ_{int} (%)	2,4	1,1	0,1	31,9
Activité minimum détectable (Bq/ μl)	2055	2255	1307	5

Les tendances observées pour l'efficacité intrinsèque se retrouvent en termes d'activité minimum de détection, avec l'influence supplémentaire du volume de détection. Si l'on compare ces valeurs avec les 15 Bq/ μl requis dans le cahier des charges, le détecteur de référence dépasse les attentes d'un facteur trois en considérant une efficacité géométrique parfaite et aucune atténuation avant le détecteur (A_{min} calculé à partir de ϵ_{int}). La diode rectangulaire ayant le plus grand volume de détection a une activité minimum détectable 87 fois supérieure à la consigne, ce qui est tout de même encourageant pour une première preuve de concept.

5.7 Conclusion

Des détecteurs de particules ont été fabriqués avec succès suivant un procédé planaire standard au CRN2. Malgré un courant de fuite assez élevé, les efficacités de détection de radiation sont très encourageantes. Plusieurs pistes de solutions ont été identifiées pour atteindre les objectifs fixés dans le cahier des charges. Tel que cité au début du chapitre, cependant, l'optimisation d'un détecteur de ce type est un projet en soi. En effet, un projet de maîtrise a été mené en parallèle afin d'optimiser les détecteurs fabriqués au CRN2. Pour le

présent projet, nous avons plutôt opté pour la poursuite avec des diodes *p-i-n* optimisées non encapsulées fournies par notre collaborateur industriel (Excelitas Technologies, précédemment PerkinElmer). L'intégration des canaux microfluidiques se fera donc directement sur les gaufres fournies par Excelitas Technologies, selon un procédé de microfabrication développé spécialement pour le projet décrit au chapitre suivant.

CHAPITRE 6 MICROCANAUX SUR DÉTECTEUR DE PARTICULES

6.1 Avant-propos

Auteurs et affiliations :

Laurence Convert : Étudiante au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Frédérique Girard Baril : Étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Alan Renaudin : Stagiaire post-doctoral, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Étienne Grondin : Professionnel de recherche, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Abdelatif Jaouad : Professionnel de recherche, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Vincent Aimez : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Paul Charette : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Roger Lecomte : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine et sciences de la santé, Département de médecine nucléaire et radiobiologie.

Date d'acceptation : 21 septembre 2010.

État de l'acceptation : Version finale publiée.

Revue : Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.

Référence : Convert, L., Girard Baril, F., Renaudin, A., Grondin, É., Jaouad, A., Aimez, V., Charette, P., & Lecomte, R. (2011). High efficiency microfluidic beta detector for pharmacokinetic studies in small animals. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, volume 652, numéro 1, p. 735–738.

Titre français : Détecteur microfluidique haute efficacité de particule bêta pour les études pharmacocinétiques chez le petit animal.

Contribution au manuscrit :

Au chapitre précédent, une preuve de concept a été réalisée pour la fabrication de détecteurs de radioactivité au CRN2. Des premiers résultats encourageants ont mené à la création d'un projet de maîtrise pour leur optimisation. La conception et la fabrication de canaux microfluidiques répondants aux objectifs du cahier des charges ont été poursuivies dans le cadre du présent projet. Une première validation sur silicium a été présentée en conférence [Convert et al., 2008b]. Le procédé a ensuite été réalisé sur des gaufres de diodes *p-i-n* provenant directement des chaînes de production d'un industriel. Ces détecteurs aux performances optimales permettent de caractériser la géométrie de détection des canaux microfluidiques dans les meilleures conditions possibles. Le présent chapitre décrit et évalue les performances du premier prototype de microcanaux en KMPR sur détecteur *p-i-n* avec des modules électroniques commerciaux. Les caractéristiques sont évaluées pour la mesure de radioactivité en temps réel, indépendamment des autres fonctions que comprendra la puce microfluidique finale. Afin de mettre en valeur les avantages de la microfluidique pour réaliser cette fonction, le détecteur microfluidique est comparé à une géométrie de référence composée d'une section de cathéter PE50 placée sur une diode commerciale encapsulée. En plus d'augmenter l'efficacité de détection et de réduire le volume de sang nécessaire, la puce microfluidique permet de détecter les radiotraceurs TEM marquée au ^{99m}Tc . À notre connaissance, c'est la première fois qu'on rapporte ce résultat.

Cet article révisé avec comité de lecture est publié dans un numéro spécial du journal *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* présentant les travaux de la conférence *Symposium on Radiation Measurements and Applications (SORMA) XII 2010*.

Contributions respectives des auteurs de l'article :

J'ai conçu et fabriqué les dispositifs présentés dans cet article, j'ai également réalisé et analysé toutes les expériences présentées et j'ai écrit l'article. Frédérique Girard-Baril a développé et réalisé l'encapsulation des dispositifs. Alan Renaudin, Étienne Grondin et Abdelatif Jaouad ont contribué au développement du protocole de fabrication des microcanaux sur détecteurs de radioactivité. Vincent Aimez, Paul Charette et Roger Lecomte ont encadré l'ensemble des travaux présentés. Tous les coauteurs ont révisé l'article.

Résumé français :

De nouveaux radiotraceurs sont continuellement développés pour augmenter l'efficacité diagnostique en TEP et en TEM. La caractérisation de leur pharmacocinétique requiert le suivi dans le temps de la radioactivité sanguine pendant toute la séquence d'imagerie, ce qui est très difficile chez les petits animaux à cause du faible volume de sang disponible. Dans ce travail, un prototype de compteur sanguin microfluidique est proposé pour augmenter l'efficacité de détection des particules bêta dans un faible volume en éliminant toute interface non nécessaire entre le fluide et le détecteur. Un canal rectangulaire en époxy de section $36 \mu\text{m} \times 1,26 \text{ mm}$ a été fabriqué sur un substrat contenant une matrice de photodiodes *p-i-n* de $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$. L'interface entre le fluide et la zone de détection des photodiodes n'est alors que de quelques micromètres. Cette géométrie conduit à une source quasi 2D qui optimise l'efficacité de détection géométrique, estimée à 41 % par calcul d'angle solide. Des mesures CV et IV ont été faites à chaque étape de fabrication et confirment que le microcanal n'a pas d'effet significatif sur les caractéristiques électriques des diodes. La puce a été micro soudée à un circuit imprimé et connectée à des modules de préamplification de charge et d'amplification pour la mise en forme du signal. Des spectres en énergie ont été mesurés pour différents isotopes montrant un spectre continu pour les isotopes TEP et un pic monoénergétique pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La sensibilité absolue a été mesurée pour les radiotraceurs TEP et TEM les plus courants. Elle varie de 26 à 33 % en TEP (^{18}F , ^{13}N , ^{11}C , ^{68}Ga) et est de plus de 2 % pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Une fonction d'entrée a été simulée avec succès avec du ^{18}F , confirmant que le système est adéquat pour les études pharmacocinétiques en TEP et TEM pour petits animaux. Utilisant des procédures et des matériaux standards, ce protocole de fabrication est bien adapté pour l'ajout de fonctionnalités sur une même puce, permettant la caractérisation complète de nouveaux radiotraceurs.

6.2 Introduction

New radiotracers are continuously being developed to improve diagnostic efficiency in nuclear medicine using Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) or Positron Emission Tomography (PET) [Cherry et al., 2001]. Before being used in humans, the pharmacokinetics of new radiolabelled molecules must be fully characterized in small animals, which involves repetitive blood sampling and analysis. Manual sampling requires fairly large amounts of blood besides being technically difficult and time-consuming, especially with mice. Real-time counters connected to a blood vessel of the animal during PET or SPECT scans offer a convenient way to partially characterize radiotracers [Laforest et al., 2005]. Such devices make it possible to withdraw small quantities of blood under tightly controlled conditions without affecting the animal homeostasis, providing a measure of whole blood radioactivity as a function of time during the scan, the so-called input function.

The input function can be measured by detection of the gamma or beta radiation. Beta counters have several advantages for small animal experiments, including small footprint and low sensitivity to ambient gamma radiation background. Typical on-line beta particle counters are made of commercially packaged detectors placed next to a catheter carrying blood. However, in such configurations, low energy beta radiation is mostly stopped by the catheter wall and detector protective layer before reaching the active region of the detector, thus reducing detection efficiency.

Microfluidic devices are miniaturized channel networks based on microelectronic fabrication processes, which provide several advantages for blood sampling in small animals, such as minimum footprint, small working volumes, short reaction time and low fabrication cost, as well as the possibility of multiple serial or parallel operations. Thus, microfluidic technology allows working with small blood volumes, while also potentially improving detection solid angle and reducing interface thickness between sample and detector to maximize detection efficiency.

Input functions have been obtained using microfluidic devices, but not with embedded radiation detection. Blood withdrawn with a microfluidic device was measured off-line using a gamma well counter [Wu et al., 2007]. In other cases, radiation detectors have been coupled to microfluidic devices [Cho et al., 2007, 2009; Yu et al., 2008] for cell imaging, but the

thickness of interface layers between sample and diode was significant and the absolute detection efficiency remained limited.

In this work, a microfluidic channel was built directly above an unpackaged *p-i-n* silicon photodiode array to overcome these limitations by eliminating unnecessary interfaces between blood and the photodiode detection layer.

6.3 Materials and methods

The prototype was made of a $0.036 \times 1.26 \times 31.5 \text{ mm}^3$ ($1.4 \text{ }\mu\text{L}$) rectangular microchannel microfabricated over a $44 \times 22 \text{ mm}^2$ die containing a continuous matrix of $2 \times 2 \text{ mm}^2$ *p-i-n* photodiodes provided by PerkinElmer (Vaudreuil, QC, Canada) (Figure 6.1). The actual detection volume of the device was calculated using the microchannel length directly exposed to the diodes used for radiation detection (10 diodes, 20 mm long, 907 nL). This first prototype was made from existing photomasks for demonstration purposes and as a result the microchannel is not perfectly centered over the diodes detection area (Figure 6.2).

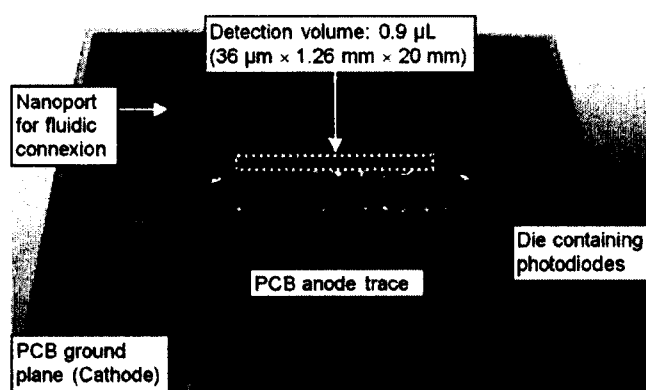


Figure 6.1: Picture of the microfluidic device.

After wafer dicing, the channel floor and wall layers were deposited directly onto the photodiode substrate by spin coating and UV patterning of KMPR [Convert et al., 2008b], an epoxy based photoresist from Microchem (Newton, MA, USA) (Figure 6.2). A glass cover slip (1916-25075, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA), previously wet etched, was then bonded with a thin layer of KMPR to form the channel roof. All sides of the microchannel were thus made out of the same material.

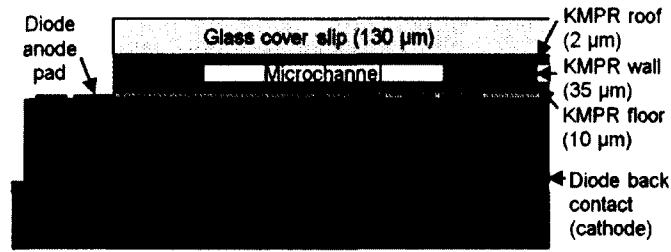


Figure 6.2: Schematic cross-sectional view of the microfluidic device made out of existing photomasks for demonstration purposes (thicknesses not to scale).

Nanoports (N126H, Upchurch, Oak Harbor, WA, USA) were added on the glass cover for fluidic connections. After microchannel fabrication, the sample was bonded onto the ground plane of a gold-plated custom-made PCB using silver paint (05002-GA, SPI Supplies, West Chester, PA, USA), ensuring the back contact connection to the common cathode. The 10 anode (top) contacts were then wire-bonded to a common PCB pad to connect the photodiodes in parallel.

CV-IV measurements were made on each single diode element using a Source Measurement Unit (4200-SCS, Keithley Instruments Inc., Cleveland, OH, USA) to check for any deleterious effects on photodiode performance. For validation, the electrical characteristics of the complete prototype (10 diodes in parallel, $2 \times 20 \text{ mm}^2$ detection surface) were compared to the characteristics of a commercially packaged detector of comparable size (Hamamatsu, S3588-08, $3 \times 30 \text{ mm}^2$), used as a reference.

The flat rectangular-shaped channel geometry (Figure 6.3A) leads to a quasi 2D source, maximizing beta detection efficiency. Estimates were made by simulations using the TracePro software (Lambda Research, Littleton, MA, USA). Linear ray tracing from the central portion of the microchannel was used and detectors were considered as perfect absorbers. Numerical simulation results give the geometrical detection efficiency corresponding to the number of rays hitting the detectors divided by the number of emitted rays. As a comparison, simulations were also performed for a conventional geometry (Figure 6.3B) consisting of the Hamamatsu detector placed next to a thin wall catheter (0.58 mm ID & 0.965 mm OD, Intramedic PE50, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

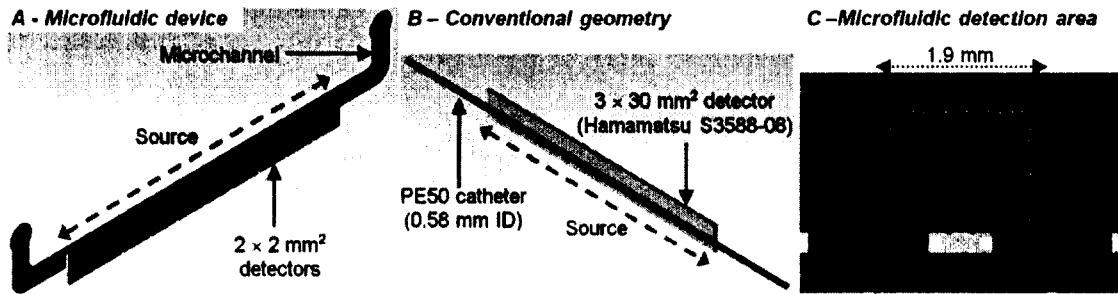


Figure 6.3: Configurations used for geometrical detection efficiency simulations: microfluidic device (A) and conventional geometry (B). For the diodes used in the microfluidic device (C), the overall diode surface (2) was considered to better account for the active detection area than the implanted area (1).

Detection efficiency was also maximized by designing the device to leave less than $10\ \mu\text{m}$ of KMPR between the radioactive fluid and the photodiodes, whereas the conventional detector assembly geometry comprises $500\ \mu\text{m}$ of protection epoxy in addition to $193\ \mu\text{m}$ of catheter wall between fluid and diode. The energy loss before reaching the active layer in the microfluidic device is therefore only $2\ \text{keV}$ for a $250\ \text{keV}$ positron, compared to $177\ \text{keV}$ for the conventional geometry with the Hamamatsu detector ([National Institut of Standards and Technology, n.d.-a]).

The microfluidic device and conventional detector were consecutively connected to preamplifier (CR110-INST, Cremat Inc., Watertown, MA, USA) followed by amplifier (CR200-250ns-INST, Cremat Inc.) modules for pulse amplification (gain = 46) and shaping ($\tau = 250\ \text{ns}$) (Figure 6.4). Radioactive solutions were prepared and calibrated in a gamma well counter to obtain a concentration of $5\ \text{kBq}/\mu\text{L}$ of the most popular PET radioisotopes (^{18}F , ^{13}N , ^{11}C , ^{68}Ga) and $50\ \text{kBq}/\mu\text{L}$ of the ubiquitous SPECT tracer $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A few microliters of radioactive solutions were then injected in the microfluidic channel as well as in a catheter section centered over the Hamamatsu detector for comparison. All acquisitions were performed with a detector reverse voltage of $-50\ \text{V}$ ensuring that the *p-i-n* junctions were totally depleted. The detection threshold level was set to $60\ \text{keV}$.

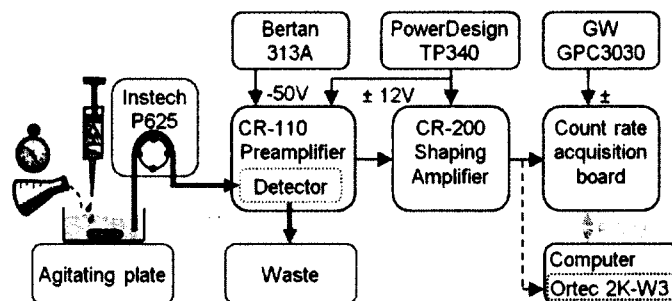


Figure 6.4: Schematic of the acquisition setup. The Ortec MCA card was used only for the acquisition of energy spectra, and the Instech peristaltic pump was used only for input function simulation.

Energy spectra from the microfluidic detecting device were recorded at the amplifier output for 5 min (^{68}Ga), 10 min (^{18}F) or 40 min ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) with a multichannel analyzer (Trump 2K-W3, Ortec, Oak Ridge, TN, USA). The amplifier output was then digitized using a custom-made acquisition board with threshold level adjustment, pulse counting and computer communication hardware [Convert et al., 2007b]. Count rate was recorded for two minutes to assess the sensitivity of the microfluidic device and the conventional detector to all isotopes. Mean count rates were corrected for radioactive decay between calibration and measure. Absolute detection efficiency was calculated using the following equation:

$$\text{Detection efficiency (\%)} = \frac{\text{Mean count rate (CPS)}}{\text{Solution concentration } \left(\frac{\text{Bq}}{\mu\text{L}}\right) * \text{Detection volume } (\mu\text{L})} \quad (6.1)$$

An improvement factor was also calculated as:

$$\text{Improvement factor (\%)} = \frac{\text{Microfluidic device detection efficiency}}{\text{Conventional geometry detection efficiency}} \quad (6.2)$$

As 511 keV photon interaction probability in 250 μm thick Si is only 0.5% ([National Institut of Standards and Technology, n.d.-b]), all detected events were attributed to beta particles. At 140 keV, the probability increases slightly to 0.8%.

Finally, a peristaltic pump (P625, Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) was used to draw water from a vial through the microfluidic device (Figure 6.4) via two 30 cm long sections of PE10 catheter (0.28 mm ID, Becton Dickinson) connected to the 30 cm long pump tube (0.5 mm ID, Instech Laboratories Inc.). An input function was simulated by injecting 0.2 ml of solution containing 10 MBq of ^{18}F in 3 ml of water followed one minute

later by dilution with 12 ml of water. Count rates recorded by the acquisition software during 30 min were converted to activity using:

$$\text{Activity (Bq/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Count rate (CPS)}}{(\text{Detection sensitivity (CPS/Bq)} * \text{Detection volume (}\mu\text{L)})} \quad (6.3)$$

The curve was also decay-corrected to the beginning of the acquisition.

6.4 Results and discussion

The mean capacitance of single photodiodes was not significantly different before and after microchannel fabrication (2.43 ± 0.25 pF @ -30 V after fabrication compared to 2.4 pF before). The mean reverse-bias dark current was significantly reduced after channel fabrication (0.27 ± 0.02 nA @ -38 V after fabrication compared to 0.58 nA before). This improvement may be due to increased surface stability at the KMPR/semiconductor interface. The complete prototype characteristics ($I_{\text{dark}} = 2.4$ nA @ -38 V; $C = 29$ pF @ -30 V) were comparable to those of the Hamamatsu diode ($I_{\text{dark}} = 1.3$ nA @ -38 V; $C = 52$ pF @ -30 V).

Solid angle calculation yielded a geometrical efficiency of 41% for the microfluidic device versus 30% for the conventional geometry, demonstrating the advantages of the flat microchannel placed directly above the detectors. It should be noted that the detection area considered for these simulations (1.9×1.9 mm²) encompasses the diodes overall dimensions rather than the active area corresponding to the implanted junction (1.5×1.3 mm²) (Figure 6.3C). This extended area is believed to more accurately account for the actual active detection region of the biased diodes. In this way, electron-hole pairs generated near the depleted region and diffusing into it are then also considered.

Energy spectra measured with the microfluidic device for ¹⁸F and ⁶⁸Ga (Figure 6.5) show continuous energy distributions with a distorted shape due to the fact that higher energy particles are not entirely stopped in the 250 μ m active thickness of the detector [National Institut of Standards and Technology, n.d.-b; Wang, 1969]. Distortion is more pronounced for ⁶⁸Ga, which emits positrons having a mean energy more than three times higher than ¹⁸F.

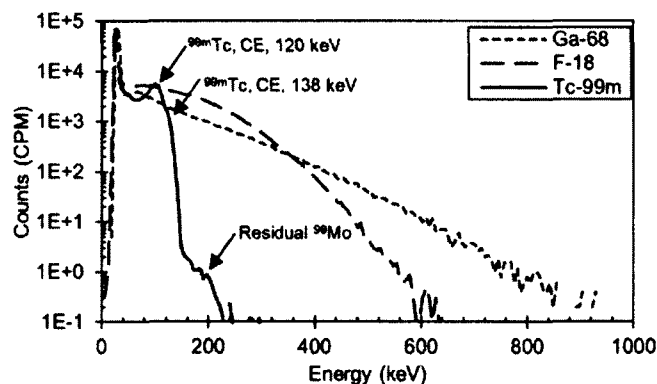


Figure 6.5: Energy spectra recorded for ^{68}Ga , ^{18}F and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ with the microfluidic device (5-50 kBq/ μL , 5-40 min acquisition).

For $^{99\text{m}}\text{Tc}$, which does not produce beta particles but emits fairly low energy conversion electrons (120 and 138 keV, see Table 6.1), two peaks can be identified together with the expected lower energy distribution resulting from the electron energy loss in the blood sample. An interesting feature that demonstrates the sensitivity of this microfluidic detector is the presence of higher energy radiation in the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ spectrum, likely due to normal contamination by residual ^{99}Mo (average beta energy: 133 and 443 keV) from the $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator (USP standards require $<0.01\%$). Finally, as expected from their low interaction probability, 140 keV gamma rays and 511 keV annihilation photons are not visible in these spectra, although some Compton events may be overlaid by the beta or conversion electron spectra.

Table 6.1: Absolute detection efficiency for microfluidic device and reference detector measured for different isotopes (5-50 kBq/ μL). Only particle energies ≥ 60 keV and interaction probability $\geq 1\%$ were considered.

Isotope	Average positron energy (keV)	Conversion electron energy (keV)	Emission probability (%)	Microfluidic detection efficiency (%)	Reference detection efficiency (%)	Improvement factor
^{68}Ga	353		1	29.0	15.2	1.9
	836		88			
^{13}N	492		100	33.0	16.4	2.0
^{11}C	386		100	29.8	12.5	2.4
^{18}F	250		97	26.1	4.4	5.9
$^{99\text{m}}\text{Tc}$		120	9	2.2	0.05	48.1
		138	1			

The absolute detection efficiency of the microfluidic device ranges from 26% to 33% for the PET isotopes, which is 2 to 6 times better than the conventional-geometry detector (Table 6.1). Due to the very thin interface between sample and detector, the improvement in detection efficiency is better for low energy emitting isotopes like ^{18}F . For the same reason, detection efficiency is less dependent on the positron energy than with a commercially packaged detector used with a catheter. As positrons emitted by ^{68}Ga have the highest energy of all tested isotopes, it would be expected to have the highest detection efficiency. The lower sensitivity measured for this isotope results from the lower branching ratio for positron decay than with the other isotopes. Finally, the very thin interface between the blood sample and detector sensitive area makes it possible to detect low-energy internal conversion electrons with an efficiency of more than 2%. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled SPECT radiopharmaceuticals can therefore be investigated with our microfluidic device, which was impossible with the previous approach using a catheter.

An input function measurement was successfully simulated, demonstrating that the setup would be suitable for animal experiments (Figure 6.6). No significant radiotracers adhesion to the microchannel walls was observed as the count rate returned back to the background level when the microfluidic chip was filled with water after experiments. However, surface modifications may be required before a prolonged exposure to blood samples.

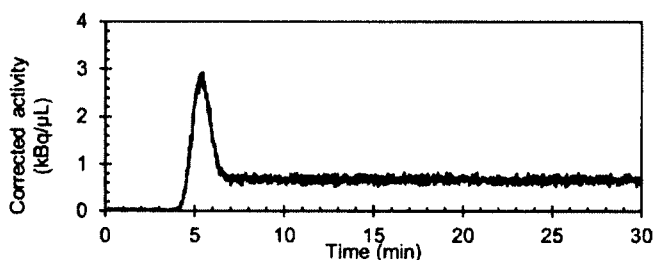


Figure 6.6: Input function simulated by injecting 10 MBq of ^{18}F in 3 mL of water followed 1 min later by a 5:1 dilution. The curve was decay-corrected to time $t = 0$.

Further improvement of the detection efficiency would be possible by using a narrower channel centered over the diode detection layer. With this improved geometry, a quasi perfect geometrical detection efficiency of 49% would then be achieved (considering that half of the positrons are emitted in the direction opposite to the detector). The overall detection efficiency would therefore be expected to range from 32% to 41% for positron emitters and nearly 3% for $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

6.5 Conclusion and future work

A microchannel was successfully fabricated above unpackaged *p-i-n* photodiodes to maximize the detection efficiency by eliminating all unnecessary interfaces between the fluid and the photodiode detection layer. The microfluidic chip provides high efficiency direct positron and low-energy internal conversion electron for PET and SPECT radiotracers characterization. Further improvement in detection efficiency is readily possible by optimally matching the channel size to the photodiode sensitive area. The fabrication process does not alter photodiode performance and allows the addition of microfluidic functionalities on-chip to provide more complete characterization of new radiotracers.

6.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Henri Dautet of PerkinElmer for supplying the *p-i-n* photodiode wafers used in this study, and the CRN2 staff for microfabrication support.

CHAPITRE 7 MODIFICATION DE SURFACE DE LA KMPR

7.1 Avant-propos

Auteurs et affiliations :

Laurence Convert : Étudiante au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Vincent Chabot : Étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Pierre-Jean Zermatten : Stagiaire post-doctoral, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Raymond Hamel : Étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Jean-Pierre Cloarec : Professeur, Institut des Nanotechnologies de Lyon site École Centrale de Lyon, Université de Lyon

Roger Lecomte : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine et sciences de la santé, Département de médecine nucléaire et radiobiologie.

Vincent Aimez : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Paul Charette : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

État de l'acceptation : Accepté le 09/07/2012.

Revue : Sensors and Actuators B : Chemical

Référence : Convert, L., Chabot, V., Zermatten, P.-J., Hamel, R., Cloarec, J.-P., Lecomte, R., Aimez, V., & Charette, P. G. (2012). Passivation of KMPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061>.

Titre français : Passivation de canaux microfluidiques en KMPR avec de l'albumine pour une héocompatibilité améliorée caractérisée avec des guides d'ondes à gaine métallique.

Contribution au manuscrit :

Au chapitre précédent, un premier prototype de canaux en KMPR sur détecteurs *p-i-n* a été fabriqué et caractérisé avec différentes solutions radioactives démontrant le grand potentiel de ces choix technologiques et incitant à poursuivre les développements dans cette voie. La KMPR est très similaire à la SU-8, une photorésine généralement considérée comme biocompatible [Kotzar et al., 2002; Voskerician et al., 2003], mais ayant une hémocompatibilité limitée [Weisenberg et al., 2002]. Avant d'entreprendre des tests avec des animaux, l'hémocompatibilité de cette résine doit être rehaussée.

L'hémocompatibilité d'un matériau réfère à sa compatibilité avec le sang et principalement son aptitude à ne pas déclencher de coagulation. La coagulation a pour but d'arrêter le saignement d'un vaisseau sanguin blessé. Elle peut également être provoquée lorsque le sang est exposé à des surfaces artificielles [Ratner et al., 2004]. Ce processus implique une série de réactions interdépendantes entre la surface, les plaquettes et les protéines de coagulation aboutissant à la formation d'un caillot sanguin. Ce dernier peut ensuite être dissout par fibrinolyse via une enzyme, la plasmine. Les plaquettes sont des fragments de cellules anucléées de forme discoïde comportant de nombreux récepteurs de type GPIb et GPIIb/IIIa à leur surface. Lorsqu'un vaisseau sanguin est blessé, du collagène est exposé. Avec la participation du facteur de von Willebrand (vWF, une protéine plasmatique), les plaquettes adhèrent au collagène par leur récepteur GPIb. Cette adhésion active les plaquettes qui changent alors de forme (sphères irrégulières avec des pseudopodes épineux), deviennent plus collantes et sécrètent des facteurs de coagulation qui activent d'autres plaquettes de la circulation sanguine et entraînent la formation de fibrine. Les plaquettes s'agrègent alors de manière irréversible et forment un caillot stable qui colmate la brèche (figure 7.1).

Les plaquettes sont extrêmement sensibles et peuvent répondre à une stimulation minimum. Leur activation est donc rapidement amplifiée. Le processus de coagulation reste cependant localisé proche de la blessure grâce à la dilution des facteurs de coagulation par la circulation sanguine et à la présence d'inhibiteurs. La haute réactivité des plaquettes est également responsable du fait que du sang stagnant coagule rapidement.

Dans le cas des surfaces artificielles, l'adhésion initiale des plaquettes se fait plutôt par les récepteurs GPIIb/IIIa qui permettent la liaison avec certaines protéines plasmatiques, appelées

ici des protéines de coagulation, soit principalement le fibrinogène, le vWF, la fibronectine et la vitronectine. Les plaquettes ne reconnaissent cependant pas ces protéines de coagulation lorsqu'elles sont en circulation dans le plasma. Par contre, quand elles adhèrent à une surface, les protéines subissent des modifications de conformation qui permet leur adhésion aux récepteurs des plaquettes. Ces dernières n'interagissent donc pas directement avec le matériau étranger, mais plutôt avec les protéines de coagulation qui y sont adsorbées. Une surface artificielle n'est ainsi pas bioréactive en elle-même, elle le devient après l'exposition à certaines protéines plasmatiques. Pour ne pas engendrer de coagulation, une surface artificielle doit donc éviter l'adhésion de ces protéines. Il est intéressant de noter que l'albumine, la protéine plasmatique la plus courante, ne fait pas partie des protéines de coagulation. Par contre, elle adhère aussi bien aux surfaces artificielles et empêche ensuite l'adhésion d'autres protéines.

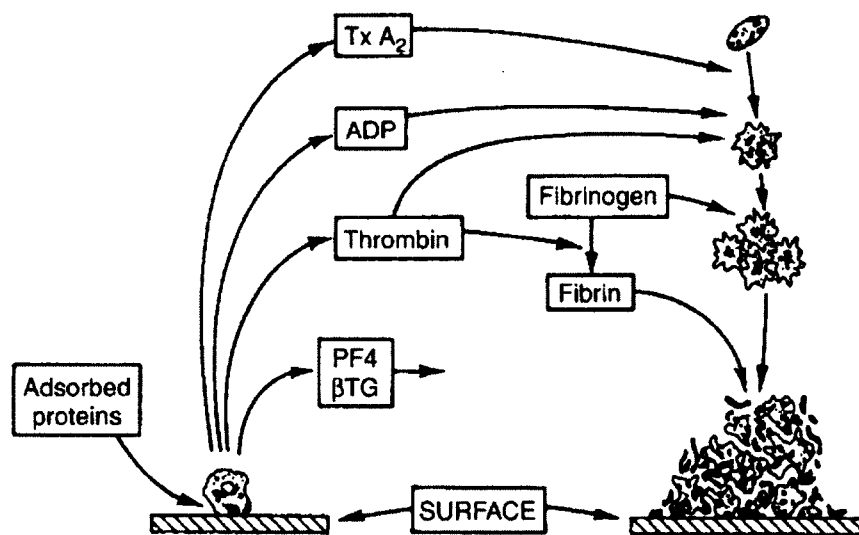


Figure 7.1 : Processus de formation d'un caillot sanguin [Ratner et al., 2004].

Le présent chapitre évalue l'efficacité d'une passivation à l'albumine pour augmenter l'hémocompatibilité de la KMPR. Cette efficacité est évaluée en termes d'adsorption de fibrinogène à la surface. Pour cela, une structure guide d'onde à gaine métallique a été optimisée pour un cœur en KMPR et validée en comparaison avec des structures standards basées sur une couche métallique. L'efficacité de la passivation est comparée sur la KMPR native et sur la KMPR rendue hydrophile. Des mesures d'angle de contact sont utilisées pour optimiser le procédé de traitement de surface de la KMPR. Aucun appareil n'étant disponible

au CRN2 pour effectuer cette mesure, un banc de test a été spécialement développé à cet effet (ANNEXE F).

Contributions respectives des auteurs de l'article :

J'ai fabriqué les dispositifs présentés dans cet article, j'ai également réalisé et analysé toutes les expériences et simulations présentées et j'ai écrit l'article. Vincent Chabot et Pierre-Jean Zermatten ont réalisé le travail de compréhension théorique des guides d'ondes à gaine métallique. Vincent Chabot a de plus été un soutien important pour les expérimentations et leur analyse. Raymond Hamel et Jean-Pierre Cloarec ont contribué à l'élaboration du protocole de passivation. Vincent Aimez, Paul Charette et Roger Lecomte ont encadré l'ensemble des travaux présentés. Tous les coauteurs ont révisé l'article.

Résumé français :

La KMPR est une résine à base d'époxy similaire à la SU-8 mais avec moins de contraintes de fabrication et ayant moins tendance à fissurer. La KMPR est donc bien adaptée à la fabrication d'instruments biomédicaux miniaturisés. Cependant, comme la SU-8, elle requiert un traitement de surface pour être hémocompatible. Ce travail démontre que la KMPR peut être efficacement passivée avec de l'albumine bovine (BSA) pour la rendre hémocompatible. L'adsorption de fibrinogène a été utilisée comme modèle pour l'hémocompatibilité dans la validation expérimentale. L'adhésion de protéines à la surface de la KMPR a été mesurée par des guides d'onde à gaine métallique avec un film de KMPR comme cœur. L'efficacité de passivation a été comparée entre la KMPR naturellement hydrophobe et la KMPR traitée au CAN-HNO₃ pour la rendre hydrophile. Les résultats montrent que la passivation augmente significativement l'hémocompatibilité des deux types de surfaces avec des résultats légèrement meilleurs pour la surface hydrophobe. Un rinçage aux ultrasons après passivation n'a pas d'effets observables, ce qui démontre que la BSA est fortement adsorbée sur la KMPR. La comparaison des mesures d'adhésion de protéine avec des guides d'onde à gaine métallique et avec des méthodes plus conventionnelles de résonance par plasmons de surface standard et à longue portée confirme la validité des mesures.

7.2 Introduction

Polymer-based biomedical microdevices have received a growing interest in the past few years. Among the available fabrication technologies, photopatternable polymers are an interesting avenue because of their compatibility with current microelectronic industry standards. In particular, SU-8 (Microchem Corp., USA), an epoxy-based photoresist, is a popular choice because of its high chemical inertness as well as its ability to be processed over a wide range of thicknesses [Pan et al., 2011]. SU-8 microchannels have been integrated over electronics for CMOS compatible labs-on-a-chip [Peng et al., 2006]. However, internal stresses generated during the patterning process tend to produce fissuring [Johnson et al., 2001] that can be highly problematic for microfluidics. Very precisely controlled temperature ramps are required during the soft and post-exposure bakes to minimize this stress, lengthening the overall processing time. Though SU-8 is considered to be biocompatible in terms of cytotoxicity and tissue inflammatory response [Kotzar et al., 2002; Voskerician et al., 2003], its hemocompatibility is inferior to that of SiO₂, parylene and polyurethane [Weisenberg et al., 2002].

Microchem recently introduced KMPR, also an epoxy-based photoresist, that is less prone to internal stress and has superior resistance to fissuring [Ou et al., 2008] compared to SU-8. KMPR also has better moisture resistance [Blanco Carballo et al., 2009] which is highly beneficial for microfluidic applications. To date, KMPR has mainly been used for electroplating moulds [Lee et al., 2008; Shin et al., 2010]. Our group recently introduced a microdevice for preclinical pharmacokinetic studies applied to molecular imaging with positron emission tomography [Convert et al., 2011] incorporating microfluidic channels fabricated using KMPR. These studies involve whole blood from animal models flowing through the KMPR microfluidic channels. The purpose of the work presented here is to comparatively assess the hemocompatibility of KMPR surfaces passivated with bovine serum albumin (BSA) relative to bare KMPR as a structural material for microchannels, in applications involving whole blood or blood products.

Hemocompatibility refers to the ability of a material to be compatible with blood, mainly to avoid blood coagulation. The coagulation process starts with the adsorption of plasma proteins such as fibrinogen and von Willebrand factor onto the material surface, followed by

platelet adhesion and activation. Activated platelets then release blood coagulation factors, resulting in thrombus formation [Ratner et al., 2004]. Complete hemocompatibility characterization is fairly complex as it requires blood plasma protein adhesion tests, coagulation factor activation detection, as well as platelet adhesion and activation assessment [Seyfert et al., 2002]. Alternatively, fibrinogen adsorption, a simple and reliable measure of platelet adhesion [Tsai et al., 2002], is generally accepted in itself as a good indicator of material hemocompatibility. Therefore, fibrinogen adsorption at physiological concentrations was used in the present study to assess hemocompatibility for bare and BSA-passivated KMPR surfaces.

Protein adsorption on surfaces is usually quantified by fluorescence assay, surface plasmon resonance (SPR), or quartz microbalance (QCM). SPR and QCM have the usual advantages of label free methods, but are normally limited to the study of very thin films (typically less than 20 nm). As with most spin-coated resists, it is difficult to fabricate KMPR films with thicknesses under a few hundred nanometers. Therefore, standard SPR and QCM cannot be readily used to assess the hemocompatibility of KMPR film surfaces. Thick polymers films are typically characterized with methods such as QCM with energy dissipation monitoring (QCM-D) [Marie et al., 2006; Reimhult et al., 2008], Love-mode surface acoustic wave sensing [Roach et al., 2007], interferometry [Shew et al., 2008] or integrated optical waveguides (IOW) [Saavedra et al., 1991].

In our work, we chose to use metal-clad waveguides (MCWG) for KMPR film surface characterization because: (1) MCWG-based measurements are very sensitive, (2) MCWG implicitly involve thick dielectric films as the waveguiding core layer, and (3) MCWG can be used with a standard SPR laboratory measurement bench. Though the MCWG were used in this work purely as a characterization method rather than as a permanent subsystem in our blood analysis microdevice [Convert et al., 2011], this technology is easily incorporated into lab-on-a-chip devices as a permanent component if required.

Polyethylene glycol (PEG) monolayers are widely used to increase material biocompatibility [Harris, 1992], including for SU-8 [Marie et al., 2006; Tao et al., 2008; Wang et al., 2006]. PEG monolayers can be covalently bonded to surfaces but can be relatively expensive when large surface area coverage is required. In contrast, BSA is an inexpensive

and efficient blocking agent [Vogt et al., 1987] that adsorbs to most surfaces forming a monolayer that can be used to increase biocompatibility. For example, Kamath and Park [Kamath et al., 1994] have shown that BSA increases hemocompatibility for polypropylene, polycarbonate, and polyvinylchloride. BSA passivation has been used on SU-8 to block non-specific adsorption after antibody or DNA probe binding [Blagoi et al., 2008; Joshi et al., 2007], to reduce DNA adsorption on polymerase chain reaction (PCR) chips [Christensen et al., 2007] and to increase bacterial mobility [Park et al., 2010]. BSA adsorption and blocking efficiency differ across materials of course, notably between hydrophilic and hydrophobic surfaces [Jeyachandran et al., 2009, 2010; Reimhult et al., 2008; Sweryda-Krawiec et al., 2004].

In the present study, hemocompatibility was measured on bare and BSA-passivated KMPR surfaces by fibrinogen adsorption using a MCWG sensing substrate, for both natively hydrophobic and hydrophilic-treated KMPR. Robustness of the BSA passivation to ultrasound wash was assessed for both surface types. To validate the MCWG data, results were compared with measurements obtained with standard surface plasmon resonance (SPR) and long-range surface plasmon resonance (LR-SPR) substrates on the same measurement apparatus.

7.3 Materials and methods

7.3.1 Protein adsorption measurement apparatus

Metal-clad waveguides (MCWG)

MCWG are asymmetric planar optical waveguides with a thick high refractive index dielectric core, a lower refractive index dielectric cladding on the top side (the fluid sensing medium) and a metal thin-film Au-Cr cladding on the bottom (Figure 7.2A, *left*). In our case, the waveguide core layer is a thick KMPR film. The three-layer waveguide is fabricated on a base material that is transparent over the optical bandwidth of interest, typically a glass substrate (e.g., BK7). Note that MCWG and SPR are closely related: the structure of a standard SPR construct (metal thin-film on a glass substrate) is in fact a special case of MCWG with a core thickness of zero, where the surface plasmons act as the waveguide core [Homola, 2006].

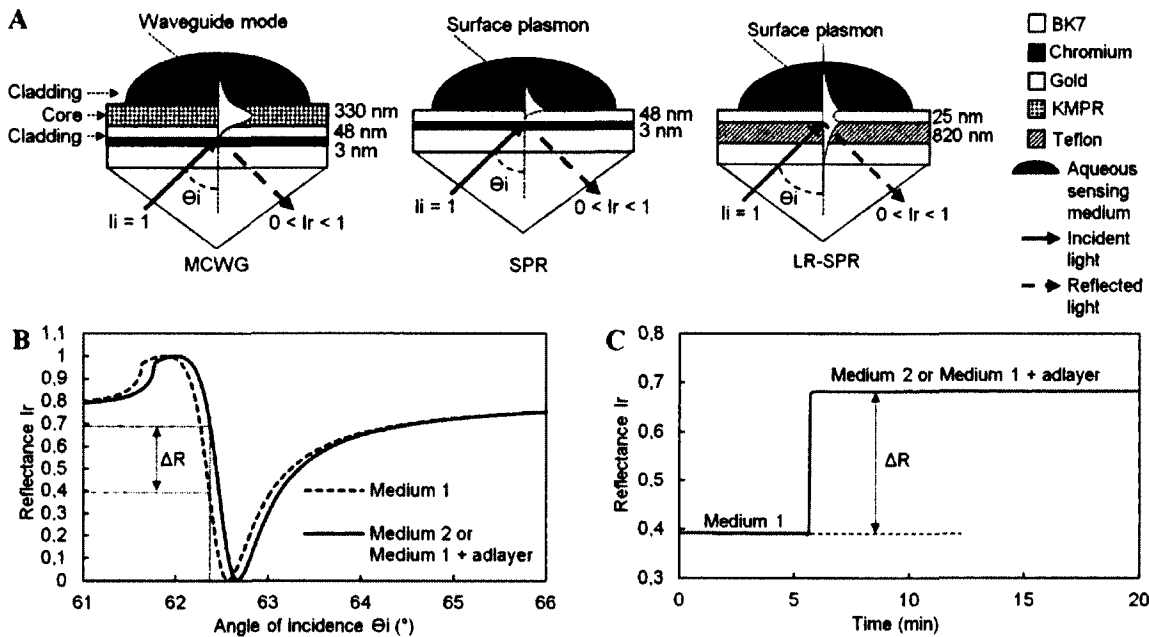


Figure 7.2: (A) MCWG, SPR and LR-SPR substrate structures; (B). modeled angular scans from the MCWG substrate for two cases yielding identical results: (1) two bulk liquid media with different RI and (2) constant bulk medium with the addition of a thin adlayer on the surface; (C) corresponding reflectance monitoring over time at 62.4° (aqueous sensing medium change at $t = 6$ min).

As with SPR, adsorption sensing with MCWG can be achieved in a prism-based Kretschmann configuration (Figure 7.3). Collimated light at 635 nm is injected at a controlled angle of incidence via the prism. At angles of incidence that fulfill the phase-matching conditions, incident light is coupled to surface plasmons in SPR sensors [Homola, 2006] or to guided modes in MCWG sensors [Otto et al., 1971]. Under such conditions, the reflected light intensity drops, leading to a dip in the angular scan sensorgrams (Figure 7.2B). Since the effective refractive index of the guided modes is very sensitive to changes in the index of the sensing medium (upper cladding), the incidence angle that satisfies the phase-matching conditions is in turn very sensitive to both bulk fluid and surface refractive index (RI) changes, the latter being due to adsorption of biomolecules to the surface.

First introduced in the 1970s [Otto et al., 1971], MCWG have gained recent interest for cellular studies [Skivesen et al., 2007] or lipid-bilayer film structure and property characterization [Salamon et al., 1997] due to their ability to sustain guided modes in both polarizations and the possibility to get modes with deeper penetration depth compared to SPR. Moreover, compared with so-called “long range” surface plasmon resonance (LR-SPR)

sensors, MCWGs have similar penetration depth but are much easier to fabricate. Indeed, LR-SPR substrates require a dielectric layer under the metallic film having a refractive index close to that of the sensing medium (generally water), such as Teflon or Cytop, to create symmetric resonant surface plasmons between the two metal/dielectric interfaces (Figure 7.2A, right). Multi-layer LR-SPR structures involving films made from Teflon or Cytop are difficult to fabricate and easily delaminate under common microfluidic biosensing conditions.

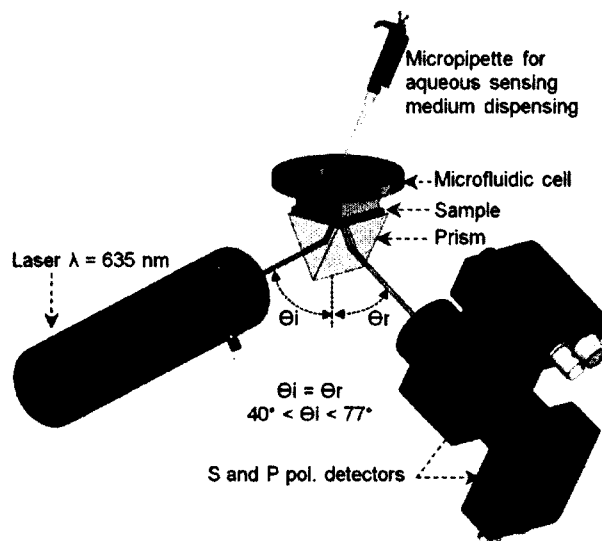


Figure 7.3: Schematic representation of the SPR system (Kreschmann configuration) used for BSA and fibrinogen adsorption measurements. Supports and motorized angle adjustments not shown. Micropipette and sample size not to scale.

For fixed-wavelength systems, MCWG or SPR sensor output is either: (1) the difference in the angle of the reflectance minimum determined from angular scans at the start- and end-points of an experiment (Figure 7.2B), or (2) real-time reflectance changes over time measured at a fixed angle during kinetics (Figure 7.2C). Compared with SPR, MCWG angular scans typically exhibit a much sharper response, with smaller shifts in the minimum angle in response to refractive index changes. As a result, making precise measurements of angular shifts in the reflectance minimum is difficult in practice. Indeed, MCWG are better suited to kinetics measurements and have very high sensitivity in this type of experiment. As with best practices in SPR, normalized reflectance in our experiments was calculated as the ratio of the two measurements at orthogonal linear polarizations, after having subtracted out dark current values.

Substrate fabrication and measurement protocol

SPR sensing substrates were fabricated as follows: BK7 75 mm × 25 mm glass slides (1 mm thick, Fisherfinest Premium Plain Glass Microscope Slides, Fisher Scientific, USA) were cleaned (Alconox then 15 min in piranha solution) followed by metal deposition on the top surface by e-beam evaporation (gold atop a 3 nm film of Cr to promote adhesion in AUTO 306, BOC Edwards, Canada). At an excitation wavelength of 635 nm, the optimal thickness of gold films to maximize sensitivity is 48 nm [Homola, 2006].

MCWG sensing substrates were fabricated by adding a KMPR film atop the standard SPR structure described above. Importantly, these KMPR films were fabricated with the same process used to fabricate the KMPR microfluidic structures. The SPR structures were first protected with S1813 resin (Shipley Company, USA) and cleaved in smaller 15 mm × 25 mm samples to maximize KMPR film spin-coating uniformity. Samples were washed in solvent with ultrasound (5 min acetone, 5 min IPA), rinsed in DI-water, dried with nitrogen and further cleaned in plasma O₂ 100 W for 2 min. After dehydration (30 min, 125 °C, oven), samples were coated with MCC Primer 80/20 (Microchem Corp., USA) to ensure reliably repetitive surface properties. KMPR 1005 (Microchem Corp., USA) was then diluted in SU-8 2000 Thinner (Microchem Corp., USA) and spin-coated over the gold layer. Samples were soft-baked (2 min, 100 °C, hot plate), exposed (broad band aligner with i-line high pass filter), post-baked (2 min, 100 °C, hot plate), and hard-baked (3 h, 180 °C, oven). The KMPR dilution, spin-coating speed and exposure time used for each thickness are shown in Table 7.1. Film thicknesses were measured by ellipsometry assuming a constant known RI (Table 7.2).

LR-SPR sensing substrates were fabricated from glass slides cleaned with the protocol described above for SPR, followed by silanization with 2% perfluorodecyl trichlorosilane (Gelest Inc., USA) in Opticlear (National Diagnostics, USA) for 5 min under nitrogen atmosphere. Samples were then rinsed with IPA and dried with nitrogen. The substrate were baked (20 min, 125 °C, hot plate) followed by Teflon AF1600 (Dupont Canada) spin-coating at 1700 rpm. Substrates were then left to dry for 1 h and baked under nitrogen (1 h, 160 °C, oven). A 25 nm layer of gold was finally evaporated at 150 °C to ensure good adhesion over the Teflon [Slavík et al., 2007].

Table 7.1: KMPR film fabrication parameters used for MCWG fabrication. Resulting thicknesses are measured by ellipsometry (Fixed RI, see Table 7.2). The optimum film fabrication parameters selected for this study are indicated in bold and italic.

KMPR dilution (% weight)	Spin speed (rpm)	Exposition (s)	Thickness (nm)
25	3400	25	302
25	3000	25	314
25	2600	25	328
25	2200	25	353
40	2800	30	696
40	2000	30	795
40	1000	30	1085
40	500	30	1148

All substrates were characterized for protein adsorption (BSA or fibrinogen) using a custom built Kretschmann configuration SPR system [Chabot et al., 2009] based on a 635 nm laser diode. Substrates were placed on a BK7 coupling prism (Melles Griot, USA) using refractive index matching fluid (Cargille Laboratories, USA). A microfluidic Teflon cell was placed over the substrates to enclose the liquid sensing medium (Figure 7.3). The measurement area covered approximately a 1 mm diameter area in the middle of the substrates. Fluids were dispensed with a micropipette and scans were performed in static fluid conditions (no flow).

Table 7.2: Simulation parameters used for MCWG, SPR and LR-SPR structures: standard values, measurement by ellipsometry (635 nm) (*) or measurement by refractometry (589 nm assuming negligible dispersion for the fluids) (**).

Material	n	k	Thickness (nm)
BK7 (Sellmeier)	1.5150	0.000	Infinite
Chromium [Palik, 1991]	3.5771	4.363	3 (SPR/MCWG)
Gold [Hass et al., 1972]	0.1594	3.231	48 (SPR/MCWG) 25 (LR-SPR)
KMPR*	1.5780	0.001	0 – 1300 (MCWG)
Teflon*	1.3070	0.000	820 (LR-SPR)
Omnicoat*	1.4900	0.000	13
Adlayer (BSA) [Hand, 1935]	1.5000	0.000	2.5
DI-water**	1.3330	0.000	Infinite
PBS**	1.3347	0.000	Infinite

Protein in solution in PBS (PBS 1X, pH 7.4, Wisent, Canada) was prepared on the day of each experiment. Angular scans (60-66° for MCWG and LR-SPR, 60-76° for SPR) were acquired for DI-water (bulk standard reference) then PBS (bulk buffer reference). Prior to starting each new kinetics measurement experiments, the illumination angle was adjusted to yield a chosen consistent value of reflectance (0.3) across experiments for the PBS buffer alone. After a 5 min stabilization period, the fluid chamber was emptied with a micropipette followed by injection of 200 μ l of protein solution. After 20 min, the chamber was flushed with PBS.

Optimization of MCWG sensitivity

Surface and bulk measurement sensitivities, S_S (nm^{-1}) and S_B (RIU^{-1} , inverse refractive index units), are defined here respectively as:

$$S_S = \frac{\Delta R}{\Delta h_{ad}}, \quad (7.1)$$

$$S_B = \frac{\Delta R}{\Delta n}, \quad (7.2)$$

where ΔR is the normalized reflectance change, Δh_{ad} is the adlayer thickness change (due to addition of BSA in the experiments) and Δn is the bulk refractive index change. Note that, strictly speaking, instrument bulk and surface sensitivity are defined as the *maxima* of the above expressions, across all possible incidence angles of illumination. Since the measurements reported below were obtained at a fixed angle of illumination, as is the case normally with kinetics measurements, the above definitions of sensitivity are used throughout to simplify the notation.

The MCWG substrates were optimized for surface sensitivity by modeling the angular response of the waveguides using the Fresnel equations, with KMPR core film thicknesses ranging from 0 to 1300 nm (25 nm increments). Optical parameters (refractive index n and absorption coefficient k at 635 nm) used in the simulations (Table 7.2) were obtained from the literature (chromium [Palik, 1991], gold [Hass et al., 1972]), experimentally measured by ellipsometry (KMPR, assuming a known thickness), or modeled (BK7 glass using the Sellmeier equation).

Bulk sensitivity estimates were based on the difference in refractive index between PBS and DI-water measured by refractometry ($\Delta n = 1.7 \times 10^{-3}$ RIU). For surface sensitivity estimates, an adlayer thickness of $\Delta h_{ad} = 2$ nm was adopted in accordance with ellipsometry measurements of BSA films ($2.3 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm}$) and with measurements found in literature for BSA films on polystyrene and GeOH substrates at the same protein concentration [Jeyachandran et al., 2009]. The refractive index of the BSA film was obtained from the literature [Hand, 1935]. Experimental measurements of bulk and surface sensitivities for the MCWG substrates were compared to modeling results by monitoring (1) the reflectance change between PBS and DI-water, (2) BSA adsorption kinetics (lyophilized powder $\geq 96\%$, Sigma Aldrich, USA), 10 mg ml^{-1} , across a range of KMPR film thicknesses (302, 314, 328, 353, 696, 795, 1085 and 1148 nm).

MCWG measurement validation

MCWG measurements were compared to modeling and experimental measurements obtained from standard SPR and LR-SPR. As with the MCWG, the SPR and LR-SPR substrates illustrated in Figure 7.2A were modeled using the Fresnel equations to compute surface and bulk sensitivities (materials parameters in Table 7.2). In order for all three substrates to present the same properties for surface chemistry, a thin layer of Omnicoat (Microchem Corp., USA) was added as a final layer to each structure. The Omnicoat was spin-coated at 3000 rpm and baked (2 min, $200 \text{ }^\circ\text{C}$, hot plate) and the thickness of the films (13 nm) was verified using ellipsometry. The effect of this protective layer on measurements will be discussed below.

7.3.2 KMPR hydrophobicity modification and surface characterisation

Surface treatment

KMPR is natively hydrophobic. To render it hydrophilic, the epoxy rings were opened using HNO_3 catalyzed with ceric ammonium nitrate (CAN) [Iranpoor et al., 1995]. Such a procedure is also used to render SU-8 hydrophilic [Nordström et al., 2004; Stangegaard et al., 2006]. To assess the optimum surface treatment duration, KMPR-covered substrates were immersed in a CAN- HNO_3 solution (0.2 M and 2 M respectively) for 30 min, 1 h, 2 h and 3 h, followed by a 5 min rinse in DI-water with ultrasound.

KMPR hydrophilicity was measured using a custom-built contact-angle measurement station (uncontrolled humidity environment), where 2 μl droplets of DI-water were delivered using a calibrated dispenser with Teflon nozzle and digital images of the droplet taken in orthogonal view within 2 s of droplet delivery. For each of the four CAN-HNO₃ treatment trial durations, two KMPR-covered sample substrates were each tested at three distinct sites, leading to 12 angle measurements per trial duration. KMPR film thickness was measured by ellipsometry before and after treatment to ensure there were no significant layer thickness modifications. AFM measurements (Nanoscope IIIa, Veeco, USA) were performed on 1 μm^2 regions using an arrow-NC-20 tip (NanoWorld Innovative Technologies, Switzerland) in tapping mode for each substrate sample to assess root mean square (*rms*) roughness.

Surface passivation

Hydrophobic and hydrophilic samples were passivated with BSA 10 mg ml^{-1} in PBS for 2 h to ensure maximum blocking efficiency [Jeyachandran et al., 2010], followed by a 5 min rinse in PBS, a 5 min rinse in DI-water, and dried with nitrogen. To verify the mechanical stability of the BSA layer, six hydrophobic and six hydrophilic-passivated samples were placed for 5 min in DI-water with ultrasound and dried with nitrogen prior to the fibrinogen absorption measurement experiment.

Fibrinogen adsorption

Human plasma fibrinogen (PBS, EMD Millipore, USA) adsorption kinetics was measured at a concentration of 1 mg ml^{-1} , a value in the range found in normal blood plasma. Fibrinogen adsorption was measured on bare and BSA-passivated KMPR films for both hydrophobic and hydrophilic KMPR surfaces ($n = 6$ per condition).

Protein adsorption measurements are expressed in terms of *surface coverage*, Γ (pg mm^{-2}). When the protein adlayer thickness, h , is much smaller than the penetration depth of the evanescent field into the sensing medium, L_{pd} , that is ($h \ll L_{pd}$), protein surface coverage is expressed as a function of the bulk sensitivity, S_B [Homola, 2008]:

$$\Gamma = \frac{\Delta R}{2S_B} \frac{L_{pd}}{(dn/dc)_{vol}}, \quad (7.3)$$

where ΔR is the normalized reflectance change and $(dn/dc)_{vol}$ ($\text{mm}^3 \text{pg}^{-1}$) is the rate of change of refractive index with bulk protein concentration.

7.4 Results and discussion

7.4.1 Protein adsorption measurement apparatus

Optimization of MCWG sensitivity

Figure 7.4A shows the estimated surface sensitivity based on the modeling results (Fresnel equations) for the highest-order (and most sensitive) guided mode in MCWGs of increasing KMPR core thickness. The sawtooth aspect of the curve as a function of increasing thickness is due to: (1) monotonic sensitivity decrease due to the increasing coupling angle for a particular highest-order mode; (2) discontinuous positive increases with the appearance of each new higher order mode supported by a thicker core layer. Bulk sensitivity estimates showed a similar behaviour (Figure 7.4B). A minimum KMPR core thickness of 300 nm was required for the structure to act as a (single mode) waveguide. Note that sensitivity is highest for the thinnest core layer because the path travelled by the light in the KMPR film ($k \neq 0$) is shortest, thereby minimizing absorption losses. Note also that for guided modes having a coupling angle very close to the critical angle, the evanescent field depth is nearly infinite, so that surface-specific sensitivity is very low in these cases.

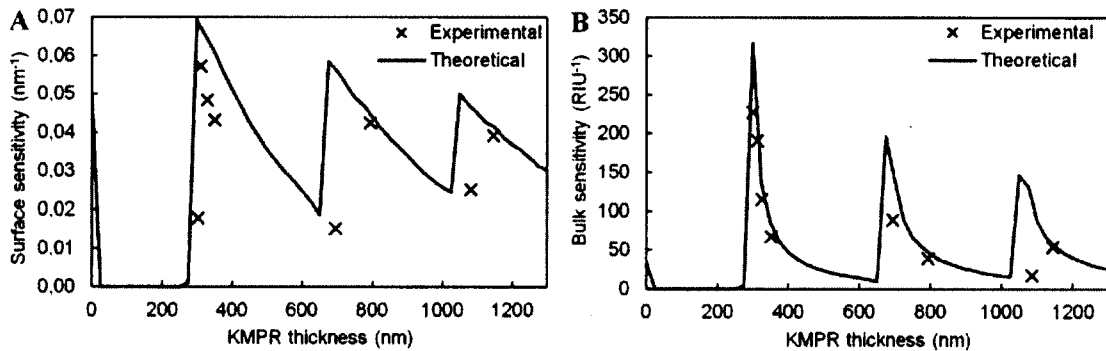


Figure 7.4: Modeled and experimentally measured surface (A) and bulk (B) sensitivities for MCWG substrates, as a function of increasing KMPR film thickness (calculated according to Eq. 1 and 2).

A 330 nm thick KMPR core layer, yielding a single-mode waveguide with a coupling angle close to but not directly equal to the critical angle (taking fabrication tolerances into

account), was therefore selected to maximize the sensitivity of the MCWG measurements. After the final hard bake, KMPR film thickness averaged over samples fabricated for protein adsorption measurements was 336 ± 3 nm, therefore very close to the intended specifications. Note that all samples were fabricated from the same diluted KMPR solution. Uncertainty on the KMPR dilution could lead to a slightly different thickness for a different solution with the same fabrication parameters (328 nm, Table 7.1). Specific modeling results for KMPR film thicknesses of 336 ± 3 nm predict a coupling angle in DI-water of $63.2 \pm 0.1^\circ$, a penetration depth of $L_{pd} = 451 \pm 20$ nm, a bulk sensitivity of $S_B = 108 \pm 7$ RIU⁻¹, and a surface sensitivity of $S_S = 6.3 \pm 0.1 \times 10^{-2}$ nm⁻¹.

Sensitivity measurements clearly show the sawtooth behavior predicted by the numerical modeling (Figure 7.4), which is consistent with work reported elsewhere for other waveguide core materials [Skivesen et al., 2005]. As seen in the Figure, sensitivity measurements appear laterally shifted compared to the modeling results for film thicknesses over 600 nm, due to the increasing uncertainty in core layer thickness measurements with ellipsometry. The difference in height between the measured and modeled results is due to the uncertainty in the adlayer physical characteristics. However, the key result in Figure 7.4 is the validation of the optimal core layer thickness (330 nm), where experimental and modeling results agree closely.

MCWG measurement validation

Normalized reflectance measurements from angular scans for all three structures (MCWG, SPR, LR-SPR) are shown in Figure 7.5. As intended, the MCWG response minimum is close to the critical angle ($\arcsin(n_{fluid}/n_{substrate}) = 61.63^\circ$). Also as expected, the MCWG exhibit a peak in reflectance, used in itself as a basis for biosensing [Salamon et al., 1997]. The LR-SPR response is centered at the same coupling angle as the MCWG, with a slightly narrower resonance due to lower losses in the very thin metal film (25 nm) compared to the KMPR core layer. The standard SPR substrate response is centered at a higher coupling angle with a much broader response owing to the highest losses of the three substrates. These experimental measurements are in close agreement with the modeled results (not shown) except for slight angular offsets between measured and modeled curves due to uncertainties in the material property values used in the models. The sensitivities in all three cases are largely unaffected, however.

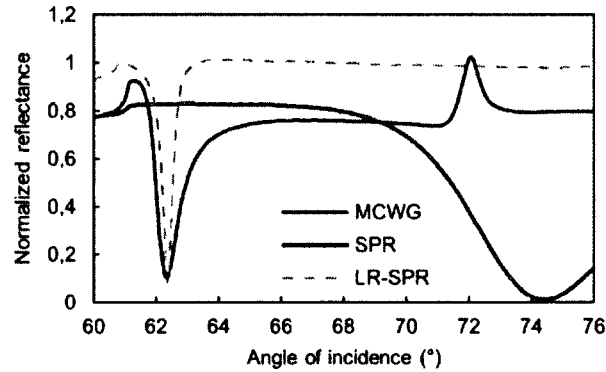


Figure 7.5: Normalized reflectance measurements from angular scans with MCWG, SPR and LR-SPR substrates.

Figure 7.6 shows the bulk and surface sensitivities calculated from modeled and experimentally measured data, according to equations 1 and 2. These results show that the sensitivities for all three substrate types are in the same range, with the exception of the lower bulk sensitivity of the standard SPR structures, as expected. Measured and modeled results are in good agreement (considering the uncertainty in the adlayer physical characteristics), with the exception of LR-SPR. This mismatch is most likely due to differences between the model and actual optical properties of the metal film. In particular, a gold layer deposited on a Teflon film will have optical parameters that differ significantly from a similar gold deposition on a glass substrate and will, in addition, be difficult to measure accurately.

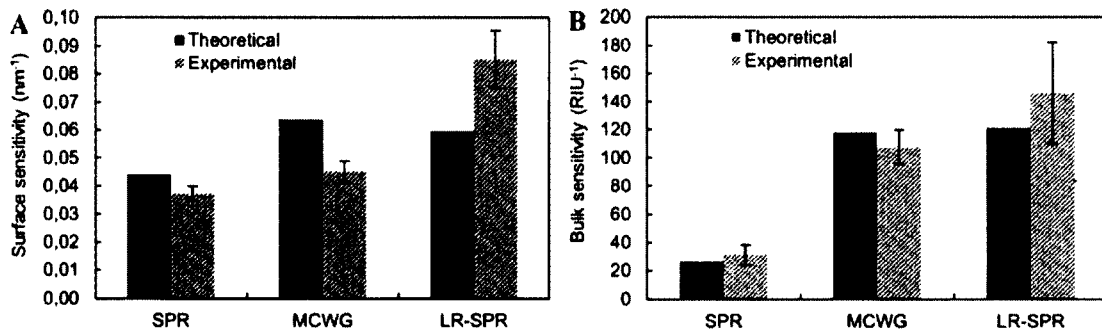


Figure 7.6: Modeled and experimentally measured surface (A) and bulk (B) sensitivities for each structure type capped with an identical Omnicoat film, calculated according to Eq. 1 and 2, respectively ($n = 4$, error bar = standard deviation).

Note that the definition of sensitivity is not consistent across the MCWG/SPR literature, so that care must be exercised when comparing results with other works. For example, MCWG sensors are sometimes presented as much less sensitive than SPR sensors when sensitivity is defined in terms of coupling angle shift estimates [Abbas et al., 2011; Chien et

al., 2004]. As explained above, however, MCWG sensors are best used to track kinetics at a fixed angle of incidence. In a similar case, when coupling angle shift is normalized by the dip full width at half maximum (FWHM), the sensitivity of MCWG sensors is in the same order or better than SPR [Skivesen et al., 2005], as confirmed by our own work.

Note finally that the Omnicoat layer, though it offers a uniform surface chemistry across substrate types and is very simple to deposit (compared to SiO₂ for example), also affects surface sensitivity slightly differently for each substrate type (11% simulated loss for SPR and LR-SPR structures compared to 4% for MCWG). However, numerical simulations of the three structure types without the Omnicoat film show the same trend as the simulation with the Omnicoat film (Figure 7.6). Globally, these results validate the performance of the MCWG-based substrates used in our experiments, both for bulk and surface measurements.

7.4.2 *KMPR hydrophobicity modification and surface characterization*

Surface treatment

Ellipsometry measurements showed no significant thickness difference of the KMPR films following the four CAN-HNO₃ treatment trial durations. Figure 7.7 shows that the KMPR contact angle decreases from 73° (hydrophobic) down to 35° (hydrophilic) after a 2 h treatment, with no significant further decrease. Surface *rms* roughness started to increase after 2 h in CAN-HNO₃ and increased significantly thereafter.

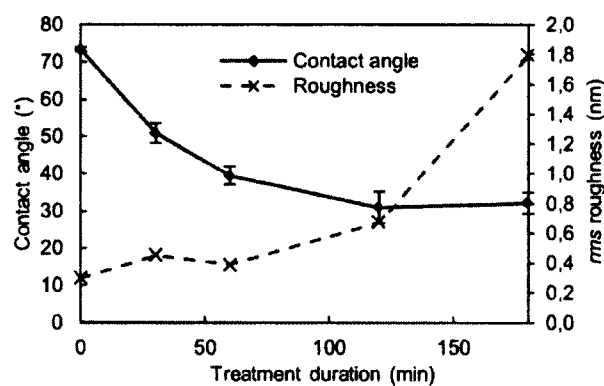


Figure 7.7: Surface *rms* roughness measured by AFM and contact angle for increasing CAN-HNO₃ treatment durations on bare KMPR surfaces (error bar = standard deviation).

The optimum treatment duration was therefore set at 2 h, resulting in a contact angle roughly divided by two (73° to 35°) and surface roughness roughly multiplied by two (0.3 nm rms to 0.67 nm rms) when compared to bare KMPR. In comparison, Stangegaard et al. observed that the SU-8 contact angle decreases from 95° to 45° after CAN- HNO_3 treatment (1 h at 50°C for 1 M HNO_3 and 0.1 M CAN) [Stangegaard et al., 2006].

Fibrinogen adsorption

Figure 7.8 shows measurement results of fibrinogen adsorption kinetics on bare and BSA-passivated KMPR films, for both hydrophobic and hydrophilic surfaces, as measured with the MCWG substrates. At the start of the experiment ($time = 0$), there is a significant increase in reflectance when the PBS solution is replaced by the fibrinogen solution, followed by a plateau when protein adsorption has saturated. The protein solution is then flushed and replaced by PBS ($time = 20 \text{ min}$), leading to the second reflectance plateau.

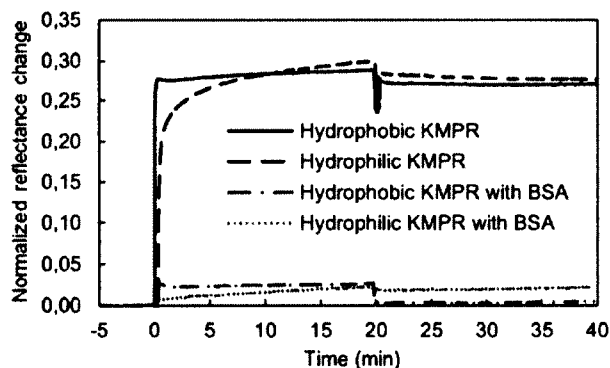


Figure 7.8: Fibrinogen adsorption kinetics on bare and BSA-passivated KMPR films, for both hydrophobic and hydrophilic surfaces. Fibrinogen injection at $t = 0$, PBS rinse after 20 min.

Importantly, replacement of the PBS solution by the fibrinogen solution (1 mg ml^{-1} , $dn/dc = 0.18 \text{ ml g}^{-1}$ [Tumolo et al., 2004]) will lead to a change in bulk refractive index of $1.8 \times 10^{-4} \text{ RIU}$ corresponding to an estimated reflectance change of 0.02, lower than the change measured for passivated and unpassivated samples (0.03 and 0.3). Note also that the bulk sensitivity of the MCWG substrates, both with and without BSA passivation, is roughly identical (Figure 7.9A). Therefore, the first plateau in Figure 7.8 is mainly a result of protein deposition on the surface, rather than a bulk change in refractive index. This interpretation of the results is confirmed by the insignificant changes in reflectance following the PBS wash in all cases. Hence, the results confirm that BSA-passivated KMPR surfaces show a significant

resistance to fibrinogen adsorption. These results are consistent with the increased hemocompatibility of BSA-passivated surfaces observed by Kamath and Park. [Kamath et al., 1994].

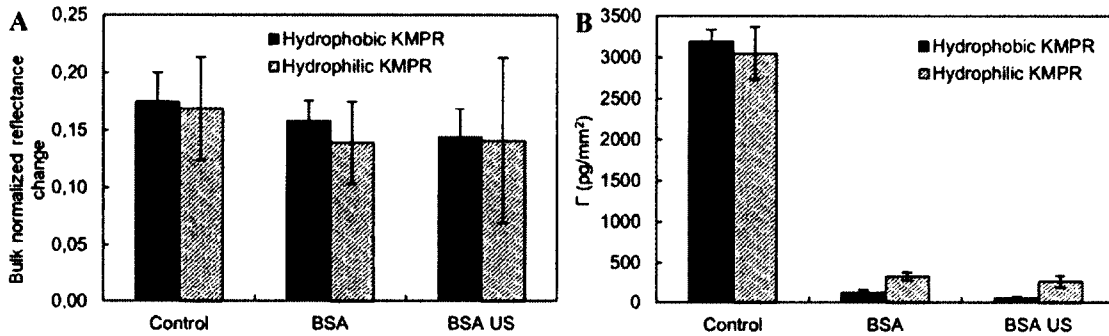


Figure 7.9: Comparison of bulk sensitivity and BSA passivation efficiency measurements for bare (control) and BSA-passivated (BSA) KMPR - “BSA US” indicates BSA-passivated samples washed in ultrasound before the fibrinogen experiment ($n = 6$, error bar = standard error of the mean). (A) Bulk reflectance change between DI-water and PBS, before fibrinogen solution injection, confirming that all substrates have similar bulk sensitivities. (B) Fibrinogen surface coverage Γ calculations (Eq. 3).

Using the values for L_{pd} and S_B specified above with a value of $(dn/dc)_{vol} = 0.18 \text{ ml g}^{-1}$ [Tumolo et al., 2004] in Eq. 3, the fibrinogen surface coverage is $\Gamma = \Delta R \times 1.16 \times 10^4$. Native (hydrophobic) BSA-passivated KMPR showed a slightly lower fibrinogen adsorption compared to hydrophilic passivated KMPR (Figure 7.9B). This result is in accordance with the better blocking efficiency measured by other groups for hydrophobic BSA-passivated polystyrene surfaces compared to hydrophilic GeOH ones for ConA and IgG proteins [Jeyachandran et al., 2010]. This tendency is however not to be taken to a generality as the blocking efficiency is highly dependent on the native surface composition and on the protein to be blocked.

Despite the better blocking efficiency of native BSA-passivated KMPR compared to hydrophilic passivated KMPR after PBS flush (second plateau height), the kinetic measurements presented in Figure 7.8 also showed faster fibrinogen deposition on the hydrophobic surface than on the hydrophilic one for both BSA-passivated KMPR films and bare ones (speed to reach the first plateau). This behaviour will require further investigation to be fully explained but might be partly due to difference in BSA conformation on hydrophobic and hydrophilic surfaces [Jeyachandran et al., 2009] as well as cerium residues on the CAN-HNO₃ surface [Walther et al., 2010].

Finally, the ultrasound wash had no observable effect (Figure 7.9B), indicating that BSA is strongly adsorbed to both hydrophilic and hydrophobic surfaces.

7.5 Conclusions

MCWG substrates were used to characterise the hemocompatibility of bare and BSA-passivated KMPR surfaces by fibrinogen adsorption. MCWGs with a KMPR core layer thickness of 330 nm showed surface and bulk sensitivities comparable to conventional SPR and LR-SPR sensors, validating the proposed structure for the adsorption measurements. KMPR surfaces, both natively hydrophobic and hydrophilic, were compared. Optimal parameters for the hydrophilic surface treatment (2 h in CAN-HNO₃ 0.2 M and 2 M respectively) resulted in a surface contact angle decrease from 73° to 35° and a surface roughness of less than 1 nm *rms*. For both hydrophilic and hydrophobic KMPR surfaces, BSA passivation was shown to dramatically decrease fibrinogen adsorption, with hydrophobic KMPR showing a slightly better blocking efficiency with a simplified passivation protocol. These results indicate that BSA-passivated KMPR is a good choice of material for fabricating microfluidic structures in miniaturized biosensors where hemocompatibility is required, allowing lab-on-a-chip designers to take advantage of the superior material properties of KMPR compared to SU-8 for microfluidic device fabrication. The static fluidic conditions used in the present study are well suited for endpoint adsorption measurements. Further work will evaluate the robustness of the BSA passivation both under dynamic flow conditions to study the effects of shear stress and viscous effects, as well as with plasma and whole blood.

7.6 Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the Sherbrooke Nanofabrication and Nanocharacterization Research Center (Department of Electrical and Computing Engineering, Université de Sherbrooke, Canada) for microfabrication support and the staff of Michel Grandbois's laboratory (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Canada) for access to the SPR system and test solutions. The authors also wish to thank NanoQuébec, NSERC, CIHR, and CIPI for funding this research.

CHAPITRE 8 COMPTEUR SANGUIN MICROLUIDIQUE

8.1 Avant-propos

Auteurs et affiliations :

Laurence Convert : Étudiante au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Frédérique Girard Baril : Étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Vincent Boisselle : Étudiante au baccalauréat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Jean-François Pratte : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Réjean Fontaine : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Roger Lecomte : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine et sciences de la santé, Département de médecine nucléaire et radiobiologie.

Paul Charette : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Vincent Aimez : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

État de l'acceptation : Accepté le 09/09/2012.

Revue : Lab on a Chip

Référence : Convert, L., Girard Baril, F., Boisselle, V., Pratte, J.-F., Fontaine, R., Lecomte, R., Charette, P. G., & Aimez, V. (2012). Blood compatible microfluidic system for pharmacokinetic studies in small animals. *Lab on a Chip*, accepté.

Titre français : Système microfluidique compatible avec le sang pour les études pharmacocinétiques chez le petit animal.

Contribution au manuscrit :

Aux chapitres précédents, un premier prototype de canaux en KMPR sur détecteurs *p-i-n* a été fabriqué et caractérisé avec différents isotopes dilués dans de l'eau. L'hémocompatibilité de la KMPR a ensuite été rehaussée pour permettre l'utilisation de la puce microfluidique dans son contexte ultime, c'est-à-dire avec du sang. Le présent chapitre décrit une optimisation du détecteur microfluidique et sa première utilisation avec un animal.

Le premier prototype de détecteur microfluidique a permis de valider que l'ajout de microcanaux n'affecte pas les propriétés électriques des détecteurs. De plus, par rapport à la géométrie de référence (PE50 + diode Hamamatsu), le détecteur microfluidique permet d'augmenter l'efficacité absolue de détection d'un facteur deux à six pour les isotopes TEP. Le détecteur développé autorise également la détection du ^{99m}Tc via ses électrons de conversion, ce qui est à notre connaissance la première démonstration de ce type de détection. Des efficacités absolues entre 26 à 33 % ont été mesurées pour les isotopes TEP ainsi que 2,2 % pour le ^{99m}Tc . Avec un volume de détection pour ce prototype de 0,9 μl , l'activité minimum détectable est alors de 44 à 56 Bq/ μl pour les isotopes TEP et de 662 Bq/ μl pour le ^{99m}Tc (équation (3.1)). Ces performances sont donc proches de la limite de 15 Bq/ μl requise dans le cahier des charges, mais des optimisations sont encore possibles, principalement pour les isotopes TEM.

Une première optimisation présentée en conférence [Convert et al., 2010b], a permis d'augmenter l'efficacité de détection de 7 % par rapport au premier prototype. Pour cela, le volume de détection a cependant dû être réduit. La limite principale de ces deux premières géométries réside dans le contact aux anodes. La zone de contact des diodes commerciales utilisées est en effet très proche de la zone de détection. Afin de laisser suffisamment de place pour la microsoudure, le mur du microcanal doit donc couvrir une partie de la zone sensible. Pour pouvoir conserver un volume de détection plus important tout en ayant une efficacité de détection optimum, le procédé de fabrication a été complété pour inclure la formation de pistes éloignant le contact à l'anode de la zone de détection. Le présent chapitre décrit en détail le protocole de fabrication de ces détecteurs optimisés, ainsi que l'efficacité de détection quasi parfaite obtenue. À notre connaissance, c'est la première fois qu'on atteint ce niveau de performances.

La puce microfluidique a ensuite été passivée suivant le protocole développé au chapitre précédent et incluse dans un système embarqué comprenant toute l'électronique et l'informatique de contrôle pour faire une première mesure de radioactivité sanguine sur un rat. Quelques éléments sur l'électronique et l'informatique de contrôle sont donnés en ANNEXE G.

Contributions respectives des auteurs de l'article :

J'ai conçu et fabriqué les dispositifs présentés dans cet article, j'ai également réalisé et analysé toutes les expériences présentées et j'ai écrit l'article. Frédérique Girard-Baril a développé et réalisé l'encapsulation des dispositifs et a participé à la conception de l'électronique de traitement. Vincent Boisselle a réalisé et testé la carte de traitement analogique et a apporté les modifications au logiciel de contrôle. Jean-François Pratte et Réjean Fontaine ont contribué à la conception de l'électronique de traitement. Vincent Aimez, Paul Charette et Roger Lecomte ont encadré l'ensemble des travaux présentés. Tous les coauteurs ont révisé l'article.

Résumé français :

Le développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie en médecine nucléaire requiert l'analyse du sang de petits animaux en fonction de temps. Un dispositif microfluidique a été développé pour enregistrer la radioactivité sanguine de rats et de souris en temps réel via la mesure directe du rayonnement bêta ou des électrons de conversion, et ainsi fournir une caractérisation de nouveaux radiotraceurs. La technologie microfluidique permet de maximiser la géométrie de détection et de réduire l'épaisseur de l'interface entre l'échantillon et le détecteur, ce qui est cruciale pour la détection de particules. L'efficacité de détection est ainsi augmentée et permet de réduire le volume de détection sans compromettre la sensibilité, ce qui représente un atout important pour les expériences avec les petits rongeurs qui ont un faible volume sanguin (quelques ml). Un procédé de fabrication robuste a été développé pour ajouter des microcanaux sur des diodes *p-i-n* non encapsulées sans altérer les performances des détecteurs. Les microcanaux ont été fabriqués en KMPR, une résine à base d'époxy similaire à la SU-8 mais ayant moins de stress interne et donc moins tendance à fissurer. La surface de la KMPR a été modifiée pour permettre de faire passer du sang non dilué dans la puce pendant au moins 20 min à faible vitesse sans déclencher de coagulation. Le

dispositif microfluidique a été embarqué dans un compteur sanguin portable avec une électronique dédiée, une pompe et un logiciel de contrôle permettant ainsi une utilisation à proximité d'une caméra d'imagerie nucléaire préclinique. La mesure expérimentale de l'efficacité de détection confirme les estimations théoriques et est quatre à neuf fois plus grande que pour des dispositifs conventionnels, réduisant le volume de détection dans les mêmes proportions. Une courbe dose réponse démontre un comportement linéaire pour des concentrations typiques d'expériences avec des rongeurs. Enfin, le système a été utilisé avec succès pour mesurer la radioactivité sanguine chez le rat en temps réel après l'injection d'un radiotraceur.

8.2 Introduction

Positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) are currently the leading clinical imaging tools in nuclear medicine [Bonekamp et al., 2010; Cherry et al., 2003]. These imaging modalities are widely used for diagnostic and follow-up studies in oncology and cardiology. They involve the intravascular administration of a radiolabeled molecule, the radiotracer, followed by static or dynamic acquisition of images of the radiotracer biodistribution to scrutinize metabolic or physiologic disorders. New radiotracers are continuously being developed to improve diagnostic accuracy and reliability. Before being used in humans, new radiolabeled molecules have to be fully characterized in small animal models through pharmacokinetic studies [Kagadis et al., 2010].

In addition to imaging, such studies requires dynamic blood analysis during the imaging sequence involving repetitive blood sampling, commonly drawn manually, followed by blood plasma separation and radiochemical analysis of each sample to isolate the radiotracer from its metabolites [Dupont et al., 2009; Serdons et al., 2009]. However, repetitive manual blood sampling and analysis is technically difficult, time-consuming and hard to perform without affecting the animal homeostasis, especially with mice (~1.4 ml total blood volume).

Automated devices can be used to facilitate blood micro sampling [Wu et al., 2007], however, samples have to be separated and measured off-line in a well counter, which can be limiting for short half-life radioisotopes like ^{15}O (2 min), ^{13}N (10 min) or even ^{11}C (20 min). Whole blood radioactivity concentration as a function of time, the so-called input function, can be monitored on a region of interest (ROI) in PET images [Bentourkia et al., 2007; Kim et al., 2006] or using online blood counters [Breuer et al., 2010; Convert et al., 2007a; Yamamoto et al., 2010]. However, the plasma and metabolite fractions cannot be estimated from such measurements. No integrated devices have yet been proposed to provide a full characterization of new radiotracers in small animals including plasma separation, radioactivity monitoring and chemical separation of metabolites.

With their range of demonstrated functionalities, reduced analysis time, cost, reagent quantities and human manipulations [Kang et al., 2008; Whitesides, 2006], microfluidic technologies are a very attractive solution to provide full characterisation of new radiotracers in rodent nuclear imaging.

In this work, we present a key building block for such an integrated microfluidic chip: a real time microfluidic blood radiation monitoring chip (Figure 8.1). After an overview of the theoretical background and prior art for radiation detection within microfluidic chips, the proposed design is described and the microfluidic detector fabrication process is detailed. The microfluidic chip was embedded in a blood counting system and characterised for sensitivity to common PET and SPECT radiotracers. A dose response curve was obtained from an aqueous radioactive solution. Finally, the system was employed to measure an input function in a rat using ^{18}F -FDG.

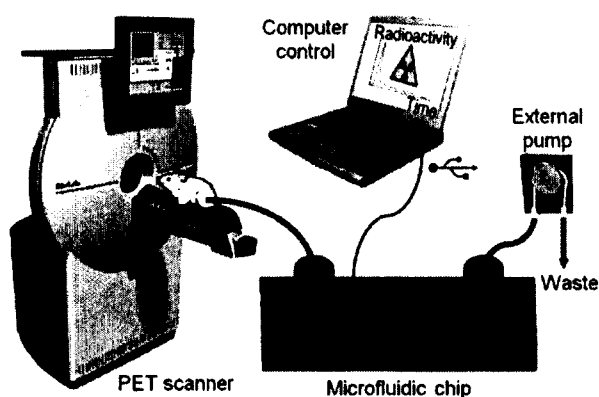


Figure 8.1: Microfluidic blood counter connected to an animal for PET pharmacokinetic studies.

8.3 Theoretical background

In typical nuclear imaging experiments with small animals, radiotracer blood concentration rapidly increases during the bolus injection of a radiotracer, typically within a few seconds. Within a few minutes after the injection, the tracer penetrates into the tissues, rapidly lowering the blood concentration, until equilibrium in the exchanges between the blood and tissues is reached. The radiotracer blood concentration then stabilises to, typically, a few tens of radioactive disintegrations per second (Becquerel, Bq) per μl . In the mouse model, only a few hundred μl at most are available for real time analysis over a 10-30 min period. As a consequence, the detection volume must be kept at a minimum, around 1 μl at any given time during measurement.

To faithfully reproduce the input function, the detector must then integrate a small signal over a very short time period, roughly 1 s, on a very small detection volume, around 1 μl . To

obtain a statistically significant signal, the detection efficiency must therefore be very high. For typical radiation detection experiments, the detection efficiency relies on three parameters: (1) the detector intrinsic efficiency (2) the capture solid angle and (3) the attenuation of the emitted radiation in the interface layer between the sample and the detector sensitive volume. The capture solid angle is maximized by minimizing the distance between the source and the detector and by having a source the same size or smaller than the detector. The attenuation of the radiation depends on the type of radiation to be detected.

PET imaging is based on positron emitting radioisotopes. Positrons, the antiparticles of electrons also known as β^+ , are emitted in a continuous energy spectrum peaking at around 1/3 of the maximum emission energy, $E_{\beta\max}$. The maximum energy depends on the isotope and ranges from 0.6 to 1.7 MeV for common PET tracers (^{64}Cu , ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{68}Ga and ^{15}O) [Cherry et al., 2003]. Positrons are typically stopped within a few millimeters in biological tissues, then they annihilate with an electron in the medium, producing two 511 keV annihilation photons that go through the body and are detected by the PET scanner. SPECT imaging relies on gamma (γ) radiation, typically between 60 keV and 250 keV, directly emitted by common radionuclides such as $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{111}In , ^{123}I and ^{201}Tl [Cherry et al., 2003]. The gamma emission is typically accompanied by Auger and conversion electrons. Another class of radionuclides used for metabolic radiotherapy decay mostly or solely by β particle emission [Anderson et al., 2000]. Measuring the input function of these radiopharmaceuticals would also be useful to calculate the radioactivity exposure of the target and other organs.

Thus, for blood radioactivity monitoring, it is possible to detect either the photon (annihilation or gamma) or the charged particle (positrons, β^- particles or electrons). High-energy photon detection requires a high-density crystal, generally between 1 and 2 cm thick, which is not appropriate for microsystem integration. Therefore, charged particle detection is preferred for miniaturized devices as it can be performed with silicon detectors of a few hundred micrometer thickness (the typical thickness of Si wafers).

Charged particles interact with matter by gradually transferring kinetic energy to substrate electrons along their path ranging from zero to a few millimeters, depending on the particle energy and medium composition. Even a very thin interface of a few hundred micrometers

thick can stop the low-energy particles before they even reach the detector. To achieve the detection efficiency required for pharmacokinetic studies in small animals with PET and SPECT, this interface layer must thus be minimized.

8.4 Prior art

Detectors for optical applications have been integrated in microfluidic devices for about twenty years, mainly for fluorescence measurements [Gai et al., 2011; Kuswandi et al., 2007]. However, the requirements for charged particle detection are quite different. In particular, most microfluidic devices with integrated fluorescence detection have an optically transparent channel floor with an optical filter between the sample and the detector. The resulting interface thickness (0.2 to 3 mm thick), however, would stop most of the charged particles emitted by PET and SPECT radioisotopes. In the few cases where the interface was very thin (below a few tens of micrometers) [Namasivayam et al., 2004], the detectors were typically optimized for visible photon detection (shallow depletion region), which is not appropriate for radiation detection.

A radiation detector with high detection efficiency for charged particles was proposed by Burns *et al.* [Burns et al., 1996] for possible integration into a microfluidic system, but the authors opted for fluorescence detection in the actual integrated system [Burns et al., 1998] because of the higher detection efficiency for their application. More recently, radiation detectors have been coupled to microfluidic devices for cell imaging [Cho et al., 2006; Vu et al., 2011] or radiolabeled protein adsorption in microchannel walls [Cho et al., 2009; Lavén et al., 2004], but the sensitivities remained limited due to absorption of low-energy β radiation in the microfluidic channel walls. Consequently, these devices were restricted to the detection of relatively energetic β^+ particles, and thus, to PET tracer detection. To overcome these limitations, the proposed design incorporates a microfluidic channel directly above a radiation detector array, providing a large capture solid angle and eliminating all unnecessary interfaces between the blood and the detection layer. The detection efficiency is thereby increased, enabling a commensurate reduction in sampled blood volume at equal sensitivity – an important advantage in small animal models.

Fabrication of polymer microchannels on top of existing electronics has received growing interest in the past few years [Pan et al., 2011]. Among the available technologies, which include replica moulding and hot embossing, photopatternable polymers are often preferred due to their compatibility with current microelectronic industry standards. In particular, SU-8 (Microchem Corp., USA), an epoxy-based photoresist, is a popular choice because of its high chemical resistance, good optical and mechanical properties, as well as its ability to be processed over a wide range of thicknesses [Pan et al., 2011]. SU-8 microchannels have been integrated on top of electronics for CMOS compatible lab-on-a-chips [Peng et al., 2006]. However, internal stress generated during the patterning process tends to produce fissuring [Johnson et al., 2001] which is problematic for microfluidic devices. Very precisely controlled temperature ramps are required during the resist soft and post-exposure bakes to minimize such stress, lengthening the overall processing time.

Microchem has recently introduced KMPR, an epoxy-based photoresist which is less subject to internal stress, leading to shorter processing time and superior resistance to fissuring [Ou et al., 2008]. To date, KMPR has mainly been used for electroplating moulds [Lee et al., 2008; Shin et al., 2010]. In previous work, we described the use of KMPR as a structural material for microfluidic devices [Convert et al., 2008b] and prototype chips were investigated for radiation detection [Convert et al., 2010b, 2011]. We also proposed a method to render KMPR hemocompatible [Convert et al., 2012a]. In this work, the fabrication process of an optimized device is detailed, including the microfluidics and contact to the underlying detection electronics. The device was embedded in a blood counting system including dedicated electronics, software and pumping unit.

8.5 Materials and methods

8.5.1 Detection principle and geometry

Charged particles transfer kinetic energy to substrate electrons creating free charges. In the depleted region of a reverse biased diode, these charges migrate rapidly to the electrodes and are collected, generating a photocurrent. With the depletion region extending through the whole wafer thickness, *p-i-n* photodiodes are well suited for charged particle detection [Knoll, 2000]. Existing charged particle counters for measuring blood radioactivity [Ashworth et al.,

1996; Convert et al., 2007a; Eriksson et al., 1988; Yamamoto et al., 2001] are typically made of a catheter from the animal cannula placed against a detector (Figure 8.2A). Such systems involve a $\sim 700 \mu\text{m}$ thick interface between the blood sample and the detection area that stops low energy beta particles, thus reducing detection efficiency. The proposed microfluidic device is made of a flat rectangular KMPR microchannel fabricated over commercial unpackaged silicon *p-i-n* photodiodes (Figure 8.2B).

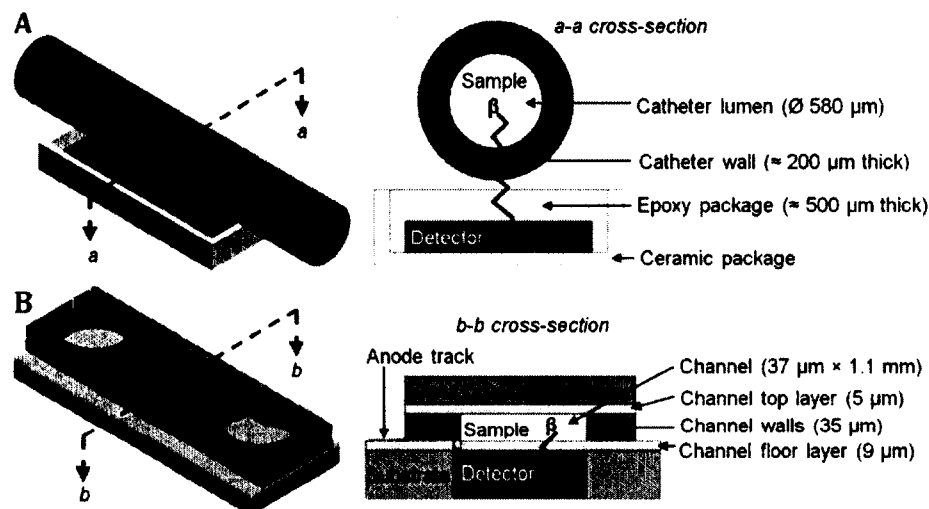


Figure 8.2: Schematic views of a cannula-based blood counter (A) and of the microfluidic blood counter (B, only one diode shown) (not to scale).

This design has two advantages over cannula-based systems: the interface thickness is limited to the microchannel floor layer (a few μm) and the aspect ratio of the microchannel (width \gg height) leads to a quasi 2D measuring geometry and, thus, to a large capture solid angle approaching 2π . The resulting increased detection efficiency enables a significant reduction in the detection volume without compromising sensitivity, making this approach better suited to the small blood volume of rodents. Though the junctions at either end of the fluidic device and change in lumen shape (circular vs rectangular) may lead to dead volumes and turbulence, these effects are expected to be negligible as explained below. Furthermore, this technology is biocompatible and readily amenable to the integration of other microfluidic functionalities (plasma separation, microsampling, chemical species separation, etc.) required for full on-chip characterisation of new radiotracers in the context of small animal nuclear imaging.

8.5.2 Microfluidic chip fabrication process

The fabrication process was based on non-sacrificial photolithography over a SiO₂ passivated Si wafer, compatible with most hard substrates (Figure 8.2B). This process provided straightforward fabrication with very precise microchannel positioning over an electronic device. A polymer-coated glass top was used to seal the channels and to provide access holes while allowing channel content visualization. The process provided a uniform polymer interface to the fluid inside the microchannel. The hydrodynamic and interface properties were then simple to model. Access holes geometry was designed to fit Nanoports (Upchurch, USA), allowing easy catheter connection.

Wall layer design

The channels were fabricated over 4 inch wafers containing a continuous matrix of $2 \times 2 \text{ mm}^2$ *p-i-n* photodiodes (Excelitas Technologies, Vaudreuil-Dorion - formerly PerkinElmer Optoelectronics). The wafers were diced into individual strips that were processed independently. The fluid microchannels were designed to exactly overlap a row of twelve adjacent photodiodes to have sufficient detection volume for efficient pharmacokinetic studies with rodent models. The channels were U-shaped to keep the diode anodes close to the pattern edge while limiting the total footprint, to maximize the fabrication yield. The overall dimensions of the resulting pattern photomask were $34 \times 8 \text{ mm}^2$. The fluid microchannels have a $37 \mu\text{m} \times 1.1 \text{ mm}$ cross section and a length of 31.5 mm (1.3 μl). Except for the Nanoport bonding zones, the unused filled areas of the wall layer were patterned in a grid shape (300 μm wide lines, 2.3 mm pitch) to limit internal stresses and reduce the bonding surface (Figure 8.3A). The microchannel walls were made larger than the grid lines (500 μm wide) to ensure good sealing. Unlike in our previous designs [Convert et al., 2010b, 2011], metallic tracks were added to displace the anode contact away from the microchannel, simplifying wire bonding and optimizing the detection area (Figure 8.3B). To minimize stray capacitance, the anode tracks were fabricated over the KMPR floor layer and kept as short as possible.

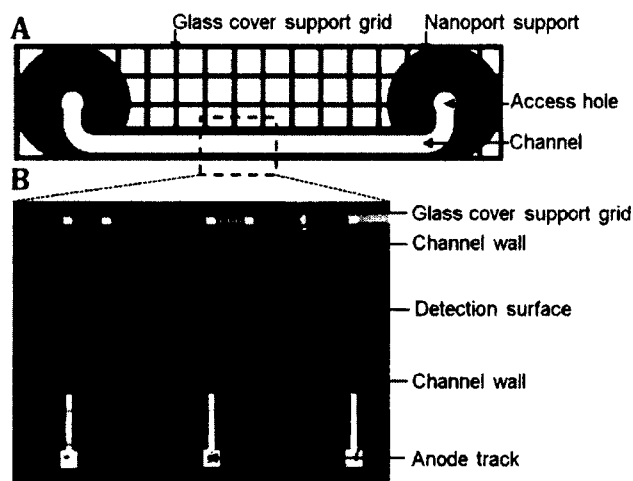


Figure 8.3: A. Wall layer photomask. B. Picture of a section of the microchannel walls build on top of commercial unpackaged photodiodes (optical microscope, 2.5X).

General microfabrication parameters

Unless otherwise specified, the photolithographic parameters were as follows: Shipley S1813 spin coating at 2000 rpm, 2 min soft bake at 115 °C; AZ nLOF 2020 spin coating at 3000 rpm, 1 min soft bake at 110 °C, 5 s exposure, 1 min post exposure baked (PEB) at 110 °C, and 2 min development in Microchem MF319; Microchem KMPR1005 spin coating at 2000 rpm, edge bead removal with acetone, 5 min soft bake at 100 °C, 40 s exposure, 2 min PEB at 100 °C, 2 min development with Microchem SU-8 developer; KMPR1005 25% in SU-8 Thinner spin coating at 2000 rpm, 1 min soft bake at 100 °C, 25 s exposure, 2 min PEB at 100 °C, 15 s development in MF319:H₂O (1:1).

Before resist spinning, samples were dehydrated in a stove at 125 °C for 30 min. Both nLOF and KMPR were exposed with a broadband aligner through a high-pass i-line filter. Soft bake and PEB were performed on a hot plate while hard bake were performed in a stove. All photoresist developments were made by immersion. The samples were rinsed in DI-water for 2 min then dried with nitrogen after each wet cleaning, wet etch or development. Samples were rinsed in IPA for 20 s after SU-8 developer development before the DI-water rinse. Descum was performed in plasma O₂ at 50 W for 2 min (Plasmaline 211, Tegal Corporation). Resist stripping was performed with solvents in ultrasonic bath, 5 min in acetone followed by 5 min in IPA.

Sample preparation and passivation (Step A, B)

The Excelitas wafers, passivated with a ~30 nm SiO₂-Si₃N₄ layer, were first protected with S1813 photoresist and diced in 42 × 16 mm² dies to add a 4 mm-wide area around the channel pattern for edge beads (Figure 8.4A). After resist stripping, an additional 300 nm SiO₂ passivation layer was deposited on the dies using plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD, HFSiO, 300 °C). Contact regions over the anodes were defined by photolithography using nLOF 2020. After descum, the SiO₂ was dry etched in CF₄ (AOE ICP, Surface Technology Systems). The nLOF mask was then stripped and the KMPR1005 floor layer added (Figure 8.4B). The dies were then hard baked for 3 h at 180 °C.

Anode track lift-off (Step C)

Anode track patterns were defined using nLOF 2020 (spin coating at 1500 rpm, 8 s exposure and development for 3 min 30 s). After descum, anode surfaces were cleaned in BOE for 5 s, rinsed in running DI-water for 5 min and dried with nitrogen just before metal evaporation. The metal films, 3 nm Cr and 300 nm Au, was then evaporated on the dies using an inclined rotating stage. Lift-off was performed in acetone for 1 h 30 (Figure 8.4C). A thin KMPR1005 25% floor layer was then deposited on the dies, patterned to allow wire bonding over the end of the gold tracks, and hard baked for 1 h at 180 °C.

Microchannel wall lithography (Step D)

After dehydration, KMPR1025 was deposited on the dies and they were placed under vacuum for 10 min for degassing. The dies were then spun at 2000 rpm, edge beads were removed with acetone and the samples were left to rest for 5 min before soft bake (15 min at 100 °C) to increase layer uniformity. The layer was then exposed for 50 s and baked for 5 min at 100 °C. The development was performed in SU-8 developer for 8 min 30 s (Figure 8.4D). Finally, the dies were hard baked for 1 h at 180 °C.

Cover etching (Step E, F)

Borosilicate cover slips, 130 to 160 μm thick, were used as the channel covers (25 × 75 mm² #1 thickness, Bellco Glass Inc., Figure 8.4E). The glass cover slips were wet etched to have the same surface area as the KMPR wall pattern with two access holes. The cover slips were first cleaned with soap (Alconox, Cole-Parmer Instrument Co) then immersed

for 15 min in piranha solution (1:1). Chromium was sputtered on one side (300 nm) and patterned using KMPR 1005 as a mask. The cover slips were then hard-baked for 1 h at 180 °C. After descum, chromium was wet etched using Chrome Etch (CR7S10, OM Group Inc.) for 5 min and the cover slips were glued to Si wafers to protect the backside during glass etching (AZ P4903 spin coated at 3000 rpm, cover slip application, bake for 30 min at 125 °C in an oven). Access holes were etched using a BOE:HCl (2:1) solution [Mazurczyk et al., 2008] at 40 °C for 1 h 30. P4903 was then stripped with solvents (10 min), KMPR was removed with piranha (1:1, 15 min) and chromium was stripped with Chrome Etch (Figure 8.4F).

Cover bonding (Step G, H)

The cover slips were bonded using KMPR in a process similar to the one usually employed with SU-8 [Carlier et al., 2006]. After dehydration, KMPR1005 was spin coated at 6000 rpm and soft-baked for 10 s at 100 °C (Figure 8.4G). The cover slips were then applied over the channel walls and the alignment was adjusted under an optical microscope. The assembly was then baked on a hot plate at 100 °C for 1 min, exposed for 30 s then baked under pressure ($\approx 1.10^6$ Pa) for 5 min at 100 °C then for 1 h at 180 °C (Figure 8.4H).

Microfluidic chip packaging

The chips were diced to position the gold pads close to the die edge, thus reducing the length of the wire bonding. To prevent residue from obstructing the microchannels, access holes were protected with semi-tack during dicing. The contact surfaces were cleaned with IPA. The Nanoport adhesive ring and then the Nanoport itself were placed over the access holes and maintained in place using the supplier's clamps. The assembly was then baked for 1 h at 180 °C.

After microchannel fabrication, the devices were glued to the metal plane of a gold-plated custom-made PCB using conductive epoxy (H20E, Epoxy Technology Inc.), ensuring that the back contact was connected to the common cathode. Eight anode (top) contacts were then wire-bonded to a common PCB pad to electrically connect the photodiodes in parallel.

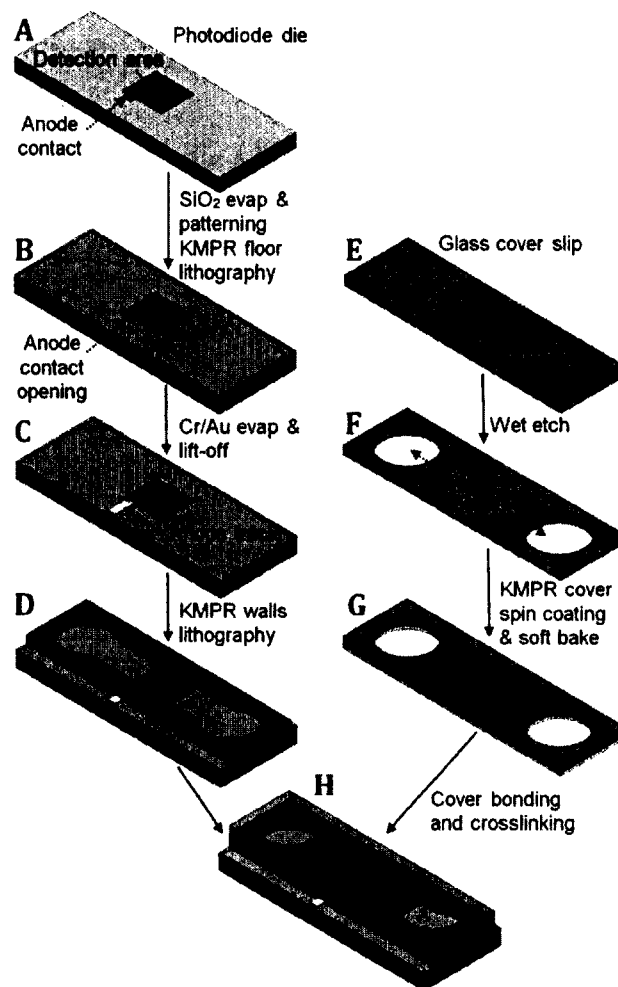


Figure 8.4: Simplified fabrication process diagram for the KMPR microfluidic radiation detector (only one diode shown, not to scale).

Hemocompatibility enhancement

Passivation of the microfluidic chip itself was performed by flowing BSA solution (10 mg ml⁻¹ in phosphate buffer saline) through the system at 2 μl min⁻¹ for 2 h. An accepted blocking agent for plasma proteins with many polymeric material surfaces [Kamath et al., 1994], BSA passivation has recently been shown to also be effective with KMPR [Convert et al., 2012a].

8.5.3 Device characterisation

Device electrical and functional performances were evaluated. As a reference, all measurements were repeated with an existing cannula-based geometry[Convert et al., 2007a] consisting of a packaged *p-i-n* photodiode (S3588-08, $3 \times 30 \text{ mm}^2$, Hamamatsu Corporation) with a catheter (0.58 mm ID, 0.965 mm OD, Intramedic PE50, Becton Dickinson) centered on its surface (Figure 8.2A).

Electrical characterisation

CV-IV measurements were made on each diode with a SMU (4200-SCS, Keithley) before microfabrication processing, after the floor layer lithography and after the cover bonding to monitor any changes in photodiode performance. Electrical characteristics were also measured after wire bonding.

Modeled detection efficiency

Theoretical detection efficiency was evaluated, for both the microfluidic chip and existing cannula-based geometries, in terms of energy loss at the interface layer (Table 8.2) between the blood sample and the detection area, as well as the geometrical detection efficiency.

When a charged particle goes through a layer of thickness X_i (cm), the energy loss, E (MeV), is estimated using the equation[Anderson, 1984]:

$$E = \int_{x_i}^0 S(x) \times \rho \times dx, \quad (8.1)$$

where S ($\text{MeV cm}^2 \text{ g}^{-1}$) is the particle collision stopping power (the average rate of energy loss per unit path length due to Coulomb interactions), ρ (g cm^{-3}) is the medium density, and x (cm) is the thickness of the medium. The energy loss must be integrated over the thickness (1 μm integration step) because the particle gradually loses energy and S is a function of the particle energy. Tabulated values [National Institut of Standards and Technology, n.d.-a] of S as a function of the particle energy and atomic composition of the three types of absorbing media were used in Eq. 1 for (1) catheter walls (Polyethylene, C_2H_4 , $\rho = 0.94 \text{ g cm}^{-3}$, mean excitation energy = 45.7 eV), (2) KMPR microchannel floor layer (epoxy, $\text{C}_{22}\text{H}_4\text{O}_{25}$, $\rho = 1.2 \text{ g cm}^{-3}$, mean excitation energy = 91.7 eV) and (3) epoxy package (same values as KMPR). Energy

loss was computed for two incident energies (E_i) of 190 keV and 836 keV, corresponding to the mean beta energy[Berkeley Laboratory Isotopes Project, n.d.] of a low and a high energy PET isotope, ^{64}Cu and ^{68}Ga , respectively.

Numerical solid angle simulations were performed with the TracePro software (Lambda Research, Littleton, MA) to determine the geometrical detection efficiency (number of particles inside the microchannel incident onto the detector as a fraction of the total number of emitted particles), η_{geo} (%), for both the microfluidic chip design described here and the cannula-based detection geometry.

Functional characterisation

Experimental confirmation of the model predictions was undertaken by embedding the microfluidic chip and the cannula-based detector in the same blood counting system. This system consists of two separate hardware modules and control software (Figure 8.5). The detector unit includes the detector chip connected to a custom made signal processing board for pulse shaping and amplification. The control unit includes the control electronics for radiation pulse counting, USB communication with a personal computer and pump speed control for the miniature peristaltic pump (P625/900.133, Instech Laboratories Inc.). A graphical user interface is used to set-up experiment parameters, display the blood time-activity curve in real time and process recorded data.

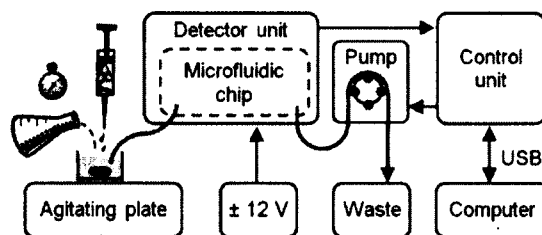


Figure 8.5: Block diagram of the acquisition setup. The pump was used only for the dose-response curve and input function measurements. The agitating plate was used only for dose-response curve measurement.

For direct charged particle detectors, the sensitivity is dependent on the incident particle energy and must be characterized for each tracer. The microfluidic chip and the Hamamatsu detector (with Intramedic PE50 catheter, 0.58 mm ID, 0.97 mm OD, Becton Dickinson) were injected with $10 \text{ kBq } \mu\text{l}^{-1}$ solutions of two of the most common PET radioisotopes (^{18}F , ^{11}C) and $30 \text{ kBq } \mu\text{l}^{-1}$ solution of the most common SPECT isotope ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). The average count rate,

m (cps), acquired during two minutes was corrected for radioactive decay and used to calculate the device absolute detection efficiency, η (%):

$$\eta = \frac{m}{C \times V}, \quad (8.2)$$

where C (Bq μl^{-1}) is the calibrated solution concentration and V (μl) is the device detection volume. An “improvement factor” (see Table 8.3), defined as the detection efficiency of the microfluidic design presented here relative to the detection efficiency of cannula-based systems, $\eta_{\text{device}}/n_{\text{conv}}$, was computed.

The system linearity was characterised by measuring the decay of a static ^{11}C source injected in the microchannel. For dynamic linearity assessment, a dose-response curve was then determined by injecting a solution of ^{18}F -FDG; 27 MBq in 5.1 ml of water, followed by four successive 1:2 manual dilutions at 5 min interval. The withdrawing pump was set to 30 $\mu\text{l min}^{-1}$, typical of experiments with rats. The microfluidic chip was then flushed with non-radioactive water to ensure that no residual radioactivity remained in the microchannel.

Finally, a 334 g Sprague–Dawley rat was anesthetized with isoflurane (2.5% + 1.5 l min^{-1} O_2) and cannulated in the caudal artery with a 5-cm-long PE50 catheter preloaded with heparinized saline (0.9%, 50 U ml^{-1}) to avoid air bubbles. A 40-cm-long PE10 catheter (0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Intramedic PE10, Becton Dickinson) was connected to the PE50 catheter and to the microfluidic chip. PE50 was chosen for cannulation to best fit the animal artery and PE10 was chosen for blood transport to reduce the dead volume between the animal and the detector. PE10 catheter was also used to connect the output of the microfluidic chip to the pump tubing (silicon tubing, 0.020” ID, 8 cm long, P625/TS020S, Instech Laboratories Inc.) and the pump to the waste. The microfluidic blood counter and all tubing were flushed with heparinized saline before connecting the animal to the PE10 catheter. The pump was then started at 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ and the rat was injected with 35 MBq of ^{18}F -FDG (caudal vein, 0.3 ml at 0.9 ml min^{-1}). The pump was stopped 20 min after injection, the cannula removed from the animal and the system flushed with heparinized saline. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the in-house Ethics Committee for Animal Experiments and the Canadian Council on Animal Care.

8.6 Results and discussion

8.6.1 Microfluidic chip fabrication process

Sample preparation and passivation

The 300 nm SiO₂ layer below the KMPR floor layer was a precautionary measure that ensured uniformly good electrical isolation of the underlying photodetector electronics in case of any fluid leakage due to micro-defects of the polymer film. The photoresist nLOF was chosen as the masking layer for contact opening in SiO₂, rather than the KMPR floor layer, to avoid the increased roughness resulting from SiO₂ dry etching. As both nLOF and KMPR are negative photoresists, the same photomask could be used for contact opening in SiO₂ and KMPR floor. Note that a KMPR hard bake was necessary to ensure sufficient chemical resistance during lift-off.

Anode track lift-off

The lift-off was facilitated by using AZ nLOF 2020 resin spin-coated at 1500 rpm leading to a 3.1 μm thick layer with retrograde profiles. BOE cleaning before evaporation was required because developers and plasma O₂ descum oxidize the anode. The inclined rotating stage led to good step coverage even for the 300 nm thick metal layer over the 9 μm KMPR step (Figure 8.6A).

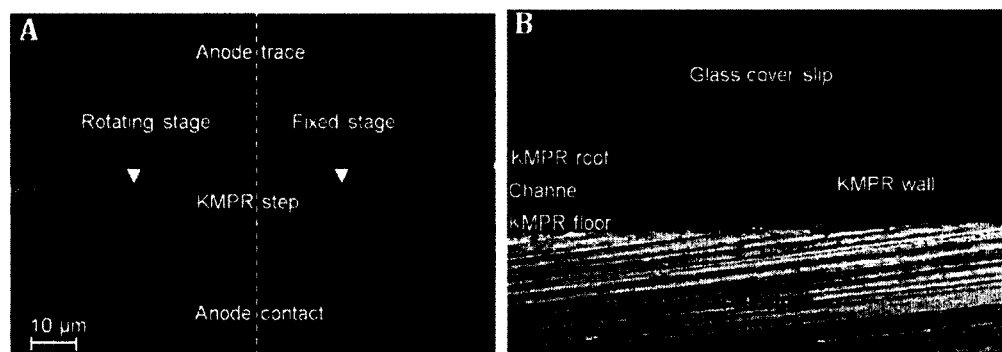


Figure 8.6: A. Electron microscope view of the step coverage after evaporation with a rotating stage compared to a fixed stage (top view with 45° slope of the microscope stage). B. Cross sectional view of a 35-μm deep microchannel wall on a Si substrate. The cross section was obtained by dicing the chip after cover bonding (Optical microscope, 10X).

Gold was chosen because it provided a better electrical contact to the underlying anode than pure aluminum. Further optimization would be required to obtain a good electrical contact with a CMOS compatible metal. Typical lift-off in Remover at 70 °C (Microchem Corp.) was not possible without strongly affecting the KMPR layer, even after hard bake. However, hard-baked KMPR, like SU-8, has good resistance to acetone supporting the lift-off process. In small number of cases, stress-induced fissures needed to be filled with KMPR1005 25% film after lift-off. This thin 350 nm film was developed with diluted MF319 because SU-8 developer or pure MF319 were too aggressive.

Microchannel wall lithography

KMPR lithography with EBR yielded 37 μm -wide channel sidewalls with a vertical profile similar to SU-8 (Figure 8.6B). The fabrication process is however more straightforward as no complex temperature ramps are needed to avoid excess stress and cracks in the resist. The reduced stress also increased surface adherence over Si and SiO_2 .

Cover etching

As the glass cover slips were less than 200 μm thick, special care was taken to limit tensile stress induced by the chromium mask layer. The metal was deposited by sputtering rather than evaporation. The wet etch performed with BOE:HCl solution [Mazurczyk et al., 2008] led to an etch rate slightly above 2 $\mu\text{m min}^{-1}$ (HCl eliminates the BOE/glass reaction products, increasing etch rate). Even if wet etch with a hard mask requires several processing steps, it was preferred to laser micromachining because it produces a V-shape hole profile that reduces edge beads around the holes during the KMPR cover layer spinning.

Cover bonding

A cross sectional view of a complete device after bonding is shown in Figure 8.6B. The cover layer was 5 μm thick and the channel walls remained vertical after bonding. Devices were tested up to $15 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ ($\approx 10 \text{ ml min}^{-1}$) fluid pressures without failure. KMPR is therefore an effective adhesive layer for microfluidic channel sealing. Wall layer flatness is of great importance for successful bonding. For channel thickness below 20 μm , those parameters are even more critical to avoid channel obstruction. Thinner adhesive layers (KMPR1005 dilution) were tested for such thin channels. Although cover bonding was facilitated, the overall adhesive strength was reduced.

Microfluidic chip packaging

A photograph of the final chip after wire bonding is shown in Figure 8.7 on a Teflon support. A gold-plated pin header on the back side is used for connection to the signal processing PCB. Nanoports allow connection from PE10 catheters (cannula from the animal artery) to the microchannel with minimal dead volume and adhesive contamination of the fluid path. Despite laminar flow in both the catheter with circular section and the microchannel with flat rectangular section, the geometrical change may introduce some turbulence and add a small smoothing of fast radioactive concentration change, contributing to the total dispersion of the system. This effect is however considered to be negligible compared to the dispersion occurring inside the catheter itself.

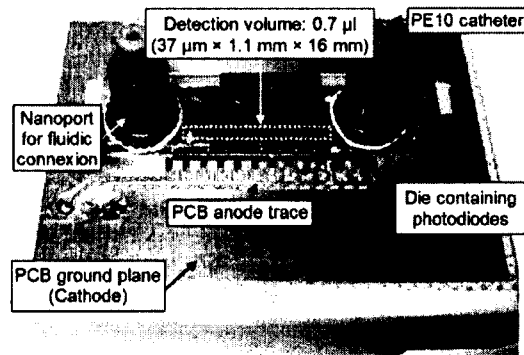


Figure 8.7: Photograph of the final chip after wire bonding.

8.6.2 Device characterisation

Electrical characterisation

The mean capacitance and dark current at -30 V bias for single diodes before microfabrication processing, after SiO_2/KMPR passivation, and at the end of the complete process, are presented in Table 1. An example of capacitance and dark current as a function of reverse voltage is presented in Figure 8.8 for a single diode. Passivation did not affect the capacitance and the gold track has a small impact. Dark current was slightly reduced after passivation and remained unchanged with the anode track and wall layer. The bonded device electrical performances (eight diodes in parallel, total 19.2 mm^2 detection surface) are comparable to the reference Hamamatsu detector (90 mm^2 detection surface) used in the cannula-based geometry (Table 8.1).

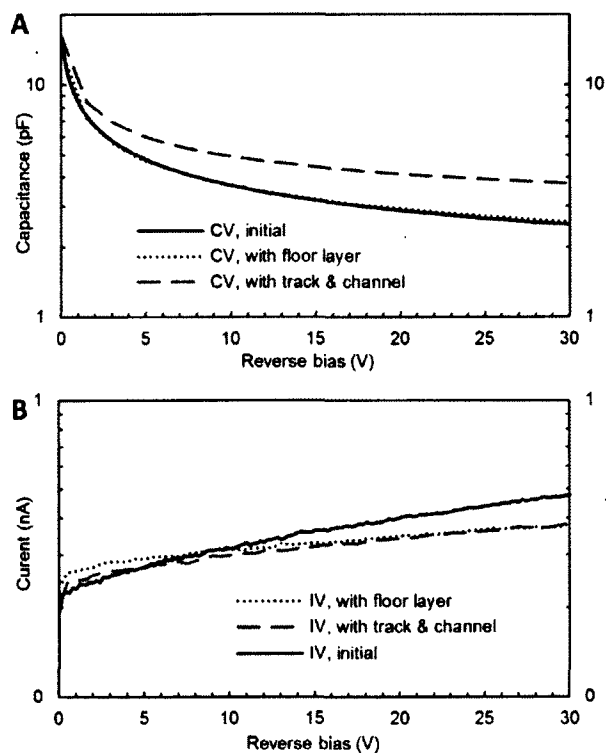


Figure 8.8: CV (A) and IV (B) measurements of one typical diode before processing, with the SiO₂/KMPR floor layer, and with the gold track and the complete microchannel.

Though the microfluidic channel was designed for twelve diodes along the fluid path, eight diodes were functional on any single device on average, due to gold track fabrication defects. Gold track fabrication yield could be improved by increasing the chromium adhesion layer thickness from 3 to 10 nm and by optimizing the KMPR floor layer lithography to obtain slightly positive sidewall angles, increasing the step coverage. A larger number of working diodes would increase the device sensitivity, as the measured radioactivity would rise linearly with the detection volume while the electronic noise rises as the square root of the number of diodes, leading to a commensurate improvement in minimum detectable radioactivity concentration. The resulting physical characteristics of the tested devices are presented in Table 8.2.

Table 8.1: Electrical properties of tested devices (measured for bias = -30 V). The final microfluidic device consists of 8 diodes bonded in parallel on a PCB (* 8 diodes).

Parameters	Capacitance (pF)		Dark current (nA)	
	Microfluidic	Cannula-based	Microfluidic	Cannula-based
Single diode before processing	2.56 ± 0.05	-	0.48 ± 0.004	-
Single diode with floor layer	2.61 ± 0.01	-	0.36 ± 0.003	-
Single diode with track & microchannel	3.77 ± 0.03	-	0.37 ± 0.05	-
Final device	32.0*	52.8	2.0*	2.1

Modeled detection efficiency

Theoretical energy loss calculations (Table 8.2) show that low energy particles will be entirely absorbed within the interface layers above the detector in the cannula-based geometry, whereas almost no particles should be lost to absorption in the microfluidic device described here. The proposed device is therefore expected to be highly beneficial for low β energy PET isotope detection. Furthermore, 120 keV conversion electrons emitted by ^{99m}Tc do not reach the active detection area in the cannula-based geometry, rendering the most widespread SPECT radioisotope undetectable, unlike with our device.

Table 8.2: Physical characteristics of tested devices (PE = polyethylene, Ep = epoxy, Ei = incident energy).

Parameters	Microfluidic	Cannula-based
Interface thickness (μm)	9 (Ep)	700 (200 PE + 500 Ep)
Detection volume (μl)	0.7	7.9
Energy loss (keV) for $E_i = 190$ keV	3	190
Energy loss (keV) for $E_i = 836$ keV	2	142
Geometrical detection efficiency (%)	49.3	30

Solid angle calculations (Table 2) predict a quasi-optimal geometrical detection efficiency of the microfluidic chip (considering that half of the particles are emitted in the direction opposite to the detector). The geometrical detection efficiency is 1.25× better than our previous prototypes [Convert et al., 2011] and 1.66× better than the cannula-based geometry.

Functional characterisation

Measured detection efficiencies for both the proposed microfluidic design and cannula-based geometries confirm the theoretical calculation (Table 8.3). As expected, the increase in detection efficiency is more significant for low-energy particles. The model calculations predict that the cannula-based geometry cannot detect conversion electrons emitted by ^{99m}Tc . The detected event rate (~ 500 cps) above background (set to a ~ 5 cps threshold before each experiment) is therefore attributable to the 140 keV gamma radiation of ^{99m}Tc , which has a very low but non-zero probability of interaction in a 300 μm thick Si detector (0.06% photoelectric and 1% total). The resulting measured detection efficiency (0.2%) is however insufficient for any typical animal model experiment. The relatively low detection efficiency of ^{99m}Tc compared to ^{18}F or ^{11}C (4% compared to 39% and 47%) in our microfluidic chip is due to the reduced emission probability of the detected particle (9% compared to $\sim 100\%$). Even though further improvements in detection efficiency would be required for experiments with rats, the typical blood radioactivity in mice is high enough to warrant studies with ^{99m}Tc .

Table 8.3: Absolute detection efficiency, η , for microfluidic device and cannula-based detector measured for different isotopes (10 kBq μl^{-1} for ^{11}C and ^{18}F , 30 kBq μl^{-1} for ^{99m}Tc).

Isotope	Particle energy (keV)	Emission probability (%)	Microfluidic η (%)	Cannula-based η (%)	Improvement factor
^{11}C	0 - 961	100	46.9	12.1	3.9
^{18}F	0 - 634	97	38.8	4.4	8.8
^{99m}Tc	120	9	3.8	0.2	19

Note that the summed error on count rate (~ 5 cps) and solution concentration (~ 20 kBq for a 400 μl solution) remained around 1% for all tracers for both the microfluidic and the cannula-based detector, leading to an error on the improvement factor of less than 1%. As both the microfluidic and the cannula-based detector have the same response to 140 keV photons,

the improvement factor will not be affected by counts due to a contribution from 140 keV gamma rays interaction.

Thus, the microfluidic detector has high detection efficiency for PET tracers and is able to detect SPECT tracers. This high detection efficiency allows the reduction of the detection volume by a factor corresponding to the improvement factor in detection sensitivity, while keeping the same counting statistics. For instance, the detection volume can be decreased from 7.9 μl to 900 nl for ^{18}F radiotracers, a considerable improvement for use with small animal models where limited blood volume is an issue.

For up to 10 kcps, the response deviated from linearity by less than 1%. This count rate is obtained for concentrations of 32 $\text{kBq } \mu\text{l}^{-1}$ with ^{11}C that are well above that typically encountered in small animal experiments. The dose response curve of Figure 8.9A shows five plateaus with an exponential decrease in mean plateau height for successive 1:2 dilutions (Figure 8.9B). The injected radioactive concentrations are representative of typical concentrations used in rats and mice studies, showing the system linearity under flow-through conditions.

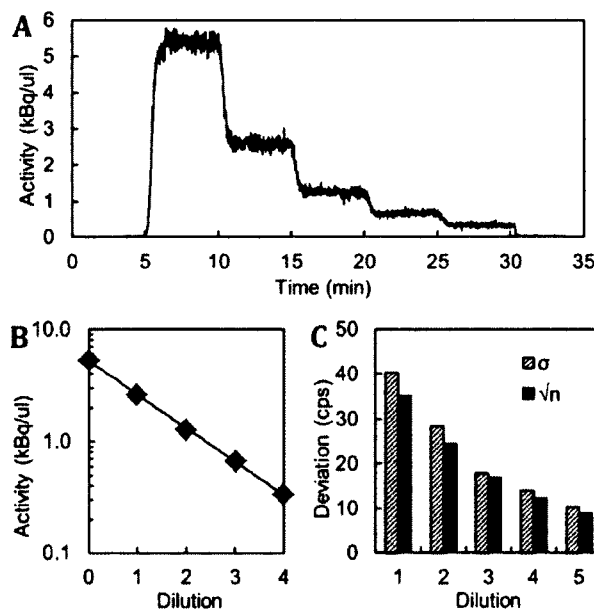


Figure 8.9: A. Dose-response curve for a 5.2 $\text{kBq } \mu\text{l}^{-1}$ ^{18}F -FDG solution, after four successive 1:2 dilutions and switch back to non-radioactive water. This curve was corrected for detector efficiency, propagation delay and radioactive decay. No corrections were required for background count rate. B. Resulting mean plateau height for each dilution. C. Resulting plateau standard deviation (σ) compared to Poisson statistical variation (\sqrt{n}).

Furthermore, the count rate variations in each plateau agrees well with the Poisson statistics inherent to radioactive emission processes (Figure 8.9C): the standard deviation of the count rate closely follows the square root of the count rate.

This experiment also demonstrates that the radioactive molecules do not adsorb to the KMPR walls as the count rate goes back to the background rate (set to a few cps before the radioactive injection) when the fluidic input is switched back to non-radioactive water. This behaviour was confirmed with whole blood by switching the microfluidic blood counter input back to non-radioactive saline solution after experiments. Finally, these results illustrate that fast changes in radioactive concentration are smoothed due to radiotracer dispersion inside the catheter. Such effects are typical of online counters and can be corrected with numerical modelling by fitting the input function time constant for a known injection speed [Meyer, 1989].

The whole-blood input function measured from the caudal artery of a rat is presented in Figure 8.10. Blood radioactivity rapidly rises after the radiotracer intravenous injection, followed by a bi-exponential decrease as the tracer penetrates into the tissues. This typical curve shape obtained from the whole blood of a rat shows that the microfluidic blood counter is suitable for small animal experiments. It also demonstrates that passivated KMPR is highly hemocompatible as non-diluted rat whole blood flowed through the thin 37- μm thick channels at low speed for 20 min without clotting. The device was tested with whole blood at $10 \mu\text{l min}^{-1}$ for the same duration without any deleterious effect, indicating that the microfluidic blood counter would also be suitable for studies with a mouse model.

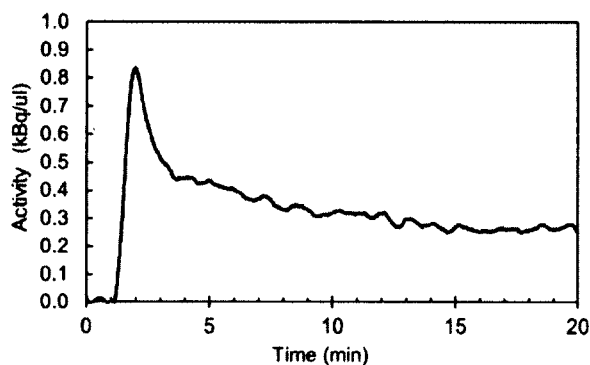


Figure 8.10 : Input function measured from a rat injected with 35 MBq of ^{18}F -FDG. The curve was corrected for detector efficiency, radioactive decay and averaged to reduce statistical noise (Savitzky-Golay method, 100 points).

8.7 Conclusion

KMPR microchannels were fabricated directly atop unpackaged *p-i-n* photodiodes to reduce the distance between the radioactive fluid sample and the detector in a microfluidic blood radioactivity counter. KMPR is easy to process, robust and does not adversely affect photodiode performance. The device geometry and electronics provide high detection efficiency for β radiation and conversion electron detection in small blood volumes compatible with pharmacokinetic PET and SPECT studies with rodent models. The response is linear with the radioactive concentration and the microfluidic blood counter was successfully used to measure rat whole blood radioactivity after injection of a PET tracer.

Future work will validate the microfluidic blood counter in pharmacokinetic studies with small animals and evaluate the robustness of the BSA passivation for reuse. Further developments will focus on the addition of plasma separation and microsampling functionalities on-chip to provide full characterization of new radiotracers.

8.8 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Henri Dautet of Excelitas Technologies for supplying the *p-i-n* photodiode wafers, Véronique Dumulon-Perreault and Mélanie Archambault from the Sherbrooke Molecular Imaging Centre for the support with animal experiments and the staff of the Université de Sherbrooke Nanofabrication and Nanocharacterisation Research Center (CRN²) for microfabrication support. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant #MOP-86717 and NanoQuébec. The Étienne-Le Bel Clinical Research Centre hosting the Sherbrooke Molecular Imaging Centre is a FRSQ funded research organization.

CHAPITRE 9 DISCUSSION

Le projet de recherche décrit dans ce document représente la réalisation de la première phase du projet plus global de développement d'une puce d'analyse sanguine complète pour l'imagerie moléculaire chez le petit animal. Les objectifs étaient d'implanter les deux premières fonctions, soit un microcanal et un détecteur de radioactivité, puis de les intégrer pour former un compteur microfluidique pour la mesure de la radioactivité du sang total. Ces objectifs généraux ont tous été atteints et les résultats obtenus quant à l'implantation de ces deux fonctions ont fait l'objet des articles scientifiques inclus dans ce document. Le présent chapitre est consacré à discuter ces réalisations, ainsi que des difficultés rencontrées lors de leur mise en œuvre, et à présenter les perspectives pour la suite du projet.

9.1 Microcanaux

Les microcanaux en KMPR développés pour remplir la première fonction peuvent être ajoutés sur tout type de substrat en utilisant des techniques de microfabrication standards. Ils montrent une bonne étanchéité pour un débit d'eau jusqu'à 10 ml/min, ce qui correspond à une pression de $15 \cdot 10^5$ Pa pour la géométrie utilisée. La validation reste cependant à faire avec du sang à 270 μ l/min tel que stipulé dans le cahier des charges.

9.1.1 Microfabrication

La fabrication de la couche plancher et des murs du canal sont de simples photolithographies qui présentent peu de difficultés dans des procédés de fabrication industriels. En période de prototypage sur des petits échantillons dans des salles blanches universitaires, la photolithographie est cependant plus délicate, surtout pour des couches épaisses. Les cordons (rebord formés lors de l'étalement de résine, voir ANNEXE C.3) posent rapidement des problèmes d'uniformité et les résines visqueuses déposées avec une pipette ont besoin d'un dégazage avant étalement.

9.1.2 Fermeture des canaux

La difficulté principale de ce procédé de fabrication réside cependant dans la fermeture du microcanal par un capot. Avant de fixer le choix sur la lamelle de verre, des essais ont été faits

avec une feuille d'acétate et avec une lame de verre. L'acétate a été rejeté, car il s'opacifiait pendant les derniers recuits du protocole. Par rapport à la lame de verre (1 mm d'épaisseur), la lamelle de verre choisie (150 μm d'épaisseur, grade 1) a l'avantage d'être assez fine pour faciliter la gravure des accès. De plus, elle donne une certaine souplesse pour s'adapter aux non-uniformités ou défauts ponctuels de la couche formant les murs. Elle est cependant cassante et se fissure fréquemment lors de son collage sur les murs du canal, de l'ajout des Nanoports ou d'un serrage trop important des férules venant fixer le cathéter aux Nanoports. Même si ces fissures sont réparables, il serait souhaitable de régler ce problème lors de la prochaine itération. Une lamelle de verre plus fine (100 μm , grade 0) et donc plus souple ou un film de KMPR laminé sont des solutions à envisager.

9.1.3 Évaluation de l'hémocompatibilité

La compatibilité sanguine de la KMPR a été caractérisée par la mesure de l'adsorption de fibrinogène. Même s'il s'agit d'un bon indicateur [Tsai et al., 2002], la coagulation est un processus complexe impliquant de nombreux facteurs qui ne peut être complètement évalué que par des tests plus complets (adhésion d'autres protéines plasmatiques, adhésion et activation des plaquettes, délai de coagulation). De plus, les mesures ont été faites sur des films de KMPR en condition statique et doivent être complétées par des mesures avec flux. La structure guide d'onde à gaine métallique optimisée lors de ce projet pour des films KMPR permettra d'effectuer ces tests. Il est en effet tout à fait possible de rajouter des murs et un toit de microcanal aux structures déjà fabriquées et de réaliser ainsi des mesures en conditions réelles d'utilisation.

9.1.4 Passivation

Avant d'opter pour une passivation à l'albumine, des tests ont été entrepris pour la fixation de polyéthylèneglycole (PEG) sur la surface de la KMPR via un groupement amine. Ce procédé a l'avantage d'aboutir à un lien covalent entre le PEG et la surface, mais requiert des traitements préalables et est très délicat à optimiser. L'adsorption non spécifique d'albumine s'est avérée beaucoup plus simple à mettre en œuvre et s'avère très efficace pour diminuer l'adhésion de fibrinogène. Elle a été appliquée à des dispositifs complets et a permis

d'effectuer des études sur sang total pendant 20 min. Performance d'autant plus remarquable que les canaux fabriqués n'ont que 35 μm de haut.

Quelques tests préliminaires pour comparer le délai de coagulation entre des dispositifs complets passivés ou non ont été entrepris et semblent confirmer l'utilité de cette passivation pour des expériences sur sang total. Cette validation devra cependant être entreprise à plus grande échelle pour avoir des résultats quantitatifs. De plus, la coagulation dans un dispositif microfluidique complet peut être engendrée par un autre élément que la KMPR. En effet, le sang est en contact avec le cathéter d'entrée, le Nanoport, son joint d'étanchéité en caoutchouc ainsi qu'une portion du capot en verre. En outre, même si le volume mort des Nanoports est minime, il n'est pas nul. Il n'est donc pas à exclure que des turbulences soient créées laissant des petites quantités de sang stagnant à la jonction. Ce type de jonction est donc pratique en phase de développement, mais ne représente sans doute pas la solution idéale dans le dispositif final pour des expériences avec du sang.

9.1.5 Réutilisation

Enfin, dans le cadre du projet global, il serait utile d'établir un protocole de nettoyage et de caractériser son efficacité et son influence sur la couche de passivation. Le potentiel de réutilisation des puces pourrait ainsi être établi. Là encore, la structure guide d'onde à gaine métallique et cœur KMPR sous forme de microcanal fermé serait un bon outil de caractérisation. Lors des premiers tests avec du sang, des échantillons ont été nettoyés avec succès entre deux expériences avec une solution de NaOH 1 M. Cette solution corrosive ne grave pas la KMPR, par contre elle agit sur ses propriétés de surface et elle est à manipuler avec soins. Des détergents bactéricides pourraient être une bonne alternative.

9.2 Détecteurs fabriqués à l'UdeS

Une première série de détecteurs de radioactivité de type *p-i-n* a été fabriquée avec les infrastructures du CRN2. Sans rencontrer les exigences du cahier des charges, les résultats étaient suffisamment encourageants pour susciter le démarrage d'un projet de maîtrise. Ce projet a abouti à une amélioration des performances des détecteurs, soit un bruit d'un à deux ordres de grandeur plus important que les détecteurs du commerce suivant la taille des diodes [Girard Baril, 2012], ce qui représente un gain d'un ordre de grandeur par rapport à la preuve

de concept présentée dans ce document. Ce bruit doit cependant encore être diminué afin de permettre une détection sur une surface suffisamment grande pour atteindre les activités minimum requises dans ce projet. La possibilité d'obtenir des gaufres de diodes *p-i-n* commerciales a permis de poursuivre l'intégration des canaux microfluidiques sur détecteurs en parallèle avec cette optimisation.

9.3 Microcanaux sur le détecteur commercial

Les canaux en KMPR ont été fabriqués sur des diodes *p-i-n* pour former une puce microfluidique de détection de radioactivité. Cette puce a été intégrée dans un système de mesure complet incluant une pompe ainsi que toute l'électronique et l'informatique permettant de contrôler la puce. Le système de contrôle est basé sur celui du CS μ et comporte les améliorations stipulées dans le cahier des charges soit : une pompe moins encombrante, une connexion USB et une chaîne d'acquisition multicanal (ANNEXE G). Même si la puce actuelle n'utilise qu'un seul canal, l'électronique de contrôle est prête pour l'ajout des autres fonctionnalités. L'encombrement global du système n'a cependant pas été jugé une priorité pour ce premier prototype et la conception mécanique du système entièrement intégré devra être revue afin de faciliter son utilisation dans l'environnement d'une caméra TEP ou TEM préclinique.

9.3.1 Performance de détection

Après plusieurs optimisations, le dispositif final de canaux intégrés sur détecteurs de radioactivité offre une mesure de radioactivité toutes les secondes avec des efficacités absolues de détection entre 39 et 47 % pour les isotopes TEP testés (^{18}F et ^{11}C) et de 4 % pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. L'efficacité est donc quasi parfaite pour les isotopes TEP les plus énergétiques puisque la détection ne s'effectue que d'un côté du canal. Elle est nettement améliorée par rapport aux géométries avec cathéter et détecteur encapsulé et également bien meilleure que les efficacités des quelques dispositifs microfluidiques de détection de radioactivité rencontrés dans la littérature (section 4.5). À notre connaissance, c'est la première fois qu'on atteint ce niveau de performances pour la détection d'isotopes TEP. De plus, il s'agit de la première démonstration de détection du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ par ce type d'appareil. Même si le développement de nouveaux radiotraceurs est plus limité en TEM qu'en TEP, les progrès faits sur la résolution

des caméras TEM rendent la quantification possible et ouvre donc tout un champ d'applications pour des compteurs sanguins.

9.3.2 *Activité minimum détectable*

L'ajout de pistes métalliques pour éloigner les contacts des anodes de la région active a cependant rajouté de la complexité au protocole de fabrication et diminué le rendement. Seule huit des douze diodes présentes dans le canal des dispositifs finaux ont pu être utilisées, limitant le volume effectif de détection à 0,66 μl . L'activité minimum détectable qui en résulte varie alors de 42 Bq/ μl pour le ^{18}F à 51 Bq/ μl pour le ^{11}C ($E_{\beta\text{max}} = 634$ et 961 keV respectivement), ce qui reste au-dessus de la consigne fixée à 15 Bq/ μl . Ce rendement est principalement dû à des problèmes d'adhésion de l'or sur la KMPR ainsi qu'à la difficulté de déposer une fine couche de métal de quelques centaines de nanomètres de manière conforme sur une marche verticale de KMPR de près de 10 μm (figure 9.1A). Une couche d'accroche de chrome plus épaisse (10 nm au lieu de 3 nm) ainsi qu'un ajustement des paramètres de photolithographie de la couche plancher de KMPR pour obtenir un profil moins vertical permettrait d'augmenter le rendement (figure 9.1B).

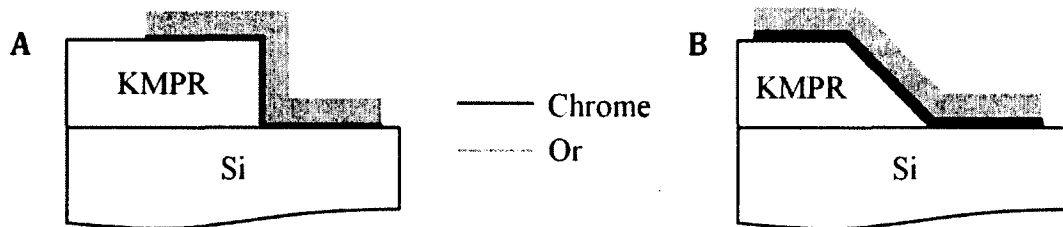


Figure 9.1 : Schéma d'une vue en coupe de la piste de métal assurant le contact à l'anode déposée sur la marche de KMPR dans la configuration actuelle (A) et dans la configuration proposée pour améliorer le rendement de fabrication (B).

Une autre solution consiste à augmenter l'épaisseur du canal. Il est en effet possible de travailler avec une KMPR plus visqueuse ou de multiplier les couches de KMPR. Des épaisseurs de canaux de 100 μm peuvent ainsi être atteintes, ce qui baisserait les activités minimales détectables autour de 10 Bq/ μl pour les isotopes TEP et à 117 Bq/ μl pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Les performances fixées par le cahier des charges seraient donc dépassées pour les isotopes TEP. La détection du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, compliquée par la faible probabilité d'émission de l'électron de

conversion, resterait plus difficile pour des injections de faible activité sur des rats, mais serait tout à fait envisageable pour des expériences chez les souris.

Enfin, une approche plus ambitieuse consisterait à fermer le dessus du microcanal avec un second détecteur de radioactivité, doublant ainsi l'efficacité géométrique de détection et permettant d'augmenter le rapport signal sur bruit en TEP et d'élargir la gamme d'applications en TEM. Cette augmentation d'efficacité de détection pourrait potentiellement permettre d'envisager des applications chez l'humain. Les injections chez l'humain sont typiquement de 370 MBq pour 5 l de sang, soit une concentration pic estimée à 74 Bq/ μ l au pic et à \sim 7 Bq/ μ l au plateau. Une efficacité de détection de 80 % et un volume de détection de 3 μ l (géométrie actuelle avec des canaux de 100 μ m d'épaisseur) correspondent à une activité minimum de 5,5 Bq/ μ l, donc tout à fait adéquate. La prochaine génération du compteur sanguin microfluidique pourrait ainsi non seulement faciliter le développement de nouveaux radiotraceurs chez les petits animaux, mais également simplifier leur validation chez l'humain.

9.3.3 Perméabilité des parois

L'intégration de canaux microfluidiques sur des détecteurs *p-i-n* offre donc une solution pour une détection de particules chargées avec une haute efficacité sur un petit volume. Elle pose cependant plusieurs difficultés. Tout d'abord, malgré la couche d'oxyde de silicium et la couche de KMPR protégeant la surface des détecteurs, le système semble sensible au contenu du microcanal. La KMPR en tant que telle n'affecte pas les performances des détecteurs mais un dispositif rempli d'air génère moins de bruit électronique qu'un dispositif rempli d'eau. Le phénomène est encore accentué lorsque le canal est rempli d'une solution saline. Le sang étant lui-même un liquide salin, ce problème est à approfondir. Les mesures de propriétés de surface avec les structures guides d'onde en KMPR ont montré une certaine porosité de la résine. L'effet semble moins important lorsque la KMPR est passivée avec de la BSA mais nécessite plus d'investigations. Le même type d'étude pourrait être fait sur la couche d'oxyde sous-jacente dont la porosité est très dépendante des paramètres de dépôt. En outre, le nitrure étant réputé pour fournir une bonne barrière à l'humidité, il serait probablement plus approprié que l'oxyde pour protéger les détecteurs.

9.3.4 Susceptibilité aux interférences électromagnétiques

Une seconde difficulté rencontrée est également liée au contenu salin du liquide mesuré. Quand un long cathéter rempli de solution saline est connecté au détecteur microfluidique, il agit comme une antenne et capte toutes les radiations électromagnétiques environnantes pour les injecter directement à l'entrée du circuit électronique de forte amplification qui traite le signal du détecteur. Malgré une conception soignée du circuit électronique et du boîtier de l'appareil, ce problème n'a pas pu être entièrement réglé. Une solution temporaire a été trouvée en ajoutant des jonctions métalliques mises à la masse pour relier le cathéter contenant le fluide au dispositif microfluidique. Ces interconnexions supplémentaires rajoutent cependant un risque d'engendrer la coagulation dans le système.

9.4 Perspectives commerciales

Gamma Medica Inc. commercialise actuellement les caméras TEP pour petits animaux développées conjointement par le Laboratoire de tomographie animale du CIMS et le Groupe de recherche en appareillage médical de la Faculté de génie de l'Université de Sherbrooke. Cette entreprise commercialise également le compteur sanguin, basé sur les détecteurs Hamamatsu et les cathéters en polyéthylène, développé précédemment au CIMS (CS μ) [Convert et al., 2007a]. Le compteur microfluidique développé dans le cadre de ce projet pour mesurer la radioactivité sur sang total présente une telle efficacité par rapport au compteur commercial que sa mise en marché peut assurément être envisagée.

D'après les premiers tests effectués avec du sang, une réutilisation devrait être possible pour un certain nombre d'expériences, mais il est peu probable que les canaux puissent être utilisés indéfiniment. Le marché visé ayant un très faible volume (une dizaine d'unités vendues par an) la fabrication de détecteurs microfluidiques commerciaux ne pourra pas bénéficier des avantages d'une production à grand volume. Il sera par exemple difficile de faire fabriquer des gaufres de détecteurs dédiés à faible coût. De plus, l'achat de gaufres de détecteurs existants, telles que celles utilisées dans le cadre de ce projet, restera onéreux puisqu'une grande partie de la surface de la gaufre ne sera pas utilisée pour la détection. Dans ce contexte, il serait donc probablement souhaitable de séparer la partie fluide de la partie détection, le consommable n'étant alors constitué que de la partie fluide. Cette séparation

permettrait également d'enlever un niveau de complexité à la fabrication des canaux puisqu'aucune piste métallique ne sera plus nécessaire. Elle permettrait également d'utiliser des détecteurs commerciaux encapsulés ayant des performances optimales. Une attention particulière devra cependant être portée à garder des parois très minces et à placer le canal à très faible distance du détecteur afin de ne pas diminuer l'efficacité de détection.

9.5 Compatibilité avec les fonctions futures

Même si leur implantation pratique n'a pas été discutée dans ce document, les fonctions de séparation de plasma et de micro échantillonnage ont fait partie des éléments de réflexion tout au long de ce projet. Au niveau macroscopique, la séparation de plasma se fait le plus souvent par centrifugation sur des échantillons discrets. Ce principe a été repris avec succès au niveau microscopique sur des échantillons discrets et permet de séparer un volume plasmatique d'environ 50 % du volume sanguin initial contenant moins de 0,11 % de cellules [Haerberle et al., 2006]. La mesure en temps réel de la concentration radioactive du plasma requiert cependant une séparation de plasma en continu. La loi d'échelle (ANNEXE A.1) a été largement exploitée pour créer des principes de séparation continue de particules et de plasma uniques à la microfluidique [Hou et al., 2011; Kersaudy-Kerhoas et al., 2008; Lenshof et al., 2010; Toner et al., 2005]. Les systèmes rencontrés dans la littérature pour la séparation de plasma sont basés principalement sur une séparation par filtre, par hydrodynamique ou par une énergie active [Hou et al., 2011]. Les systèmes à filtre semblent poser des défis de fabrication et de coagulation [Hou et al., 2011]. Les systèmes hydrodynamiques et par énergie active, plus spécifiquement par ondes acoustiques de surface sont tous les deux à envisager pour la suite du projet.

9.5.1 Séparation de plasma par hydrodynamique

Les systèmes de séparation de plasma par hydrodynamique ne requièrent qu'une simple géométrie de canaux (ANNEXE H.1) et sont donc tout à fait compatibles avec les canaux en KMPR développés pour les deux premières fonctions. À des fins de validation sur microscope à épi fluorescence (section 3.5.4), il est cependant souhaitable d'avoir les accès dans le silicium au lieu du capot en verre. De plus, il est primordial d'avoir un capot en verre assez fin pour accommoder la distance focale des objectifs (grade 0 ou 1). Des tests préliminaires de

quelques géométries typiques de séparation hydrodynamique ont été effectués dans le cadre de ce projet et ont mené à l'établissement d'une variante du protocole de fabrication de canaux avec accès dans le silicium (ANNEXE I). Les propriétés d'autofluorescence de la KMPR ont également été étudiées afin de choisir le fluorophore optimum pour les tests (ANNEXE J). L'efficacité de tels dispositifs est cependant encore trop limitée pour l'application présentée ici et son optimisation est un projet de recherche en soi.

9.5.2 Séparation de plasma par ondes acoustiques de surface

La séparation de plasma par ondes acoustiques de surface a l'avantage d'avoir déjà démontré des performances répondant au cahier des charges de ce projet, soit l'obtention continue de plasma pur (contamination 0,1 %) avec un débit de 80 $\mu\text{l}/\text{min}$ [Lenshof et al., 2009]. Son implantation pratique requiert le couplage d'une puce microfluidique à une céramique piézoélectrique ou la fabrication d'un microcanal sur un substrat ou un film piézoélectrique comportant des peignes interdigités d'or (ANNEXE H.2). Dans les deux cas, des canaux en KMPR peuvent tout à fait convenir. La difficulté réside principalement dans le type de signaux à haute tension et à haute fréquence requis et leur interaction possible avec le détecteur de radioactivité qui s'est montré très sensible à tout type de bruit électromagnétique. De plus, cette technologie est réputée pour élever la température du liquide. L'efficacité démontrée et l'expertise disponible au CRN2 concernant cette technologie en font tout de même une excellente candidate.

9.5.3 Micro échantillonnage

De nombreuses méthodes plus ou moins complexes ont été développées pour mouvoir et contrôler un fluide dans un microcanal, mais aucun standard ne semble encore faire l'unanimité [Mark et al., 2010; Oh et al., 2006]. Parmi les différentes technologies disponibles, les valves passives formées d'un simple rétrécissement du microcanal sont très attrayantes de par leur simplicité de fabrication. Ce principe serait d'autant facilité avec la KMPR qui est naturellement hydrophobe. Ce type de valve n'est cependant efficace qu'à basse pression et requiert une force active pour déclencher l'écoulement au temps voulu. Les ondes acoustiques de surfaces ou l'électromouillage sont deux principes intéressants à approfondir pour cette actuation. Un événement serait également nécessaire pour déclencher l'arrêt du prélèvement. Un

autre type de valve très populaire est basé sur une membrane souple de PDMS actionnée par air comprimé. Ce principe pourrait être adapté à la KMPR. Enfin, des systèmes de flux segmentés sont également envisageables [Lapointe et al., 1998]. Des bulles d'air ou d'un liquide non miscible peuvent être injectées à des temps voulus dans le microcanal principal pour isoler différents fragments du liquide principal. Le flux pourrait alors être dirigé vers un capillaire qui serait sectionné entre les échantillons pour les séparer. Ce type de séparation est adapté pour une analyse externe des échantillons, mais ne serait cependant pas adéquat pour une analyse intégrée sur puce.

CHAPITRE 10 CONCLUSION

10.1 Rappel du contexte du projet

De nouveaux radiotraceurs sont continuellement développés pour améliorer l'efficacité diagnostique en TEP et TEM, principalement dans les domaines de l'oncologie, de la cardiologie et de la neurologie. Avant de pouvoir être utilisés chez les humains, ces radiotraceurs doivent être caractérisés chez les petits animaux, principalement les rats et les souris. Pour cela, de nombreux échantillons sanguins doivent être prélevés et analysés dans un temps très court suivant l'injection du radiotraceur en concomitance avec un protocole d'imagerie. Cette analyse complète requiert une mesure de radioactivité, une séparation de plasma puis une séparation d'espèces chimiques pour chaque échantillon, tâches très délicates lorsque le volume sanguin disponible est très faible. Des solutions fournissant une analyse partielle sont rapportées dans la littérature, mais leur sensibilité est trop limitée pour l'application recherchée et aucune ne permet d'effectuer toutes les opérations dans un même système. Le présent projet de recherche s'insère dans le contexte global d'un projet visant à développer un système microfluidique d'analyse sanguine complète et en temps réel pour la caractérisation des nouveaux radiotraceurs TEP et TEM. Cette puce comprendra des microcanaux, une mesure de radioactivité à plusieurs endroits sur la puce, une séparation continue de plasma ainsi qu'une prise de microéchantillons plasmatiques. Plus spécifiquement, les objectifs du présent projet de recherche étaient d'établir les spécifications globales du système, de concevoir des microcanaux, un détecteur de radioactivité et d'intégrer ces deux fonctions dans un compteur sanguin microfluidique permettant de mesurer la radioactivité du sang total en temps réel et intégrant toute l'électronique et l'informatique de contrôle.

10.2 Résumé des accomplissements

Un cahier des charges a tout d'abord été établi et a permis de fixer des critères quantitatifs ou qualitatifs à respecter pour chacune des fonctions de la puce. Un état de l'art sur les travaux ayant déjà combiné la microfluidique et la détection de radioactivité a ensuite permis de souligner qu'aucune solution existante ne répondait aux critères du projet. Parmi les différentes technologies disponibles pour fabriquer des microcanaux et détecter les radiations

émises par les isotopes TEP et TEM, des microcanaux en KMPR fabriqués sur des détecteurs semiconducteurs de type *p-i-n* ont été identifiés comme une solution technologique entièrement originale permettant de répondre aux besoins du cahier des charges.

Des détecteurs de type *p-i-n* ont ensuite été fabriqués en utilisant un procédé standard exploitant les infrastructures du CRN2. Les performances obtenues étaient encourageantes, mais nécessitaient des optimisations pour rencontrer les exigences du cahier des charges. Un collaborateur industriel (Excelitas Technologies, précédemment PerkinElmer) ayant accepté de nous fournir des diodes *p-i-n* optimisées non encapsulées sous forme de gaufre, l'intégration des canaux microfluidiques a été poursuivie sur ces gaufres. En parallèle, un projet de maîtrise a été initié afin d'optimiser les détecteurs fabriqués au CRN2.

Un premier dispositif comprenant des canaux en KMPR sur gaufres Excelitas a permis de valider le concept démontrant le grand potentiel de ces choix technologiques et incitant à poursuivre les développements dans cette voie, notamment en envisageant des expériences animales. L'utilisation prolongée des canaux avec du sang non dilué est cependant particulièrement exigeante pour les matériaux artificiels. Une passivation à l'albumine a permis d'augmenter considérablement la compatibilité sanguine de la KMPR. Le concept initial incluant la passivation des canaux a ensuite été optimisé et intégré dans un système de mesure complet avec toute l'électronique et l'informatique de contrôle. Le système final a permis d'effectuer des mesures de radioactivité sanguine en temps réel avec une très haute efficacité de détection chez le rat. Les différents objectifs fixés pour ce projet ont donc été remplis.

Enfin, ce projet a mené à l'élaboration de deux outils de caractérisation mis à disposition des membres du CRN2 : un banc de mesure d'angle de contact et une structure guide d'onde à gaine métallique et cœur polymère. Ces deux outils seront également de précieux atouts dans la poursuite du projet. Un prototype fonctionnel de compteur sanguin microfluidique est également disponible pour les membres du CIMS.

10.3 Contributions à l'avancement

Ces travaux ont mené à la publication de trois articles dans des revues scientifiques avec comité de lecture [Convert et al., 2011, 2012a, 2012d], ainsi qu'à la participation à quatre conférences avec comités de lecture, dont une conférence nationale [Convert et al., 2008a] et trois conférences internationales [Convert et al., 2010a, 2010c, 2012b]. Deux d'entre elles ont mené à la rédaction de rapports de conférences publiés sur internet [Convert et al., 2008b, 2010b].

Ces différentes publications ont rapporté la première démonstration d'un détecteur microfluidique à haute efficacité pour la mesure de fonction d'entrée en TEP et TEM. Cette première brique d'un projet plus global est déjà une innovation en soi qui permettra d'augmenter l'efficacité de développement d'outils diagnostiques pour la TEP et la TEM. Au-delà de l'application visée, ces publications démontrent l'utilisation de la KMPR pour la fabrication de canaux microfluidiques, un matériau robuste, d'utilisation simple et compatible avec la production industrielle. En plus d'être compatible avec les technologies requises pour les futures fonctions de la puce d'analyse étudiée, ce principe de fabrication peut être utile à l'ensemble de la communauté scientifique des laboratoires sur puce. Ces publications décrivent également une méthode simple et robuste pour passer la KMPR et mettent en valeur le principe de structure guide d'onde à gaine métallique pour la caractérisation de surface de couches polymères.

Enfin, un quatrième article destiné à être publié dans la revue *Journal of Nuclear Medicine* était en rédaction au moment de soumettre cette thèse [Convert et al., 2012c]. Il donne un aperçu de l'électronique et du logiciel de contrôle développés pour former le système embarqué. Ce dernier est caractérisé en sensibilité sous la forme d'activité minimum détectable pour une plus large gamme d'isotopes. Le temps mort, la dispersion, le délai de propagation et la sensibilité au bruit de fond radioactif du système sont également évalués afin d'apporter les corrections nécessaires aux mesures avant leur utilisation dans un modèle mathématique. Le système est ensuite validé lors d'études pharmacocinétiques chez la souris.

10.4 Perspectives

Les très bonnes performances du dispositif développé nous conduisent à envisager une commercialisation. Pour aboutir à un produit commercial, le procédé de fabrication des canaux devra être adapté à une production en petite série. De plus, la passivation de surface et le potentiel de réutilisation des puces devront être caractérisés de manière plus approfondie. Des canaux plus épais ainsi que la fermeture du canal par un second détecteur de radioactivité permettraient d'augmenter le rapport signal sur bruit en TEP, d'élargir la gamme d'applications en TEM et d'envisager une utilisation chez l'humain. Enfin, les fonctions de séparation de plasma et de micro échantillonnage, ainsi qu'à terme l'analyse chimique *in situ* sont à ajouter afin de fournir une puce d'analyse complète.

ANNEXE A QUELQUES NOTIONS DE MICROFLUIDIQUE

La microfluidique est au cœur de ce projet. Elle implique l'utilisation de canaux à l'échelle micrométrique soit celle de cheveux, de cellules ou de bactéries (figure A.1). La microfluidique offre des possibilités et pose des défis inédits par rapport au monde microscopique. Ce phénomène sera abordé dans une première section décrivant la loi d'échelle dans les microsystèmes. Un aperçu de la mécanique des fluides et des équations permettant de calculer les pressions dans les microcanaux sera ensuite donné.

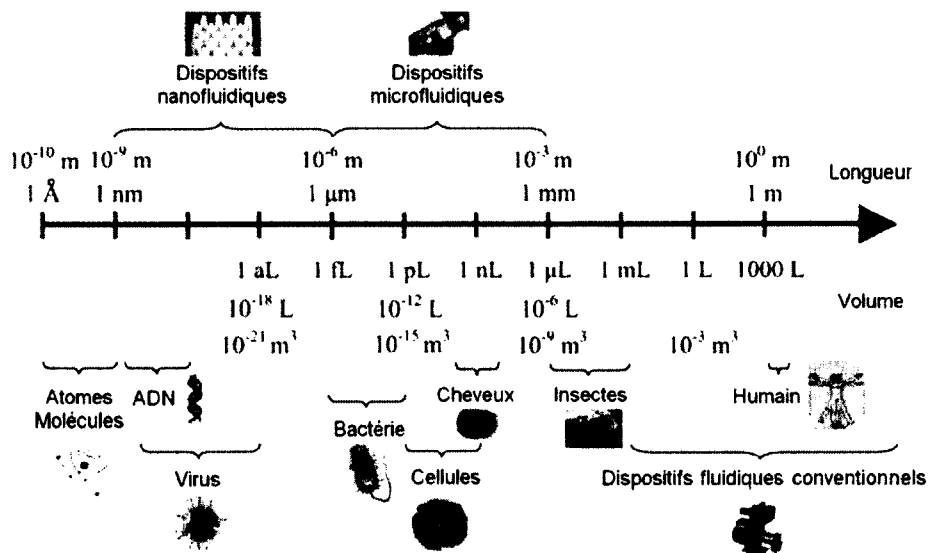


Figure A.1 : Longueurs caractéristiques de la microfluidique par rapport à diverses entités biologiques (adapté de [Yeo et al., 2011]).

A.1 Loi d'échelle dans les microsystèmes

La loi d'échelle est la relation qui décrit les variations de quantités physiques avec la taille l du système, ou de l'objet considéré [Tabeling, 2006]. Ces variations sont illustrées au tableau A.1 pour différentes grandeurs physiques. L'échelle l est ici l'ordre de grandeur de la taille de l'objet quand ses dimensions sont proches dans les trois axes. Lorsque l'objet est fortement anisotropique (une de ses dimensions est beaucoup plus grande que les autres), l est alors une échelle qui pilote toutes les dimensions en gardant le rapport d'aspect constant.

De cette loi d'échelle, il découle que, quand la taille d'un système diminue, le rapport entre les différentes forces change. Par exemple, la gravité varie en l^3 alors que les forces capillaires varient en l^1 . Donc, leur rapport varie en l^2 , si la dimension du système diminue d'un facteur dix, le rapport entre ces deux forces est divisé par cent. La gravité est donc la plupart du temps négligée dans les microsystèmes alors que l'on peut faire avancer un fluide dans un microcanal seulement par la force capillaire. C'est le même principe qui permet aux insectes de marcher sur l'eau.

Tableau A.1 : Loi d'échelle pour différentes grandeurs physiques [Tabeling, 2006].

Grandeur	Loi d'échelle
Force de Van der Waals intermoléculaire	l^{-7}
Densité de force de Van der Waals entre les interfaces	l^{-3}
Temps	l^0
Force capillaire	l^1
Distance	l^1
Vitesse d'écoulement	l^1
Puissance thermique transférée par conduction	l^1
Force électrostatique	l^2
Temps de diffusion	l^2
Volume	l^3
Masse	l^3
Force de gravité	l^3
Force magnétique sous champ extérieur	l^3
Force magnétique sans champ extérieur	l^4
Puissance électrique motrice	l^3
Force centrifuge	l^4

En règle générale, lorsque deux forces sont en présence dans un microsystème, c'est celle ayant l'exposant le plus faible qui prédomine. Les équilibres auxquels nous sommes habitués à l'échelle macroscopique sont donc complètement différents à l'échelle microscopique. Dans le cadre général de ce projet, cette loi d'échelle implique des principes d'actuation de liquides, de séparation de plasma ou d'échantillonnage inédits aux microsystèmes.

A.2 Mécanique des fluides dans un microcanal

Les caractéristiques de l'écoulement d'un fluide dans un conduit découlent des lois de conservation [Senturia, 2000]. Ainsi, la quantité de mouvement d'un volume de fluide dans un conduit est la résultante des forces agissant sur sa surface, soit la pression et le cisaillement, ainsi que des forces agissant sur son volume comme la gravité.

Pour un fluide newtonien (un fluide dont la loi contrainte – vitesse de déformation est linéaire), ces lois donnent lieu aux équations de Navier-Stokes. Ces équations différentielles non linéaires n'ont cependant pas de solution finie si elles ne sont pas simplifiées. Pour cela, il faut connaître les propriétés du fluide que l'on cherche à décrire (principalement s'il est compressible) ainsi que les propriétés de l'écoulement dans notre système (principalement s'il est de type visqueux, s'il est en régime permanent et s'il est laminaire ou turbulent).

La plupart des liquides sont incompressibles. Un nombre sans dimension, le nombre de Reynolds, Re , permet de connaître le type d'écoulement. Il est défini par

$$Re = \frac{\rho_m LU}{\eta} = \frac{LU}{\nu}, \quad (\text{A.1})$$

où ρ_m (kg/m^3) est la masse volumique du fluide, L (m) est la dimension caractéristique du système, U (m/s) est la vitesse du fluide, η (Pa.s) sa viscosité dynamique et ν (m^2/s) sa viscosité cinématique. Ce nombre décrit l'importance relative des forces d'inertie par rapport aux forces de viscosité. Lorsque $Re \ll 1$, les forces visqueuses prédominent et les forces inertielles peuvent être négligées. L'écoulement est alors décrit comme visqueux. C'est le cas pour la plupart des microsystèmes, il est cependant important de vérifier la valeur du nombre de Reynolds avant d'appliquer des équations de Navier-Stokes simplifiées. De plus, à faible nombre de Reynolds ($Re < 100$ ou 1000 suivant la géométrie), l'écoulement est considéré comme laminaire et suit des lignes de flux continues qui ne se mélangent jamais (figure A.2A). Au-dessus de ces valeurs, le régime devient turbulent et l'écoulement subit alors des fluctuations complexes. Dans les microsystèmes, l'écoulement est en général laminaire, ce qui explique la facilité avec laquelle il est possible de manipuler des particules ou des cellules et la difficulté avec laquelle deux fluides sont mélangés.

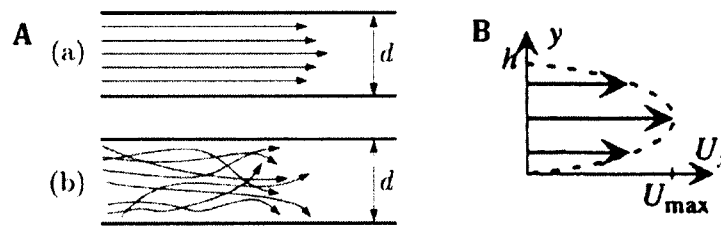


Figure A.2 : A. Écoulement laminaire (a) et turbulent (b) (Wikipédia). B. Profil de vitesse dans un écoulement de Poiseuille [Senturia, 2000].

Pour un fluide newtonien incompressible et un écoulement laminaire et visqueux en régime permanent, la vitesse dans un canal est de type parabolique (figure A.2B). La vitesse est alors nulle aux parois et maximum au centre du canal. Il s'agit de l'écoulement de Poiseuille. Pour un canal circulaire, lorsqu'un flux est engendré par une différence de pression (par pompe externe par exemple) avec un gradient de pression constante le long du conduit, la perte de charge, ΔP (Pa), entre l'entrée et la sortie s'exprime alors [Senturia, 2000]

$$\Delta P_{tube} = \frac{8\eta L}{\pi a^4} Q, \quad (\text{A.2})$$

où η (Pa.s) est la viscosité dynamique de fluide, L (m) est la longueur du canal, a (m) est son rayon et Q (m^3/s) est le débit.

Pour un canal rectangulaire de fort rapport d'aspect assimilé à deux plaques parallèles, comme c'est le cas pour ce projet, l'équation devient [Senturia, 2000]

$$\Delta P_{\text{plaque}} = \frac{12\eta L}{wh^3} Q, \quad (\text{A.3})$$

où w (m) est la largeur du canal et h (m) sa hauteur. Pour que cette équation soit valide, il faut que w/h soit plus grand que dix [Tabeling, 2006]. Pour un canal rectangulaire de rapport d'aspect entre 1 et 10, une estimation de la chute de pression à 10 % près est donnée par [Stone et al., 2004]

$$\Delta P_{\text{rectangle}} = \frac{1}{C} \times \frac{12\eta L}{wh^3} Q \quad \text{avec} \quad C \approx \left(1 - \frac{6 \times 2^5 h}{\pi^5 w}\right). \quad (\text{A.4})$$

Ces équations nous permettent de calculer les pressions présentes dans un microsystème en fonction de la taille des canaux. Par exemple, un débit d'eau ($\eta = 1,007 \cdot 10^{-3}$ Pa.s) de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal circulaire de 2 cm de long et 100 μm de diamètre engendre une différence de pression de $1,4 \cdot 10^4$ Pa soit 140 mBar. Pour un canal de 20 μm de diamètre, cette pression devient $8,6 \cdot 10^6$ Pa soit 86 Bars. La pression peut donc rapidement devenir très importante quand les dimensions du canal diminuent.

Il est intéressant ici de faire l'analogie avec les circuits électriques qui étaient à l'origine considérés comme une sorte de fluide. Ainsi, la loi de Poiseuille correspond à la loi d'Ohm ($V = RI$) où la différence de pression est l'analogie de la tension et le débit celui du courant. La résistance hydraulique est alors définie par

$$R_{\text{tube}} = \frac{8\eta L}{\pi a^4}, \quad R_{\text{plaque}} = \frac{12\eta L}{wh^3} \quad \text{et} \quad R_{\text{rectangle}} = \frac{1}{C} \times \frac{12\eta L}{wh^3}. \quad (\text{A.5})$$

Cette analogie est utilisée pour résoudre les débits dans des circuits microfluidiques complexes.

Les équations ci-dessus nous permettent de calculer la pression dans un microsystème utilisé avec un liquide newtonien, soit de l'eau ou du plasma. Le sang total, lui, est non-newtonien, sa viscosité change avec les forces de frottement [Skalak et al., 1989]. Dans le cas d'un flux de sang dans des vaisseaux sanguins, le sang peut être considéré comme un liquide homogène pour des vaisseaux de plus de 22 μm de diamètre. L'écoulement de Poiseuille peut s'appliquer en prenant en compte une viscosité dépendante du cisaillement et de l'hématocrite. Pour un cisaillement de plus de 1000 s^{-1} (diamètre de plus de 0,5 mm) et un hématocrite constant, le sang peut être considéré comme un fluide homogène avec une viscosité constante.

ANNEXE B RADIOACTIVITÉ EN TEP ET EN TEM

Une partie importante de ce projet consiste à détecter la radioactivité émise en TEP et en TEM. Cette section donnera tout d'abord les éléments de base définissant la radioactivité, ses unités et les grandes lois la régissant. Les processus d'émission rencontrés en TEP et en TEM et les spectres d'énergie résultants seront ensuite décrits. Les interactions avec la matière et les profils de dépôt d'énergie des deux grands types de radiations impliquées seront abordées par la suite. Enfin, les caractéristiques principales des détecteurs de radiations seront données. Toute cette section est principalement basée sur les informations du manuel de Knoll [Knoll, 2000].

B.1 Émission radioactive

L'émission radioactive est un processus de relaxation atomique qui transforme un atome parent instable énergétiquement en atome fils plus stable conduisant à l'émission de radiations électromagnétiques ou particulaires (la fission étant exclue de cette section).

C'est un processus stochastique, dans le sens qu'il est impossible de prévoir quand un atome va relaxer. Cependant, pour un échantillon contenant un grand nombre d'atomes d'un même type, la probabilité pour un atome donné de relaxer est constante, menant à une décroissance exponentielle de l'activité totale de l'échantillon, A , en fonction du temps suivant

$$A = A_0 e^{\frac{-\ln(2) \times t}{\tau}}, \quad (\text{B.1})$$

où A_0 est la radioactivité initiale ($t = 0$) et τ est la demi-vie de l'isotope, c'est-à-dire le temps après lequel la moitié des noyaux de l'échantillon auront décré (caractéristique de chaque isotope). La radioactivité s'exprime en Becquerel (Bq) qui correspond à un nombre de désintégration par seconde. Les émissions issues du noyau suite à une désintégration sont principalement des particules alpha (α , noyau comportant deux protons et deux neutrons), des particules bêta (β^+ ou β^- , analogues de l'électron avec une charge positive ou négative) et des rayons gammas (γ , photons très énergétiques), mais peuvent aussi être des protons, des neutrons ou des deutérons. De plus, ces radiations initialement émises peuvent interagir dans le cortège électronique de l'atome émetteur produisant alors des rayons X ou des électrons Auger de plus faible énergie. Il est à noter qu'on distingue les particules β des électrons puisque les premières sont émises suite à une désexcitation du noyau alors que les seconds sont une émission secondaire provenant du cortège électronique de l'atome. Un même isotope peut avoir plusieurs voies de désintégration ou de désexcitation possibles et même une voie composée, conduisant à l'émission de différentes radiations avec une certaine probabilité appelée rapport d'embranchement. Une bonne source décrivant les différentes émissions radioactives de tous les isotopes du tableau périodique ainsi que leur probabilité d'émission est disponible dans internet [Berkeley Laboratory Isotopes Project, n.d.].

La radioactivité d'un échantillon mesurée sur un temps négligeable par rapport à la demi-vie des isotopes, par exemple sur une seconde, est considérée comme constante. Pourtant d'une mesure à l'autre, le nombre d'évènements émis varie. Ce phénomène est dû aux propriétés stochastiques de l'émission radioactive. La déviation standard σ du nombre d'évènements n émis sur une courte période peut-être approximée par la loi de Poisson selon

$$\sigma = \sqrt{n}. \quad (\text{B.2})$$

Donc si l'on mesure des comptes par secondes, sur une courte période, leur écart-type est équivalente à la racine du nombre d'évènements mesurés. Toute variation statistique supérieure à cette valeur peut être attribuée à du bruit dans le système de mesure.

L'énergie libérée lors de la décroissance radioactive s'exprime en électron volt (eV) où 1 eV correspond à l'énergie cinétique gagnée par un électron accéléré depuis le repos par un potentiel de 1 V soit $1,602 \cdot 10^{-19}$ J. L'énergie d'une radiation électromagnétique correspond à sa longueur d'onde λ selon la relation $E = hc/\lambda$ (où h est la constante de Planck et c la vitesse de la lumière), alors que pour une radiation particulaire, elle est composée d'une partie matérielle (masse) et cinétique.

B.2 Émission en TEP et en TEM

Les isotopes utilisés en TEP sont des émetteurs de positrons. Leur noyau est rendu instable par le bombardement d'une cible avec des protons dans un cyclotron. Il retrouve sa stabilité par la transmutation d'un proton en neutron selon



où X et Y sont les espèces nucléaires initiales et finales, β^+ est le positron (antiparticule de l'électron, même masse, mais charge opposée) et ν est un neutrino. Les noyaux X et Y sont deux espèces chimiques différentes, par exemple le fluor et l'oxygène. Le noyau Y a souvent peu ou pas d'énergie et le neutrino à une très faible probabilité d'interaction avec la matière. La seule particule détectable est alors le positron. L'énergie libérée par la réaction, ou valeur Q , est fixe et correspond à la différence d'énergie entre les noyaux X et Y . Elle est répartie entre le positron et le neutrino. Le positron est donc émis avec un spectre polyénergétique et peut apparaître avec une énergie variant de zéro à $E_{\beta\max}$, caractéristique de chaque isotope (figure B.1A). L'énergie moyenne de la distribution correspond environ au tiers de l'énergie maximale.

Ce mode d'émission radioactive est toujours accompagné de l'émission de deux photons d'annihilation de 511 keV en coïncidence. En effet, le positron émis perd rapidement son énergie cinétique dans le milieu. Lorsque cette dernière est nulle, le positron s'annihile avec un électron du milieu produisant les deux photons. L'énergie E (J) de chacun des photons correspond donc exactement à la masse de l'électron ($m_0 = 9,1 \cdot 10^{-31}$ kg) suivant

$$E = m_0 c^2, \quad (\text{B.4})$$

où $c = 3 \cdot 10^8$ m/s est la vitesse de la lumière.

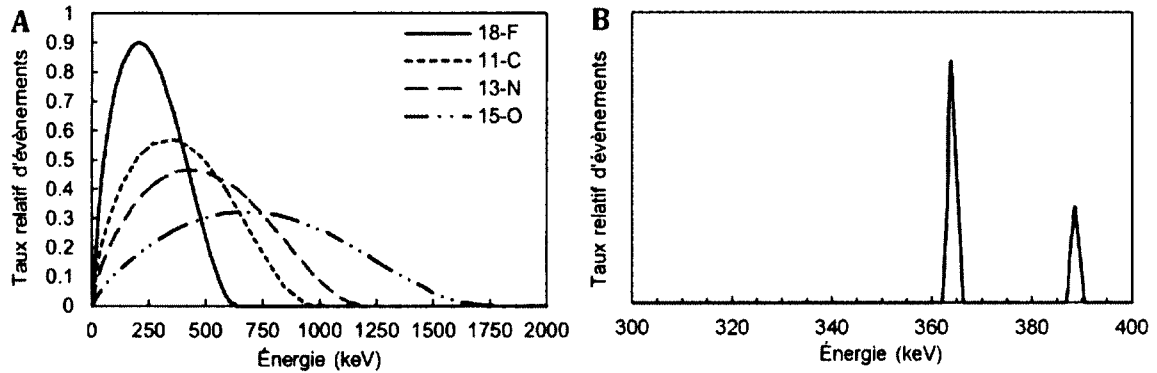
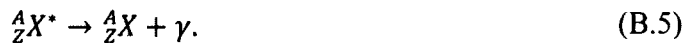


Figure B.1 : A. Spectre d'émission continue d'une particule bêta pour les isotopes TEP les plus courants (adapté de [Levin et al., 1999]). B. Spectre d'émission de raies pour la conversion interne d'un photon émis typiquement en TEM, exemple du ^{113m}In (adapté de [Knoll, 2000]).

Les isotopes utilisés en TEM émettent des rayons gamma (γ) suite à la désexcitation de leur noyau suivant



L'énergie libérée est ici toujours la même et est caractéristique de la réaction. Le spectre d'émission est donc monoénergétique. Le nombre de nucléons est conservé, il n'y a pas de transmutation, seulement désexcitation vers un niveau d'énergie stable. Lors de l'émission du rayon gamma, il existe une probabilité de conversion interne. Le rayon gamma interagit alors avec un électron interne de l'atome, lui cédant son énergie. L'électron émis est appelé électron de conversion et possède une énergie cinétique E_{e^-} de

$$E_{e^-} = E_{ex} - E_b, \quad (\text{B.6})$$

où E_{ex} est l'énergie d'excitation du noyau et E_b est l'énergie de liaison de l'électron. L'électron de conversion est donc émis avec une énergie légèrement plus faible que celle du rayon gamma. De plus, suivant la couche électronique d'où l'électron est éjecté, E_{e^-} peut légèrement varier (figure B.1B).

Les isotopes TEP et TEM émettent donc des particules chargées (positrons ou électrons de conversion) et des rayonnements électromagnétiques (rayons gamma ou photons d'annihilation) qui peuvent tous être utilisés pour la détection. Une table des particules émises par les isotopes TEP et TEM les plus courants ainsi que leur énergie et leur probabilité d'émission est présentée au tableau B.1.

Tableau B.1 : Émission des isotopes TEP et TEM courants ainsi que des isotopes utilisés pour la calibration au cours de ce projet [A *hanbook of radioactivity measurements procedures*, 1984]. Seuls les éléments d'énergies supérieures à 45 keV et de probabilité d'émission supérieure à 1 % sont représentés. Toutes les énergies sont exprimées en keV.

Espèce	½ vie	Bêta			Positron			Électron		Photon	
		$E_{\beta\max}$	$E_{\beta\text{moy}}$	%	$E_{\beta\max}$	$E_{\beta\text{moy}}$	%	E	%	E	%
⁹⁹ Mo	65,92 h	436	133	16,6				120	9	141	90,6
		848	290	1,2				138	1	181	6
		1214	443	81,9						366	1,2
										740	12,2
									778	4,3	
^{99m} Tc	6,007 h							120	8,8	141	89
								138*	1*		
¹¹¹ In	2,805 j							145	7,9	171	91
								167	1	245	94
								219	5		
¹²³ I	13,221 h							127	13,6	159	83,3
								154	1,8	529	1,4
²⁰¹ Tl	72,91 h							52	7,9	69	27,7
								54	3,4	71	47,2
								84	16,5	80	20,8
								121	1,3	135	2,8
								153	2,8	167	10,6
¹¹ C	20,38 min				960	386	99,8			511	199,5
¹³ N	9,965 min				1199	492	99,8			511	199,6
¹⁵ O	122,24 s				1732	735	99,9			511	199,8
¹⁸ F	109,71 min				633	250*	96,9			511	193,8
⁶⁴ Cu	12,7 h	578	190	37,7	653	278	17,9			511	35,8
⁶⁸ Ga	68 min				822	353	1,2			511	175,6
					1899	836	87,8			1077	3,2
²⁴¹ Am	432,2 ans							54	8,1	60	35,9
								58	34		
¹⁰⁹ Cd	462,6 j							88	1,6	88	3,7

B.3 Interaction des particules chargées avec la matière

Le transfert d'énergie entre une particule chargée, ici un électron ou un positron, et la matière se fait principalement par interactions coulombiennes, lors de collisions avec les électrons du milieu. Chaque collision conduit à une ionisation ou une excitation du milieu et entraîne une perte d'énergie qui se traduit par un ralentissement du projectile. Une particule transfère donc son énergie tout au long de sa trajectoire et peut subir des changements de direction importants (figure B.2A). Chaque collision peut conduire à des changements de direction plus ou moins importants, impliquant un transfert d'énergie plus ou moins grand. En outre, plus l'énergie cinétique de la particule est basse, plus le transfert d'énergie par collision est grand. Le dépôt d'énergie sera donc maximum en fin de trajectoire. Le profil de dépôt d'énergie en résultant est illustré à la figure B.2B pour un électron.

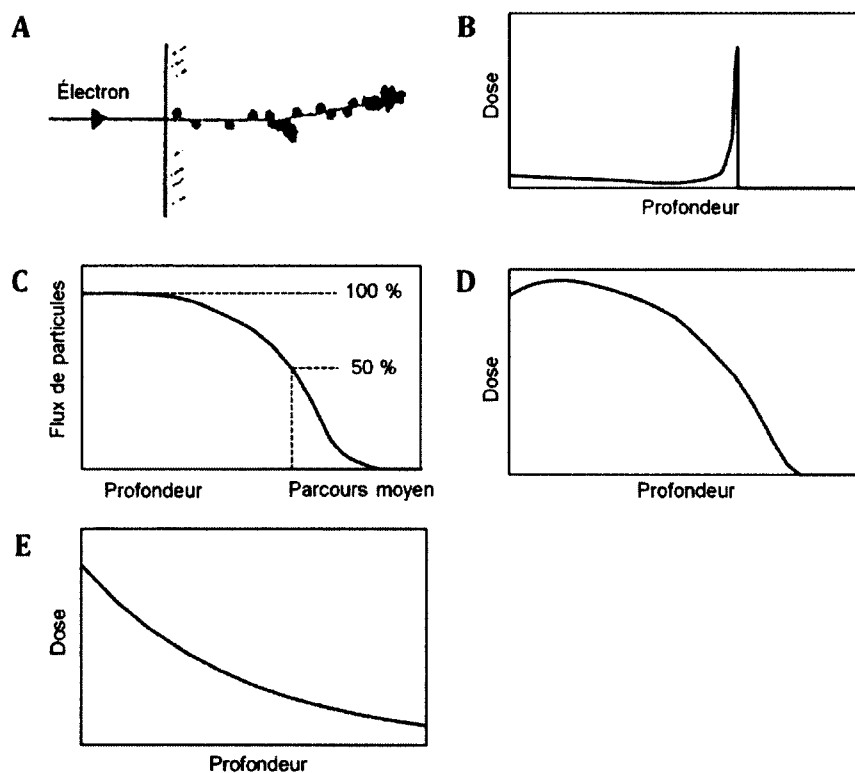


Figure B.2 : A. Schéma des pertes d'énergie d'un électron dans la matière. B. Profondeur de pénétration pour un faisceau monoénergétique. C. Profil de dose déposée par une particule unique. D. Profil de dose déposée par un faisceau monoénergétique. E. Profil de dose déposée par un faisceau polyénergétique.

L'incidence des collisions et la quantité d'énergie transférée à chaque collision sont des phénomènes discrets qui varient statistiquement d'une particule à l'autre. Ainsi, un faisceau de particules monoénergétiques aura une profondeur de pénétration qui ne sera pas unique, mais distribuée autour d'une valeur moyenne appelée parcours moyen (figure B.2C). Ce parcours est tabulé et disponible sur internet [National Institut of Standards and Technology, n.d.-a]. Il est de l'ordre de 0,1 à 1,3 mm dans le silicium et de 0,2 à 2,3 mm dans le sang pour des énergies incidentes de 120 keV (E_c - du ^{99m}Tc) et 634 keV ($E_{\beta\text{max}}$ du ^{18}F).

Étant donné cette distribution de parcours moyens, le profil de dépôt d'énergie d'un faisceau d'électrons monoénergétiques est alors beaucoup plus distribué en profondeur que pour une particule unique (figure B.2D). Pour un faisceau de particules polyénergétiques, le profil de dépôt est plus de forme exponentielle décroissante (figure B.2E), une grande partie de l'énergie est donc déposée à faible profondeur. De plus, pour ce type de faisceau, on ne parle plus de parcours moyen, mais de portée, qui correspond en pratique au parcours moyen des particules de plus haute énergie ($E_{\beta\max}$).

Le pouvoir de ralentissement représente le taux de perte d'énergie de la particule par unité de longueur et s'exprime en MeV/cm. Il permet de calculer la perte d'énergie d'une particule le long de sa trajectoire. Il dépend de la composition et de la densité du matériau cible ainsi que de la charge et de la vitesse de la particule incidente. Le pouvoir de ralentissement va progressivement augmenter au fur et à mesure que la particule perd de l'énergie. Il est tabulé dans des bases de données disponibles sur internet [National Institut of Standards and Technology, n.d.-a] sous forme de pouvoir de ralentissement spécifique qui correspond au pouvoir de ralentissement divisé par la densité du matériau cible. La perte d'énergie E (MeV) d'une particule dans une épaisseur X_i (cm) peut donc s'exprimer comme

$$E = \int_{X_i}^0 S_E(x) \cdot \rho \cdot dx, \quad (\text{B.7})$$

où S_E (MeV.cm²/g) est le pouvoir de ralentissement spécifique dû aux collisions pour une énergie incidente donnée, ρ (g/cm³) est la densité du matériau et dx est le pas d'intégration en profondeur.

Cette perte d'énergie se traduit en charge générée dans un détecteur par

$$Q = n \cdot q = \frac{E}{W} \cdot q, \quad (\text{B.8})$$

où $q = 1,6 \cdot 10^{-19}$ C est la charge d'un électron, n est le nombre de porteurs générés et W est l'énergie requise pour générer une paire électron/trou (3,62 eV pour le silicium).

Les électrons peuvent également perdre de l'énergie par un phénomène de freinage lorsqu'ils passent à proximité du noyau. Ce processus est radiatif et conduit à l'émission d'un photon, mais ne produit pas d'ionisation. L'énergie perdue de manière radiative est cependant négligeable en dessous de quelques MeV, donc pour les isotopes TEP et TEM courants.

Enfin, les fortes déviations que subissent les particules chargées lors de leurs collisions dans le matériau cible peuvent conduire à faire ressortir l'électron par sa face d'entrée. Ce phénomène est appelé rétrodiffusion. Le parcours de la particule est donc plus court et son dépôt d'énergie plus faible qu'escompté. La rétrodiffusion est plus prononcée pour les projectiles de faible énergie et les cibles de haut numéro atomique. Pour le silicium, qui a un numéro atomique relativement faible, la fraction d'électrons rétrodiffusés reste inférieure à 5 % [Knoll, 2000].

Les particules chargées produisent donc des ionisations tout le long de leur trajectoire dans la matière qui est de l'ordre du millimètre pour les énergies en jeu en TEP et en TEM. Un détecteur assez fin est donc adéquat pour leur détection et il est important de minimiser toute interface entre la source et le détecteur pour maximiser l'énergie déposée dans le détecteur, donc le rapport signal sur bruit de ce dernier. Toute interface même de quelques centaines de microns aura un effet d'autant plus dramatique dans le cas des particules β puisqu'elle arrêtera complètement les particules de plus faible énergie avant même leur arrivée au détecteur.

B.4 Interaction des photons avec la matière

Les photons interagissent avec la matière principalement par effet photoélectrique, diffusion Compton et production de paires (figure B.3A).

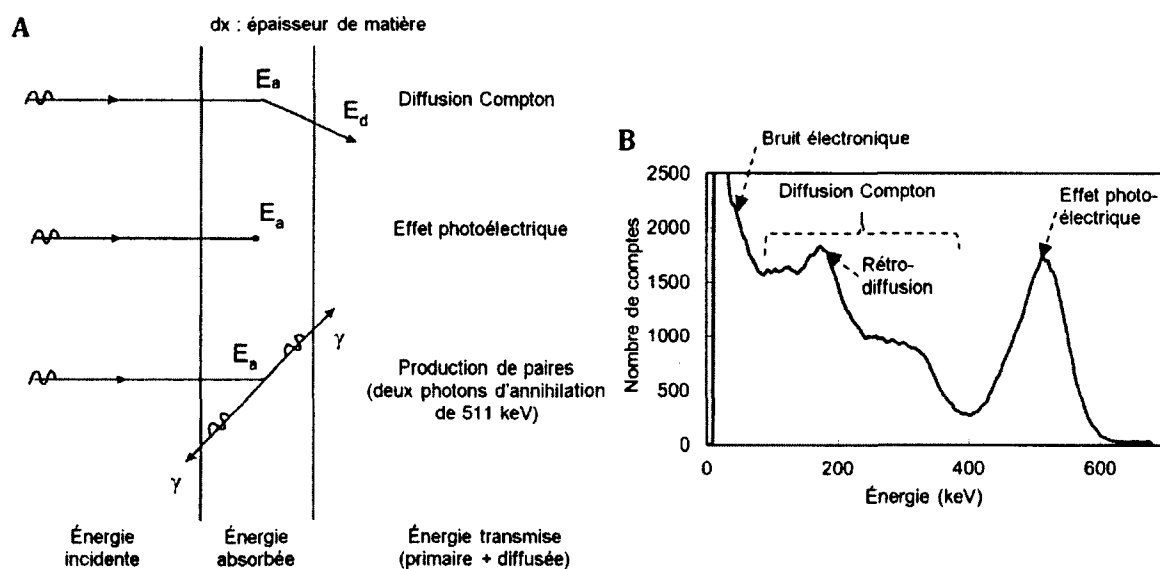


Figure B.3 : A. Différentes catégories d'interaction des photons avec la matière. B. Spectre d'absorption d'un photon de 511 keV (source de ^{68}Ge , LYSO couplé à un photodiode à avalanche) (Gracieuseté de C. M. Pepin, CIMS).

La production de paires est une interaction du photon avec le champ électrique du noyau (le plus souvent). Le photon disparaît et une paire électron/positron est créée. Ces derniers déposent de l'énergie localement puis le positron s'annihile. Cette interaction n'est possible qu'à partir d'une énergie incidente supérieure à 1022 keV, donc ne se rencontre pas en TEP et TEM.

La diffusion Compton est la collision inélastique, ou diffusion incohérente, avec un électron libre ou faiblement lié du milieu. Le photon incident est dévié et perd de l'énergie, mais continue son chemin. L'électron cible est éjecté et dépose son énergie localement en créant des ionisations. La quantité d'énergie déposée localement dépend de l'angle de déviation du photon incident. Pour un faisceau de photons, les interactions Compton forment un spectre d'absorption continu (figure B.3B). Certains angles de diffusion étant plus

probables que d'autres (notamment la rétrodiffusion, 180°), le spectre continu n'est pas uniforme.

L'effet photoélectrique est l'absorption du photon par l'atome cible. Ce dernier se désexcite en éjectant un électron. Le réarrangement électronique qui s'en suit produit des rayons X et des électrons Auger caractéristiques de la cible. L'énergie déposée localement (ionisations par les électrons secondaires) correspond à l'énergie du photon incident et produit une raie dans le spectre d'absorption (figure B.3B). C'est donc le mode d'interaction préféré pour la détection. Noter que l'élargissement de la raie dans le spectre de la figure B.3B résulte du processus de détection.

Comme pour les particules chargées, la fréquence d'interaction des photons avec la matière est un processus stochastique. Cependant, n'ayant ni masse ni charge, les photons peuvent traverser des épaisseurs beaucoup plus grandes que les particules chargées avant d'effectuer une interaction. Pour un faisceau de photons incidents, la proportion de photons subissant une interaction dans l'épaisseur x (cm) de matériau cible est

$$p = 1 - e^{-\mu x}, \quad (\text{B.9})$$

où μ (cm^{-1}) est le coefficient d'atténuation linéaire du photon. Les valeurs du coefficient d'atténuation de masse, μ/ρ , sont tabulées sur internet pour chaque type d'interaction [National Institut of Standards and Technology, n.d.-b]. Cette formule nous permet par exemple de calculer que seulement 0,5 % des photons d'annihilation de 511 keV subiront une interaction (tous types confondus) dans 250 μm de silicium, avec 0,001 % d'interactions photoélectriques. Ces chiffres sont à peine plus élevés pour un rayon gamma de 140 keV (produit par le $^{99\text{m}}\text{Tc}$), soit 0.9 % d'interactions totales et 0.05 % d'interactions photoélectriques. Pour des rayons X secondaires qui ont une énergie beaucoup plus faible, par exemple 30 keV, les interactions commencent à être plus significatives, soit 8 % totales et 6.5 % photoélectriques.

Arrêter des rayons gamma ou des photons d'annihilation requiert donc un matériau à nombre de masse élevé (> 100), dense et épais (typiquement un à deux centimètres). Ils peuvent donc facilement traverser une gaufre de silicium sans produire aucune interaction.

ANNEXE C PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA MICROFABRICATION

Les techniques de fabrication standard de la microélectronique comme le nettoyage, la photolithographie, le dépôt, la gravure, le soulèvement, le dopage et le collage ont été utilisées dans ce projet. Après une brève description des salles blanches, les techniques de fabrication standard seront sommairement présentées dans cette section à partir des informations contenues dans le manuel de Franssila [Franssila, 2010] et de celui de Tabeling [Tabeling, 2006]. Les techniques de réplification fréquemment utilisées pour fabriquer des dispositifs microfluidiques et abordées dans l'état de l'art seront également introduites.

C.1 Salles blanches

Les salles blanches sont des installations à environnement contrôlé qui permettent la fabrication de dispositifs microélectroniques de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres. Le premier élément à contrôler est le taux de poussières dans l'air. En effet, une poussière a une dimension micrométrique et a tendance à s'adsorber sur les surfaces. Elle peut ainsi facilement endommager un microsystème. L'air doit donc être filtré dans les salles de microfabrication. La pureté de l'air est classée en fonction du nombre de particules de plus de $0,5\ \mu\text{m}$ dans un pied cube. Les salles de systèmes micro électromécaniques (MEMS) sont typiquement de classe 1000 à 10000 alors que les salles blanches de microélectronique de pointe sont de classe 1 à 10. Les salles blanches du CRN2 utilisées lors de ce projet sont de classe 100. Afin de maintenir un faible taux de poussière, le personnel doit revêtir des habits spécifiques soit une cagoule, des bottes, des gants et un survêtement complet. L'hygrométrie et la température sont également contrôlées pour assurer une haute reproductibilité des procédés et les filtres d'air permettent également d'éliminer les différents gaz dus aux divers processus chimiques utilisés. Ces installations de pointe permettent de maintenir un environnement idéal pour la microfabrication mais sont très coûteuses (installation et opération).

C.2 Nettoyage

Le nettoyage représente souvent plus de 30 % de toutes les étapes formant un procédé de fabrication complet. Il permet de préparer la surface pour la laisser dans un état connu et contrôlé entre chaque étape ainsi que de se prémunir contre la contamination (particulaire, moléculaire ou ionique). Le nettoyage se fait dans des bacs humides à l'aide d'acides, de bases ou de solvants suivant le type de contaminant à éliminer. Les bacs humides sont des paillasse dont l'air est en permanence aspiré par des hottes. Ils sont approvisionnés en eau désionisée (pour le rinçage sans introduire de nouveaux contaminants) et en azote gazeux (pour le séchage des échantillons en atmosphère inerte). Ils sont aussi équipés d'outils tels que des bassins à ultrasons (pour activer le déplacement des liquides sur les surfaces) et des bains-marie (pour les réactions chimiques à chaud).

C.3 Photolithographie

La photolithographie permet de créer des motifs de photorésine sur les dispositifs. En microélectronique, elle est souvent temporaire et sert simplement de masque pour ensuite venir graver les couches sous-jacentes (figure C.1A). En MEMS, elle est également utilisée pour créer des structures permanentes, comme des microcanaux.

Une photorésine est un mélange d'un polymère (lui donnant ses propriétés thermiques et mécaniques), d'un composé photosensible et d'un solvant (lui donnant sa viscosité). Il existe deux grandes classes de résines. Les résines positives reproduisent exactement le photomasque alors que les résines négatives produisent l'image inverse.

Pour créer un motif, les gaufres sont d'abord étuvées afin de retirer toute trace d'humidité à leur surface et favoriser une bonne adhésion. La résine est ensuite appliquée à l'aide d'une tournette (figure C.1B). La viscosité de la résine ainsi que la vitesse d'étalement déterminent l'épaisseur finale de la couche. Ce type d'étalement produit un cordon (zone d'accumulation de résine au pourtour de la gaufre) qu'il est souvent nécessaire d'enlever avant l'exposition de la résine (figure C.1C).

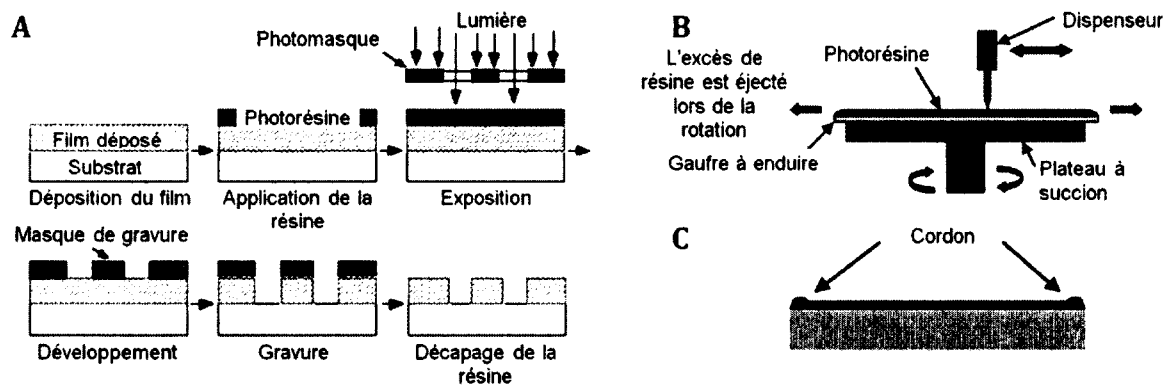


Figure C.1 : A. Principe de la photolithographie (adapté de <http://ahshonorschemistry.wikispaces.com/A-Silicon+Wafer+Patterned>). B. Étalement de résine par tournette (adapté de <http://2009.igem.org/Team:HKU-HKBU/Protocols#Photolithography>). C. Cordon d'étalement (même source).

Un premier recuit, appelé recuit doux, permet d'évaporer les solvants. La gaufre est ensuite placée dans une aligneuse qui permet de positionner très précisément le photomasque (plaque de verre avec un motif de chrome) par rapport aux motifs déjà présents sur la gaufre. Cette dernière est exposée à la lumière UV via le photomasque, rendant une photorésine positive soluble dans les zones exposées ou y activant la polymérisation pour une photorésine négative (polymérisation qui devient effective seulement après un second recuit ou recuit post-exposition).

Pour produire le motif, la gaufre est ensuite développée avec un produit chimique pour dissoudre les régions solubles d'une résine positive ou les régions non polymérisées d'une résine négative. Les temps d'exposition, de recuit et de développement sont autant de paramètres qui influencent la taille finale et le profil des motifs. Enfin, comme les résines négatives sont polymérisées, elles sont beaucoup plus résistantes mécaniquement,

thermiquement et chimiquement que les résines positives. Ce sont donc des résines de choix pour les MEMS et la microfluidique.

Il est à noter que la résolution d'une photolithographie est limitée par la longueur d'onde de la lumière d'excitation (environ 400 nm pour les lampes à Mercure). Pour obtenir des structures plus petites, l'industrie utilise des lampes à longueur d'onde plus courte ainsi que des masques à contraste de phase et des techniques de double exposition. Il est également possible d'utiliser une lithographie par faisceaux d'électrons. Ce type de résolution n'est cependant la plupart du temps pas nécessaire pour les dispositifs microfluidiques.

C.4 Dépôt

Le dépôt de couches minces est utilisé pour former des couches protectrices, isolantes ou sacrificielles, des masques de gravure ou d'implantation plus résistants que la résine ou bien pour métalliser l'échantillon.

La métallisation permet d'établir les contacts électriques entre les dispositifs d'une même puce et avec l'extérieur. Elle est généralement effectuée par déposition physique de vapeur (PVD). Le principe général de la PVD est que le matériel à déposer est éjecté d'une cible et que l'énergie cinétique ainsi acquise permet aux atomes cibles de se déplacer dans le vide jusqu'à la surface du substrat. L'éjection d'atomes de la cible peut s'effectuer par pulvérisation ou par évaporation. En pulvérisation, la cible est bombardée par un plasma d'argon (figure C.2A). En évaporation, elle est chauffée sous vide au-dessus de son point de vaporisation. La chaleur peut être obtenue par résistivité ou en bombardant la cible par un canon à électrons. Les propriétés des couches sont différentes suivant le mode de déposition choisi. Par exemple, l'évaporation a tendance à être plus directionnelle que la pulvérisation, couvrant moins bien les reliefs.

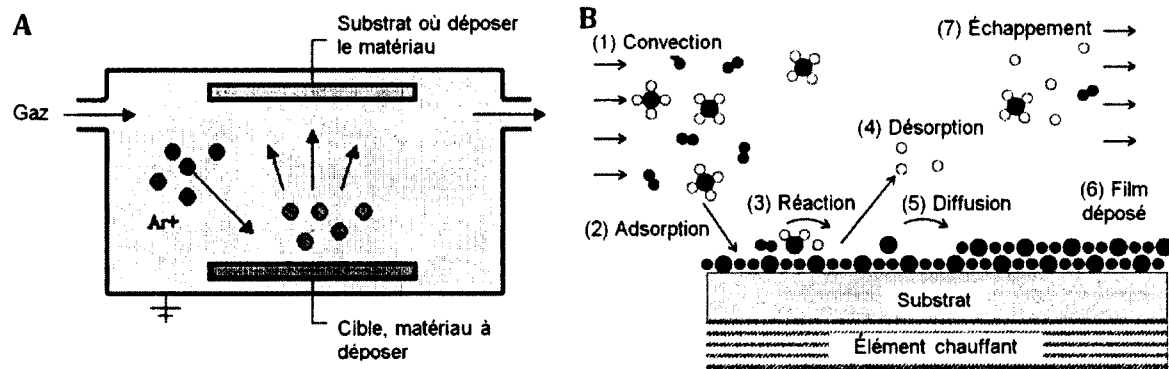


Figure C.2 : A. Pulvérisation cathodique (adapté de Wikipedia). B. Déposition par vapeur chimique (adapté de <http://accessscience.com/content/Chemical%20vapor%20deposition/800560>).

Les couches isolantes peuvent être déposées par PVD ou par déposition par vapeur chimique (CVD). Un composé à l'état gazeux est alors amené à la surface du substrat où il se décompose et réagit (figure C.2B). Ce gaz et les produits de la réaction sont ensuite pompés et évacués de la chambre. Pour que la réaction chimique se fasse, il faut un apport d'énergie, soit sous forme de chaleur (600 à 1000 °C), soit sous forme d'un plasma. Les dépôts rehaussés par plasma (PECVD) sont faits à des températures beaucoup plus basses (~300 °C), ce qui est

indispensable si des métaux sont présents sur l'échantillon et très utile s'il contient des dopants.

Enfin, il est possible de faire croître un oxyde de silicium sur un substrat de silicium. La bonne qualité de cet oxyde comme isolant a d'ailleurs en partie contribué au choix du silicium comme substrat en microélectronique industrielle. Pour faire croître un oxyde, il suffit de mettre le silicium dans un four à très haute température (~ 1000 °C) en présence d'oxygène. L'oxygène peut-être sous forme pure (O_2), on parle alors de croissance sèche. Il peut également être sous forme de vapeur d'eau (H_2O), on parle alors de croissance humide. La croissance sèche est plus lente, mais donne un oxyde de meilleure qualité que la croissance humide. D'une manière générale une croissance donne un oxyde de meilleure qualité qu'un dépôt, parce qu'il est très pur et que l'interface entre l'oxyde et le silicium contient très peu de défauts. Cependant, la croissance peut uniquement se faire sur du silicium et nécessite de très hautes températures souvent proscrites en fin de procédé. Il est à noter que le silicium s'oxyde également à température ambiante en présence de l'oxygène et de l'humidité de l'air. Il se forme ainsi spontanément une fine couche (quelques nanomètres) appelée oxyde natif.

C.5 Gravure

La gravure transfère un motif de photorésine dans une couche sous-jacente non photosensible, pouvant être un isolant, un métal ou le substrat lui-même. Il existe deux grandes classes de gravures, la gravure humide ou sèche.

La gravure humide consiste à tremper la gaufre dans une solution aqueuse contenant un agent chimique qui attaquera le matériau, souvent un acide. Elle est simple et peu coûteuse, mais a l'inconvénient de graver le plus souvent de manière isotropique, c'est-à-dire dans toutes les directions (figure C.3). Elle n'est donc pas indiquée pour former de très petits motifs.

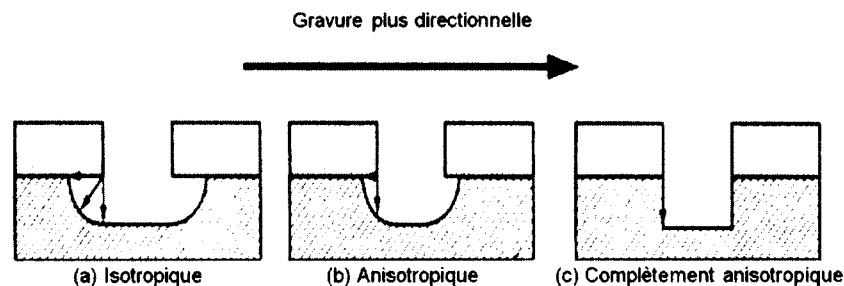


Figure C.3 : Différents profils de gravure (adapté de [Fransila, 2010]).

La gravure sèche utilise un plasma pour effectuer une gravure physique ou physico-chimique qui peut être complètement anisotropique, c'est-à-dire dans une seule direction. La gravure physique est obtenue par un bombardement avec des ions argons (IBE). La gravure physico-chimique (RIE) est obtenue en ajoutant un gaz qui va réagir à la surface, un peu comme la CVD mais en enlevant des atomes au lieu de les déposer. Grâce à la combinaison des deux phénomènes (physique et chimique), cette gravure est beaucoup plus rapide que la gravure purement physique.

Pour les gravures humides ou RIE, le réactif est plus ou moins sélectif du matériau à graver et peu attaquer également le masque de gravure ou le matériau sous-jacent. Le réactif, qu'il soit aqueux ou gazeux, doit donc être choisi avec soin.

C.6 Soulèvement

Lorsqu'il n'existe pas de réactif adéquat pour effectuer une gravure, comme c'est souvent le cas avec les métaux nobles, il est possible de former un motif par soulèvement. Le motif désiré est d'abord transféré sur une couche de résine par photolithographie. Chaque ouverture dans la résine doit correspondre à l'emplacement final de métal. Une fine couche de métal est ensuite déposée sur l'ensemble de la gaufre. Enfin, la résine est dissoute, emportant avec elle tout métal non en contact avec le substrat (figure C.4A). Le défi principal de ce procédé consiste à enlever uniquement le film présent sur la résine sans affecter celui en contact direct avec le substrat. Pour cela le film doit bien adhérer au substrat et la couche de résine doit être plus épaisse que le film métallique. De plus, il est nécessaire d'introduire une certaine discontinuité du film au niveau des reliefs sous forme d'une bicouche de résine ou d'une résine à profil rétrograde (figure C.4B).

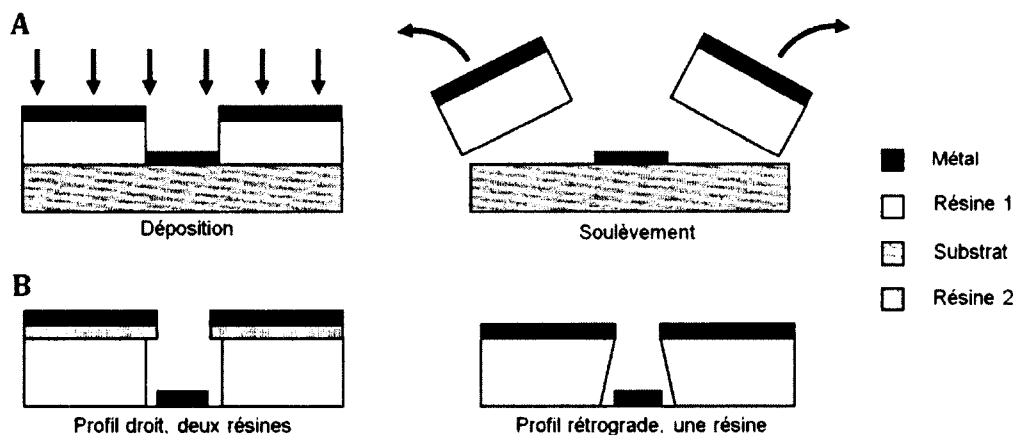


Figure C.4 : A. Procédé de soulèvement. B. Profils de résines facilitant le soulèvement.

C.7 Dopage

Le dopage permet de rendre le silicium conducteur et d'ajuster sa résistivité. Les dopants incorporés dans le silicium sont le plus souvent du bore pour un dopage de type p et du phosphore ou de l'arsenic pour un dopage de type n . Ce dopage peut être effectué par diffusion dans des fours à haute température (dopant sous forme gazeuse ou sous forme de film déposé à la surface du substrat). Pour un meilleur contrôle de dose et de profondeur, les dopants sont incorporés par implantation ionique. Pour cela, des ions positifs sont accélérés puis bombardés sur la surface. Après l'implantation, l'échantillon doit être recuit à haute température (800 à 1200 °C) pour que les dopants deviennent actifs électriquement. Lors de ce recuit, les dopants diffusent dans le silicium, élargissant la zone dopée dans les trois dimensions. Tout recuit subséquent à haute température aura d'ailleurs le même effet. Il est donc primordial de prendre en compte toutes les étapes hautes températures d'un procédé de fabrication lors de la conception et de les limiter lorsque des jonctions très petites ou très

abruptes sont nécessaires (budget thermique). Un inconvénient de l'implantation ionique est qu'elle crée beaucoup de dommages à la surface du substrat qui sont en partie réparés par le recuit. Lorsqu'une très grande qualité de surface est nécessaire, il est possible d'implanter les ions au travers d'une fine couche sacrificielle. Enfin, lors d'une implantation ionique, le faisceau d'ions balaye toute la surface de l'échantillon. Pour définir des zones à doper, il est nécessaire de créer un motif dans une couche mince en surface de l'échantillon. Dans les zones masquées, cette couche doit être suffisamment épaisse pour arrêter complètement le faisceau d'ions. Il peut s'agir d'un oxyde ou simplement d'une photorésine.

C.8 Collage

Le collage permet d'assembler deux gaufres identiques ou différentes pour intégrer leurs fonctionnalités en trois dimensions ou pour former des structures complexes épaisses comme des microturbines MEMS par exemple [Fréchette et al., 2005]. En microfluidique, le collage permet de fermer les canaux, une gaufre comprenant le plancher et les murs du canal et la seconde formant le toit du canal. Il existe deux grandes classes de collage : le collage direct ou le collage indirect (par couche intermédiaire) (figure C.5).

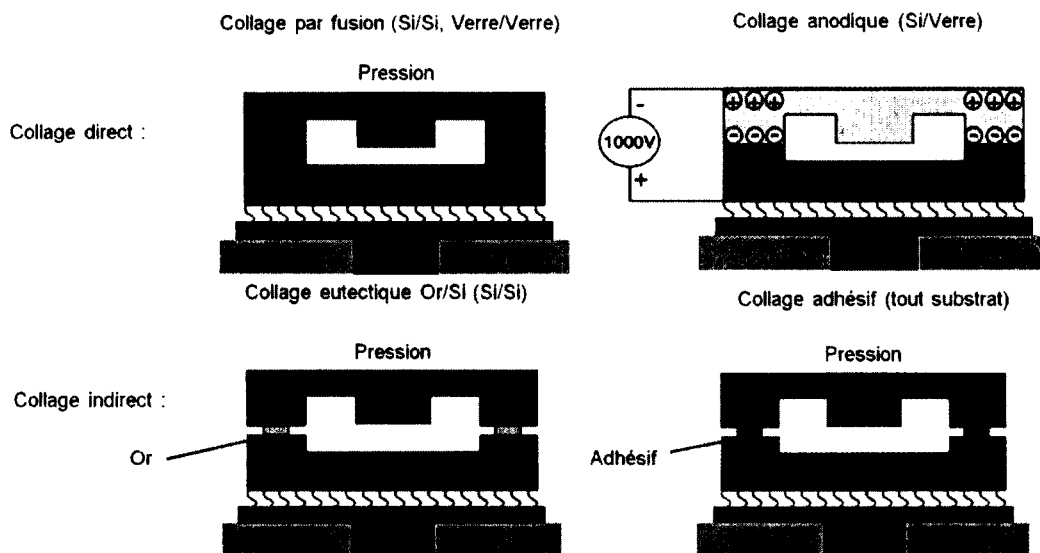


Figure C.5 : Différents types de collages (adapté de [Abgrall et al., 2007]).

Le collage direct implique la mise en contact de deux gaufres puis l'apport d'énergie au système pour créer des liens covalents. La plupart du temps les deux gaufres sont identiques et l'apport d'énergie se fait sous forme de chaleur. Il s'agit du collage par fusion. Les températures impliquées sont en général très élevées (de l'ordre de 600 °C pour le verre et 1000 °C pour le silicium) et ne peuvent descendre en dessous de 400 °C pour les matériaux durs même avec une activation plasma. Pour deux gaufres plastiques, les températures sont beaucoup plus faibles (100 – 200 °C). Un cas particulier de collage direct est le collage anodique. Il permet de coller une gaufre de silicium sur une gaufre de verre par l'application d'un champ électrique (300 – 1000 V à 400 °C). Ce dernier remplace la pression appliquée pour les autres collages et fait migrer les ions oxygènes du verre pour former des liaisons Si-O

avec le silicium. Le collage direct entraîne un lien très fort entre les deux gaufres qui peuvent ensuite être considérées comme une seule gaufre. Par contre, en plus des hautes températures, il nécessite une propreté et une planéité de surface irréprochables.

Le collage par couche intermédiaire est divisé en trois classes suivant le matériau servant à effectuer le collage soit un métal ou un polymère et suivant qu'il soit appliqué sur une face ou les deux. Le collage par métal est aussi appelé thermocompression dans le cas d'un collage métal sur métal ou collage eutectique dans le cas d'un collage métal sur semiconducteur. Il requiert l'application de pression de 1 à 10 MPa et de température entre 300 et 400 °C. Il est souvent difficile à effectuer sur une gaufre complète, car il est requiert une pression très uniforme. Le collage par polymère est aussi appelé collage adhésif et le polymère est généralement appliqué sur une seule face. La stabilité à long terme de ce collage est moins bonne que les autres types de collages, mais il possède plusieurs avantages. Il est simple, peu coûteux et effectué à basse température (20 - 200 °C). De plus, comme les polymères sont souples, le collage adhésif est relativement tolérant à la non-planéité du substrat ainsi qu'à la contamination particulaire et peut s'effectuer sur des gaufres possédant des structures. Ces avantages en font un choix intéressant pour des procédés post-CMOS, comme l'ajout de canaux microfluidiques par exemple.

C.9 Réplication

En microfabrication, la réplication regroupe principalement trois techniques, soit le moulage, l'impression à chaud et la micro injection (figure C.6).

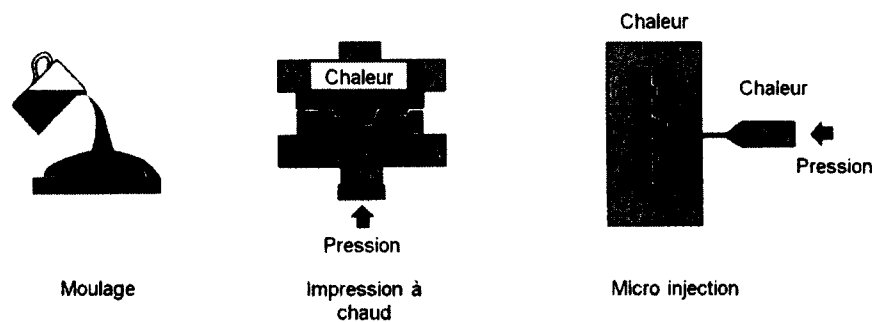


Figure C.6 : Techniques de réplication (adapté de [Tabeling, 2006]).

Le moulage occupe une place très importante en microfluidique. Un prépolymère liquide est mélangé à un catalyseur, versé sur un moule et chauffé pour commencer la polymérisation (65 °C). Une fois réticulée, la pellicule de polymère démoulée représente le négatif du moule. Comme ce moulage est effectué à basse température, le moule peut être formé de polymère, le plus souvent de la SU-8. Une fois le moule microfabriqué, de nombreux dispositifs peuvent être reproduits sans nécessiter de salles blanches, rendant la microfluidique accessible à un très grand nombre.

L'impression à chaud est utilisée avec des plastiques solides à température ambiante de type Plexiglass. Pressé à chaud contre un moule microfabriqué (quelques dizaines de bars et environ 170 °C), le plastique se déforme et reproduit le négatif du moule. Ici, le moule est le plus souvent métallique (couche de métal épaisse formée sur support silicium). Des motifs très petits (quelques dizaines de nanomètres) peuvent être ainsi reproduits avec des rapports de

forme élevés. Cette technique est cependant lente à cause des temps de chauffage et refroidissement de la presse et les moules sont délicats à utiliser. Pour des polymères photosensibles liquides, les rampes thermiques sont remplacées par une exposition UV.

La micro-injection est la méthode utilisée pour fabriquer les CD, DVD et Blu-ray. Un plastique fondu (environ 300 °C) est injecté dans un moule chauffé qui est refroidi avant le démoulage. Cette technique est plus rapide que l'impression à chaud. Les moules sont cependant très onéreux.

ANNEXE D DÉTECTION OPTIQUE ET DÉTECTION DE RADIOACTIVITÉ HORS PUCE

D.1 Détection optique pour la microfluidique

Les systèmes de détection optique sont principalement basés sur la fluorescence, mais regroupent également l'absorbance, la chimiluminescence et la réfractométrie. Les systèmes de détection pour dispositifs microfluidiques sont généralement répartis en deux grandes classes : les systèmes de détection hors puce et les systèmes sur puce [Gai et al., 2011; Kuswandi et al., 2007]. Les premiers impliquent une séparation totale du dispositif microfluidique et du système d'illumination et de détection de lumière (figure D.1).

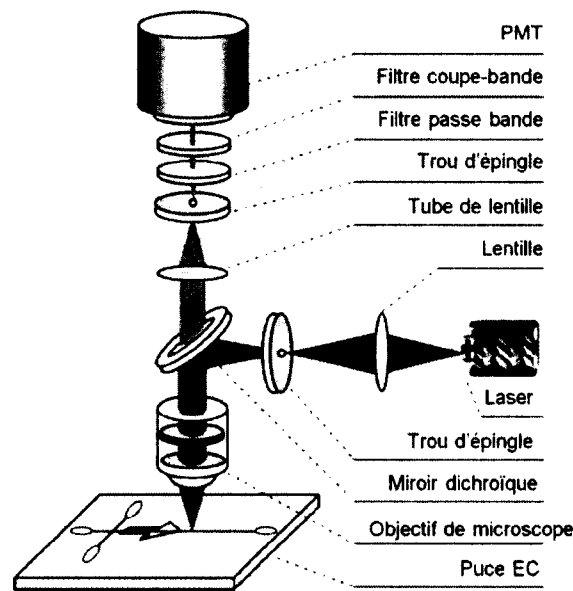


Figure D.1 : Exemple de détection optique hors puce par un microscope confocal (adapté de [Gai et al., 2011]).

Pour une plus grande portabilité, les développements récents visent à intégrer la détection, voire la génération de lumière, sur puce. Un exemple de ce type de systèmes est illustré à la figure D.2.

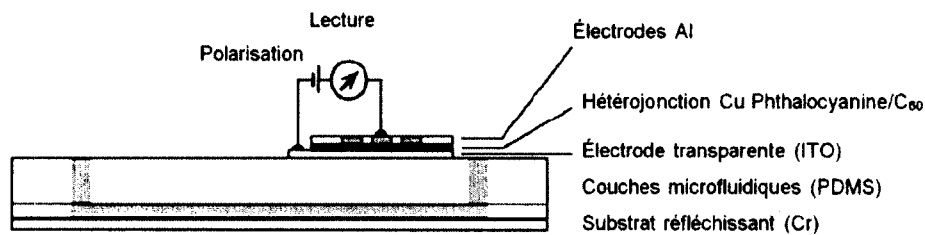


Figure D.2 : Exemple de détection optique sur puce avec une interface typique épaisse mais optiquement transparente (adapté de [Hofmann et al., 2005]).

Pour la radioactivité, une interface même peu dense (polymère) de quelques centaines de microns peut arrêter complètement un électron de conversion ou couper une grande partie du spectre d'émission des particules β . Dans le présent projet, la sensibilité de détection serait alors insuffisante. Certains systèmes de détection optiques ont toutefois une interface beaucoup plus fine (figure D.3). La différence avec le système proposé repose alors principalement sur le type de matériau utilisé pour faire le microcanal (polymère KMPR) et le type de détecteur utilisé (zone de détection épaisse).

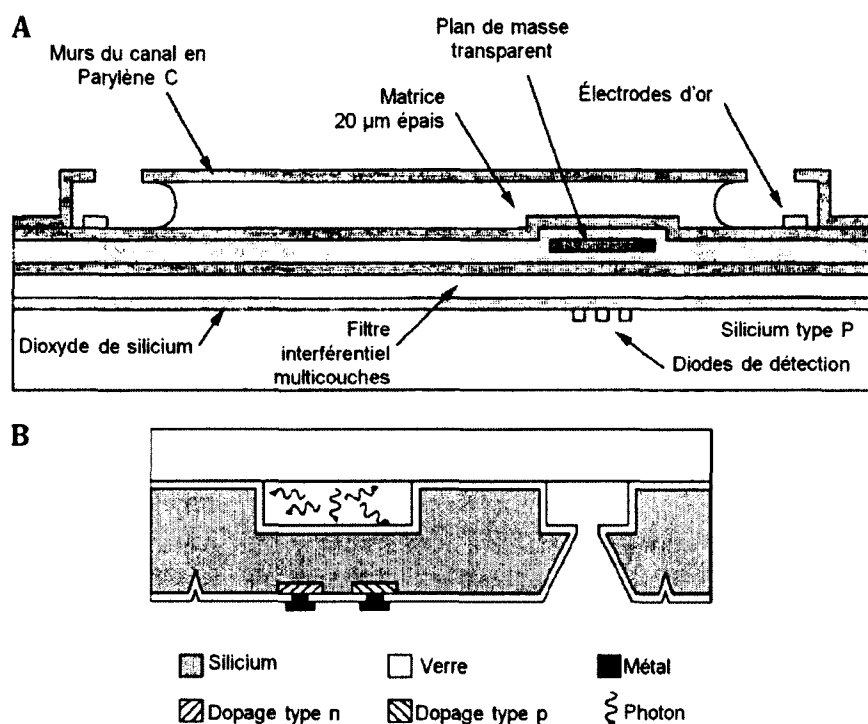


Figure D.3 : Exemples de détection optique intégrée avec une interface compatible avec de la détection de radioactivité. A. Dispositif d'électrophorèse capillaire avec détecteur de fluorescence (adapté de [Webster et al., 2001]). B. Détecteur de chimiluminescence (adapté de [Jorgensen et al., 2003]).

D.2 Détection de radioactivité hors puce


Comme pour les détecteurs optiques, deux grandes catégories de systèmes microfluidiques de détection de radiation se retrouvent dans la littérature, les systèmes hors puce et les systèmes sur puce. Des détecteurs de radiation ont été utilisés hors puce, dans un synchrotron, pour des études de diffraction de rayons X ou de fluorescence aux rayons X principalement dédiées à la cristallisation de protéines [Martel et al., 2008; Ng et al., 2008; Vig et al., 2009; Zheng et al., 2004] ou à l'interface solide-liquide [Reich et al., 2005]. Certains tendent même à intégrer une source de rayons X dans la puce [Greaves et al., 2005]. Les puces sont faites de polymères et sont placées dans le faisceau de rayons X, entre la source et le détecteur.

Certains auteurs soulignent les avantages des plastiques (PMMA, COC) comparés au PDMS pour ce type d'application. Le PDMS est en effet trop flexible pour la manipulation, trop poreux pour éviter l'évaporation des liquides à l'intérieur du canal et pas suffisamment transparent aux rayons X [Dhouib et al., 2009]. Les problématiques sont cependant différentes pour la détection de rayons X et pour celle des particules chargées (la notion de radio opacité n'est pas la même) et ces dispositifs n'intègrent pas le détecteur.


Un système de détection hors puce pour particules chargées a été démontré en 2004 par Lavén et coll. pour la détection d'adsorption de peptides dans les murs du microcanal [Lavén et al., 2004]. Une puce en plastique avec un analyte marqué au ^{68}Ga est placée sur un imageur phosphore après rinçage. L'influence de différentes modifications de surface, concentration d'analyte, pH ou force ionique peut ainsi être évaluée. Le procédé n'est cependant pas temps réel et la prise d'une image requiert deux heures d'exposition.


ANNEXE E PROTOCOLE DE FABRICATION DES DIODES P-I-N



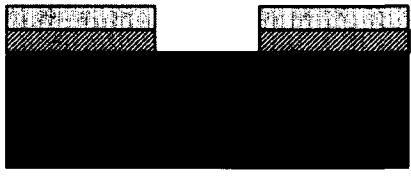

E.1 Dégraissage et nettoyage du substrat


Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
1.1 Clivage, marquage					
1.2 Nettoyage	Bancs humides	Opticlear (US) Acetone (US) Isopropanol (US) Rinçage Eau DI $H_2O_2:H_2SO_4$ (1:5) Rinçage Eau DI $H_2O:NH_4OH:H_2O_2$ (5:1:1) Rinçage Eau DI HF: H_2O / 1:50 Rinçage Eau DI $H_2O:HCl:H_2O_2$ (5:1:1) Rinçage Eau DI Séchage azote	5 min 5 min 5 min 2 min 15 min 2 min 15 min 2 min 10 s 30 s 15 min 1 min	 75 °C 75 °C	

E.2 Formation du masque d'implantation face avant




Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
2.1 Oxydation thermique humide	Four Tempres	1050 °C	70 min	Masque de dopage au bore et oxyde de champ.	
2.2 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min		


 Silicium
  SiO₂
  Résine
 ● ● Dopage
  Aluminium

2.3	Étalement de HMDS	Étaleuse Laurell	Vitesse (rpm) : 500 Vitesse (rpm) : 5000	3 s 30 s	Meilleure adhésion de la S1813	
2.4	Étalement de résine	Étaleuse Laurell	S1813 Vitesse (rpm) : 1000 Vitesse (rpm) : 5000	3 s 30 s	1,2 µm Masque pour gravure SiO ₂	
2.5	Recuit de résine	Plaque chauffante	115 °C	1 min	Cuisson douce	
2.6	Exposition	Aligneuse OAI 200	20 mW/cm ²	7 s	Masque 1, Zones d'implantation	
2.7	Développement	Développeuse	MF319	30 s		
2.8	Recuit de résine	Plaque chauffante	125 °C	10 min	Cuisson forte	
2.9	Gravure humide	Bancs humides	BOE (6:1) Rincage eau DI	8 min 2 min	Oxyde Gravure jusqu'à hydrophobicité face arrière	
2.10	Décapage de résine	Bancs humides	Acétone + US IPA + US Rincage eau DI	3 min 3 min		


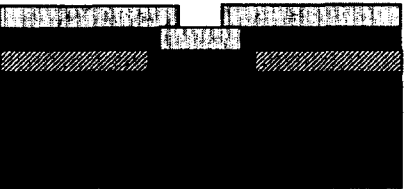

 Silicium
 SiO₂
 Résine
 Dopage
 Aluminium





E.3 Dopage et activation des dopants



Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
3.1 Nettoyage	Bancs humides	H ₂ O ₂ :H ₂ SO ₄ (1:1) Rinçage Eau DI HF:H ₂ O ₂ (1:10) Rinçage eau DI	15 min 2 min 10 s 2 min		
3.2 Dopage	Implanteur ionique	Bore 8.10 ¹² cm ⁻² , 35 KeV 8.10 ¹² cm ⁻² , 10 KeV	183 s 174 s	Face avant	 Bore
3.3 Dopage	Implanteur ionique	Phosphore 8.10 ¹² cm ⁻² , 90 KeV 8.10 ¹² cm ⁻² , 35 KeV	40 s 42 s	Face arrière	 Bore Phosphore
3.4 Nettoyage	Bancs humides	Idem 1.2			
3.5 Activation des dopants	Four Tempress	900 °C, N ₂	2 h 15		 p+ n+

 Silicium
  SiO₂
  Résine
 ● ● Dopage
  Aluminium

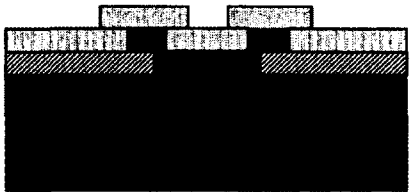
E.4 Métallisation face avant

Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
4.1 Nettoyage	Bancs humides	HF:H ₂ O ₂ (1:10) Rinçage eau DI	10 s 2 min	Jusqu'à hydrophobie	
4.2 Dépôt	Évaporateur Edwards	Aluminium		Face avant 0,25 µm	 p+ n+
4.3 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min		
4.4 Étalement de résine	Étaleuse Laurell	S1813 Vitesse (rpm) : 1000 Vitesse (rpm) : 5000	3 s 30 s	1,2 µm Masque pour gravure Aluminium	 p+ n+
4.5 Recuit de résine	Plaque chauffante	115 °C	1 min	Cuisson douce	
4.6 Exposition	Aligneuse OAI 200	20 mW/cm ²	7 s	Masque 2 Métallisation	
4.7 Développement	Développeuse	MF319			 p+ n+
4.8 Recuit de résine	Plaque chauffante	125 °C	10 min	Cuisson forte	
4.9 De-Scum	Plasmale	O ₂ , 75 W	2 min		

 Silicium
  SiO₂
  Résine
 ● ● Dopage
  Aluminium

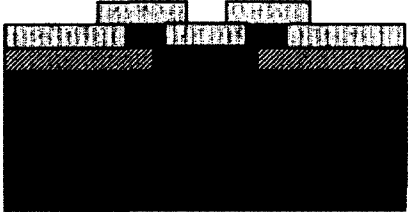

4.10 Gravure humide	Bancs humides	H ₃ PO ₄ :CH ₃ CO ₂ HCH ₃ (3:1) Rinçage eau DI Séchage azote Observation	2,5 min	Aluminium 55 °C avec agitation Jusqu'à gravure complète	
4.11 Décapage de résine	Bancs humides	Acétone + US IPA + US Rinçage eau DI Séchage azote	5 min 5 min		

E.5 Décapage de la face arrière

Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
5.1 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min		
5.2 Étalement de résine	Étaleuse Laurell	S1813 Vitesse (rpm) : 1000 Vitesse (rpm) : 5000	3 s 30 s	1,2 µm Masque face avant	
5.3 Recuit de résine	Plaque chauffante	125 °C	10 min	Cuisson forte	
5.4 Gravure humide	Bancs humides	HF:H ₂ O (1:10) Rinçage eau DI	20 s 2 min	Oxyde face arrière Couleur uniforme face arrière	

Silicium
 SiO₂
 Résine
 Dopage
 Aluminium

E.6 Métallisation face arrière

Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
6.1 Dépôt	Évaporateur Edwards	Aluminium		Face arrière 0,25 µm	
6.2 Décapage de résine	Bancs humides	Acétone + US IPA + US Rinçage eau DI	5 min 5 min		
6.3 Recuit	Four Tempress	450 °C 80% N ₂ , 20% H ₂	30 min	Recuit d'alliage	

Silicium
 SiO₂
 Résine
 Dopage
 Aluminium

E.7 Passivation

Type	Équipement	Détail	Durée	Note	Illustration
7.1 Dépôt	PECVD STS	Recette HFSiN	4 min 30 s	50 nm	Nitruure
7.2 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min		
7.3 Étalement de résine	Étaleuse Laurell	S1813 Vitesse (rpm) : 1000 Vitesse (rpm) : 5000	3s 30s	1,2 µm Masque pour gravure nitruure	
7.4 Recuit de résine	Plaque chauffante	115 °C	1 min		Cuisson douce
7.5 Exposition	Aligneuse OAI 200	20 mW/cm ²	7 s	Masque 3 Contacts	
7.6 Développement	Développeuse	MF319			
7.7 Recuit de résine	Plaque chauffante	125 °C	10 min		Cuisson forte
7.8 Gravure sèche	AOE STS	Recette SiNSlow		50 nm	Gravure du nitruure

E.8 Photomasques utilisés

Un exemple de chaque masque pour une diode ronde de 1 mm de diamètre est donné à la figure E.1.

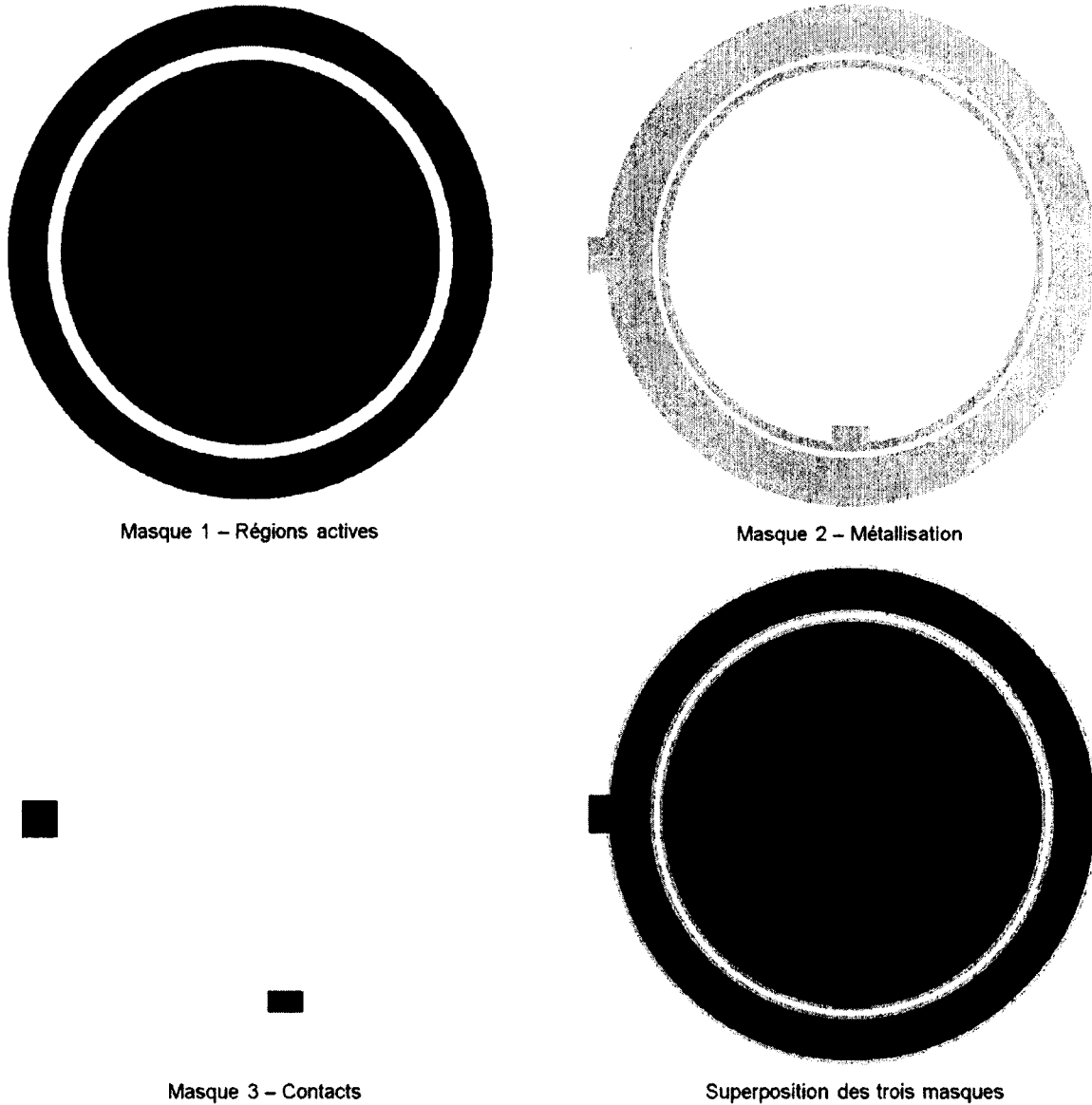


Figure E.1 : Photomasques pour la fabrication des détecteurs de radioactivité. Exemple des diodes rondes.

Les trois masques superposés pour un motif complet (1/4 de gaufre) sont donnés à la figure E.2.

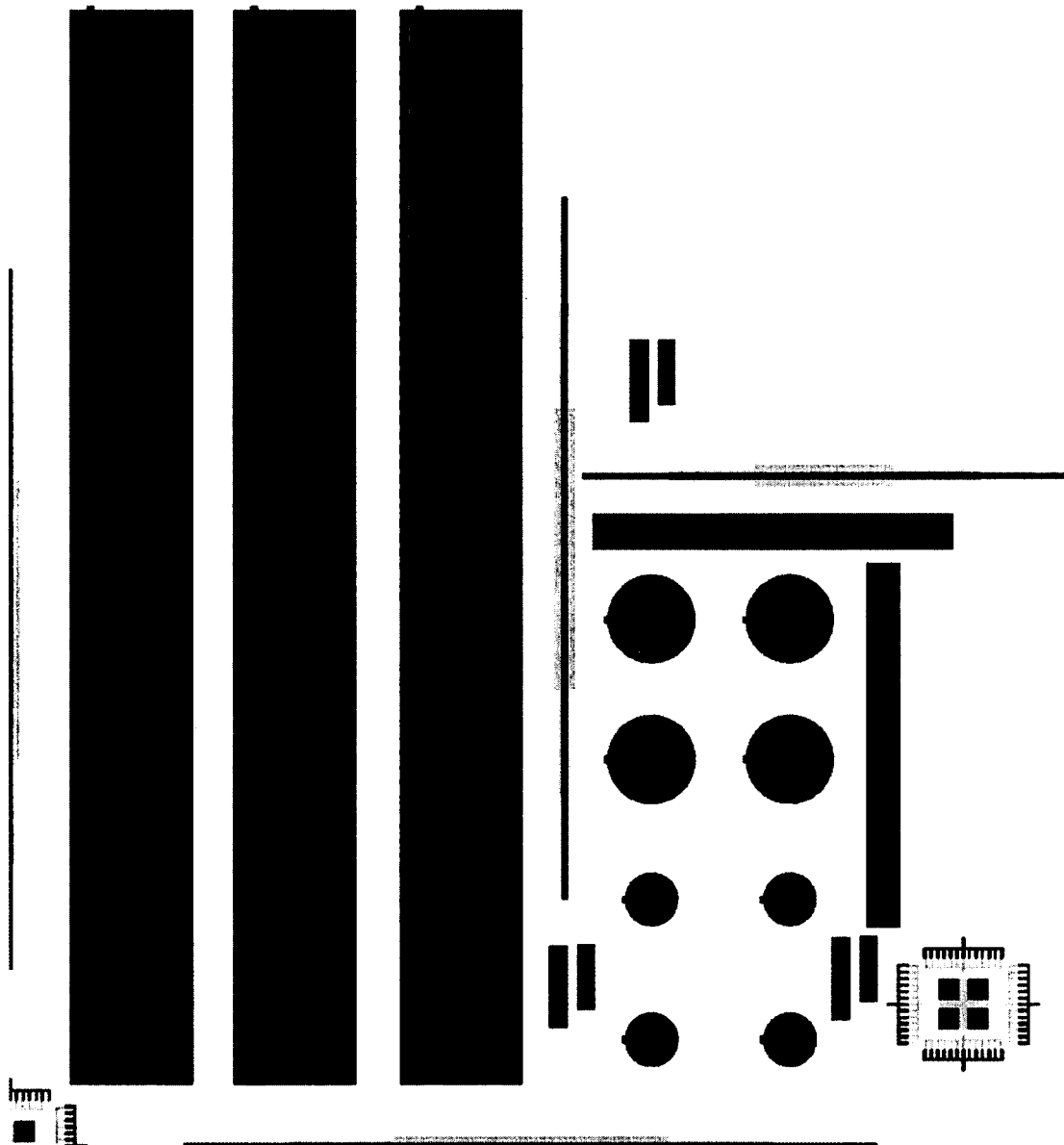


Figure E.2 : Photomasques pour la fabrication des détecteurs de radioactivité. Motif complet.

ANNEXE F BANC DE MESURE D'ANGLE DE CONTACT

Le banc de mesure d'angle de contact développé lors de ce projet est illustré à la figure F.1.

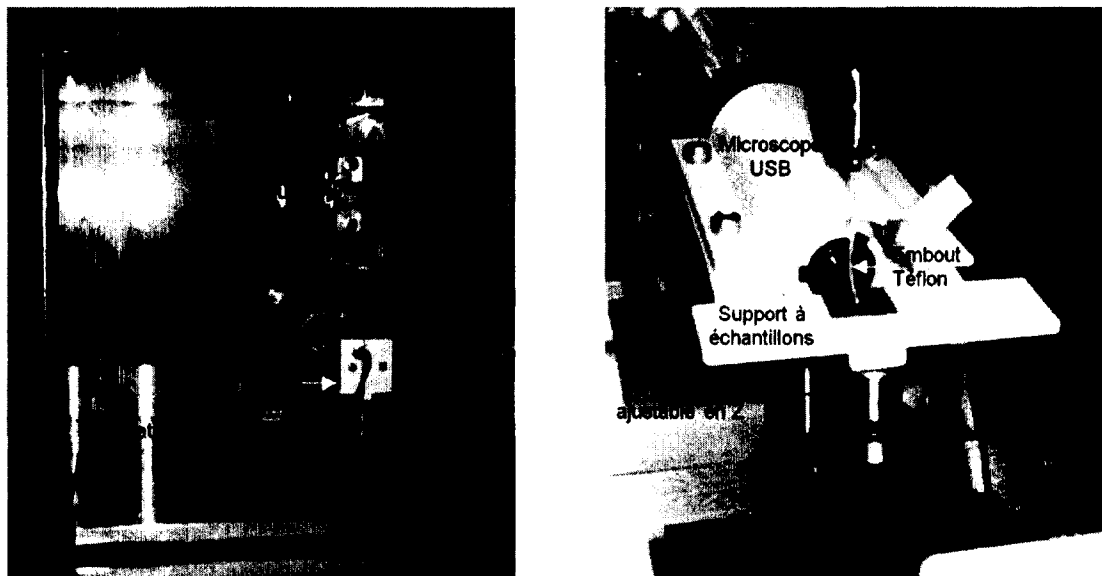


Figure F.1 : Photographies du banc de mesure d'angle de contact.

Les éléments importants de ce banc sont :

- Un dépôt reproductible de la goutte. Pour cela, une seringue 100 μ l (Hamilton, HAM81020) est installée dans un distributeur (Hamilton, HAM83700) délivrant 2 μ l à chaque pression.
- Un dépôt de goutte influençant le moins possible la mesure. Pour cela, un embout téflon est connecté au bout de la seringue (Hamilton, HAM84255) et cette dernière est montée sur une platine assurant le mouvement en Z pour le dépôt. Des images d'une séquence de dépôt sont données à la figure F.2.
- Une prise d'image en vue orthogonale avec fort contraste. Pour cela, un microscope USB (Aven, Digital Mighty Scope 1.3M) est installé horizontalement vis-à-vis du support à échantillon. Ce dernier est placé sur deux platines assurant les mouvements en X et Y pour centrer la goutte dans le champ de vue de la caméra. Le support est également placé sur un poteau ajustable en Z pour s'adapter à des échantillons de différentes épaisseurs. De plus, l'anneau de LED du microscope a été démonté, placé de l'autre côté du support à échantillon et couvert d'un papier pour diffuser sa lumière.

- Un environnement de mesure pouvant être contrôlé pour limiter l'influence de l'évaporation. Pour cela, le montage est installé dans une boîte en plexiglass ayant une entrée pour une circulation de gaz. Pour une opération simplifiée, un second support à échantillon permettant de mieux délimiter l'environnement de la goutte a été fabriqué (figure F.3). Un papier imbibé de l'eau ou du solvant à mesurer et déposé sur le support permet de créer un microenvironnement saturé en vapeur. Pour des mesures avec de l'eau, la durée d'évaporation d'une goutte de $2 \mu\text{l}$ à atmosphère ambiante est cependant très longue ($\sim 40 \text{ min}$) par rapport au délai de prise d'image après le dépôt (quelques secondes). La mesure peut donc se faire sans ce type de contrôle.

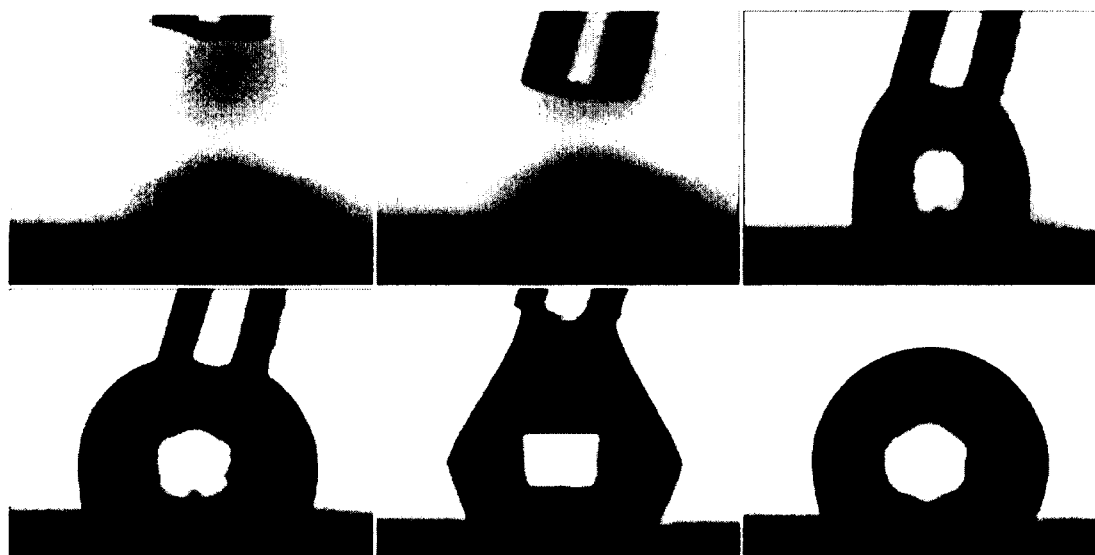


Figure F.2 : Séquence d'images illustrant le dépôt d'une goutte d'eau sur de la KMPR non traitée.

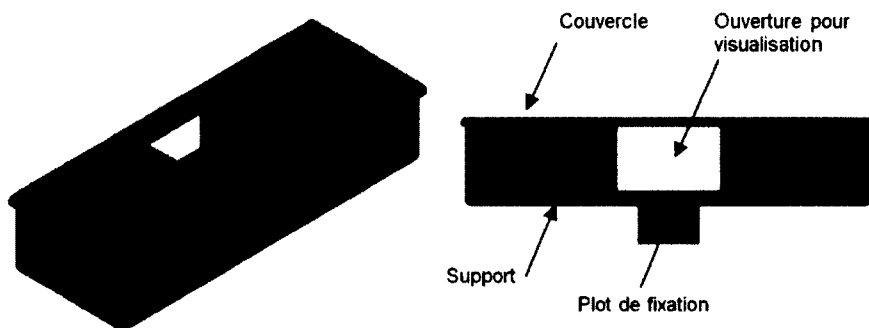


Figure F.3 : Schéma du support à échantillon permettant un contrôle partiel de l'environnement de mesure de la goutte.

Les mesures d'angle de contact sont faites avec le plugin DropSnake du logiciel ImageJ basé sur la détection active des contours avec algorithme B-Spline [Stalder et al., 2006]. Une première esquisse de la forme de la goutte est tracée par l'utilisateur (figure F.4, courbe bleue) puis l'algorithme fait une interpolation plus précise (figure F.4, courbe rouge) et calcule les angles de contact de chaque côté de la goutte. Il est important de noter que pour bien fonctionner, le logiciel a besoin d'un reflet de la goutte sur le substrat.

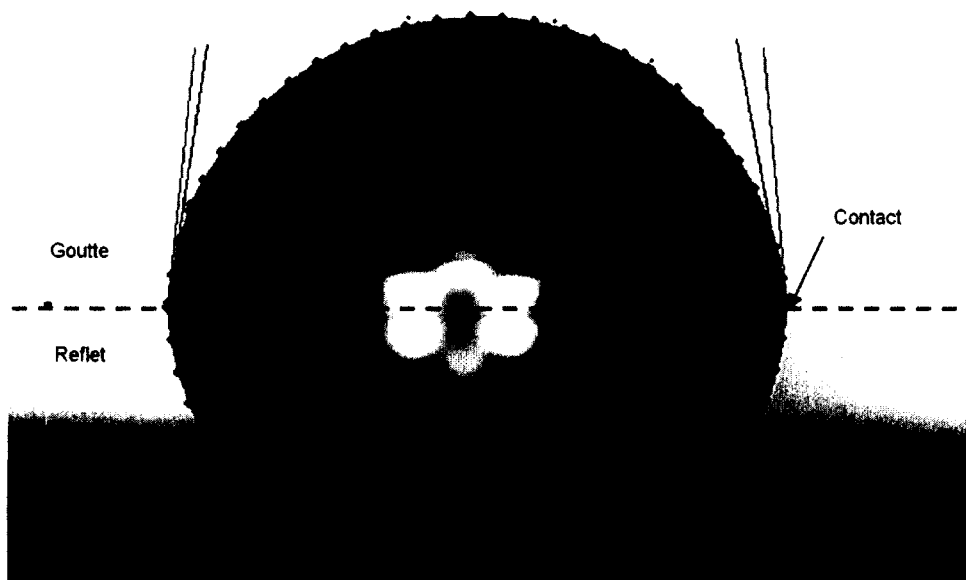


Figure F.4: Image d'une goutte d'eau sur de la KMPR non traitée après interpolation par le logiciel ImageJ.

ANNEXE G ÉLECTRONIQUE ET INFORMATIQUE DE CONTRÔLE

Afin de limiter les interférences dans ce premier prototype, l'électronique de contrôle a été séparée en deux modules : un module de détection et un module principal.

G.1 Module de détection

Le module de détection comporte une carte électronique qui permet d'amplifier et de mettre en forme le très faible signal provenant des détecteurs (figure G.1A). Par rapport à la carte du CS μ , le préamplificateur de charge a été changé pour un modèle ayant 16 entrées (LabPETTM CSP [Fontaine et al., 2009]), préparant ainsi l'électronique pour une puce ayant plusieurs sites de détection. Le filtre de mise en forme du signal a également été révisé pour mettre en place un filtre passif passe-haut suivi d'un filtre actif passe-bas de second ordre de type Bessel implanté dans la configuration Sallen-Key [Jung, 2004; Lancaster, 1996]). La sortie de la carte a été mise en différentiel pour limiter les interférences provenant de la carte numérique. Cette carte a principalement été réalisée par Vincent Boisselle (stagiaire en génie électrique) avec un co-encadrement par Frédérique Girard Baril (étudiante M.Sc.) et avec la collaboration de Réjean Fontaine et Jean-François Pratte (Professeurs en génie électrique).

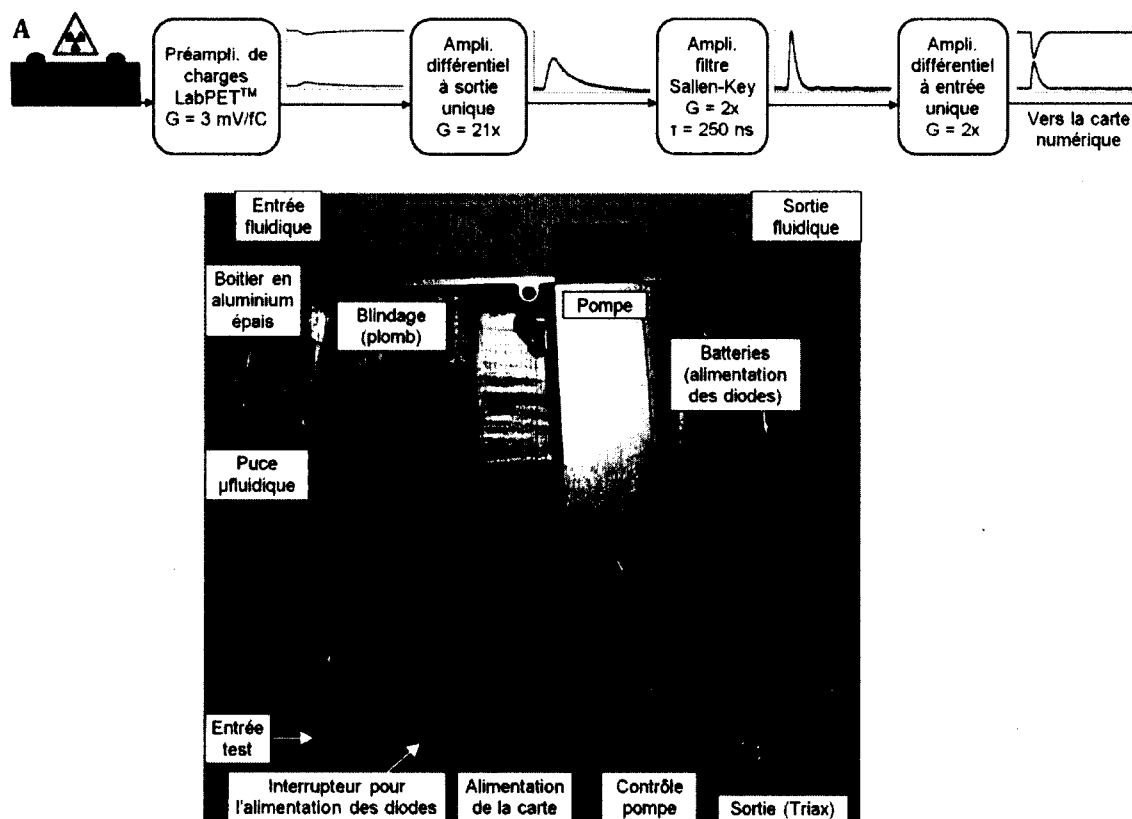


Figure G.1 : Module de détection. A. Schéma de principe de la carte électronique. B. Photo du module.

Le module de détection comporte également un blindage contre les radiations, des batteries pour l'alimentation faible bruit du détecteur et une pompe péristaltique miniature (P625/900.133, Instech Laboratories Inc., vitesses de 4 à 3300 $\mu\text{l}/\text{min}$) (figure G.1B).

G.2 Module principal

Le module principal comprend une carte électronique permettant de compter les pulses, provenant du module analogique, de contrôler la pompe et de communiquer avec un ordinateur via un port USB. Par rapport à l'électronique du CS μ , l'étage d'entrée a été modifié pour accommoder le signal différentiel, quatre voies d'entrées ont été implantées, le contrôle de la pompe a été modifié et le microcontrôleur changé pour une version incluant une communication USB (C8051F340, Silicon Labs) (figure G.2A). La mise en circuit imprimé de cette carte a été réalisée par Sylvain Lauzier (Technicien en génie électrique). Une photo de ce module est présentée à la figure G.2B.

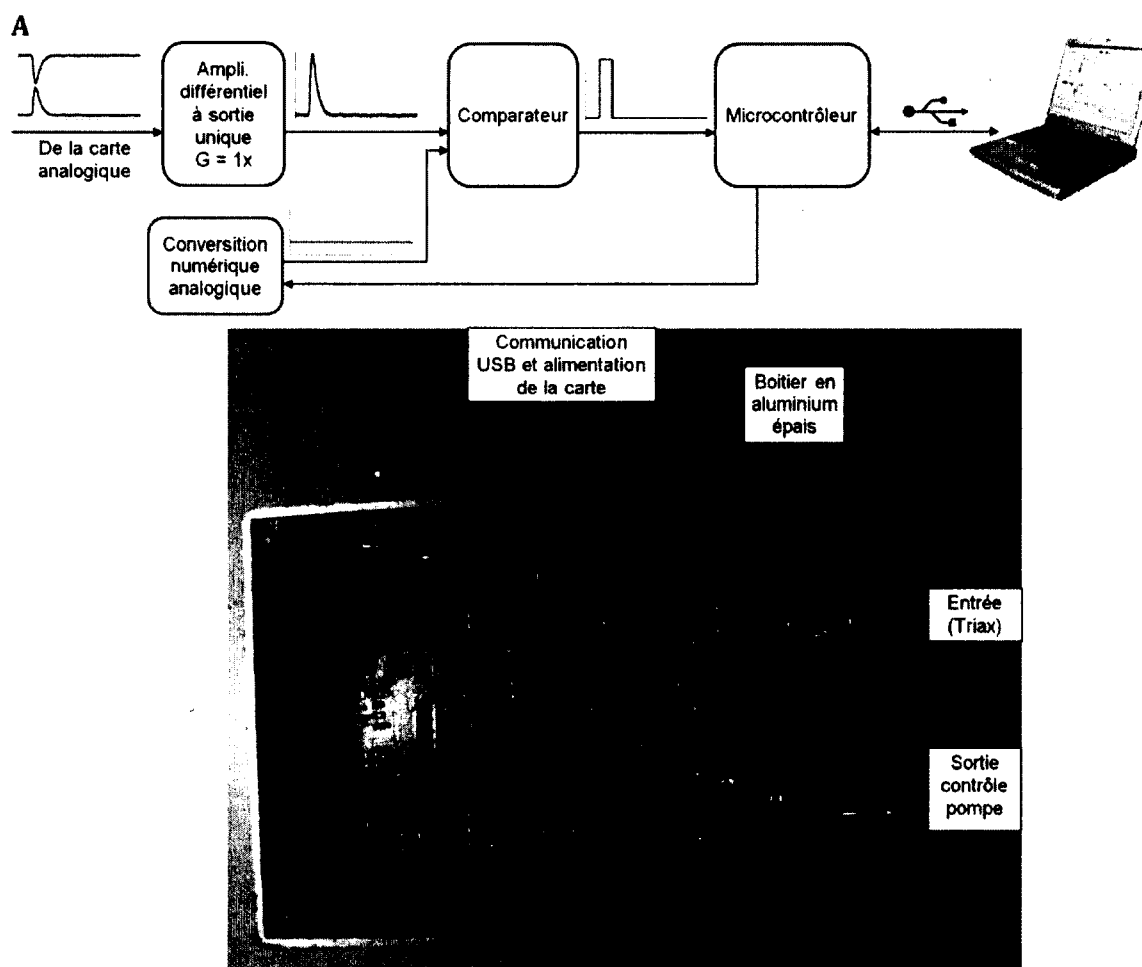


Figure G.2 : Module principal. A. Schéma de principe de la carte électronique. B. Photo du module.

G.3 Logiciel de contrôle

Le logiciel de contrôle du compteur microfluidique est composé de deux parties, un logiciel embarqué codé en langage C grâce à l'interface fournie par le fabricant (Silicon Laboratories IDE) et un logiciel de contrôle sur ordinateur codé en C++ et basé sur la librairie graphique QT 4. Par rapport au CSμ, le logiciel embarqué a dû être entièrement remodelé pour la nouvelle version de microcontrôleur (Vincent Boisselle, stagiaire en génie électrique, deuxième stage). Même si l'électronique est prête pour quatre voies, la programmation est pour l'instant faite pour une seule voie. Des nouvelles classes ont également été ajoutées dans le logiciel de contrôle pour accommoder la communication USB et la nouvelle pompe (Vincent Boisselle, stagiaire en génie électrique, deuxième stage). La communication USB est basée sur la librairie USBXpress (Silicon Laboratories).

Un utilitaire de communication USB en mode commande a également été réalisé pour le déverminage du système (terminal USB, Timothée Pradier, stage court de technique en génie électrique). Un aperçu de l'aspect du logiciel de contrôle et du terminal USB est donné à la figure G.3. Le protocole de communication avec la carte numérique est donné au tableau G.1.

Tableau G.1 : Protocole de communication avec le compteur.

Compteur reçoit	Compteur fait	Compteur répond
"A"	Démarre acquisition Une fois l'acquisition démarrée, envoie les cps toutes les secondes.	- "C"+ "Cps" + "\r"
"B"	Arrêt d'acquisition, arrête d'envoyer les cps.	-
"G"	Répond	"D"+ "DacLevel" + "\r"
"S"+ "Chiffre" + "\r"	Règle le niveau du DAC et répond quand fini.	"D"+ "DacLevel" + "\r"
"N"+ "Chiffre" + "\r"	Démarre réglage seuil. Affiche message sur LCD. Retourne taux de comptage après réglage quand fini.	"C"+ "Cps" + "\r"
"P"+ "Chiffre" + "\r"	Règle le DAC contrôlant la vitesse de la pompe avec la valeur indiquée (1 à 99).	
"F1\r"	Quand l'acquisition démarrera, le compteur enverra des données factices (0 à 255, +1).	"F1\r"
"F0\r"	Quand l'acquisition démarrera, le compteur enverra les données provenant du détecteur	"F0\r"
"X"	Répond	"Y"

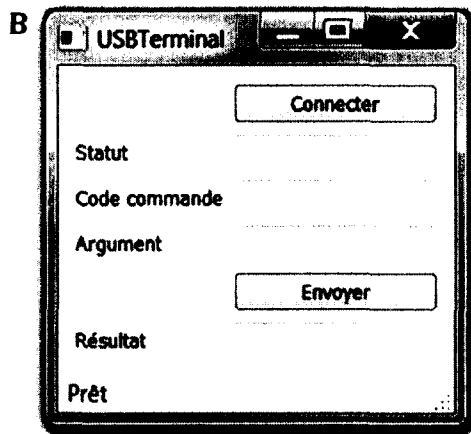
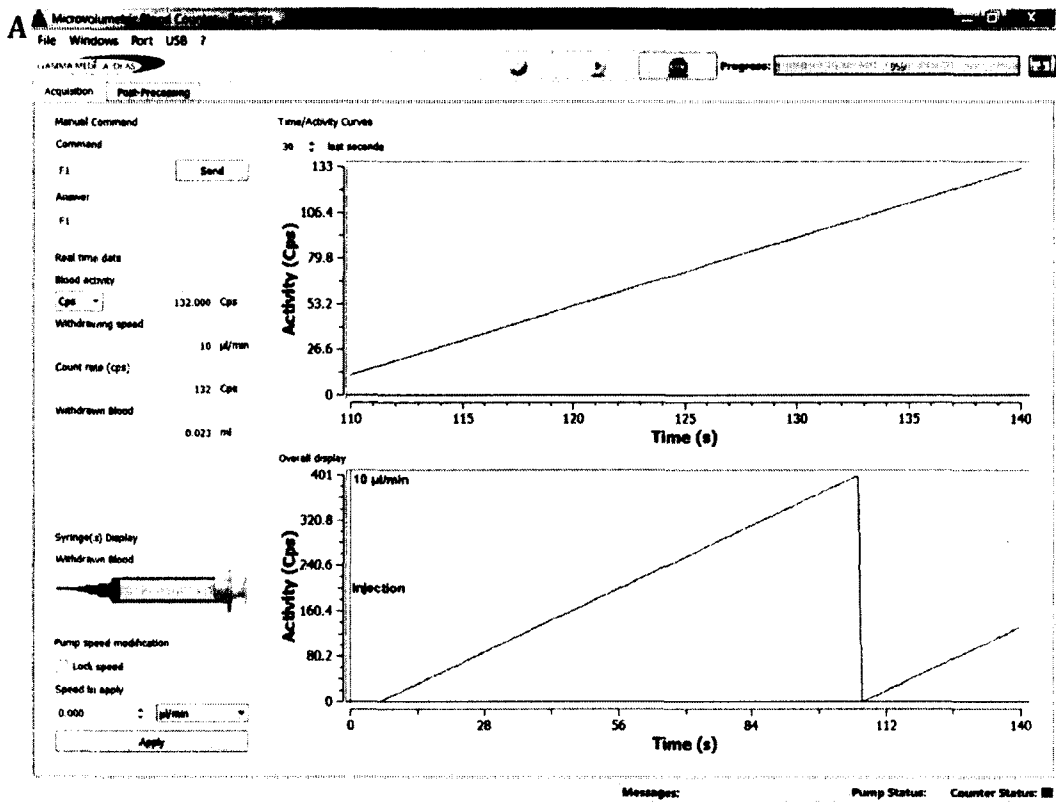


Figure G.3 : Aperçu du logiciel de contrôle (A) et de l'utilitaire Terminal USB (B).

ANNEXE H SÉPARATION DE PLASMA

H.1 Séparation de plasma par hydrodynamique

La séparation de plasma par hydrodynamique repose principalement sur l'effet Zweifach-Fung et l'effet Fahraeus. Le premier, aussi appelé loi de bifurcation, décrit la tendance d'une cellule à suivre la branche de plus fort débit lorsqu'elle arrive à une jonction (figure H.1A). Ce principe fonctionne à hémocrite élevé (45 %). Les canaux doivent cependant être de taille proche de celle des cellules et les débits restent très limités (quelques $\mu\text{l}/\text{min}$) avec un ratio de débit sang total/plasma d'environ 8 : 1. L'effet Fahraeus, ou écrémage de plasma, est plus adapté pour des débits plus importants. Dans des canaux sous flux de Poiseuille, les cellules sanguines hautement déformables sont regroupées au centre du canal où les forces de frottement sont minimales (figure H.1B). L'efficacité de séparation diminue par contre rapidement avec l'hémocrite ($\eta = 90\%$ pour 4,5 % d'hémocrite, $\eta = 30\%$ pour 45 % d'hémocrite). Cet effet a été combiné avec la force centrifuge dans des canaux courbés, mais l'efficacité dépend de la vitesse du sang dans le canal et elle reste limitée en conditions physiologiques.

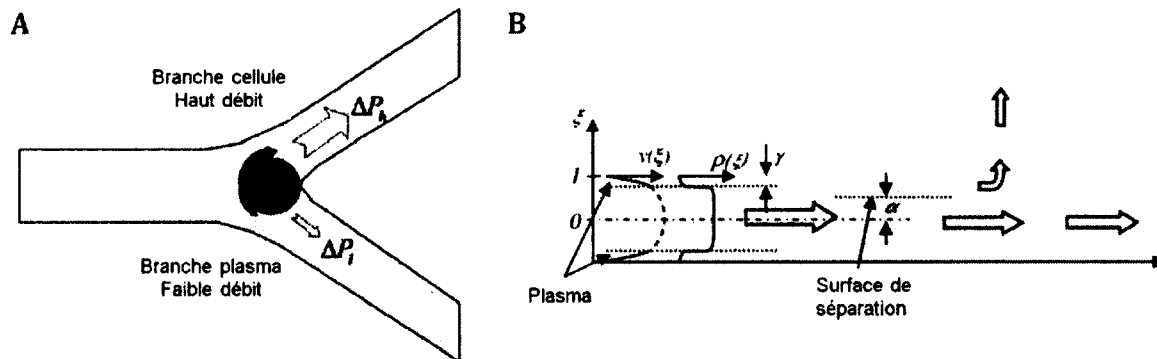


Figure H.1 : Séparation de plasma par hydrodynamique. A. Effet Zweifach-Fung (adapté de [Yang et al., 2006]). B. Effet Fahraeus (adapté de [Jaggi et al., 2007]).

H.2 Séparation de plasma par ondes acoustiques de surface

Pour améliorer l'efficacité de séparation, il est possible de faire appel à une source d'énergie active comme les forces acoustiques. Des ondes acoustiques stationnaires appliquées transversalement dans un canal génèrent des forces radiatives qui concentrent les cellules sanguines dans un nœud de pression au centre du canal (figure H.2A). Les cellules peuvent ensuite être retirées par des accès au centre du canal et le plasma peut être collecté par des embranchements en fin de parcours (figure H.2B). Ce principe a été utilisé par Lenshof et coll. pour obtenir des fractions de plasma pur ($< 6.10^6 \text{ g}/\text{ml}$) avec un débit de $80 \mu\text{l}/\text{min}$. [Lenshof et al., 2009]. Dans cet exemple, la puce microfluidique est fabriquée en silicium, fermée par un capot en verre et déposée sur un transducteur piézo-céramique (avec un couplage acoustique par hydrogel) (figure H.2C). Le même type de séparation peut également être obtenue par des peignes interdigités en or microfabriqués sur un substrat ou une couche piézoélectrique (figure H.2D).

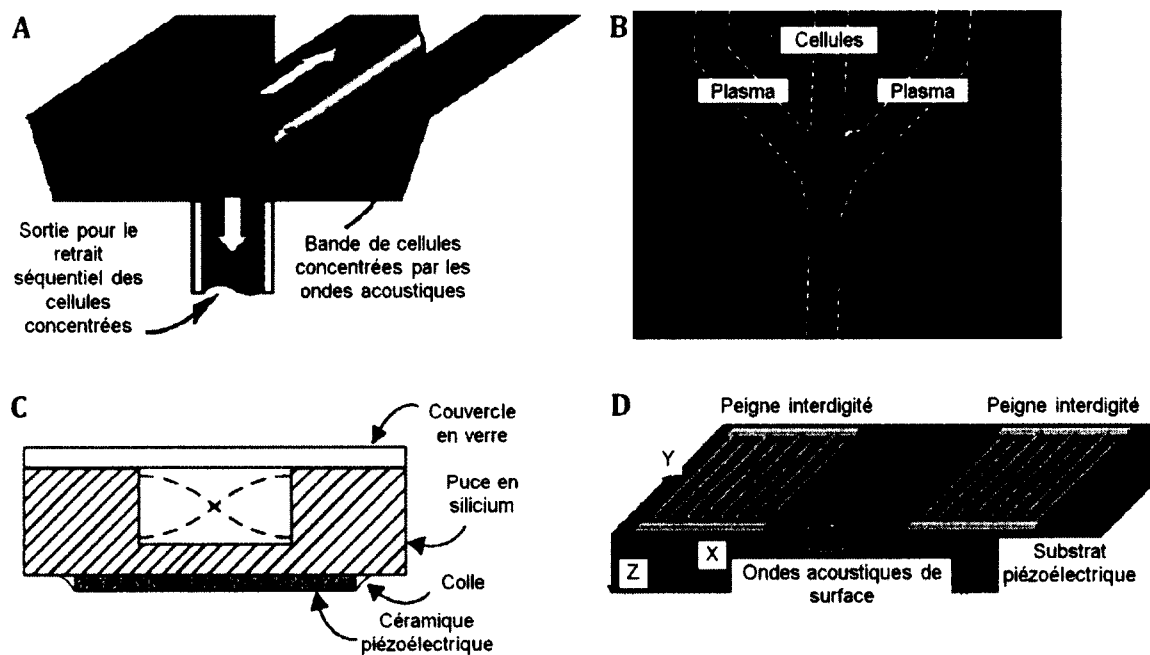


Figure H.2 : Séparation de plasma par ondes acoustiques stationnaires. A. Principe de séparation et de retrait séquentiel de cellules (adapté de [Lenshof et al., 2009]). B. Principe de collecte de plasma après plusieurs retrait successifs (adapté de [Lenshof et al., 2009]). C. Vue en coupe du dispositif utilisé par Lenshof et coll. (adapté de [Nilsson et al., 2004]). D. Illustration des ondes acoustiques de surface (adapté de [Ahmed et al., 2008]).

ANNEXE I PROTOCOLE DE FABRICATION DE CANAUX AVEC ACCÈS DANS LE SILICIUM

Ce protocole est basé sur les mêmes étapes de photolithographie que le procédé avec accès dans le capot en verre. Cependant, ce procédé a été développé pour des substrats sous forme de gaufre complète. Pour une meilleure uniformité des couches épaisses de KMPR, les recuits de résine sont donc faits en étuve. De plus, l'ouverture des accès se fait par gravure sèche dans le silicium pour avoir une gravure profonde rapide et de forme circulaire. Enfin, l'aligneuse double face n'étant pas encore disponible lorsque ce protocole a été développé, la gravure est faite en face avant après formation du plancher et des murs du canal. Afin de ne pas modifier les propriétés de la KMPR (rugosité), cette dernière n'est pas utilisée comme masque pour cette gravure. Le masque est formé d'une couche de résine positive épaisse (AZ). Pour faciliter son décapage après la gravure, une couche d'oxyde est évaporée sur la KMPR avant l'étalement de la résine AZ.

I.1 Préparation du substrat

Type	Équipement	Détail	Durée	Note
1.1 Nettoyage chimique	Bancs humides	Opticlear Acétone IPA Rinçage eau DI	5 min 5 min 5 min	Ultrasons
1.2 Dépôt SiO ₂	PECVD STS	Recette HFSiO	3 min	200 nm

I.2 Couche plancher

Type	Équipement	Détail	Durée	Note
2.1 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min	
2.2 Étalement de résine	Étaleuse Solitec	KMPR 1005 300 rpm 1000 rpm	3 s 30 s	
2.3 Recuit de résine	Étuve	100 °C	10 min	
2.4 Exposition	Aligneuse AOI 200	15 mW/cm ²	30 s	Filtre i-line
2.5 Recuit de résine	Étuve	100 °C	5 min	
2.6 Développement de résine	Bancs humides	Développeur SU8 Rinçage IPA, eau DI	1 min	
2.7 Recuit de résine	Étuve	100 °C 180 °C	5 min 30 min	

I.3 Couche murs

Type	Équipement	Détail	Durée	Note
3.1 Étalement de résine	Étaleuse Solitec	KMPR1025 300 rpm 3000 rpm	3 s 30 s	EBR acétone
3.2 Recuit de résine	Étuve	100 °C	20 min	
3.3 Exposition	Aligneuse AOI 200	15 mW/cm ²	40 s	Filtre i-line
3.4 Recuit de résine	Étuve	100 °C	5 min	
3.5 Développement de résine	Bancs humides	Développeur SU8 Rinçage IPA, eau DI	3 min	
3.6 Recuit de résine	Étuve	100 °C 180 °C	5 min 30 min	

I.4 Gravure des accès dans le silicium

Type	Équipement	Détail	Durée	Note
4.1 Dépôt de SiO ₂	Évaporateur Sloan	200 nm		À angle et avec rotation
4.2 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min	
4.3 Étalement de résine	Étaleuse Solitec	AZ9245 300 rpm 2000 rpm	3 s 30 s	
4.4 Recuit de résine	Étuve	100 °C	7 min	
4.5 Étalement de résine	Étaleuse Solitec	AZ9245 300 rpm 2000 rpm	3 s 30 s	
4.6 Recuit de résine	Étuve	100 °C	7 min	
4.7 Exposition	Aligneuse AOI 200	15 mW/cm ²	60 s	
4.8 Développement de résine	Bancs humides	AZ400K 3:1 Rinçage eau DI	4 min	
4.9 De-Scum	Plasmaline	O ₂ , 75 W	2 min	
4.10 Gravure humide	Bancs humides	BOE (6:1)	1 min	Oxyde sous la couche plancher
4.11 Gravure sèche	ASE-ST5	Recette DEEP 3	2 h	Silicium, 360 µm

4.12 Décapage de résine	Bancs humides	Acétone IPA Rinçage eau DI	1 min 1 min	
4.13 Décapage de résine	Plasmaline	O2, 200 W	5 min	
4.14 Gravure humide	Bancs humides	BOE (6:1)	1 min	Oxyde de protection de la KMPR

I.5 Préparation et collage du capot

Type	Équipement	Détail	Durée	Note
5.1 Clive	Pointe diamant	Lamelle 25 mm × 75 mm clivée en deux		
5.2 Nettoyage	Bancs humides	Savon (frottement) Rinçage eau DI H ₂ O ₂ : H ₂ SO ₄ (1 : 1) Rinçage eau DI		
5.3 Déshydratation	Étuve	125 °C	30 min	Capot et murs
5.4 Étalement de résine	Étaleuse Solitec	KMPR1005 300 rpm 6000 rpm	3 s 30 s	Sur le capot
5.5 Recuit de résine	Plaque chauffante	100 °C	10 s	Recuit des murs également
5.6 Assemblage		Capot sur les murs		
5.7 Recuit	Plaque chauffante	Pression avec une pince	1 min	Collage initial
5.8 Exposition	Aligneuse AOI 200	15 mW/cm ²	30 s	
5.9 Recuit sous pression	Presse dans l'étuve	≈1.10 ⁶ Pa	15 min	Collage final

I.6 Filtre i-line

Les lampes utilisées dans les salles blanches du CRN2 sont des lampes à mercure ayant un spectre large bande entre 330 et 430 nm (figure I.1). Les figures suivantes ont été préparées par Nicolas André suite à des mesures faites sur l'aligneuse AOI 200 avec les différents filtres disponibles en salles blanches. Le filtre utilisé dans ce projet pour exposer la KMPR est le filtre i-line passe-haut (figure I.2A). Il permet d'éliminer les longueurs d'onde trop courtes dommageables à ce type de résine sans toutefois sacrifier la puissance d'exposition. L'utilisation du filtre i-line passe-bande demanderait des temps d'expositions beaucoup plus longs (figure I.2B).

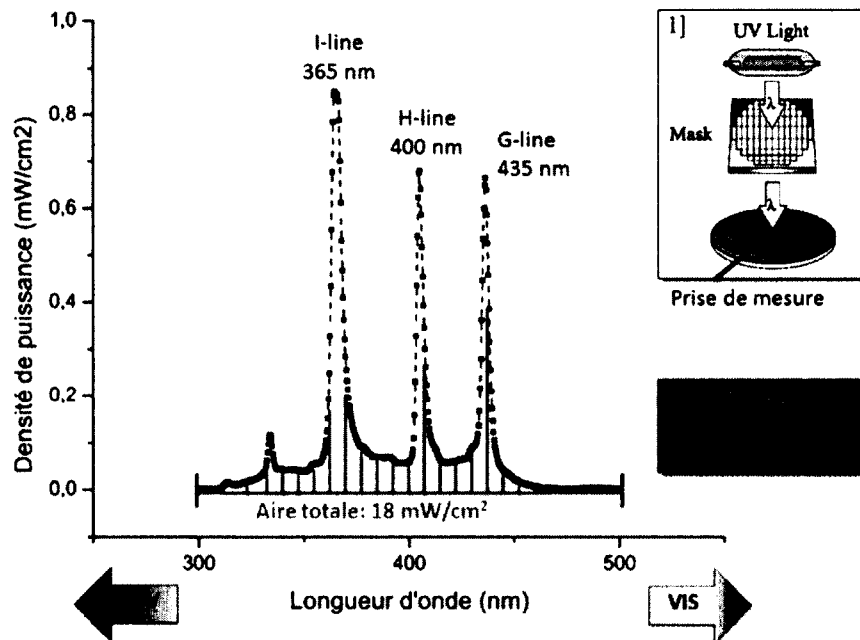


Figure I.1 : Spectre de l'aligneuse AOI 200 avec un masque standard en verre sodo-calcique (sans chrome) (Courtoisie de N. André, CRN2).

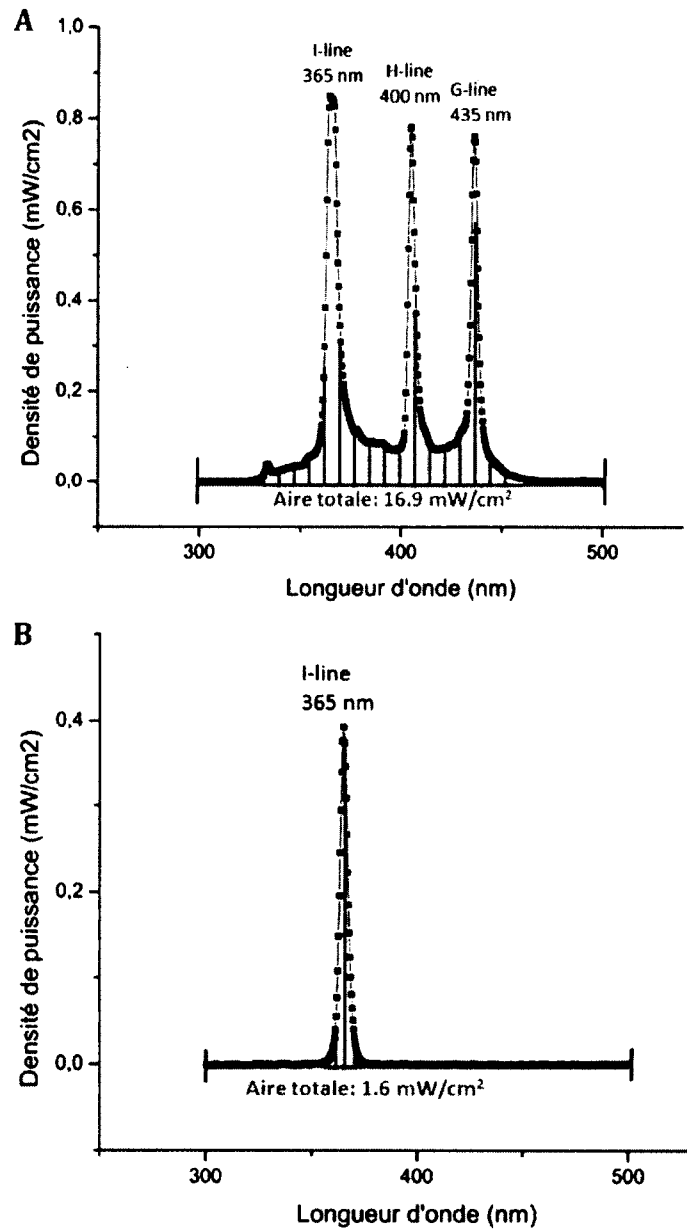


Figure I.2 : Spectre de l'aligneuse AOI 200 avec le filtre i-line passe-haut (A) et le filtre passe-bande (B) (Courtoisie de N. André, CRN2).

ANNEXE J AUTOFLUORESCENCE DE LA KMPR

Comme la plupart des polymères, la KMPR comporte une certaine auto fluorescence qui peut venir interférer avec le signal des particules fluorescentes utilisées en période de validation. Un microscope à fluorescence (Olympus IX70 avec une caméra QiCam QIC-F-M-12) a été utilisé pour caractériser l'autofluorescence de la KMPR pour différentes longueurs d'onde communes dans les fluorophores biologiques. Une couche de KMPR sur silicium a tout d'abord été observée avec six cubes comprenant des filtres d'émission/excitation pour les fluorophores suivants : Qdots (420/655 nm), DAPI (358/461 nm), GFP (470/508 nm), FITC (494/518 nm), CY3 (550/570 nm) et CY5 (649/670 nm). Les résultats présentés à la figure J.1A montrent que le cube CY5 fournit le plus bas bruit de fond.

À des fins de validation, des billes de polystyrène fluorescentes (PeakFlow Claret, 6 μm de diamètre, marquées au CY5, Invitrogen) ont été injectées dans un canal de $15 \times 25 \mu\text{m}^2$. Des images et lignes de profil prises à différents temps d'intégration démontrent un excellent rapport signal sur bruit (figure J.1B).

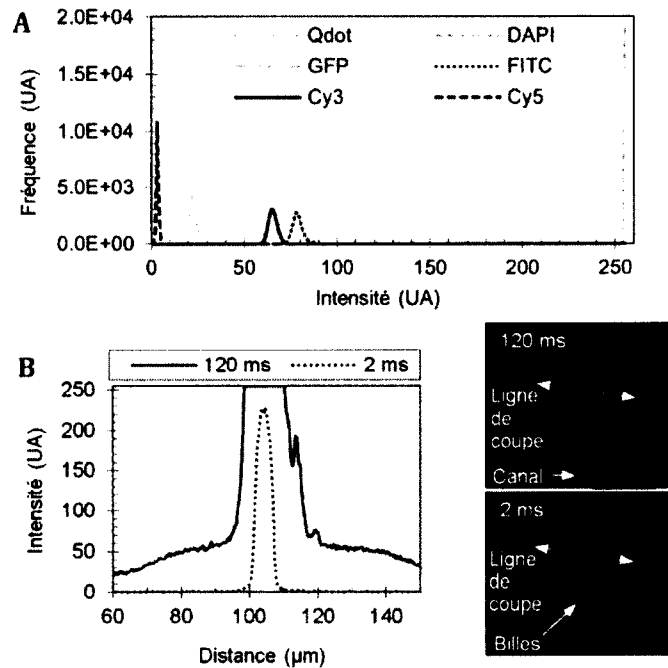


Figure J.1 : A. Histogrammes montrant la fluorescence de la KMPR pour différentes combinaisons de filtres d'excitation/émission. B. *Gauche* : profil d'intensité d'un microcanal de KMPR contenant des billes statiques marquées au CY5 pris suivant la ligne indiquée dans l'image de droite. *Droite* : image des microcanaux en question pour des temps d'intégration de 2 et 120 ms.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- A handbook of radioactivity measurements procedures.* (1984). (2^{ème} Ed.). Bethesda: National Council on Radiation Protection and Measurements.
- Abbas, A., Linman, M. J., & Cheng, Q. (2011). Sensitivity comparison of surface plasmon resonance and plasmon-waveguide resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 156, p. 169–175.
- Abgrall, P., & Gué, A.-M. (2007). Lab-on-chip technologies : making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem — a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 17, numéro 5, p. R15–R49.
- Abgrall, P., Lattes, C., Conédéra, V., Dollat, X., Colin, S., & Gué, A.-M. (2006). A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 16, numéro 1, p. 113–121.
- Ahmed, D., & Huang, T. J. (2008). Surface acoustic wave (SAW) induced patterning of micro beads in microfluidic channels. *IEEE 21st International Conference on Micro Electro Mechanical Systems Conference Record*, p. 26–29.
- Anderson, C. J., & Lewis, J. S. (2000). Radiopharmaceuticals for targeted radiotherapy of cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, volume 10, numéro 7, p. 1057–1069.
- Anderson, D. W. (1984). *Absorption of Ionizing Radiation*. Baltimore: University Park Pr, 428 p.
- Ashworth, S., Ranciar, A., Bloomfield, P. M., Jones, T., & Lammertsma, A. A. (1996). Development of an on-line blood detector system for PET studies in small animals. *Quantification of Brain Function using PET* (pp. 62–66). San Diego: Academic Press.
- Becker, H., & Gärtner, C. (2000). Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, volume 21, numéro 1, p. 12–26.
- Bentourkia, M., & Zaidi, H. (2007). Tracer Kinetic Modeling in PET. *PET Clinics*, volume 2, numéro 2, p. 267–277.
- Berkeley Laboratory Isotopes Project. (n.d.). Exploring the table of isotopes. <http://ie.lbl.gov/education/isotopes.htm>, page consultée le 15 février 2012.
- Blagoi, G., Keller, S., Johansson, A., Boisen, A., & Dufva, M. (2008). Functionalization of SU-8 photoresist surfaces with IgG proteins. *Applied Surface Science*, volume 255, numéro 5, p. 2896–2902.
- Blanco Carballo, V. M., Melai, J., Salm, C., & Schmitz, J. (2009). Moisture resistance of SU-8 and KMPR as structural material. *Microelectronic Engineering*, volume 86, numéro 4-6, p. 765–768.
- Bonekamp, D., Hammoud, D. A., & Pomper, M. G. (2010). Molecular imaging: techniques and current clinical applications. *Applied Radiology*, volume 39, numéro 5, p. 10–21.

- Breuer, J., Grazioso, R., Zhang, N., Schmand, M., & Wienhard, K. (2010). Evaluation of an MR-compatible blood sampler for PET. *Physics in Medicine and Biology*, volume 55, numéro 19, p. 5883–5893.
- Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmasandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. H., & Burke, D. T. (1998). An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, volume 282, numéro 5388, p. 484–487.
- Burns, M. A., Mastrangelo, C. H., Sammarco, T. S., Man, F. P., Webster, J. R., Johnsons, B. N., Foerster, B., Jones, D., Fields, Y., Kaiser, A. R., & Burke, D. T. (1996). Microfabricated structures for integrated DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, volume 93, numéro 11, p. 5556–5561.
- Carlier, J., Chuda, K., Arscott, S., Thomy, V., Verbeke, B., Coqueret, X., Camart, J.-C., Druon, C., & Tabourier, P. (2006). High pressure-resistant SU-8 microchannels for monolithic porous structure integration. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 16, numéro 10, p. 2211–2219.
- Carlier, J., Arscott, S., Thomy, V., Fourier, J., Caron, F., Camart, J.-C., Druon, C., & Tabourier, P. (2004). Integrated microfluidics based on multi-layered SU-8 for mass spectrometry analysis. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 14, numéro 4, p. 619–624.
- Chabot, V., Cuerrier, C. M., Escher, E., Aimez, V., Grandbois, M., & Charette, P. G. (2009). Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosensors & Bioelectronics*, volume 24, numéro 6, p. 1667–1673.
- Charrin, M. (1991). *Hématologie, aspects théoriques et pratiques*. Paris: Doin, 189 p.
- Chatziioannou, A. F. (2002). PET scanners dedicated to molecular imaging of small animal models. *Molecular Imaging and Biology*, volume 4, numéro 1, p. 47–63.
- Cherry, S. R., Sorenson, J. A., & Phelps, M. E. (2003). *Physics in Nuclear Medicine* (3^{ème} Ed.). Philadelphia: Saunders, 544 p.
- Cherry, S. R., & Gambhir, S. S. (2001). Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR journal*, volume 42, numéro 3, p. 219–232.
- Chien, F.-C., & Chen, S.-J. (2004). A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes. *Biosensors & Bioelectronics*, volume 20, numéro 3, p. 633–642.
- Cho, J. S., Taschereau, R., Olma, S., Liu, K., Chen, Y.-C., Shen, C. K.-F., Van Dam, R. M., & Chatziioannou, A. F. (2009). Cerenkov radiation imaging as a method for quantitative measurements of beta particles in a microfluidic chip. *Physics in Medicine and Biology*, volume 54, numéro 22, p. 6757–6771.
- Cho, J. S., Vu, N. T., Yu, Z. T. F., Silverman, R. W., & Taschereau, R. (2007). Optimization of design parameters of a prototype CCD-based lens-coupled imaging system for the detection of beta particles in a microfluidic chip. *IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, volume 6, p. 4615–4619.

- Cho, J. S., Vu, N. T., Chung, Y. H., Yu, Z. T. F., Silverman, R. W., Taschereau, R., Tseng, H.-R., & Chatziioannou, A. F. (2006). Detection of beta particles in a microfluidic chip using a scintillator and CCD. *IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, volume 4, p. 1977–1981.
- Christensen, T. B., Pedersen, C. M., Gröndahl, K. G., Jensen, T. G., Sekulovic, A., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). PCR biocompatibility of lab-on-a-chip and MEMS materials. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 17, numéro 8, p. 1527–1532.
- Clark, D. (1974). The intrinsic scintillation efficiency of plastic scintillators for ^{60}Co gamma excitation. *Nuclear Instruments and Methods*, volume 117, numéro 1, p. 295–303.
- Convert, L., Chabot, V., Zermatten, P.-J., Hamel, R., Cloarec, J.-P., Lecomte, R., Aimez, V., & Charette, P. G. (2012a). Passivation of KMPPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.061>.
- Convert, L., Chabot, V., Zermatten, P.-J., Hamel, R., Cloarec, J.-P., Lecomte, R., Aimez, V., & Charette, P. G. (2012b). Passivation of KMPPR microfluidic channels for increased hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides. *22nd Anniversary World Congress on Biosensors*. Cancun, 15–18 mai.
- Convert, L., Girard Baril, F., Boisselle, V., Fontaine, R., Pratte, J.-F., Charette, P. G., Aimez, V., & Lecomte, R. (2012c). Real time microfluidic blood counter for PET and SPECT preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of Nuclear Medicine*, à soumettre.
- Convert, L., Girard Baril, F., Boisselle, V., Pratte, J.-F., Fontaine, R., Lecomte, R., Charette, P. G., & Aimez, V. (2012d). Blood compatible microfluidic system for pharmacokinetic studies in small animals. *Lab on a Chip*, accepté.
- Convert, L., Girard Baril, F., Renaudin, A., Grondin, É., Jaouad, A., Aimez, V., Charette, P., & Lecomte, R. (2011). High efficiency microfluidic beta detector for pharmacokinetic studies in small animals. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, volume 652, numéro 1, p. 735–738.
- Convert, L., Girard Baril, F., Boisselle, V., Pratte, J.-F., Fontaine, R., Aimez, V., Charette, P. G., & Lecomte, R. (2010a). Microfluidic beta and conversion electron radiation detector for preclinical pharmacokinetic studies with PET and SPECT radiotracers. *IEEE Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference and 17th room temperature semiconductor detector workshop*. Knoxville, 30 octobre au 6 novembre.
- Convert, L., Girard Baril, F., Boisselle, V., Pratte, J.-F., Fontaine, R., Aimez, V., Charette, P., & Lecomte, R. (2010b). Microfluidic beta and conversion electron radiation detector for preclinical pharmacokinetic studies with PET and SPECT radiotracers. *IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, p. 2128–2131.
- Convert, L., Girard Baril, F., Renaudin, A., Grondin, É., Jaouad, A., Aimez, V., Charette, P. G., & Lecomte, R. (2010c). High efficiency microfluidic beta detector for pharmacokinetic studies in small animals. *Symposium On Radiation Measurements and Applications*. Ann Arbor, 24–28 mai.

- Convert, L., Aimez, V., Charette, P. G., & Lecomte, R. (2008a). Rapid prototyping of integrated microfluidic devices for combined radiation detection and plasma separation. *1st Microsystems and Nanoelectronics Research Conference*. Ottawa, 15 octobre.
- Convert, L., Aimez, V., Charette, P., & Lecomte, R. (2008b). Rapid prototyping of integrated microfluidic devices for combined radiation detection and plasma separation. *1st Microsystems and Nanoelectronics Research Conference Record*, p. 105–108.
- Convert, L., Morin-Brassard, G., Cadorette, J., Archambault, M., Bentourkia, M., & Lecomte, R. (2007a). A new tool for molecular imaging: the microvolumetric beta blood counter. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 48, numéro 7, p. 1197–1206.
- Convert, L., Morin-Brassard, G., Cadorette, J., Rouleau, D., Croteau, É., Archambault, M., Fontaine, R., & Lecomte, R. (2007b). A microvolumetric β blood counter for pharmacokinetic PET studies in small animals. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, volume 54, numéro 1, p. 173–180.
- Convert, L. (2006). *Compteur sanguin microvolumétrique pour l'imagerie moléculaire chez le petit animal*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, 155 p.
- Croft, B. Y. (2002). Animal models for imaging. *Disease Markers*, volume 18, numéro 5-6, p. 365–374.
- Croteau, É., Bénard, F., Bentourkia, M., Rousseau, J., Paquette, M., & Lecomte, R. (2004). Quantitative myocardial perfusion and coronary reserve in rats with ^{13}N -ammonia and small animal PET: impact of anesthesia and pharmacologic stress agents. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 45, numéro 11, p. 1924–1930.
- Depre, C. (1998). Isolated working heart: description of models relevant to radioisotopic and pharmacological assessments. *Nuclear Medicine and Biology*, volume 25, numéro 8, p. 711–713.
- Dhouib, K., Malek, C. K., Pflieger, W., Gauthier-Manuel, B., Duffait, R., Thuillier, G., Ferrigno, R., Jacquamet, L., Ohana, J., Ferrer, J.-L., Théobald-Dietrich, A., Giegé, R., Lorber, B., & Sauter, C. (2009). Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. *Lab on a Chip*, volume 9, numéro 10, p. 1412–1421.
- Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., & van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, volume 21, numéro 1, p. 15–23.
- Dupont, P., & Warwick, J. (2009). Kinetic modelling in small animal imaging with PET. *Methods*, volume 48, numéro 2, p. 98–103.
- Eggers, M. D., Hogan, M. E., Reich, R. K., Lamture, J. B., Beattie, K. L., Hollis, M. A., Ehrlich, D. J., Kosicki, B. B., Shumaker, J. M., Varma, R. S., Burke, B. E., Murphy, A., & Rathman, D. D. (1993). Genosensors: microfabricated devices for automated DNA sequence analysis. *Proceedings of the SPIE, Advances in DNA Sequencing Technology*, volume 1891, p. 113–126.

- Eriksson, L., Holte, S., Bohm, C., Kesselberg, M., & Hovander, B. (1988). Automated blood sampling systems for positron emission tomography. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, volume 35, numéro 1, p. 703–707.
- Fontaine, R., Belanger, F., Viscogliosi, N., Semmaoui, H., Tétrault, Ma.-A., Michaud, J.-B., Pepin, C., Cadorette, J., & Lecomte, R. (2009). The hardware and signal processing architecture of LabPET, a small animal APD-based digital PET scanner. *IEEE Transaction on Nuclear Science*, volume 56, numéro 1, p. 3–9.
- Franssila, S. (2010). *Introduction to microfabrication* (2eme Ed.). West Sussex: Wiley, 518 p.
- Fréchette, L., Jacobson, S. A., Breuer, K. S., Ehrich, F. F., Ghodssi, R., Khanna, R., Wong, C. W., Zhang, X., Schmidt, M. A., & Epstein, A. H. (2005). High-speed microfabricated silicon turbomachinery and fluid film bearings. *Journal of Microelectromechanical Systems*, volume 14, numéro 1, p. 141–152.
- Gai, H., Li, Y., & Yeung, E. S. (2011). Optical detection systems on microfluidic chips. *Topics in Current Chemistry*, volume 304, p. 171–201.
- Girard Baril, F. (2012). *Réalisation d'un détecteur de radioactivité pour un système microfluidique*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, 197 p.
- Greaves, E. D., & Manz, A. (2005). Toward on-chip X-ray analysis. *Lab on a Chip*, volume 5, numéro 4, p. 382–391.
- Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*. (2007). (13^{ème} Ed.). Strasbourg: Council of Europe Publishing.
- Haeberle, S., Brenner, T., Zengerle, R., & Ducleé, J. (2006). Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk. *Lab on a Chip*, volume 6, numéro 6, p. 776–781.
- Hand, D. B. (1935). The refractivity of protein solutions. *The Journal of Biological Chemistry*, volume 108, numéro 3, p. 703–707.
- Harris, J. M. (1992). *Poly(ethyleneglycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1^{ère} Ed.). New York: Springer, 408 p.
- Hass, G., & Hadley, L. (1972). Optical constants of metals. In M. H. B. Company, *American Institute of Physics Handbook, D.E. Gray* (pp. 6.124–6.156). New York.
- Hofmann, O., Miller, P., Sullivan, P., Jones, T. S., John, C., Bradley, D. D. C., & Andrew, J. (2005). Thin-film organic photodiodes as integrated detectors for microscale chemiluminescence assays. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 106, numéro 2, p. 878–884.
- Holland, S. E. (1989). Fabrication of detectors and transistors on high-resistivity silicon. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, volume 275, numéro 3, p. 537–541.
- Holmes, D., & Gawad, S. (2010). Microengineering in Biotechnology. *Methods in Molecular Biology* (pp. 55–80). Totowa: Humana Press.
- Homola, J. (2008). Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews*, volume 108, numéro 2, p. 462–493.

- Homola, J. (2006). *Surface plasmon resonance based sensors* (1^{ère} Ed.). New York: Springer, 251 p.
- Hou, H. W., Bhagat, A. A. S., Lee, W. C., Huang, S., Han, J., & Lim, C. T. (2011). Microfluidic devices for blood fractionation. *Micromachines*, volume 2, numéro 3, p. 319–343.
- Iranpoor, N., & Salehi, P. (1995). Ceric ammonium nitrate: a mild and efficient reagent for conversion of epoxides to beta-nitrate alcohols. *Tetrahedron*, volume 51, numéro 3, p. 909–912.
- Jaggi, R. D., Sandoz, R., & Effenhauser, C. S. (2007). Microfluidic depletion of red blood cells from whole blood in high-aspect-ratio microchannels. *Microfluidics and Nanofluidics*, volume 3, numéro 1, p. 47–53.
- Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E., & Rai, B. (2010). Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, volume 341, numéro 1, p. 136–142.
- Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, E., Rai, B., & Mielczarski, J. A. (2009). Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*, volume 25, numéro 19, p. 11614–11620.
- Johnson, D. W., Jeffries, A., Minsek, D. W., & Hurditch, R. J. (2001). Improving the process capability of SU-8, part II. *Journal of Photopolymer Science and Technology*, volume 14, numéro 5, p. 689–694.
- Jorgensen, A. M., Mogensen, K. B., Kutter, J. P., & Geschke, O. (2003). A biochemical microdevice with an integrated chemiluminescence detector. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 90, numéro 1-3, p. 15–21.
- Joshi, M., Kale, N., Lal, R., Ramgopal Rao, V., & Mukherji, S. (2007). A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomolecules in bio-MEMS. *Biosensors & Bioelectronics*, volume 22, numéro 11, p. 2429–2435.
- Jung, W. (2004). *Op amp applications handbook* (1^{ère} Ed.). New York: Newnes, 831 p.
- Kagadis, G. C., Loudos, G., Katsanos, K., Langer, S. G., & Nikiforidis, G. C. (2010). In vivo small animal imaging: current status and future prospects. *Medical Physics*, volume 37, numéro 12, p. 6421–6442.
- Kamath, K. R., & Park, K. (1994). Surface modification of polymeric biomaterials by albumin grafting using γ -irradiation. *Journal of Applied Biomaterials*, volume 5, numéro 2, p. 163–173.
- Kang, L., Chung, B. G., Langer, R., & Khademhosseini, A. (2008). Microfluidics for drug discovery and development: from target selection to product lifecycle management. *Drug Discovery Today*, volume 13, numéro 1-2, p. 1–13.
- Kemmer, J. (1984). Improvement of detector fabrication by the planar process. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, volume 226, numéro 1, p. 89–93.

- Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R., & Desmulliez, M. P. Y. (2008). Recent advances in microparticle continuous separation. *IET Nanobiotechnology*, volume 2, numéro 1, p. 1–13.
- Key, M. (2004). On the radiation tolerance of SU-8, a new material for gaseous microstructure radiation detector fabrication. *Radiation Physics and Chemistry*, volume 71, numéro 5, p. 1003–1007.
- Kim, J., Herrero, P., Sharp, T., Laforest, R., Rowland, D. J., Tai, Y.-C., Lewis, J. S., & Welch, M. J. (2006). Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 47, numéro 2, p. 330–336.
- Knoll, G. F. (2000). *Radiation Detection and Measurement* (3^{ème} Ed.). New York: John Wiley and Sons, 816 p.
- Kotzar, G., Freas, M., Abel, P., Fleischman, A., Roy, S., Zorman, C., Moran, J. M., & Melzak, J. (2002). Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials*, volume 23, numéro 13, p. 2737–2750.
- Kuswandi, B., Nuriman, Huskens, J., & Verboom, W. (2007). Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. *Analytica Chimica Acta*, volume 601, numéro 2, p. 141–155.
- Laforest, R., Sharp, T. L., Engelbach, J. A., Fettig, N. M., Kim, J., Lewis, J. S., Rowland, D. J., Tai, Y.-C., & Welch, M. J. (2005). Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions. *Nuclear Medicine and Biology*, volume 32, numéro 7, p. 679–685.
- Lamtore, J. B., Beattie, K. L., Burke, B. E., Eggers, M. D., Ehrlich, D. J., Fowler, R., Hollis, M. A., Kosicki, B. B., Reich, R. K., & Smith, S. R. (1994). Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Research*, volume 22, numéro 11, p. 2121–2125.
- Lancaster, D. (1996). *Active filter cookbook* (2^{ème} Ed.). New York: Newnes, 235 p.
- Lapointe, D., Cadorette, J., Rodrigue, S., Rouleau, D., & Lecomte, R. (1998). A microvolumetric blood counter/sampler for metabolic PET studies in small animals. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, volume 45, numéro 4, p. 2195–2199.
- Lavén, M., Wallenborg, S., Velikyan, I., Bergström, S., Djodjic, M., Ljung, J., Berglund, O., Edenwall, N., Markides, K. E., & Långström, B. (2004). Radionuclide imaging of miniaturized chemical analysis systems. *Analytical chemistry*, volume 76, numéro 23, p. 7102–7108.
- Lee, C. H., & Jiang, K. (2008). Fabrication of thick electroforming micro mould using a KMPR negative tone photoresist. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 18, numéro 5, p. 055032 (7pp).
- Lenshof, A., & Laurell, T. (2010). Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, volume 39, numéro 3, p. 1203–1217.

- Lenshof, A., Ahmad-Tajudin, A., Ja, K., Swa, A.-M., Åberg, L., Malm, J., Lilja, H., & Laurell, T. (2009). Acoustic wholeblood plasmapheresis chip for prostate specific antigen microarray diagnostics. *Analytical Chemistry*, volume 81, numéro 15, p. 6030–6037.
- Levin, C. S., & Hoffman, J. (1999). Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution. *Physics in Medicine and Biology*, volume 44, numéro 3, p. 781–799.
- Mapelli, A., Gorini, B., Haguenuer, M., Jiguet, S., Miotto, G. L., Vandelli, W., Triviño, N. V., & Renaud, P. (2010). Scintillation particle detection based on microfluidics. *Sensors and Actuators A: Physical*, volume 162, numéro 2, p. 272–275.
- Marie, R., Beech, J. P., Vörös, J., Tegenfeldt, J. O., & Höök, F. (2006). Use of PLL-g-PEG in micro-fluidic devices for localizing selective and specific protein binding. *Langmuir*, volume 22, numéro 24, p. 10103–10108.
- Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F., & Zengerle, R. (2010). Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, volume 39, numéro 3, p. 1153–1182.
- Martel, A., Burghammer, M., Davies, R., DiCola, E., Panine, P., Salmon, J.-B., & Riekel, C. (2008). A microfluidic cell for studying the formation of regenerated silk by synchrotron radiation small-and wide-angle X-ray scattering. *Biomicrofluidics*, volume 2, numéro 2, p. 024104.
- Mathieu, H. (1998). *Physique des semi-conducteurs et des composants électroniques* (4^{ème} Ed.). Masson, 709 p.
- Mazurczyk, R., Khoury, G. E., Dugas, V., Hannes, B., Laurenceau, E., Cabrera, M., Krawczyk, S., Souteyrand, E., Cloarec, J.-P., & Chevolot, Y. (2008). Low-cost, fast prototyping method of fabrication of the microreactor devices in soda-lime glass. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 128, numéro 2, p. 552–559.
- Meikle, S. R., Kench, P., Kassiou, M., & Banati, R. B. (2005). Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Physics in Medicine and Biology*, volume 50, numéro 22, p. R45–R61.
- Meyer, E. (1989). Simultaneous correction for tracer arrival delay and dispersion in CBF measurements by the H215O autoradiographic method and dynamic PET. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 30, numéro 6, p. 1069–1078.
- Morozov, V. N., Gavryushkin, A. V., & Deev, A. A. (2002). Direct detection of isotopically labeled metabolites bound to a protein microarray using a charge-coupled device. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, volume 51, numéro 1, p. 57–67.
- Munk, O. L., Keiding, S., & Bass, L. (2008). A method to estimate dispersion in sampling catheters and to calculate dispersion-free blood time-activity curves. *Medical Physics*, volume 35, numéro 8, p. 3471–3481.

- Namasivayam, V., Lin, R., Johnson, B., Brahmasandra, S., Razzacki, Z., Burke, D. T., & Burns, M. A. (2004). Advances in on-chip photodetection for applications in miniaturized genetic analysis systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 14, numéro 1, p. 81–90.
- National Institut of Standards and Technology. (n.d.-a). ESTAR stopping-power and range tables for electrons. <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR.html>, page consultée le 10 avril 2012.
- National Institut of Standards and Technology. (n.d.-b). XCOM Photon cross-section data. <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>, page consultée le 10 avril 2012.
- Ng, J. D., Clark, P. J., Stevens, R. C., & Kuhn, P. (2008). In situ X-ray analysis of protein crystals in low-birefringent and X-ray transmissive plastic microchannels. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, volume 64, numéro 2, p. 189–197.
- Nilsson, A., Petersson, F., & Laurell, T. (2004). Acoustic control of suspended particles in micro fluidic chips. *Lab on a Chip*, volume 4, numéro 2, p. 131–135.
- Nordström, M., Marie, R., Calleja, M., & Boisen, A. (2004). Rendering SU-8 hydrophilic to facilitate use in micro channel fabrication. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 14, numéro 12, p. 1614–1617.
- Oh, K. W., & Ahn, C. H. (2006). A review of microvalves. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, volume 16, numéro 5, p. R13–R39.
- Otto, A., & Sohler, W. (1971). Modification of the total reflection modes in a dielectric film by one metal boundary. *Optics Communications*, volume 3, numéro 4, p. 254–258.
- Ou, K.-S., Yan, H.-Y., & Chen, K.-S. (2008). Mechanical characterization of KMPR by nano-indentation for MEMS applications. *Strain*, volume 44, numéro 3, p. 267–271.
- Palik, E. D. (1991). *Handbook of the Optical Properties of Solids II*. London: Academic Press, 1096 p.
- Pan, T., & Wang, W. (2011). From cleanroom to desktop: emerging micro-nanofabrication technology for biomedical applications. *Annals of Biomedical Engineering*, volume 39, numéro 2, p. 600–620.
- Park, S. J., Bae, H., Kim, J., Lim, B., Park, J., & Park, S. (2010). Motility enhancement of bacteria actuated microstructures using selective bacteria adhesion. *Lab on a Chip*, volume 10, numéro 13, p. 1706–1711.
- Patlak, C. S., Blasberg, R. G., & Fenstermacher, J. D. (1983). Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, volume 3, numéro 1, p. 1–7.
- Peng, Z.-C., Ling, Z.-G., Tondra, M., Liu, C.-G., Zhang, M., Lian, K., Goettert, J., & Hormes, J. (2006). CMOS compatible integration of three-dimensional microfluidic systems based on low-temperature transfer of SU-8 films. *Journal of Microelectromechanical Systems*, volume 15, numéro 3, p. 708–716.

- Perozziello, E. (n.d.). Silicon Thermal Oxide Thickness Calculator. <http://lelandstanfordjunior.com/thermaloxide.html>, page consultée le 10 avril 2012.
- Phelps, M. E., Huang, S. C., Hoffman, E. J., Selin, C., Sokoloff, L., & Kuhl, D. E. (1979). Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Annals of Neurology*, volume 6, numéro 5, p. 371–388.
- Pirofsky, B. (1953). The determination of blood viscosity in man by a method based on Poiseuille's law. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 32, numéro 4, p. 292–298.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* (2^{ème} Ed.). San Diego: Elsevier Academic Press, 851 p.
- Reich, C., Hochrein, M., Krause, B., & Nickel, B. (2005). A microfluidic setup for studies of solid-liquid interfaces using x-ray reflectivity and fluorescence microscopy. *Review of Scientific Instruments*, volume 76, numéro 9, p. 0905103.
- Reimhult, K., Petersson, K., & Krozer, A. (2008). QCM-D analysis of the performance of blocking agents on gold and polystyrene surfaces. *Langmuir*, volume 24, numéro 16, p. 8695–8700.
- Roach, P., Atherton, S., Doy, N., McHale, G., & Newton, M. I. (2007). SU-8 guiding layer for Love wave devices. *Sensors*, volume 7, numéro 11, p. 2539–2547.
- Rowland, D. J., & Cherry, S. R. (2008). Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology. *Seminars in Nuclear Medicine*, volume 38, numéro 3, p. 209–22.
- Saavedra, S. S., & Reichert, W. M. (1991). In situ quantitation of protein adsorption density by integrated optical waveguide attenuated total reflection spectrometry. *Langmuir*, volume 7, numéro 5, p. 995–999.
- Salamon, Z., Macleod, H. A., & Tollin, G. (1997). Coupled plasmon-waveguide resonators: a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties. *Biophysical Journal*, volume 73, numéro 5, p. 2791–2797.
- Salm, C., Blanco Carballo, V. M., Melai, J., & Schmitz, J. (2008). Reliability aspects of a radiation detector fabricated by post-processing a standard CMOS chip. *Microelectronics Reliability*, volume 48, numéro 8-9, p. 1139–1143.
- Schooneveld, E. M., Eijk, C. W. E. V., Hollander, R. W., & Audet, S. A. (1989). A silicon strip detector for β -radiochromatography. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, volume 275, numéro 3, p. 597–602.
- Senturia, S. D. (2000). Fluids. *Microsystem Design* (1^{ère} Ed., pp. 318–350). New York: Springer, 720 p.
- Serdons, K., Verbruggen, A., & Bormans, G. M. (2009). Developing new molecular imaging probes for PET. *Methods*, volume 48, numéro 2, p. 104–111.

- Seyfert, U. T., Biehl, V., & Schenk, J. (2002). In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*, volume 19, numéro 2-6, p. 91–96.
- Shew, B. Y., Cheng, Y. C., & Tsai, Y. H. (2008). Monolithic SU-8 micro-interferometer for biochemical detections. *Sensors and Actuators A: Physical*, volume 141, numéro 2, p. 299–306.
- Shin, Y.-M., Gamzina, D., Barnett, L. R., Yaghmaie, F., Baig, A., & Luhmann, N. C. (2010). UV lithography and molding fabrication of ultrathick micrometallic structures using a KMPR photoresist. *Journal of Microelectromechanical Systems*, volume 19, numéro 3, p. 683–689.
- Singh, M., & Waluch, V. (2000). Physics and instrumentation for imaging in-vivo drug distribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*, volume 41, numéro 1, p. 7–20.
- Skalak, R., & Ozkaya, N. (1989). Biofluid mechanics. *Annual Review of Fluid Mechanics*, volume 21, p. 167–204.
- Skivesen, N., Horvath, R., Thinggaard, S., Larsen, N. B., & Pedersen, H. C. (2007). Deep-probe metal-clad waveguide biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, volume 22, numéro 7, p. 1282–1288.
- Skivesen, N., Horvath, R., & Pedersen, H. (2005). Optimization of metal-clad waveguide sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 106, numéro 2, p. 668–676.
- Slavík, R., & Homola, J. (2007). Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 123, numéro 1, p. 10–12.
- Sollier, E., Rostaing, H., Pouteau, P., Fouillet, Y., & Achard, J.-L. (2009). Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*, volume 141, numéro 2, p. 617–624.
- Stalder, A. F., Kulik, G., Sage, D., Barbieri, L., & Hoffmann, P. (2006). A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, volume 286, numéro 1-3, p. 92–103.
- Stangegaard, M., Wang, Z., Kutter, J. P., Dufva, M., & Wolff, A. (2006). Whole genome expression profiling using DNA microarray for determining biocompatibility of polymeric surfaces. *Molecular BioSystems*, volume 2, numéro 9, p. 421–428.
- Stone, H. A., Stroock, A. D., & Ajdari, A. (2004). Engineering flows in small devices, microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annual Review of Fluid Mechanics*, volume 36, p. 381–411.
- Streetman, B. G., & Banerjee, S. (2005). *Solid state electronic devices* (6^{ème} Ed.). New Delhi: Prentice Hall, 581 p.
- Sweryda-Krawiec, B., Devaraj, H., Jacob, G., & Hickman, J. J. (2004). A new interpretation of serum albumin surface passivation. *Langmuir*, volume 20, numéro 6, p. 2054–2056.

- Tabeling, P. (2006). *Introduction to Microfluidics* (2^{ème} Ed.). New York: Oxford University Press, 310 p.
- Tao, S. L., Popat, K. C., Norman, J. J., & Desai, T. A. (2008). Surface modification of SU-8 for enhanced biofunctionality and nonfouling properties. *Langmuir*, volume 24, numéro 6, p. 2631–2636.
- Toner, M., & Irimia, D. (2005). Blood-on-a-chip. *Annual Review of Biomedical Engineering*, volume 7, p. 77–103.
- Tsai, W.-B., Grunkemeier, J. M., McFarland, C. D., & Horbett, T. A. (2002). Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *Journal of Biomedical Materials Research*, volume 60, numéro 3, p. 348–359.
- Tumolo, T., Angnes, L., & Baptista, M. S. (2004). Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, volume 333, numéro 2, p. 273–279.
- Vig, A. L., Haldrup, K., Enevoldsen, N., Thilsted, A. H., Eriksen, J., Kristensen, A., Feidenhans'l, R., & Nielsen, M. M. (2009). Windowless microfluidic platform based on capillary burst valves for high intensity x-ray measurements. *Review of Scientific Instruments*, volume 80, numéro 11, p. 115114 (6 p.).
- Vogt, R. F. J., Phillips, D. L., Henderson, L. O., Whitfield, W., & Spierto, F. W. (1987). Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Journal of Immunological Methods*, volume 101, numéro 1, p. 43–50.
- Voskerician, G., Shive, M. S., Shawgo, R. S., Recum, H. V., Anderson, J. M., Cima, M. J., & Langer, R. (2003). Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials*, volume 24, numéro 11, p. 1959–1967.
- Vu, N. T., Yu, Z. T. F., Comin-Anduix, B., Sondergaard, J. N., Silverman, R. W., Chang, C. Y. N., Ribas, A., Tseng, H. R., & Chatziioannou, A. F. (2011). A beta-camera integrated with a microfluidic chip for radioassays based on real-time imaging of glycolysis in small cell populations. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 52, numéro 5, p. 815–821.
- Vu, N. T., Chung, Y. H., Yu, Z. T. F., Silverman, R. W., Taschereau, R., Farrell, R., Shah, K. S., Tseng, H.-R., & Chatziioannou, A. F. (2006). Direct detection of beta particles on a microfluidic chip using position sensitive APDs. *IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, volume 6, p. 3536–3539.
- Walther, F., Drobek, T., Gigler, A. M., Hennemeyer, M., Kaiser, M., Herberg, H., Shimitsu, T., Morfill, G. E., & Stark, R. W. (2010). Surface hydrophilization of SU-8 by plasma and wet chemical processes. *Surface and Interface Analysis*, volume 42, numéro 12-13, p. 1735–1744.
- Wang, Y., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., & Allbritton, N. L. (2006). Simple photografting method to chemically modify and micropattern the surface of SU-8 photoresist. *Langmuir*, volume 22, numéro 6, p. 2719–2725.

- Wang, Y. (1969). *Handbook of radioactive nuclides* (1st Ed.). Cleveland: Chemical Rubber Co., 960 p.
- Webster, J. R., Burns, M. A., Burke, D. T., & Mastrangelo, C. H. (2001). Monolithic capillary electrophoresis device with integrated fluorescence detector. *Analytical Chemistry*, volume 73, numéro 7, p. 1622–1626.
- Weisenberg, B. A., & Mooradian, D. L. (2002). Hemocompatibility of materials used in microelectromechanical systems: platelet adhesion and morphology in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, volume 60, numéro 2, p. 283–291.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, volume 442, numéro 7101, p. 368–373.
- Wu, H.-M., Sui, G., Lee, C. C., Prins, M. L., Ladno, W., Lin, H.-D., Yu, A. S., Phelps, M. E., & Huang, S.-C. (2007). In vivo quantitation of glucose metabolism in mice using small-animal PET and a microfluidic device. *Journal of Nuclear Medicine*, volume 48, numéro 5, p. 837–845.
- Wu, H.-M., Sui, G., Lee, C.-C., Ladno, W., Quake, S. R., Tseng, H.-R., & Huang, S.-C. (2005). An integrated microfluidic blood sampler for determination of blood input function in quantitative mouse microPET studies. *IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, volume 3, p. 1658–1661.
- Yamamoto, S., Imaizumi, M., Shimosegawa, E., Kanai, Y., Sakamoto, Y., Minato, K., Shimizu, K., Senda, M., & Hatazawa, J. (2010). A compact and high sensitivity positron detector using dual-layer thin GSO scintillators for a small animal PET blood sampling system. *Physics in Medicine and Biology*, volume 55, numéro 13, p. 3813–3826.
- Yamamoto, S., Tarutani, K., Suga, M., Minato, K., Watabe, H., & Iida, H. (2001). Development of a phoswich detector for a continuous blood-sampling system. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, volume 48, numéro 4, p. 1408–1411.
- Yang, S., Ündar, A., & Zahn, J. D. (2006). A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab on a Chip*, volume 6, numéro 7, p. 871–880.
- Yeo, L. Y., Chang, H.-C., Chan, P. P. Y., & Friend, J. R. (2011). Microfluidic devices for bioapplications. *Small*, volume 7, numéro 1, p. 12–48.
- Yu, Z. T. F., Vu, N. T., Shu, C. J., Kamei, K.-I., Silverman, R. W., Witte, O. N., Radu, C. G., Chatziioannou, A. F., & Tseng, H.-R. (2008). Design and characterization of a biomedical device capable of pico-Ci level beta detection for the study of cell metabolism. *IEEE 21st International Conference on Micro Electro Mechanical Systems Conference Record*, p. 280–283.
- Zacheo, A., Arima, V., Pascali, G., Salvadori, P. A., Zizzari, A., Perrone, E., Marco, L., Gigli, G., & Rinaldi, R. (2011). Radioactivity resistance evaluation of polymeric materials for application in radiopharmaceutical production at microscale. *Microfluidics and Nanofluidics*, volume 11, numéro 1, p. 35–44.

- Zheng, B., Tice, J. D., Roach, L. S., & Ismagilov, R. F. (2004). A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, volume 43, numéro 19, p. 2508–2511.
- Zhou, C. Z., & Warburton, W. K. (1996). Comparison of silicon pin diode detector fabrication processes using ion implantation and thermal doping. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, volume 378, numéro 3, p. 529–530.