



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Sébastien Cargou

le 03 Mars 2014

Titre :

Développement d'outils microfluidiques appliqués à la biologie.
Réalisation de dispositifs de tri cellulaire magnétique vertical.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

LAAS-CNRS

Directeur(s) de Thèse :

Mme. Anne-Marie Gué

Jury :

M. Gilbert Reyne, Rapporteur
M. Jean-Louis Viovy, Rapporteur

M. Ali Boukabache
M. Thierry Parra
Mme. Karine Reybier
Mme. Rose-Marie Sauvage

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
GLOSSAIRE	2
INTRODUCTION GENERALE.....	4
CHAPITRE 1 : LE TRAITEMENT D'ECHANTILLON BIOLOGIQUE APPLIQUE AU DIAGNOSTIC : ETAT DE L'ART	6
Introduction	7
1.1 Le sang un outil pour le diagnostic	10
1.1.1 Le sang, un mélange complexe.....	10
1.1.2. Les monocytes comme marqueur de l'inflammation.....	11
1.2 Les appareils pour le diagnostic entre macro et micro	11
1.2.1 Les « gold standard » de l'analyse sanguine : la cytométrie de flux et l'étude de lame	11
1.2.2 L'analyse sanguine par microdispositifs commercialisés : une grande gamme de produits pour des analyses restreintes.....	14
1.2.3 Les microsystèmes d'analyse en recherche : une grande diversité.....	16
1.3 Le magnétisme appliqué à la microfluidique.....	18
1.3.1 Quand la microfluidique utilise le magnétisme	18
1.3.2 La manipulation magnétique : une question d'intégration	20
1.4 Positionnement du travail de thèse.....	21
1.4.1 Quelques dispositifs qui valent le détour	21
1.4.2 Les travaux de la thèse	25
CHAPITRE 2 : CONCEPTION, SIMULATION ET OPTIMISATION DE L'ACTIONNEUR MAGNETIQUE	28
Introduction	29
2.1 La force magnétique : l'association d'un objet paramagnétique et d'un champ magnétique	30
2.1.1 Propriétés magnétiques des matériaux et billes magnétiques	30
2.1.2 Création d'un champ magnétique : aimant permanent et électroaimant	35
2.1.3 Force magnétique ou interaction entre champ et particule	38
2.2 Conception des bobines d'actionnement.....	40
2.2.1 Travaux antérieurs.....	40
2.2.2 Approfondissement de l'étude des structures	42
2.3 Optimisation des structures	45
2.3.1 Diminution du plot central.....	45

2.3.2 Augmentation du nombre de spires	48
2.3.3 Ajout d'un matériau ferromagnétique	49
2.4 Bobines en vis-à-vis et perspectives	51
Conclusion.....	57

CHAPITRE 3 : MANIPULATION D'ÉCOULEMENTS FLUIDIQUES DANS DES GEOMETRIES 3D ORIGINALES EN SU8 58

Introduction	59
3.1 Procédé de fabrication	60
3.1.1 La photolithographie	60
3.1.2 La SU8 : un matériau incontournable	62
3.1.3 Technologie de structuration de la SU8.....	64
3.1.4 Le procédé de laminage : réaliser un puce tout en SU8	66
3.1.5 Amélioration du procédé de fabrication	67
3.2 Le laminage une technique irremplaçable	68
3.2.1 Quelques difficultés liées à l'utilisation du laminage	68
3.2.2 Optimisation du procédé de laminage	70
3.2.3 Autres moyens de faire du 3D :	70
3.3 L'écoulement en microfluidique.....	73
3.3.1 L'écoulement mis en équation	73
3.3.2 Analogie avec les circuits électriques	76
3.3.3 Les phénomènes de diffusion : A ne pas toujours négliger	76
3.4 Co-écoulements dans les structures 3D	77
3.4.1 Principe de fonctionnement	77
3.4.2 Modélisation des écoulements dans les structures 3D	78
3.4.3 Validation expérimentale	81
3.4.4 Vers le concept de mulTsensor.....	86
3.4.4 Application à l'étude de l'agrégation d'amyloïde beta.....	90
Conclusion.....	96

CHAPITRE 4 : CONCEPTION ET REALISATION DE DISPOSITIF DE SEPARATION MAGNETIQUE 97

Introduction	98
4.1 Conception du module de tri magnétique vertical	99
4.1.1 Design des micro bobines.....	99
4.1.2 Design des micro canalisations	100
4.2 Fabrication	102
4.2.2 Comportement de la SU8 non réticulée	103
4.2.3 Etapes de fabrication	108

4.2.4 Minimisation des contraintes mécaniques.....	118
4.3 Connectiques fluidiques et électriques	119
4.3.2 La connectique fluidique.....	119
4.3.3 La connexion électrique.....	122
Conclusion.....	123
CHAPITRE 5 : MANIPULATION DES MICROBILLES MAGNETIQUES	124
Introduction	125
5.1 Présentation du banc de caractérisation	126
5.1.1 Contrôle des fluides	126
5.1.2 Contrôle électrique :	127
5.1.3 Système d'observation	128
5.2 Séparation verticale de microbilles magnétiques.....	129
5.2.1 Bilan des forces : un équilibre vite renversé.....	129
5.2.2 Mise en œuvre expérimentale.....	133
5.2.3 Caractérisation de la fonction de piégeage avec des billes magnétiques	135
5.2.4 Caractérisation de la fonction de séparation avec des billes magnétiques.....	138
5.3 Etude de l'échauffement.....	149
5.3.1 Partie expérimentale	149
5.3.2 Partie théorique.....	154
Conclusion.....	156
CHAPITRE 6 : MANIPULATION D'ELEMENTS BIOLOGIQUES = SEPARATION MAGNETIQUE DE MONOCYTES	157
Introduction	158
6.1 Culture des monocytes	159
6.1.1 Les monocytes de culture THP1.....	159
6.1.2 Le milieu de culture	159
6.1.3 Culture des monocytes	161
6.2 Billes magnétiques et fonctionnalisation	163
6.3 Marquage des monocytes	165
6.3.1 Marquage magnétique des monocytes	165
6.3.2 Marquage fluorescent des monocytes	167
6.4 Séparation/déviation bille + monocytes	169
6.4.1 Bilan des forces avec monocytes	169
6.4.2 Piégeage des billes et monocytes	172
6.4.3 Séparation en dispositif 3D.....	173

Conclusion.....	175
CONCLUSION GENERAL ET PERSPECTIVES.....	176
Une séparation magnétique verticale performante et prometteuse	176
Le design de deuxième génération n'a pas livré tous ses secrets	177
Des designs imaginés et réalisés mais non encore exploités	178
Une séparation horizontale avec un design en 2D	178
De nouvelles options avec des bobines en vis-à-vis	180
Les approches hybrides : voir l'aimant permanent comme un atout.....	180
Les avantages de la combinaison aimants permanents et microbobines	180
Les avantages d'ajout d'aimants permanents pour notre étude	182
BIBLIOGRAPHIE	183
ANNEXE A : CONFERENCE, POSTER, BREVET	190
ANNEXE B : TRI HYDRODYNAMIQUE POUR LA SEPARATION EN TAILLE ET AMELIORATION.....	192
ANNEXE C : MARQUAGE SUR PUCE.....	200
ANNEXE D : LA VISUALISATION EN 3D : OBSERVATION SUR LA TRANCHE	203

Remerciements

J'ai commencé ma thèse il y a plus de trois ans maintenant et je n'aurais jamais pu imaginer la moitié de ce que j'ai vécue durant ces années au LAAS.

Je suis aujourd'hui bien différent que quand j'ai commencé, et tant mieux, mais finalement, n'est ce pas le propre du chercheur, d'apprendre, comprendre et pousser plus loin ? J'ai appris énormément d'un point de vue scientifique et bien plus encore d'un point de vue personnel.

J'ai beaucoup apprécié de travailler au LAAS, rendant plus difficile le moment du départ et plus grande la peur de ne plus retrouver pareil merveille. Je ne suis pas sûr que tout le monde ici se rende compte de la chance de pouvoir travailler dans un tel endroit, tant le lieux est propice au travail, à l'échange mais aussi à une bonne ambiance.

J'ai parlé de bonne ambiance et elle est beaucoup due au gens que nous pouvons rencontrer, de ce fait, il y a beaucoup de personnes que j'aimerais remercier ici. D'autant plus que j'ai eu la chance de pouvoir interagir avec beaucoup de gens et des gens formidables. « Vous côtoyer au laboratoire ferait croire que tout le monde est génial mais c'est faux c'est vous qui êtes génial ». J'ai prononcé cette phrase lors de mon pot de thèse et je le pense sincèrement alors merci à vous (je m'excuse si l'ordre des remerciement ne convient pas à tous le monde et surtout si j'ai oublié des gens) : Stéphane, Vincent, Hubert, Ana, Marc, Joris, Loïc, Catherine, Sébastien, Charline, Céline, Alik, Sandrine, Anaëlle, Sabeha, Cloé, Medhi, Guillaume, Ludo, Mathilde, Aurélien, Pierre, Marie, Anne, Georges, Marie-Laure, Hakim, Georgina, Maud, Fabien, Sabri, Denis, Pattamon, Maeva, François, Lamine, JohnJohn, Jo...

J'aimerais aussi remercier des gens extérieures au laboratoire mais qui compte pour moi. Je pense d'abord à mes amis certains d'enfance comme Sébastien qui a toujours était présent durant toutes ces années. Je pense aussi aux cygnes, Coline, Emilie et Sébastien, vous êtes tellement important à mes yeux, je ne vous oublie pas. Aux vo sinh du club de Toulouse, aux improvisateurs de la LUDI et aux rencontres plus ou moins fortuites.

Finalement, comment ne pas parler de ma famille et notamment de mes deux frères Laurent et Cyril et de ma belle sœur Marine, toujours partant pour me changer les idées.

Un dernier merci, à vous mes parents pour votre soutien infaillible et ces week-end de ressourcement à Bordeaux.

Glossaire

ADN	Acide DésoxyriboNucléique	Pr	Nombre de Prandlt
BNC	Bayonet Neill-Concelman	PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
BSA	Bovine Serum Albumin	Re	Nombre de Reynolds
CD	Cluster of Differentiation	SDS	Sodium DodécylSulfate
CMS	Composant Monté en Surface	SVF	Sérum de Veau Foetal
Cp	Capacité thermique massique	η	Viscosité dynamique
CTC	Cellules Tumoral Circulantes	θ	Angle de contact
CTE	Coefficient Thermique d'Expansion	μ_r	Perméabilité magnétique relative
D	Coefficient de diffusion	χ	Susceptibilité magnétique
D_h	Diamètre hydraulique		
DLD	Deterministic Lateral Displacement		
DLS	Dynamic Light Scattering		
DMSO	Dymethylsulfoxyde		
DRX	Diffraction Rayon X		
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) cabodiimide		
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique		
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay		
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device		
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter		
Fc	Fragment Cristallisable		
FFC	Flat Flexible Cable		
FITC	Fluorescein Isothiocyanate		
HEPA	Haute Efficacité pour les Particules de l'Air		
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique		
k	Conductivité thermique		
k_B	Constante de Boltzman		
LOC	Lab On Chip		
MEB	Microscope Electronique à Balayage		
MEMS	MicroElectroMechanical Systems		
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid		
Nu	Nombre de Nusselt		
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PCB	Printed Circuit Board		
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane		
Pe	Nombre de Peclet		
PEB	Post Exposure Bake		
PET	PolyEthylène Téréphtalate		
PGMEA	Propylène Glycol Monoethyl Ether Acetate		

Po Nombre de Poiseuille
POC Point Of Care

Introduction générale

Les approches « laboratoires sur puce » constituent aujourd'hui un enjeu majeur aussi bien dans le monde des micro-nanotechnologies que dans celui des sciences analytiques, du diagnostic ou de la recherche pharmaceutique. Ils offrent en effet la possibilité, d'une part, de travailler sur des volumes d'échantillons réduits et d'autre part, d'intégrer des procédés complexes. L'intégration complète et automatisée dans une démarche « de l'échantillon au résultat » offre d'intéressantes perspectives en termes de portabilité, délocalisation des analyses, réduction des coûts et fiabilisation du diagnostic. Le projet de cette thèse s'inscrit dans cette démarche. Il vise au développement de dispositifs intégrés de type laboratoire sur puce pour le diagnostic précoce d'infections virales ou parasitaires. La détection de l'infection sera dans ce cas réalisée à partir du sang via l'analyse quantitative de monocytes circulants infectés comme marqueurs de l'infection.

Les laboratoires sur puce peuvent être vus comme une révolution dans le domaine de l'analyse et du diagnostic, comparable à ce qu'a été, en électronique, le remplacement des composants individuels par les microprocesseurs. La problématique n'est cependant pas simple : les technologies directement issues de la microélectronique (silicium en particulier) sont souvent très mal adaptées au domaine spécifique de la biologie et de l'analyse biologique :

- Les milieux manipulés (fluides biologiques) sont complexes
- Les problématiques scientifiques associées sont complètement pluridisciplinaires
- Les niveaux d'exigence en précision et fiabilité en particulier sont élevés

L'actionnement magnétique, très largement utilisé en laboratoire, permet d'implémenter de nombreuses opérations de prétraitement de l'échantillon. Facile à mettre en œuvre, il s'avère parfaitement compatible avec une réduction des dimensions des dispositifs d'analyse et offre une grande versatilité. C'est donc autour de ce principe d'actionnement que s'articule notre travail. Celui-ci propose de mettre en œuvre un laboratoire sur puce de diagnostic par tri immunologique magnétophorétique de cellules.

Nous nous intéressons à des monocytes circulants mais il est important de signaler ici que l'approche décrite dans cette thèse est totalement générique. En effet, le principe de détection peut être facilement décliné pour d'autres types cellulaires présentant un antigène caractéristique d'une pathologie donnée ou surexprimé en réaction à une cause donnée. Nous voyons donc la diversité d'applications que peut, potentiellement, adresser ce dispositif.

Cette thèse s'articule autour de 6 chapitres.

Le chapitre 1 nous propose une introduction aux différents domaines exploités par les travaux de cette thèse. Nous commencerons d'abord par introduire la microfluidique, puis ferons un tour d'horizon du magnétisme utilisé dans la microfluidique. Nous positionnerons enfin notre travail dans son contexte scientifique.

Le chapitre 2 introduira les principales notions de magnétisme. Il présentera ce phénomène physique, comment le quantifier et comment le créer. Nous verrons le choix des designs d'actionneurs magnétiques que nous utiliserons dans les dispositifs. Ce chapitre portera essentiellement sur de la simulation par éléments finis réalisé grâce au logiciel COMSOL.

A l'image du chapitre 2, le chapitre 3 traitera des aspects fluidiques. Nous verrons alors comment réaliser des dispositifs microfluidiques en utilisant des procédés de photolithographie et de laminage pour l'obtention de dispositifs en 3D. Puis nous étudierons les écoulements microfluidiques dans ce type de dispositifs, afin, en particulier, de créer des co-écoulements laminaires superposés.

Le chapitre 4 présentera la réalisation des dispositifs de tri magnétique, des aspects design jusqu'au procédé technologique. Puis, nous verrons comment interfacer les puces entre le monde microfluidique et nos appareils de mesure du laboratoire.

Les chapitres 5 et 6 seront enfin consacrés aux expérimentations et à la preuve de concept.

Nous pourrions alors conclure sur ces travaux de thèses, mais nous apporterons aussi des perspectives car de nombreux points restent encore à étudier.

Chapitre 1 : Le traitement d'échantillon biologique appliqué au diagnostic : Etat de l'art

Introduction	7
1.1 Le sang un outil pour le diagnostic	10
1.1.1 Le sang, un mélange complexe.....	10
1.1.2. Les monocytes comme marqueur de l'inflammation	11
1.2 Les appareils pour le diagnostic entre macro et micro	11
1.2.1 Les « gold standard » de l'analyse sanguine : la cytométrie de flux et l'étude de lame	11
1.2.2 L'analyse sanguine par microdispositifs commercialisés : une grande gamme de produits pour des analyses restreintes	14
1.2.3 Les microsystèmes d'analyse en recherche : une grande diversité.....	16
1.2.3.1 Détection optique	16
1.2.3.2 Détection électrique.....	17
1.2.3.3 Détection par onde acoustique de surface	17
1.2.3.4 Détection par résonance magnétique.....	17
1.3 Le magnétisme appliqué à la microfluidique.....	18
1.3.1 Quand la microfluidique utilise le magnétisme	18
1.3.2 La manipulation magnétique : une question d'intégration	20
1.4 Positionnement du travail de thèse.....	21
1.4.1 Quelques dispositifs qui valent le détour	21
1.4.1.1 Des aimants permanents collés à la canalisation fluide : notre point de repère	21
1.4.1.2 Des électroaimants permettant un champ variable mais à quel prix	22
1.4.1.3 Le fil de cuivre peut être la bonne solution.....	24
1.4.2 Les travaux de la thèse	25

Introduction

La microfluidique est la science qui étudie les écoulements des fluides dans des canaux dont au moins une dimension est micrométrique. Elle inclut aussi les différentes techniques de fabrication de dispositifs.

La microfluidique tire une part de son origine dans les technologies de la microélectronique. En effet, la démarche de miniaturisation a pris naissance au travers des composants électroniques et notamment des transistors qui depuis leur création en 1947 par les chercheurs John Bardeen, William Shockley et Wakter Brattain, n'ont cessé de diminuer en taille. Cette course à la miniaturisation s'est appuyée sur les techniques de fabrication par photolithographie qui sont aujourd'hui maîtrisées.

Les années 80 ont vu apparaître un nouveau type de dispositifs appelé MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) combinant plusieurs disciplines telles que l'électronique, la mécanique, la chimie, l'optique ... permettant la création de nouvelles fonctions miniaturisées. Les MEMS sont de nos jours très utilisés et sont présents partout autour de nous que ce soit dans les têtes d'imprimante ou pour les accéléromètres présents dans tous les Smartphones.

Dans l'objectif d'élargir le champ d'application des MEMS au domaine du vivant et de la biologie, la science des écoulements des fluides a fait son entrée dans les dispositifs. Le début de la microfluidique se situe autour des années 1990 avec les premières applications pour la chromatographie (A. Manz N. G., 1990).

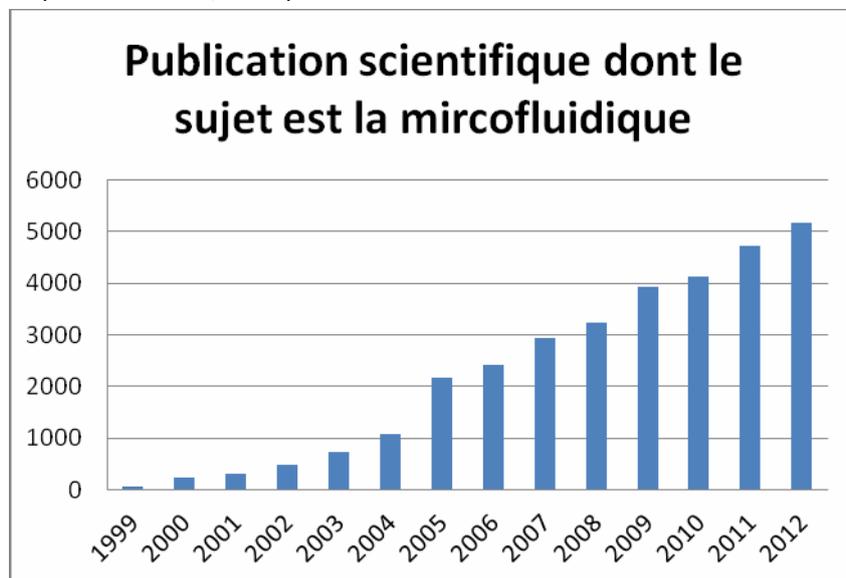


Figure 1. Evolution du nombre de publications relatant de la microfluidique sur web of science entre 1999 et 2012

Cependant l'intérêt pour ce domaine n'apparaît réellement qu'au début des années 2000 avec l'apparition de puces en polymère facilement réalisables et à bas coût. Notons que le nombre de dispositifs microfluidiques a fortement augmenté ces dernières années (figure 1), corrélé à l'objectif de déployer des systèmes d'analyse complets (μ TAS ou Lab-on-chip). Le but affiché est de faire sur quelques cm^2 ce que les technologies conventionnelles permettent de faire mais de façon plus

efficace, plus rapide, à une plus petite échelle et coût. En effet, la microfluidique permet de manipuler des petits volumes avec une grande précision (Whitesides, 2006).

Ainsi, les chercheurs ont pu démontrer la possibilité de créer de multiples fonctions élémentaires en n'utilisant que les propriétés hydrodynamiques des fluides. Parmi ces fonctions, le mélange (V. Hessel, 2005) (N-T. Nguyen, 2005), la focalisation, la séparation en taille (M. Yamada K. K., 2007), par DLD (Deterministic Lateral Displacement) (M. Heller, 2008), par contraction/expansion (J. S. Park, 2009), et autres comme l'effet de Dean (E. Sollier, 2008) ...



Figure 2. Micromélangeur cyclone (Hardt, 2002)

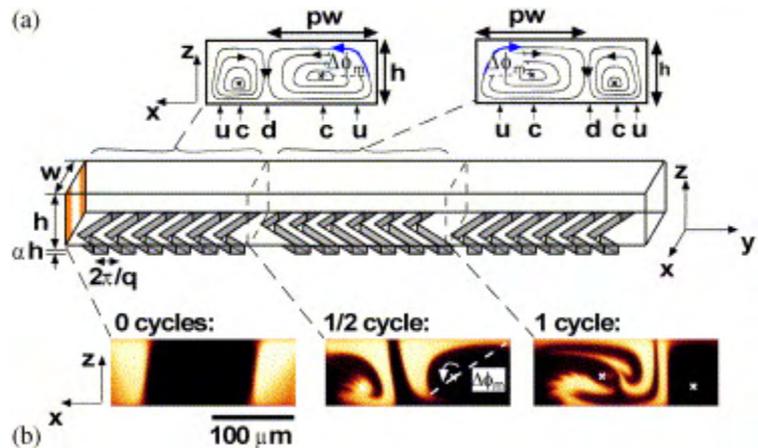


Figure 3. Micromélangeurs à chevrons. (A. D. Stroock, 2002)

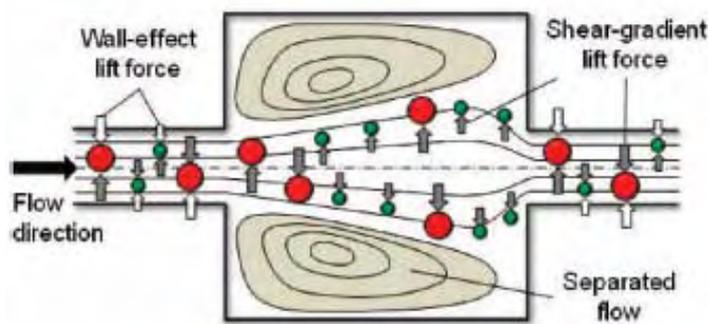


Figure 4. Séparation par succession de contraction et d'expansion. (J-S. Park, 2011)

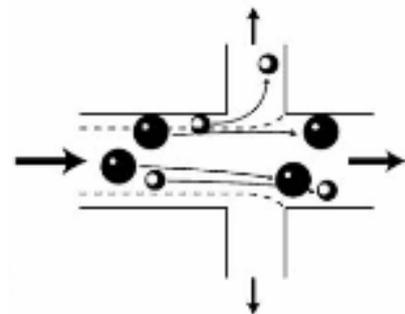


Figure 5: Tri hydrodynamique par taille. (M. Yamada M. S., 2005)

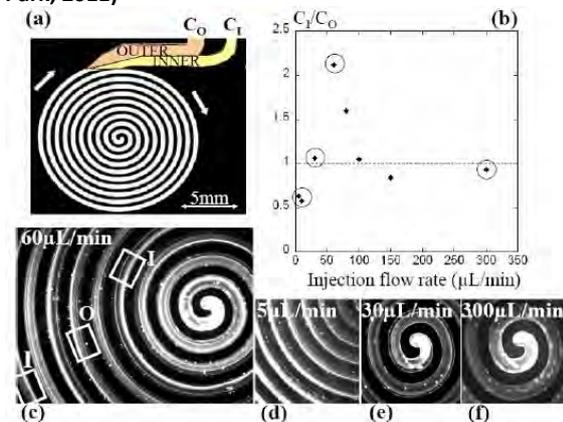


Figure 6: Séparation par centrifugation. (E. Sollier H. R.-L., 2009)

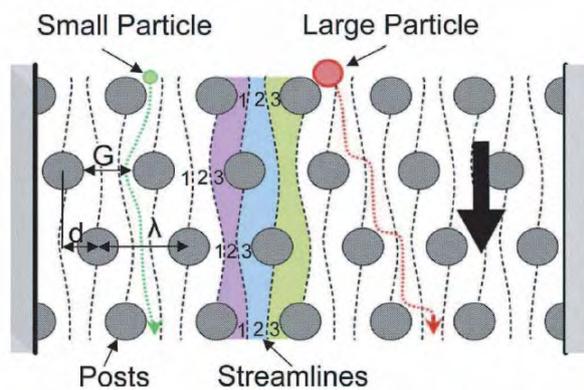


Figure 7. Séparation par DLD (Deterministic lateral displacement). (J. A. Davis, 2006)

Nous verrons dans le chapitre 3 que les liaisons entre la microfluidique et la microélectronique sont nombreuses. D'ailleurs, tout comme l'électronique, qui après avoir connue ses années « toujours plus petit » diminuant ainsi la taille des composants selon la loi de « Moore », s'oriente aussi dans la voie de la complexification des composants, la microfluidique devient tri dimensionnelle et multifonctionnelle. De façon analogue aux options « more Moore » et « more than Moore » de la micro et nano électronique, deux voies coexistent en microfluidique, celle qui consiste à intégrer, multiplier des fonctions simples et l'exemple le plus concret est bien sûr celui des vannes de Quake (T. Thorsen, 2002), et celle qui cherche des fonctions plus complexes comme nous allons le voir dans ces travaux de thèse.

1.1 Le sang un outil pour le diagnostic

1.1.1 Le sang, un mélange complexe

Le sang est un élément primordial dans le fonctionnement du corps humain car il permet la transmission de nombreux composants à travers les différents organes et ses fonctions sont très diverses. Nous pouvons citer l'acheminement de l'oxygène et du gaz carbonique dans le processus de respiration, la distribution des nutriments vers les organes, l'élimination des déchets et l'élimination de menaces microbiennes...

Le sang est un mélange complexe composé de divers éléments avec des propriétés physiques, rhéologiques et chimiques très différentes. De plus, la proportion de chaque élément varie de façon très importante. De façon simplifiée nous pouvons considérer le sang comme un milieu composé de plasma et d'éléments figurés que sont les globules rouges (ou érythrocytes), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes. Le tableau 1 regroupe les concentrations et les tailles caractéristiques de ces différents composants.

Composants		Proportion dans le sang		Taille	
Erythrocytes ou globules rouge		4-6 *10 ⁶ /μl		6,6 à 7,5 μm	
Plaquettes		0,2-0,3 *10 ⁶ /μl		2 à 3 μm	
Leucocytes (5-7 *10 ³ /μl)	Granulocytes	Neutrophiles	3,6*10 ³ /μl	50-70%	12 à 15 μm
		Eosinophiles	180/μl	2-4%	12 à 15 μm
		Basophiles	45/μl	0,5-1%	9 μm
	Cellules lymphoïdes (ou agranulocytes)	Lymphocytes	1,8*10 ³ /μl	20-40%	8 à 10 μm
		Monocytes	330/μl	3-8%	16 à 20 μm

Tableau 1. Proportion et information sur les éléments figurés du sang

Chaque élément se différencie des autres par de multiples critères que ce soit la taille, l'aspect, la présence de noyau, ... ils sont alors facilement différenciables lors d'une observation sur lame suite à un frottis sanguin par exemple, comme illustré figure 8.

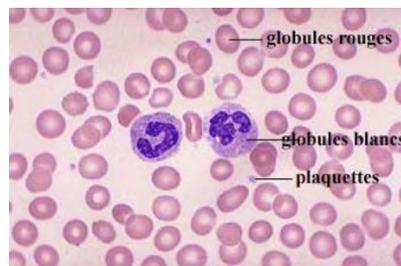


Figure 8. Exemple d'observation d'une lame d'analyse à la suite d'un frottis sanguin et d'une coloration

Les globules rouges sont les éléments figurés les plus nombreux et représentent plus de 98% des éléments figurés en volume. Les plaquettes sont les plus petites et même si elles sont nombreuses,

elles ne représentent que 0,5% des éléments figurés. En dépit de leur faible proportion, elles jouent un rôle important dans la coagulation sanguine. Les globules blancs, eux, représentent un peu plus d'1% des éléments figurés et sont très diversifiés.

1.1.2. Les monocytes comme marqueur de l'inflammation

Les monocytes sont de la famille des agranulocytes, ce sont des phagocytes, ils sont donc responsables de la phagocytose ou l'élimination des déchets sanguins par ingestion. La phagocytose se déroule en trois phases : la phase d'adhésion, la phase d'ingestion et la phase de digestion. Les principaux récepteurs macrophagiques impliqués dans le processus de phagocytose sont les récepteurs CD14 présents en surface de tous les monocytes.

Les monocytes pro-inflammatoires en plus d'exprimer les récepteurs CD14, expriment des récepteurs CD16. (Ziegler-Heitbrock, 2007). Ils sont alors nommés CD14+CD16+ c'est-à-dire exprimant les 2 antigènes.

La première description de ces cellules a été faite en 1988 par cytométrie de flux avec deux couleurs d'anticorps. Ces monocytes pro-inflammatoires représentent en moyenne 10% des monocytes pour une personne saine (Belge, 2002). Ce rapport augmente de façon drastique lors d'une infection. On note par exemple un pourcentage de 24% pour des patients souffrant d'infections chroniques (Wa, 1998). Notons que cette population se caractérise par une diminution de leur faculté d'adhésion à la paroi et de phagocytose (B. Passlick, 1989)

Toutefois leur rôle lors dans une infection ou un état inflammatoire peut être porté à jugement. En effet, suite à un effort excessif, le nombre de CD14+CD16+ peut être multiplié par 4 dans les vaisseaux périphériques. Donc la cause de l'augmentation ou la diminution du nombre de ces cellules dans le sang périphérique peut être diverse. Nous devons donc être critiques lors de l'interprétation des résultats.

1.2 Les appareils pour le diagnostic entre macro et micro

1.2.1 Les « gold standard » de l'analyse sanguine : la cytométrie de flux et l'étude de lame

Le principal examen d'étude des cellules sanguines est l'hémogramme. Il consiste, à l'aide d'automates, à compter le taux des différents éléments figurés du sang par unité de volume sanguin (ml) et à effectuer une identification, la plus précise possible, de ces cellules et de leur répartition.

L'hémogramme comprend deux types d'examen :

- un examen **quantitatif** ou numération sanguine
- un examen **qualitatif** : étude morphologique des différents composants du sang comportant la formule leucocytaire et la recherche des anomalies morphologiques.

La numération sanguine :

Cet examen permet de connaître le nombre de cellules pour un certain volume de sang. Cette grandeur doit être prise avec précaution puisque relative à la quantité de plasma : en effet, un manque de plasma chez le patient entrainerait des concentrations de cellules importantes alors que normales. Cet examen était autrefois réalisé au microscope sur des lamelles quadrillées mais est remplacé de façon quasi-systématique par l'utilisation d'automates. Généralement ces appareils (ABX, Abbott, Coulter-Beckman, Sysmex et Bayer-Technicon) peuvent travailler avec de petits volumes d'échantillon (200µl).

La formule leucocytaire :

C'est la répartition en pourcentage des cinq grandes populations de leucocytes. Ces mesures doivent toujours être mises en parallèle avec le nombre effectif mesuré, car le pourcentage de chacun des types de leucocytes dépend des autres. Si l'appareil effectuant cette mesure ne peut identifier toutes les cellules sanguines, des alarmes sont déclenchées et un frottis sanguin est nécessaire pour s'assurer des résultats obtenus.

Le frottis sanguin :

Le frottis sanguin est en fait, une goutte de sang étalée de façon à bien séparer les cellules qui sont séchées mais non fixées, puis colorées avec du May Grünwald-Giemsa, qui est le colorant le plus utilisé. La figure 8 précédemment présentée est l'observation d'un frottis sur lame. Le frottis permet de lever des doutes sur des éléments que les automates n'auraient pas pu identifier et permet aussi la recherche d'anomalies morphologiques.

La cytométrie de flux :

La cytométrie de flux est sans nul doute la méthode la plus utilisée pour l'analyse d'échantillons sanguins, en tout cas c'est certainement la plus complète. Les cellules sanguines sont préalablement marquées avec des anticorps monoclonaux fluorescents et l'appareil reconnaît ensuite ces cellules marquées selon la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence).

La cytométrie en flux permet l'analyse de différents paramètres. En effet, outre la reconnaissance du type cellulaire par la couleur de l'anticorps, des informations sur la taille et l'aspect des cellules sont aussi recueillies grâce à l'étude de la lumière diffractée et réfléchi.

Nous pouvons distinguer deux cytomètres, le cytomètre d'analyse en flux où les cellules passent les unes derrière les autres portées dans le fluide et sont analysées par les différents lasers. L'échantillon est alors récupéré dans un même récipient en sortie. A séparer du cytomètre de tri où les cellules sont piégées dans des gouttes : ce sont les gouttes qui sont analysées par les lasers et qui peuvent ensuite être séparées, par diverses méthodes, dans des récipients différents. Le grand avantage de la cytométrie de tri est de pouvoir faire des analyses complémentaires sur une population donnée ou la remettre en culture. Le nombre de populations qu'il est possible de trier en un passage dépend du nombre de lasers disponibles, certains appareils peuvent avoir jusqu'à 6 lasers. Avec le bon choix d'anticorps fluorescents, il est alors possible en un seul passage de séparer 6 populations différentes, et donc de séparer par exemple tous les éléments d'une formule leucocytaire.

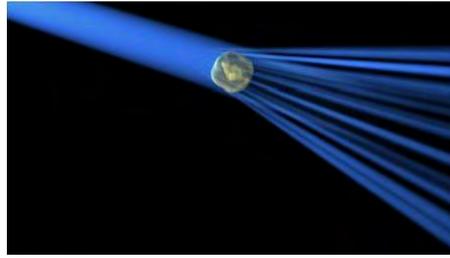


Figure 9. Illustration d'une mesure de cytométrie en flux

Les résultats des cytomètres de flux permettent de visualiser des populations de cellules en fonction de différents fluorophores, et ainsi de définir visuellement les profils des différents groupes de cellules. Nous reportons ici l'exemple d'un résultat de l'analyse d'un échantillon de monocytes marqués avec du FITC pour les CD14 et du PE pour les CD16, figure 10. Nous pouvons voir clairement l'augmentation du pourcentage de CD16 entre un patient sain (figure 10A et 7% de CD16) et un patient avec une infection (figure 10B et 20% de CD16).

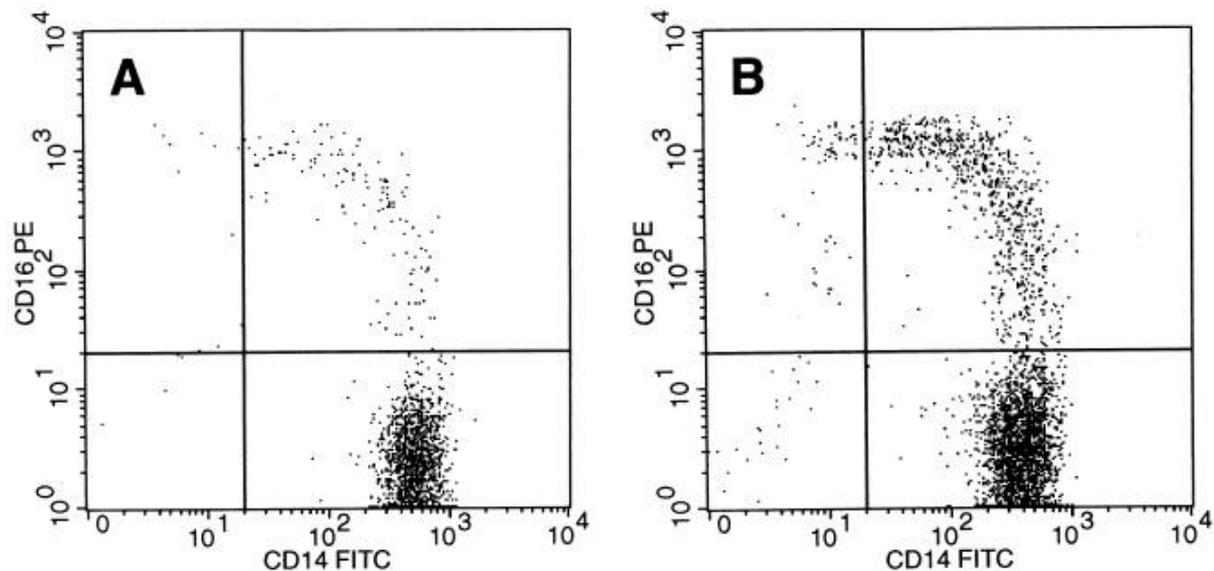


Figure 10

: Diagramme résultant d'une analyse de cytométrie en flux. (A) pour un patient sain, (B) pour un patient présentant un état inflammatoire

Test ELISA :

ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire appelé *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme lié », c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide.

L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie, mais pas uniquement, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène cible, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. En termes clairs, si l'élément recherché est présent en solution, il y aura une réponse optique détectable.

Les techniques Elisa et par cytométrie de flux sont les seules capables de repérer et de compter les monocytes CD14+ CD16+ et CD14++.

1.2.2 L'analyse sanguine par microdispositifs commercialisés : une grande gamme de produits pour des analyses restreintes

Les équipements actuellement utilisés, comme vu précédemment, pour traiter les échantillons sanguins sont volumineux et/ou lents. Il serait très intéressant de pouvoir effectuer les mêmes analyses en microsystème pour bénéficier des avantages de ces derniers, à savoir, la réduction de taille, l'augmentation de portabilité, la diminution des volumes à traiter, l'augmentation de la précision et de la sélectivité...

Les systèmes utilisés dans le domaine de la santé sont appelés, « point-of-care (POC) devices ». L'idée est de réaliser des POC grâce à la technologie des microsystèmes et donc des laboratoires sur puces (LOC) pour le suivi et le diagnostic de patients.

Les premières applications POC réussies sont des tests simples basés sur la filtration sur membrane appelés lateral flow tests.

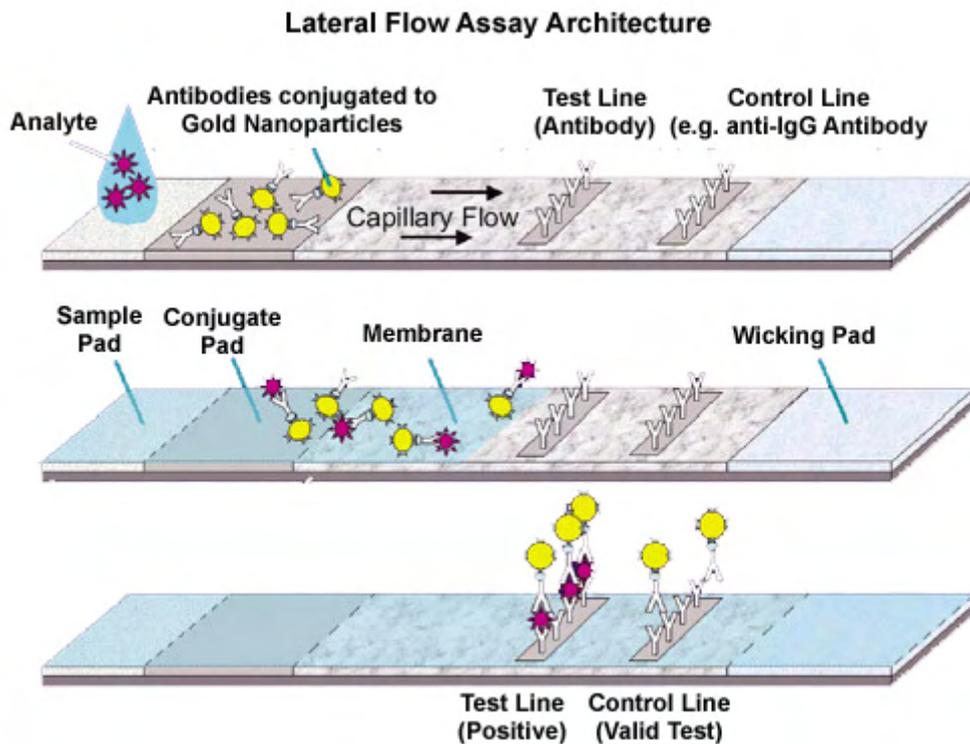


Figure 11. Exemple et principe de fonctionnement de dispositifs basés sur la filtration sur membrane

Comme indiqué figure 11, ces tests consistent généralement à faire passer l'échantillon à travers une membrane fonctionnalisée pour y détecter certaines protéines comme des antigènes ou des anticorps (Curtis D. Chin, 2012). Ces tests sont simples à réaliser, ils sont utilisés couramment pour des tests de grossesses, certaines infections et le diagnostic du sida. Cependant leur simplicité de

fonctionnement ne permet pas de mimer la diversité des étapes d'analyse possibles en laboratoire, d'où la limitation dans leurs applications.

Un autre exemple de réussite de systèmes POC est la mesure du glucose pour le traitement du diabète. Cette mesure se fait classiquement par électrochimie (Kost, 2002) qui a montré son efficacité. Cependant la réussite de ces systèmes repose sur la particularité de cette mesure qu'est la forte concentration en composés à mesurer. En effet la concentration du glucose dans le sang est de l'ordre du mM, bien supérieure aux autres marqueurs sanguins. Pour des marqueurs plus rare, il faut des appareils plus complexes, nous pouvons alors citer l'i-STAT d'Abbott, commercialisé à partir de 1983. L'i-STAT combine microfluidique et électrochimie et permet de détecter des petites molécules du sang telles que les sels de potassium, de chlore,... (Erickson KA, 1993).

Nous venons de voir historiquement l'apparition des premiers micro POC, de nos jours, il en existe des dizaines commercialisés mais nous nous intéresserons plus particulièrement à ceux qui travaillent sur les espèces cellulaires. Les appareils commerciaux issus de travaux de recherche amont, interviennent généralement dans le suivi du sida ou encore pour la détection et le suivie des cancers.

Le diagnostic du sida et le suivi de ses différents traitements a été et reste un enjeu majeur dans le domaine de la santé. C'est pourquoi nous retrouvons de nombreuses études sur les lymphocytes T CD4+ qui sont un bon indicateur de l'évolution de la maladie (F. Vullier, 1986). Nous pouvons citer notamment le compteur de CD4 Pima de chez Alere permettant un comptage en 20 min à partir de 25µl de sang (E. Ermantraut, 18 juin 2013). Le compteur Pima fonctionne en utilisant des anticorps fluorescents incubés avec le sang, le tout est entrainé par des pompes micro-staltiques et la mesure se fait par imagerie de fluorescence intégrée.

Nous pouvons aussi citer le système Daktari Diagnostic (figure 12) qui, après avoir fixé les cellules dans une canalisation où le flux est contrôlé, réalise une mesure de concentration par impédancemétrie (X.H. Cheng, 2007).



Figure 12. Illustration du système d'analyse Daktari Diagnostic

Nous pouvons citer, en plus, l'appareil de chez MBio Diagnostics Inc. permettant aussi le comptage des CD4 utilisant une technique de fluorescence par guide d'onde (MBio).

Enfin nous parlerons du dispositif de chez Zyomyx, qui se démarque des précédents car ne possède pas de système d'entraînement de fluide, la séparation est effectuée par sédimentation en fixant des billes à forte densité sur les éléments d'intérêt, ces derniers sédimentant alors. Une observation visuelle du culot obtenu donne la réponse au test (F. Zaugg, 2012).

Finalement nous pouvons conclure ce tour d'horizon des appareils de POC en disant que, en comparaison aux avancées et au volume de recherche dans la microfluidique, peu d'appareils pour le diagnostic ou le suivi de maladie existent pour le moment. On peut penser que ce demi-succès est en partie lié à la difficulté d'implémenter des fonctions complexes afin de reproduire les tests des laboratoires (Becker, 2010).

1.2.3 Les microsystèmes d'analyse en recherche : une grande diversité

Le monde de la microfluidique a encore beaucoup de choses à apporter au domaine médical. Au travers des appareils précédents, nous avons déjà vu différentes méthodes de détection ou de comptage, nous allons voir ici plus en détail les grandes familles d'analyses possibles pour réaliser ces étapes en microsystèmes (L. Yu, 2013) (M. Glynn, 2013). Le but est de voir la diversité du monde microfluidique.

1.2.3.1 Détection optique

Les techniques les plus utilisées sont basées sur la détection optique. Avec en premier lieu le marquage fluorescent, qui permet de colorer directement les cellules ou les éléments ciblés. Nous avons aussi la chimiluminescence, un procédé chimique qui permet la création de lumière. L'exemple le plus connu est l'oxydo-réduction du luminol par un hydroxyde comme l'eau oxygénée (W. Liu, 2011).

Nous pouvons citer l'utilisation de DLS (Dynamic light scattering) pour avoir des informations sur la taille et la structure des objets analysés. Greiner *et al.* ont d'ailleurs réussi à distinguer et compter des cellules cancéreuses en recoupant les données fournies par trois lasers et donc trois longueurs d'ondes différentes (C. Greiner, 2011).

Il est possible également d'utiliser des mesures d'absorbance. Le principe est d'induire un contraste artificiel, en colorant ou fixant un objet sur les éléments d'intérêt (J. A. Viator, 2010).

La spectroscopie Raman, qui mesure les variations de fréquence de la lumière suivant les milieux qu'elle traverse, permet d'obtenir des informations sur la nature des éléments étudiés. L'avantage de cette technique est qu'elle ne demande pas d'étape de marquage. Elle a pu être utilisée pour détecter des cellules cancéreuses (S. Dochow, 2011).

Nous pouvons aussi retrouver la cytométrie en flux adaptée à la microfluidique décrite par (J-H. Wang, 2011) et illustrée figure 13.

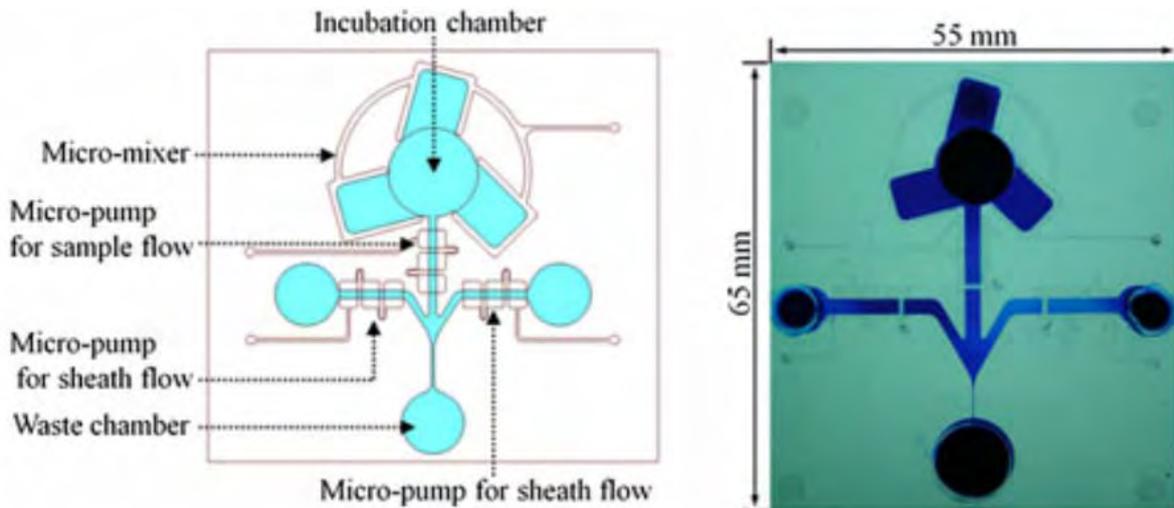


Figure 13. Exemple de cytométrie en flux réalisée en microfluidique

1.2.3.2 Détection électrique

Les détections électriques sont un moyen facile et sans marquage préalable pour la détection et le comptage. Elles mesurent généralement une modification de conductivité ou d'impédance du milieu. La mesure électrique la plus répandue est certainement la mesure d'impédance. En quelques mots, le principe est simple, nous faisons passer un courant entre deux électrodes et selon le milieu traversé, la résistance est plus ou moins grande. Il est possible comme cela de réaliser un comptage de cellules une fois ces dernières fixées sur les électrodes (N. N. Watkins, 2011).

1.2.3.3 Détection par onde acoustique de surface

Le principe est de faire vibrer des plots ou des poutres grâce à un actionneur piézoélectrique. Les plots et les poutres peuvent être fonctionnalisés de sorte à n'interagir qu'avec une certaine cible spécifique. Les modifications dans les fréquences d'oscillations lors de l'accroche de l'élément d'intérêt montrent sa présence (Gronewold, 2007) et permettent de déduire sa concentration.

1.2.3.4 Détection par résonance magnétique

Cette détection fonctionne dans des cas bien particuliers, avec des nanoparticules ferromagnétiques par exemple, fonctionnalisées pour s'accrocher à des fonctions bien particulières de la cellule. Le nombre de nanoparticules informe alors sur l'expression plus ou moins développée de la fonction en question. Comme pour une résonance magnétique nucléaire classique, le milieu et les complexes cellules + billes sont soumis à un champ magnétique constant B_0 , puis à des oscillations perpendiculaires B_1 . La présence des billes influence alors le temps de relaxation des spins des molécules d'eau environnant la cellule pour se réorienter dans le sens de B_0 (H. Lee, 2008).

En conclusion nous avons pu voir les techniques de détection les plus utilisées en microfluidique, elles sont nombreuses et diverses, nous pouvons les regrouper en quatre familles avec des mesures basées sur des propriétés optiques, électriques, acoustiques ou magnétiques. L'enjeu de la microfluidique de nos jours et d'intégrer ces techniques de détections avec différents moyens

d'actionnement, de prétraitement des échantillons... pour réaliser des fonctions complexes qui répondent aux besoins de la santé.

Notons que nous aurions pu classer ces techniques de détection aussi suivant leur fonctionnement en batch ou en continu. En effet, selon les méthodes de détections il est possible ou non de faire les mesures en continu dans le flux, en d'autres termes certaines méthodes nécessitent de piéger et fixer les éléments cibles avant de réaliser la mesure.

1.3 Le magnétisme appliqué à la microfluidique

L'utilisation du magnétisme en microfluidique a de nombreux avantages et rend possible de nombreuses fonctions comme nous allons le voir.

Un premier avantage est de pouvoir agir sur les fluides ou les particules à distance sans contact avec ces derniers, contrairement à une activation électrique par exemple où le courant passe à travers l'électrolyte (T. Vilknér, 2004). De plus les champs et forces magnétiques ne dépendent que de la nature des éléments soumis au champ et sont peu sensibles aux variations environnementales telles que la température, le pH, les charges de surface, ...

Toutefois le magnétisme n'apparaît en microfluidique qu'aux années 2000 soit plus de 10 ans après son début. Cela s'explique peut être par la réticence première des chercheurs à mettre des particules magnétiques dans les microcanaux (Verpoorte, 2003). Depuis de nombreuses utilisations, variées et ingénieuses, ont fait leur apparition.

La théorie du magnétisme sera présentée dans le chapitre 2, nous verrons ici des exemples de réalisation de fonctions microfluidiques telles que des pompes, des valves, du mélange, du transport, du piégeage, de tri, du support réactionnel, de l'auto-assemblage et de la détection, grâce au magnétisme.

1.3.1 Quand la microfluidique utilise le magnétisme

Fonctionnement des pompes magnétiques :

Il existe plusieurs façons de faire des pompes à actionnement magnétique. La première est de réaliser une pompe magnétohydrodynamique. Le principe est de créer une force de Lorentz pour actionner le fluide. Cette force de Lorentz est créée par l'utilisation d'un champ électromagnétique sur un fluide conducteur, elle nécessite un courant continu et un champ uniforme facilement réalisable en plaçant un aimant permanent à une distance adéquate du dispositif par exemple. Grâce à ce système de pompes, il est possible de pomper de l'eau à une vitesse de $2,5\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un canal rectiligne en silicium métallisé en aluminium au fond et au dessus de la canalisation (J. Jang, 2000).

La deuxième est de faire une pompe magnétique en utilisant un ferrofluide et des aimants permanents. En effet, comme expliqué sur la figure 14, il est ainsi possible de pousser le fluide d'intérêt par une partie de fluide ferromagnétique suivant le mouvement d'un aimant en rotation (A. Hatch, 2001). Avec une vitesse de 4 à 8 tours par minute, Hatch a pu pomper l'eau à une vitesse de 2,1 à 4,2 mm.s⁻¹.

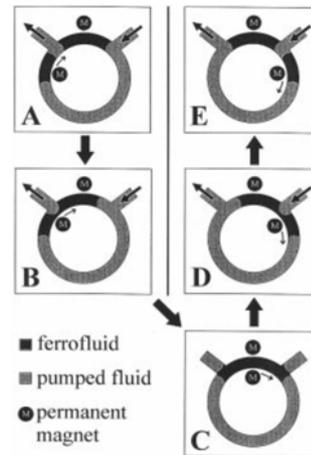


Figure 14. Principe de fonctionnement d'une pompe magnétique

Valves et on/off :

Des vannes sont également réalisables grâce à des ferrofluides selon un principe similaire à celui de la pompe avec du ferrofluide. En effet, il est possible de bloquer un canal en plaçant à son entrée un bouchon de ferrofluide, obligeant le fluide à circuler autre part (H. Hartshorne, 2004). Une autre façon est de mélanger des particules magnétiques (des particules de fer par exemple) avec un polymère, matériaux souple qui pourra se déformer et obstruer une canalisation fluïdique sur demande. Des vannes ont été réalisées sur ce principe avec du PDMS, résistant à une pression de 150mbar (W. C. Jackson, 2001).

Mélange magnétique :

Pour faire du mélange magnétique, la méthode la plus facile est sans doute d'utiliser des micro-agitateurs. En effet le mélange peut être réalisé par un micro-barreau placé dans une canalisation et entraîné par un agitateur macro (L-H. Lu, 2002). Le problème est de pouvoir faire correspondre la taille du barreau à la taille de la canalisation, toutefois possible en maîtrisant bien les technologies (K. S. Ryu, 2004).

Le mélange peut être aussi réalisé par le déplacement de billes magnétiques, plus faciles à introduire dans une canalisation. Les particules peuvent être regroupées sous forme de barreau pour rappeler le mélange précédent (S. L. Biswal, 2004), ou se déplacer de façon chaotique (A. Rida, 2004). Notons aussi l'utilisation de micro-bobines permettant d'attirer et de repousser des billes magnétiques, opérant ainsi un mélange rapide et efficace (C-H. Chiou, 2013).

Piégeage et transport :

Il est possible de déplacer des éléments magnétiques à travers un réseau d'aimants ou d'électroaimants. En effet, des billes magnétiques par exemple vont se déplacer vers les zones de fort champ magnétique, zones que l'on peut déplacer en alimentant alternativement des électroaimants (J. Joung, 2000) (C. S. Lee, 2001). Dans le cas d'aimants permanents, il est possible de structurer des aimants sous forme de lignes que les billes magnétiques suivront, portées dans l'écoulement (L. F. Zanini, 2012).

Tri et séparation :

La séparation magnétique est couramment utilisée en macro, dans la préparation d'un échantillon biologique par exemple. En plaçant un aimant permanent au contact des tubes d'échantillons il est possible de récupérer les billes magnétiques pour toutes étapes de rinçage, ou de séparation (C. L. Yang, 2005). Cette séparation magnétique peut être effectuée aussi en microfluidique, dans un design de T-sensor par exemple, comme illustré figure 15. La suspension de particules est introduite dans l'entrée A, un tampon est mis en entrée B, les écoulements étant laminaires, il n'y a pas de déplacement des particules si ce n'est celles qui seront magnétiques et donc déviées dans la sortie C par l'aimant (N. Chronis, 2001) (X. Wu, 2011).

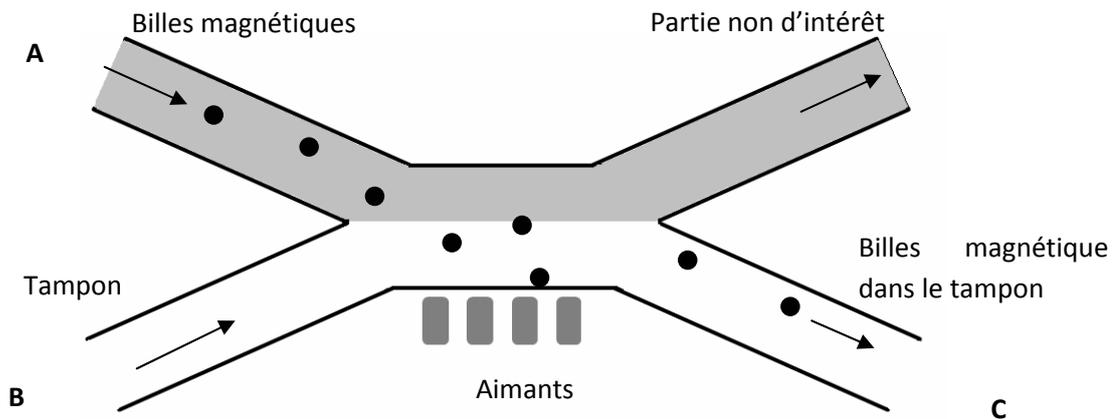


Figure 15. Principe de fonctionnement d'une séparation magnétique grâce à un aimant permanent

1.3.2 La manipulation magnétique : une question d'intégration

Nous venons d'avoir une panoplie des différentes fonctions réalisables grâce au magnétisme permettant de manipuler des fluides comme des particules. Comment intégrer le magnétisme au sein de la microfluidique ? C'est ce que nous allons voir ici. Nous pouvons d'ores et déjà séparer en deux familles les micro-dispositifs selon qu'ils utilisent des aimants permanents pour la création du champ magnétique ou des électroaimants.

Manipulation avec des aimants permanents :

Les aimants permanents ont l'inconvénient de ne pas pouvoir être contrôlable, leur champ magnétique est constamment actif, cependant ils permettent la création de forts champs supérieurs à plusieurs dizaines de milliTesla.

Les aimants permanents peuvent être de tailles différentes, soit imposants et placés à l'extérieur du dispositif (M. D. Estes, 2009) (D. Robert, 2011), soit de plus petite taille et intégrés dans le support du dispositif (C. Nwankire, 2012). Enfin il existe des micro-aimants intégrables à l'échelle microfluidique, au plus près des canalisations fluidiques.

Manipulation avec des électroaimants :

Les électroaimants se caractérisent par un champ magnétique plutôt faible de l'ordre de quelques mT mais ont le grand avantage de pouvoir être contrôlés et donc allumés et éteints selon les besoins.

Tout comme pour les aimants permanents, il existe une grande diversité d'électroaimants. Lorsqu'ils sont non intégrés, ils sont placés en dehors de la puce (R. Rong, 2006) ou intégrés sous forme de bobines dans la puce (R. Fulcrand, 2011).

1.4 Positionnement du travail de thèse

1.4.1 Quelques dispositifs qui valent le détour

Nous avons vu qu'il existe une multitude de façons d'utiliser le magnétisme dans la microfluidique. Nous allons nous intéresser ici, plus en détail, à certaines recherches plus ou moins proches de notre étude et qui nous permettront de positionner notre travail.

1.4.1.1 Des aimants permanents collés à la canalisation fluide : notre point de repère

Notre première analyse porte sur l'article de Xinyu Wu, intitulé « Enhancement of separation efficiency on continuous magnetophoresis by utilizing L/T-shaped microchannels » publié en 2011 à *Microfluidics and Nanofluidics*.

Cette étude se base sur une séparation magnétique en 2D (latéralement dans la canalisation) et avec des aimants intégrés à proximité de la canalisation.

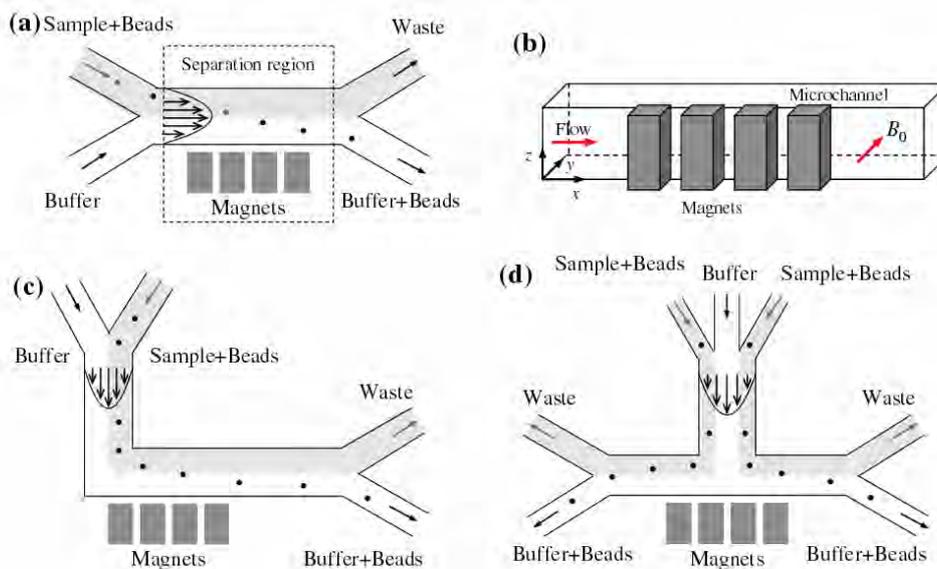


Figure 16. Schéma des différentes géométries des puces de séparation magnétophorétiques, a pour une configuration rectiligne classique, b pour une configuration rectiligne avec une séparation en 3D, c configuration en L, d configuration en T.

Outre les différences de géométrie, la taille des billes magnétiques ainsi que la température sont étudiées. En effet la taille des billes magnétiques influence la force magnétique appliquée et la température modifie la viscosité du milieu et donc les frottements subis par les billes.

La gamme de billes étudiée va de 200nm à 1µm. Il est montré que, quelque soit le design étudié, plus les billes sont grosses et plus l'efficacité de séparation est grande. La température, quand à elle est modifiée de 10 à 60 °C. Avec l'influence de la température, une autre donnée rentre en compte, c'est le mouvement Brownien. En effet plus la température est élevée et plus l'agitation thermique est grande, Wu a pu quantifier ce paramètre et montrer qu'il faut des billes d'un diamètre supérieur à 0,513 µm à 60°C pour avoir un effet positif de la température sur l'efficacité de séparation. Une fois ce critère validé, l'efficacité de séparation augmente avec la température.

Notons que les champs créés sont de l'ordre de la centaine de milliTesla et que les forces magnétiques qui s'appliquent aux billes utilisées sont de l'ordre de 500, 70, 24 et 6,5 pN pour des distances de 10, 50, 100 et 200 µm des aimants. Ces forces sont importantes mais en accord avec l'utilisation d'aimants permanents.

Pour finir avec cet article, la géométrie la plus proche de la notre est sans doute la géométrie en L. Wu et son équipe ont pu obtenir une séparation de 100% jusqu'à une vitesse de 6500µm.s⁻¹ pour des billes de 500nm et à température ambiante.

1.4.1.2 Des électroaimants permettant un champ variable mais à quel prix

Notre deuxième analyse porte sur l'article de Rong Rong, intitulé « An on-chip magnetic bead separator for biocell sorting » publié en 2006 au Journal Micromechanics and Microengineering.

L'étude est basée sur l'utilisation d'électroaimants pour réaliser une séparation magnétique en 2D. Comme illustré sur la figure 17, il est possible de faire circuler les billes vers la droite ou vers la gauche selon l'activation des bobines.

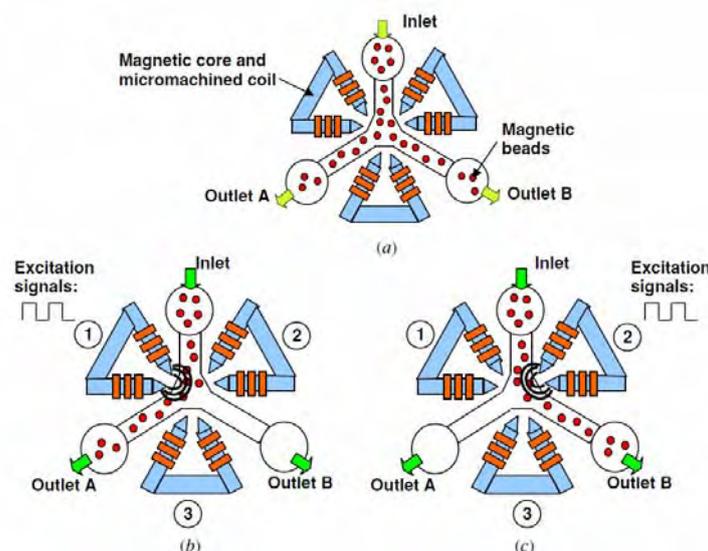


Figure 17. Principe de fonctionnement du trieur magnétique. (a) aucun courant n'est introduit, en alimentation (b) la paire de gauche (c) la paire de droite.

Le procédé de fabrication pour réaliser de tels outils est très compliqué et demande beaucoup d'étapes comme illustré figure 19. De plus, nous pouvons voir une photo des pointes magnétiques autour des canaux microfluidiques sur la figure 18, et leur taille est conséquente, bien supérieure à celle des canaux.

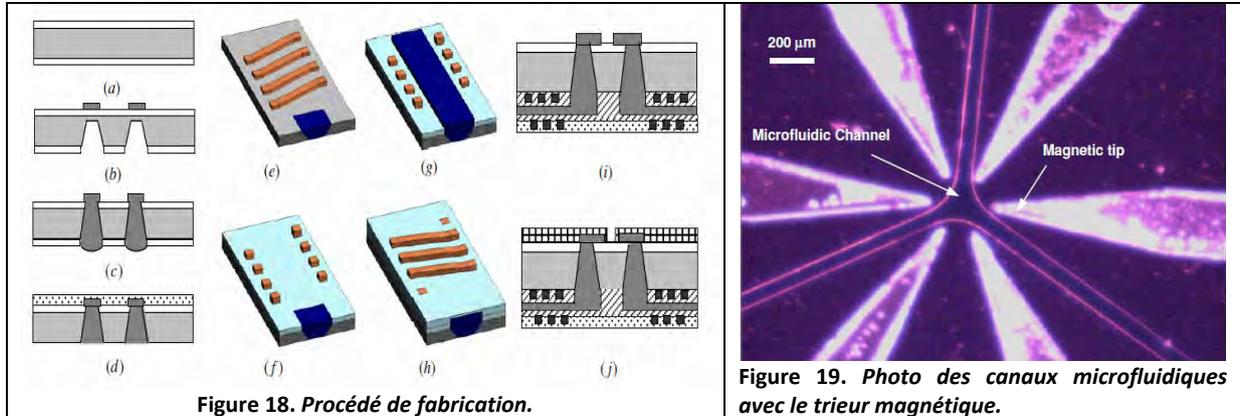


Figure 18. Procédé de fabrication.

Figure 19. Photo des canaux microfluidiques avec le trieur magnétique.

L'article montre des travaux de simulation et des travaux expérimentaux. Nous nous arrêterons sur les résultats expérimentaux. Le dispositif est constitué de pointes magnétiques avec des enroulements de 30 spires alimentées en courant continu entre 100mA et 500mA. Les canaux fluidiques font 70μm de large afin d'assurer une distance maximale de 100μm entre les électroaimants et le centre du canal. Les expériences sont réalisées avec des billes magnétiques de 8μm de chez Sphérotec. L'efficacité de séparation est mesurée en fonction du courant appliqué, si les bobines ne sont pas alimentées la séparation est de 50 % (autant de billes passent dans la canalisation de droite que celle de gauche). L'écoulement est fixé à 1μl.min⁻¹.

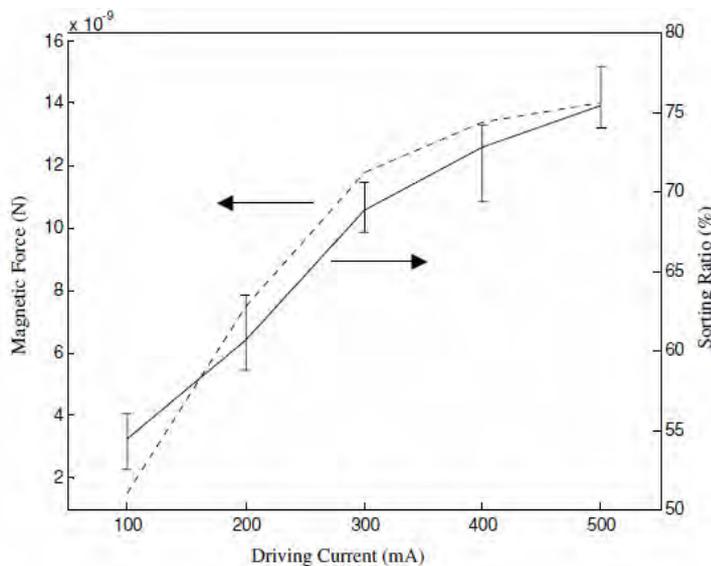


Figure 20. Taux de séparation mesuré et force magnétique calculée en fonction du courant d'alimentation.

Les résultats sont résumés figure 20. Nous voyons qu'un taux maximal de séparation de 75 % est obtenu pour un courant d'alimentation de 500mA et que par exemple pour 100mA, la force générée n'est que de 3pN donnant un taux de séparation très faible de 55%...

Ce dispositif semble bien fonctionner mais pour des débits très petits. Le problème est que pour un débit trop faible, les billes se piègent sur la surface et ne sont donc pas triées en continu. Il semble qu'il n'y ait pas de point de fonctionnement adéquat dans une telle géométrie pour un fonctionnement en continu.

1.4.1.3 Le fil de cuivre peut être la bonne solution

Pour cette troisième analyse, nous nous baserons sur les travaux de Jin-Woo Choi et notamment de son article intitulé : « A new magnetic bead-based, filterless bio-separator with planar electromagnet surfaces for integrated bio-detection systems » publié en 2000 à Sensors and Actuators B.

Le champ magnétique est cette fois créé par un courant traversant un fil de cuivre sous forme de serpentín. Le procédé de fabrication est présenté figure 21. Il présente certaines particularités. Tout d'abord au lieu de construire la canalisation fluidique au dessus de la bobine, le silicium est gravé en face arrière pour se placer à $1\mu\text{m}$ de la bobine correspondant au $1\mu\text{m}$ d'oxyde de silicium. De ce fait la bobine est au plus près de la canalisation fluidique. Choi utilise aussi une croissance de permalloy pour entourer le cuivre de la bobine afin d'augmenter le champ magnétique généré. Le serpentín est carré de $10\mu\text{m}$ de coté et les retours sont espacés de $10\mu\text{m}$. La canalisation fluidique est rectangulaire avec $800\mu\text{m}$ de large et $250\mu\text{m}$ de haut

L'étude est menée avec des billes superparamagnétiques composées d'un cœur en magnétite (Fe_3O_4) et de taille $1\mu\text{m}$ de diamètre. Les résultats traitent notamment de la vitesse maximale pour laquelle les billes peuvent être piégées en fonction de l'alimentation de la bobine. Ces résultats sont résumés figure 22.

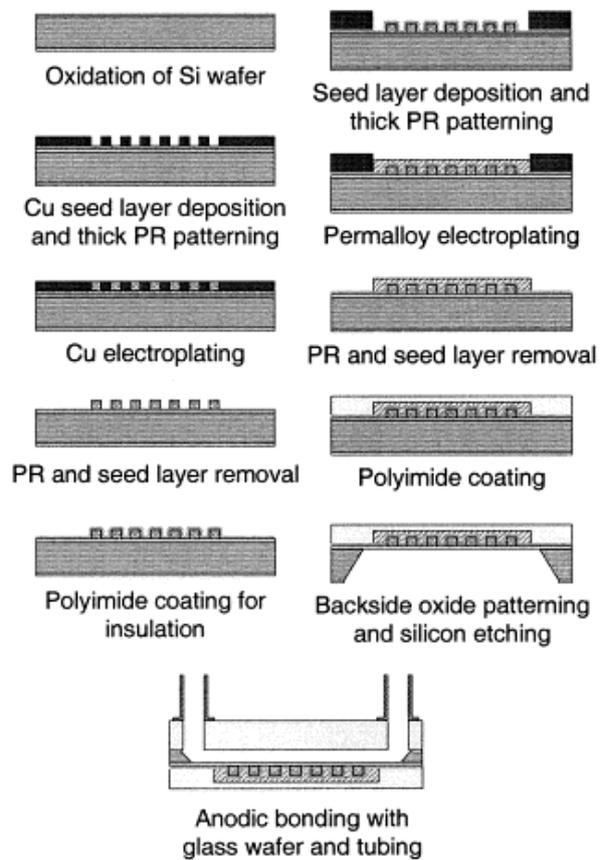


Figure 21. Procédé de fabrication du bioséparateur sans filtre par électroaimants de surface.

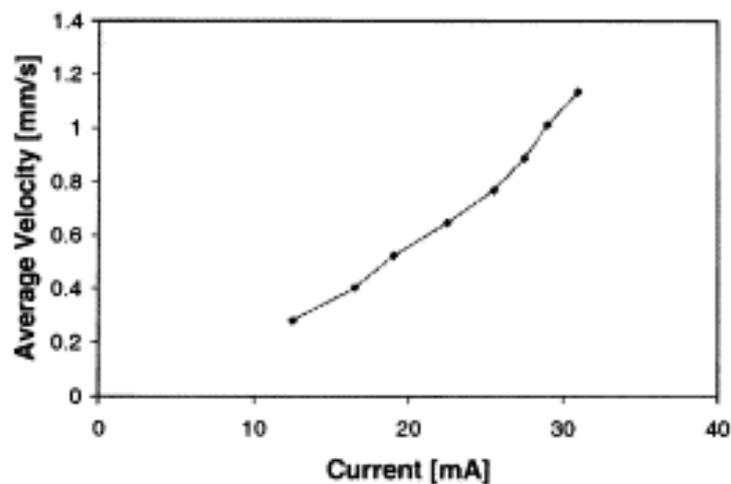


Figure 22. Vitesse maximale du fluide avant arrachement des billes immobilisées sur les électroaimants pour différents courants d'alimentation.

Nous pouvons donc noter un piégeage effectif des billes jusqu'à $1,2\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour une alimentation de la bobine de 30 mA seulement. En conclusion, l'alimentation de la bobine est faible mais permet un très bon fonctionnement à des vitesses couramment utilisées dans la microfluidique. Nous voyons ici deux points forts des travaux qui sont le positionnement au plus près de la bobine du canal microfluidique ($1\mu\text{m}$ seulement) et l'utilisation de Permaloy pour augmenter le champ magnétique.

1.4.2 Les travaux de la thèse

L'étude bibliographique montre bien que l'actionnement magnétique est une méthode pertinente pour implémenter de nombreuses fonctions au sein des laboratoires sur puce, que cet actionneur soit directement intégré à la puce ou positionné en dehors de celle-ci. Même si l'utilisation d'aimants permanents est certainement la méthode la plus simple, il est intéressant d'explorer les possibilités offertes par les « électroaimants ». Ceux-ci ont en effet la particularité de pouvoir être pilotés simplement par commande électrique, à distance sans manipulation du dispositif, d'être aussi reconfigurables et adaptables. La gamme de fonctions qu'ils peuvent ainsi générer est large et encore assez peu exploitée. Ils ont toutefois la particularité d'être planaires et de ce fait doivent être intégrés en dessous des canalisations ce qui renverse la problématique par rapport à l'utilisation d'aimants permanents. La déviation des espèces se fera ainsi non plus dans le plan du dispositif et de l'écoulement mais perpendiculairement à ceux-ci. Ce changement impose de revisiter de nombreux aspects, le premier étant bien sûr technologique, et à valider pas à pas les fonctionnalités élémentaires.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse est de développer un dispositif de séparation magnétique pour trier les monocytes et les isoler. En reprenant les différentes catégories explicitées précédemment, nous avons choisi dans ces travaux de réaliser une détection électrique, d'utiliser le magnétisme pour réaliser les étapes cruciales de séparation et de piégeage en utilisant des électroaimants sous forme de bobines situées au plus proche de la canalisation fluidique.

L'objectif est de partir d'une solution de sang complet ou d'une solution ayant subi un pré traitement comme une première séparation par taille, de mélanger cette solution avec une solution de billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps CD14. Les monocytes, une fois marquée pourront être séparés par déviation et/ou piégeage magnétique.

Une fois les monocytes séparés des autres éléments, ils seront différenciés selon leur expression CD14⁺⁺ et CD14⁺ CD16⁺. Cette différenciation se fera par accroche des monocytes marqués CD16⁺ sur une électrode fonctionnalisée antiCD16 qui permet le comptage par mesure d'impédance. Les monocytes CD14⁺⁺, donc non accrochés sur la surface fonctionnalisée et donc sur la première électrode seront piégés sur une autre électrode utilisant une autre bobine plus loin dans la canalisation sans accroche spécifique.

Le schéma global de la séparation, du piégeage et du comptage des monocytes est expliqué figure 23.

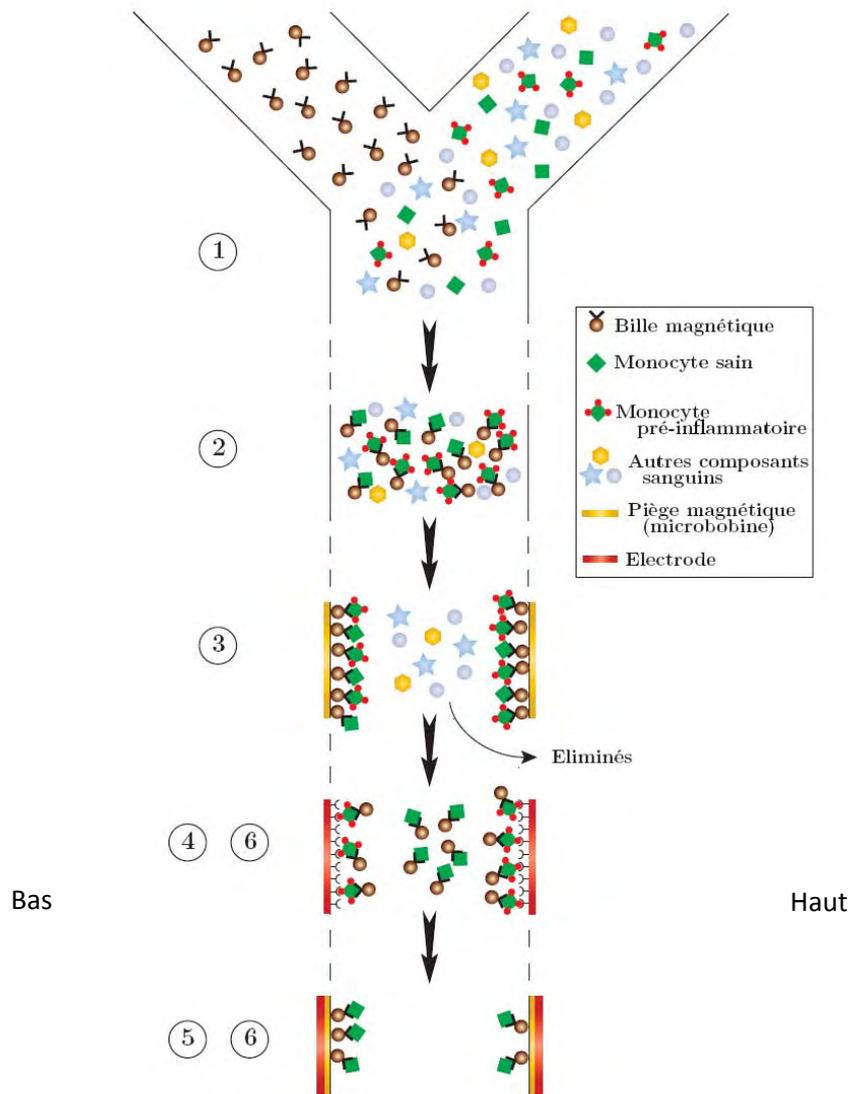


Figure 23. Schéma général du principe de fonctionnement du dispositif à réaliser

Nous voyons donc que le dispositif se compose de plusieurs fonctions bien distinctes (6 étapes), les étapes de préparation de l'échantillon, de séparation et de piégeage magnétique sont l'objet de cette thèse, les étapes de fonctionnalisation et de comptage par mesure d'impédance sont réalisées en collaboration avec le laboratoire Pharmadev et font l'objet d'une autre thèse.

La préparation de l'échantillon : Etape 1

Bien sûr, il est souhaitable d'avoir un minimum d'étapes de préparation des monocytes avant leur séparation. Mais travailler avec du sang complet est très délicat et réaliser un marquage directement avec l'échantillon sanguin risque de se révéler compliqué. C'est pourquoi il est envisageable de réaliser un premier tri hydrodynamique (décrit en annexe) afin d'effectuer une première élimination par taille et de concentrer les monocytes dans l'échantillon.

Marquage des monocytes : Etape 2

Lors de cette étape, les billes magnétiques fonctionnalisées anti-CD14 s'accrochent aux monocytes, qu'ils soient pré-inflammatoires ou non, puisqu'ils expriment tous le récepteur CD14.

L'étape de marquage des monocytes avec les billes magnétiques est une étape cruciale car si nous souhaitons récupérer le maximum de monocytes il faut atteindre des taux de marquages spécifiques importants.

La séparation et le piégeage magnétique : Etape 3

Grâce à un système de séparation/piégeage magnétique, les monocytes sont conservés dans le dispositif pendant que les autres constituants du sang sont écartés.

La création de la force magnétique se fait grâce à des microbobines. Notre choix s'est tourné vers des bobines afin de pouvoir intégrer au maximum le dispositif et surtout d'avoir la possibilité d'activer et de désactiver l'actionnement magnétique.

Le magnétisme au service du capteur : Etape 4, 5 et 6

Les monocytes sont relâchés du piégeage magnétique et amenés plus loin dans le canal microfluidique où des anticorps anti-CD16 disposés sur la paroi piègent les monocytes pré-inflammatoires. C'est un système d'électrodes qui permet de mesurer le rapport des monocytes pré-inflammatoires / sains par spectroscopie d'impédance.

Le piégeage des cellules sur les électrodes de comptage a fait l'objet d'une demande de brevet et ne sera pas exposé ici.

Il est important de comprendre que les outils mis en place durant cette thèse sont adaptables à différentes situations. En effet, il est facilement imaginable de pouvoir séparer et compter autre chose que les monocytes en marquant d'autres éléments d'intérêt. L'astuce vient du fait que le choix des composés qui seront séparés et piégés est défini par le choix des anticorps sur les billes magnétiques, or il existe une grande diversité d'anticorps permettant de cibler spécifiquement une grande diversité de composés.

Chapitre 2 : Conception, simulation et optimisation de l'actionneur magnétique

Introduction	29
2.1 La force magnétique : l'association d'un objet paramagnétique et d'un champ magnétique	30
2.1.1 Propriétés magnétiques des matériaux et billes magnétiques	30
2.1.1.1 Qu'est ce que le magnétisme ?	30
2.1.1.2 Comment caractériser les matériaux ?	31
2.1.1.3 Les billes magnétiques : une grande diversité	34
2.1.2 Création d'un champ magnétique : aimant permanent et électroaimant	35
2.1.2.1 Aimant permanent	36
2.1.2.2 Génération par induction électrique	36
2.1.3 Force magnétique ou interaction entre champ et particule	38
2.1.3.1 Expression de la force magnétique	38
2.2 Conception des bobines d'actionnement.....	40
2.2.1 Travaux antérieurs	40
2.2.2 Approfondissement de l'étude des structures	42
2.3 Optimisation des structures	45
2.3.1 Diminution du plot central.....	45
2.3.2 Augmentation du nombre de spires	48
2.3.3 Ajout d'un matériau ferromagnétique	49
2.4 Bobines en vis-à-vis et perspectives	51
Conclusion.....	57

Introduction

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'actionnement magnétique était très utilisé en micro-fluidique, dans une grande gamme d'applications : caractérisation de l'écoulement, mélange, séparation, détection ...

L'utilisation du magnétisme est particulièrement bien adapté au diagnostic médical et au traitement d'échantillon biologique de par la diversité en taille et la facilité de fonctionnaliser les billes magnétiques, ce qui permet au personnel soignant de se doter d'outils sélectifs et sensibles comme, par exemple, en fonctionnalisant les billes avec des anticorps marqueur d'un antigène particulier.

Il existe plusieurs façons de créer un champ magnétique, soit en utilisant un aimant permanent, soit un électroaimant. Nous avons privilégié cette solution en faisant passer du courant dans une bobine de cuivre.

La conception des laboratoires sur puces est délicate et nécessite une bonne compréhension des mécanismes. Nous utiliserons des modèles et des simulations pour prédire la géométrie optimale des actionneurs magnétiques que nous intégrerons.

2.1 La force magnétique : l'association d'un objet paramagnétique et d'un champ magnétique

2.1.1 Propriétés magnétiques des matériaux et billes magnétiques

2.1.1.1 Qu'est ce que le magnétisme ?

La force magnétique ou le champ magnétique sont facilement visualisables en plaçant de la limaille de fer autour d'un aimant par exemple (figure24), cette dernière va s'orienter suivant des lignes qui rejoignent les pôles de l'aimant. Les deux pôles d'un aimant se distinguent entre le pôle nord et le pôle sud, les pôles de même nature se repoussent alors que s'ils sont de natures différentes, ils s'attirent.

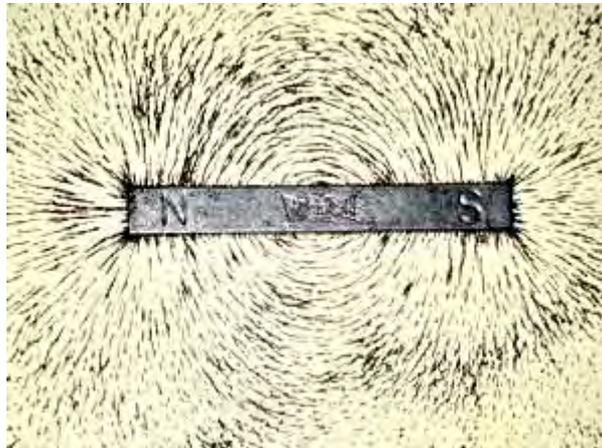


Figure 24. Illustration des lignes de champ autour d'un aimant permanent par l'utilisation de limaille de fer

Le magnétisme est créé par un déplacement de charge comme un courant dans un fil. A l'échelle microscopique et au niveau de l'atome, l'électron est une charge en mouvement qui tourne autour du noyau mais aussi sur lui-même (spin de l'électron). Il n'y a pas de sens préférentiel de la rotation de l'électron autour du noyau, donc l'effet de ce déplacement de charge sur un champ résultant est nulle car les effets de tous les électrons se compensent entre eux. Cependant ce n'est pas la même chose pour le spin. En effet, certains matériaux mis dans des conditions particulières peuvent orienter leur spin. Le magnétisme du spin est faible mais s'ajoutant à celui des voisins, il en résulte une composante non négligeable.

L'excitation magnétique est noté H et en tout point de l'espace est définie par une norme et une direction. Le champ magnétique noté B est relié à H par l'équation suivante :

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \text{ ou } \vec{B} = \mu \vec{H} \quad [2.1]$$

Avec μ_0 la perméabilité magnétique du vide, μ la perméabilité magnétique du matériau et M l'aimantation qui représente la densité de moments magnétiques induits ou permanents au sein d'un matériau.

M peut être exprimé en fonction de H et d'une grandeur caractéristique du milieu, la susceptibilité magnétique χ .

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad [2.2]$$

La perméabilité magnétique relative caractérise la faculté d'un matériau à modifier un champ magnétique et est décrite comme suit :

$$\mu_r = \mu \frac{0}{\mu_0} = (1 + \chi) \quad [2.3]$$

2.1.1.2 Comment caractériser les matériaux ?

Nous pouvons caractériser un matériau suivant sa courbe d'aimantation : en effet quand un matériau est mis dans un champ magnétique, une aimantation est induite en son sein et est décrite par une courbe d'aimantation. Il existe plusieurs façons de tracer une courbe d'aimantation, on peut tracer M en fonction de H (figure 25) ou bien B en fonction de H.

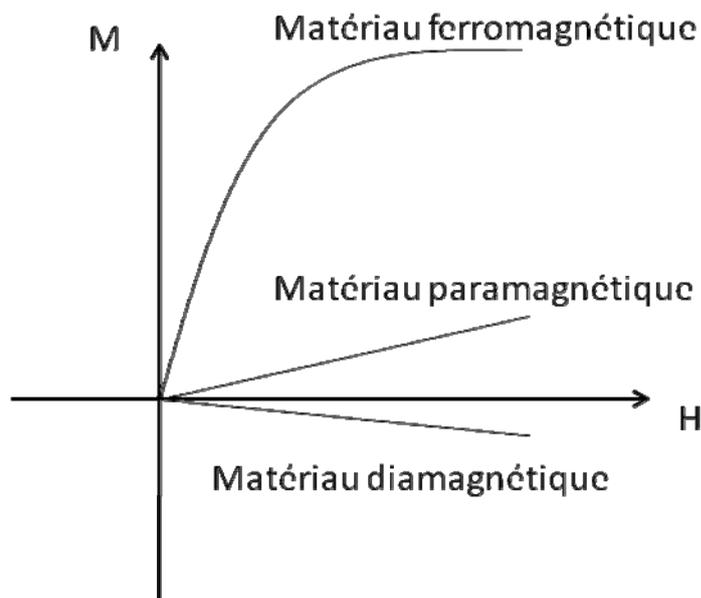


Figure 25. Courbe d'aimantation pour les trois familles de matériaux

Il existe trois comportements principaux décrits dans la figure 25, qui correspondent à trois classes de matériaux à savoir diamagnétique, paramagnétique ou ferromagnétique. L'allure de la courbe dépend de la susceptibilité magnétique du matériau. Ainsi les matériaux diamagnétiques ont une susceptibilité magnétique constante, négative et faible, inférieure à 1. Les matériaux paramagnétiques ont une susceptibilité magnétique constante et faible mais positive. Enfin les matériaux ferromagnétiques ont une susceptibilité magnétique très grande et qui varie en fonction du champ. Nous allons voir les comportements de ces différents matériaux plus en détail dans la suite.

Diamagnétisme :

Comme décrit précédemment, les matériaux diamagnétiques se caractérisent par une susceptibilité magnétique négative et faible de l'ordre de 10^{-5} , leur perméabilité magnétique relative est inférieure à 1. Ce sont les matériaux qui réagissent le moins aux champs magnétiques. En effet, sous l'action d'un champ magnétique, les moments magnétiques sont quasi nuls et la réponse opposée au champ d'excitation est très faible.

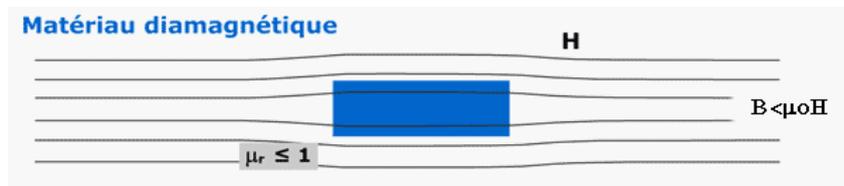


Figure 26. Visualisation des modifications des lignes du champ magnétique par l'introduction d'un élément diamagnétique

Paramagnétisme :

Les matériaux paramagnétiques se caractérisent par une susceptibilité magnétique positive et faible de l'ordre de 10^{-3} , leur perméabilité magnétique relative est supérieure à 1. Sous l'action d'un champ magnétique les moments magnétiques dans le matériau s'alignent suivant le champ et retrouvent leur état initial quand le champ est nul.

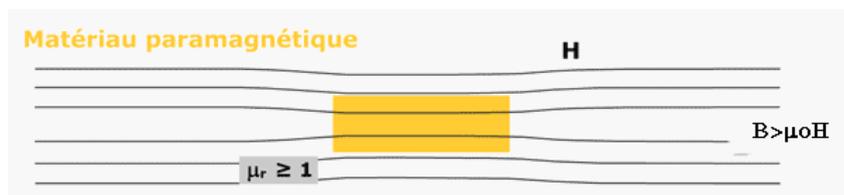


Figure 27. Visualisation des modifications des lignes du champ magnétique par l'introduction d'un élément paramagnétique

Ferromagnétisme :

Les matériaux ferromagnétiques se caractérisent par une susceptibilité magnétique positive et très grande, leur perméabilité magnétique relative est très supérieure à 1. Sous l'action d'un champ magnétique les moments magnétiques dans le matériau s'alignent suivant le champ et peuvent conserver une aimantation rémanente une fois le champ coupé.

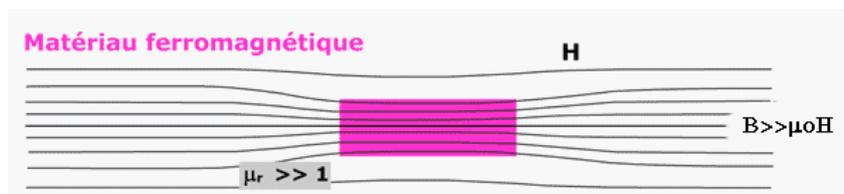


Figure 28. Visualisation des modifications des lignes du champ magnétique par l'introduction d'un élément ferromagnétique

Le comportement des matériaux ferromagnétiques dans un champ magnétique s'explique au niveau atomique. En effet, leurs atomes ont la propriété d'aligner leur spin avec ceux de leurs proches voisins. Car selon les théories quantiques, il est plus favorable énergétiquement que les spins de ces atomes s'alignent entre eux, cependant si tous les spins étaient alignés il en résulterait un fort champ extérieur au matériau ce qui nécessiterait une grande énergie. C'est pourquoi dans un matériau ferromagnétique les spins sont alignés dans des domaines appelés domaines de Weiss qui sont séparés par des parois dites de Bloch. L'aimantation dans chaque domaine est égale à l'aimantation de saturation du matériau M_s , mais l'orientation du champ étant différente dans les domaines adjacents, la résultante globale dans le matériau est nulle.

Quand un champ extérieur est appliqué aux matériaux ferromagnétiques, l'énergie fournie est suffisante pour aligner les différents domaines entre eux et dans le sens du champ appliqué. Les domaines coalescent jusqu'à l'obtention d'un seul domaine, le matériau a alors atteint son aimantation de saturation (voir figure 29).

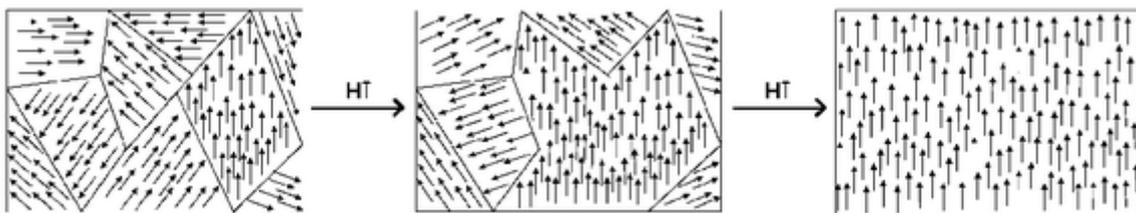


Figure 29. Phases d'aimantation d'un matériau ferromagnétique

Non seulement les matériaux ferromagnétiques ont une forte réponse quand ils sont placés dans un champ mais leur réponse dépend aussi de leur historique magnétique. En effet si nous regardons la courbe d'aimantation d'un matériau ferromagnétique plus en détail, nous pouvons voir une courbe dite de première aimantation puis l'apparition d'une hystérésis (figure 30).

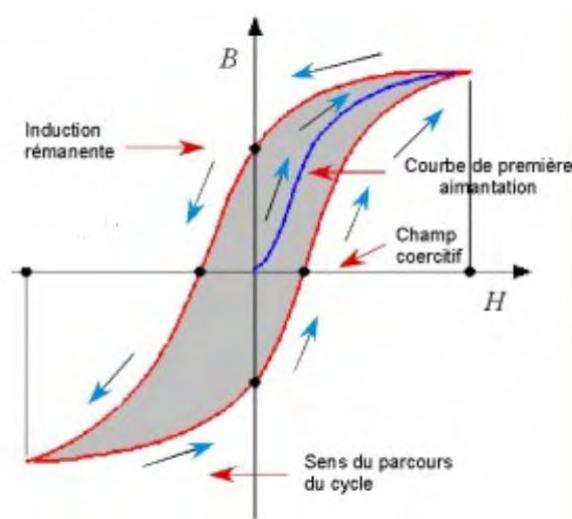


Figure 30. Exemple de courbe d'aimantation répétée pour un matériau ferromagnétique avec l'apparition d'une hystérésis

L'hystérésis coupe les axes en des points bien particuliers B_r et H_c . B_r est l'induction rémanente du matériau une fois le champ d'excitation annulé et H_c et le champ coercitif, valeur qu'il faut dépasser pour annuler le champ rémanent.

Cette non linéarité dans la courbe d'aimantation montre que la susceptibilité magnétique, et donc la perméabilité magnétique, dépend de l'intensité du champ d'excitation. Nous pouvons décrire ce comportement par la courbe de perméabilité (figure 31) qui donne μ en fonction de B ou de H .

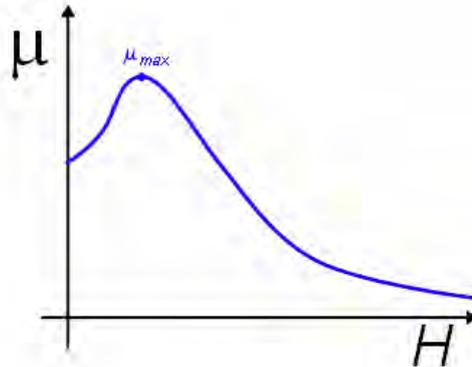


Figure 31. Exemple de courbe de perméabilité magnétique

2.1.1.3 Les billes magnétiques : une grande diversité

Les billes super-paramagnétiques sont généralement constituées de nanoparticules ferromagnétiques enveloppées dans un polymère par exemple du polystyrène. Comme la taille de la particule est réduite à l'extrême, de l'ordre de 50 ou 20 nm, il n'est énergiquement plus favorable de maintenir des domaines et des parois, le matériau n'est alors qu'un seul domaine. En dehors de toute excitation magnétique, la résultante du domaine est faible et les spins des différentes nanoparticules ne sont pas orientés dans la même direction, donc la bille est globalement non magnétique. Mais lors de l'activation dans un champ, les moments magnétiques des différentes nanoparticules s'alignent facilement et rapidement. En revanche l'alignement est perdu de nouveau lors de l'arrêt du champ, car l'agitation thermique suffit à changer l'orientation des moments magnétiques.

Il est aussi possible de déposer les particules ferromagnétiques à la surface des billes en utilisant un mélange de magnétite et de polystyrène (afin de diluer la magnétite). C'est le procédé qu'à choisi Spherotech pour la fabrication de ses billes magnétiques. Cette solution pose cependant des problèmes. En effet, la réponse magnétique de la bille dépend de sa concentration en matériaux ferromagnétiques, si seule la surface en est recouverte, une augmentation du diamètre de la bille par deux, augmente le volume par 8 et la surface seulement par 4, ainsi, il y aura deux fois moins de matériaux ferromagnétiques par unité de volume.

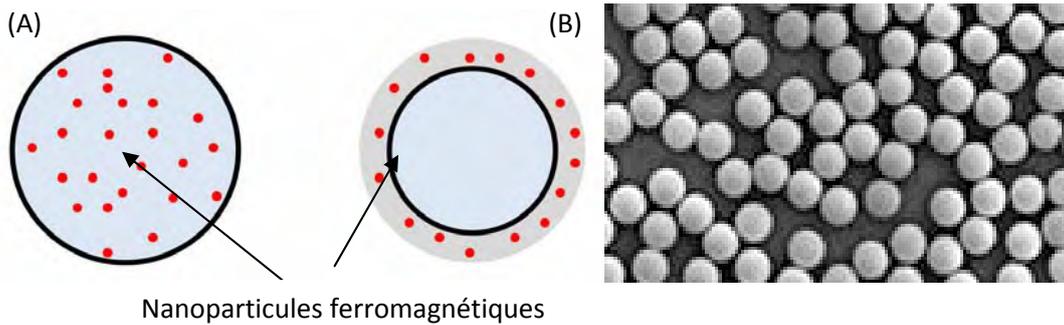


Figure 32. (A) Schémas de billes superparamagnétiques, (B) Image MEB de billes superparamagnétiques

Il existe aussi des billes ferromagnétiques constituées entièrement de matériau ferromagnétique (mise à part la fonctionnalisation de la surface) qui auront une réponse plus importante face au champ magnétique. Cependant elles n'ont plus leur faculté de revenir à un état neutre une fois le champ annulé. Les billes ferromagnétiques peuvent s'aimanter ce qui crée des agrégats de billes plus difficiles alors à re-suspendre (voir figure 33).

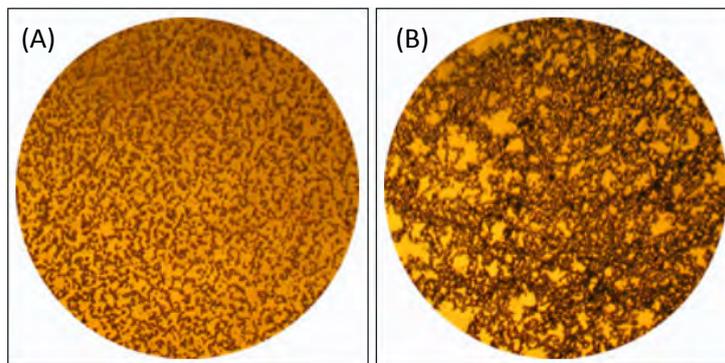


Figure 33. Comparaison de billes suspendue après aimantation de (A) billes superparamagnétiques, (B) billes ferromagnétiques

Nous ferons le choix d'utiliser des billes superparamagnétiques qui sont équivalentes à celles utilisées actuellement pour les diagnostics médicaux.

Bien que les billes soient superparamagnétiques, par souci de simplicité et par abus de langage nous utiliserons plutôt le terme plus générale de billes magnétiques.

2.1.2 Création d'un champ magnétique : aimant permanent et électroaimant

Il existe deux façons de créer un champ magnétique, soit en utilisant un aimant permanent soit en faisant circuler du courant dans un conducteur électrique.

2.1.2.1 Aimant permanent

Les aimants permanents sont des matériaux ferromagnétiques possédant un grand champ rémanent et une excitation coercitive importante, ce qui leur vaut leur dénomination de matériaux magnétiques durs.

Les aimants existent à l'état naturel, ils sont alors composés de magnétite. La magnétite est un minéral composé d'oxyde de fer ferrimagnétique, avec des traces de magnésium, de zinc, de manganèse, de nickel, de chrome, de titane, de vanadium et d'aluminium. Selon la légende elle a été découverte il y a plus de 4000 ans en Grèce par un berger dont les clous de ses souliers ont été attirés et collés sur un rocher. Dans tous les cas la magnétite est présente dans des couches rocheuses où il existe des gisements de fer. Elle peut se retrouver à la surface du sol suite à des éruptions volcaniques. Ces particules ferromagnétiques se sont alignées en suivant le champ terrestre et ont gardé leurs alignements d'où cette aimantation rémanente, mais le champ créé est faible.

Pour avoir un aimant permanent créant un fort champ, il faut le fabriquer en le saturant grâce à un électroaimant. Les propriétés magnétiques d'un aimant dépendent de sa composition et de son procédé de fabrication (recuits thermiques). Historiquement les aciers étaient utilisés comme aimant mais étaient très faibles. Nous pouvons citer comme aimants les ferrites, aimants faibles mais pas chers, les Alnico (alliage aluminium, nickel et cobalt) qui se démagnétisent facilement, les samarium/cobalt, bons mais chers et enfin les plus répandus les néodyme/fer/bore. Fabriqués à partir de terre rare (le néodyme), ils permettent la génération de champs importants ($B_r \sim 1,3T$) mais sont fragiles et se cassent facilement, ils doivent donc être manipulés avec précaution.

L'aimant est permanent mais peut perdre son aimantation s'il est placé à une température supérieure de sa température de Curie, l'excitation thermique est alors suffisante pour que les domaines de Weiss se réorientent aléatoirement. Il faut noter que les températures de Curie sont généralement importantes, 858°C pour la magnétite par exemple et de l'ordre de 310°C pour un aimant au Néodyme, Fer et Bore.

De plus, un aimant se désaimante petit à petit, avec le temps ou suite à des coups. Mais il peut toujours être réaimanté dans un champ magnétique.

2.1.2.2 Génération par induction électrique

Pour créer un champ magnétique, il est aussi possible de faire circuler du courant dans un conducteur. Ce phénomène est régi par la loi de Biot-Savart qui donne la valeur de l'induction magnétique en tout point de l'espace, par un élément conducteur parcouru par un courant I (figure34).



Figure 34. Création d'un champ magnétique par un courant circulant dans un fil

La loi s'écrit :

$$\vec{dB} = \frac{\mu_0 I d\vec{l} \wedge \vec{u}}{4\pi r^2} \quad [2.4]$$

Avec \vec{u} le vecteur unitaire perpendiculaire à dl, I le courant circulant dans le fil, μ_0 la perméabilité du vide et r la distance entre l'élément de fil dl et le point P où nous considérons le champ magnétique.

Le calcul du champ se fait en intégrant la loi de Biot-Savart sur l'ensemble des contributions des éléments de fil dl. Ce calcul peut s'effectuer simplement dans des cas particuliers comme pour un fil infini ou au centre d'une spire.

Géométrie	Schéma	Valeur du champ
Fil infini		$B_p = \frac{\mu_0 I}{2\pi r} \quad [2.5]$
Centre d'une spire		$B_o = \frac{\mu_0 I}{2R} \quad [2.6]$
Axe d'une spire		$B_o = \frac{\mu_0 I}{2R} \sin^3 \alpha \quad [2.7]$

Tableau 2. Calcul du champ magnétique pour des géométries particulières de courant circulant dans un fil

Une bobine est un enroulement de spires. Généralement une bobine est un composant en 3D, l'enroulement de fil constituant un solénoïde. Là aussi dans des cas particuliers il est facile de calculer le champ en des points particuliers.

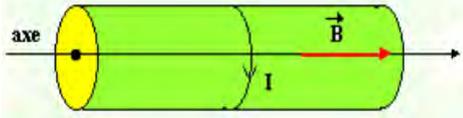
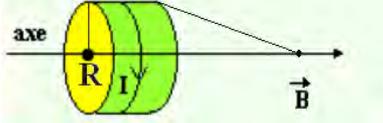
Géométrie	Schéma	Valeur du champ
Centre d'un solénoïde infini		$B = \mu_0 n I$ [2.8] Avec n le nombre de spire par mètre
Axe d'une bobine plate		$B_0 = \frac{\mu_0 N n I}{2R} \sin^2 \alpha$ [2.9] Avec N_b le nombre de spire

Tableau 3. Calcul du champ pour des géométries particulières de courant circulant dans une bobine

Pour des géométries plus complexes et en tout point de l'espace, il est plus facile d'utiliser des logiciels de simulation à éléments finis comme Maxwell ou Comsol. Nous pouvons noter toutefois que le champ maximal se situe au plus proche de la spire et en son centre dans le cas d'un fil unique comme dans le cas de la bobine de plus il est alors proportionnel au nombre de spires pour ce dernier (LeMen).

2.1.3 Force magnétique ou interaction entre champ et particule

2.1.3.1 Expression de la force magnétique

La force magnétique est l'action créée à distance sur un objet soumis à un champ. Il y a donc trois paramètres qui rentrent en jeu dans l'établissement de la force : la nature de l'objet, la nature du champ et celle du milieu où s'applique le champ.

La force magnétique appliquée à une particule non chargée placée dans un champ magnétique se calcule grâce à l'énergie magnétique d'interaction.

$$\vec{F}_m = -\nabla \vec{U}_p \quad [2.10]$$

L'énergie magnétique acquise par la particule s'écrit comme suit :

$$\vec{U}_p = -\frac{1}{2} \mu_0 \int \vec{M}_p \cdot \vec{H} dv \quad [2.11]$$

Avec μ_0 la perméabilité du vide ($\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{H} \cdot \text{m}^{-1}$).

Nous considérons que la taille des particules est suffisamment petite pour négliger les variations de champ en son sein, nous prendrons alors la valeur du champ au centre de la particule. 2.11 devient :

$$\vec{U}_p = -\frac{1}{2} V_p \mu_0 \vec{M}_p \cdot \vec{H} \quad [2.12]$$

Avec V_p le volume de la particule.

Nous avons vu dans la partie 2.1.1.1 que l'aimantation et l'excitation magnétique étaient reliées proportionnellement par la susceptibilité magnétique selon :

$$\vec{M}_p = \chi_p \vec{H} \quad [2.13]$$

Ainsi l'expression de la force magnétique devient :

$$\vec{F}_m = \mu_0 V_p \chi_p (\vec{H} \cdot \nabla) \vec{H} \quad [2.14]$$

Nous avons donc la forme de base de la force magnétique s'appliquant à une particule. Dans notre étude la particule sera une bille qui se déplace dans un fluide en écoulement.

Deux approches permettent de traiter l'influence d'un champ magnétique sur des billes qui sont dans un fluide. Soit l'option continue, où les billes sont considérées comme partie intégrante du liquide, le champ magnétique est alors modifié par la présence des billes. C'est une option plus complète mais beaucoup plus couteuse en temps de calcul. Soit l'option discontinue, où l'on regarde la trajectoire des billes dans un fluide sans que celles-ci ne modifient les propriétés du fluide, le champ choisi est alors celui qui se trouve dans le fluide à l'emplacement de la bille. L'option discontinue permet de calculer le champ sans prendre en compte la présence des billes ce qui est un avantage certain. Nous avons choisi dans ces travaux l'option discontinue.

Il faudrait toutefois, en toute rigueur, soustraire à 2.14 l'interaction entre le champ magnétique et le volume de fluide correspondant à la bille. En effet, nous pouvons voir cela comme une analogie avec la poussée d'Archimède, mais en magnétisme, en opposant les différentes densités aux différentes susceptibilités magnétiques.

$$\vec{F}_m = \mu_0 V_b (\chi_b - \chi_f) (\vec{H} \cdot \nabla) \vec{H} \quad [2.15]$$

Avec χ_f la susceptibilité du fluide porteur, or elle est négligeable car très faible devant celle de la particule ($-1,2 \cdot 10^{-5}$ pour l'eau par exemple contre 10^{-1} à 10^{-2} pour des billes superparamagnétiques).

L'excitation magnétique totale est composée de l'excitation créée par la bobine elle-même H_{bob} et par les différentes aimantations générées par l'excitation de la bobine sur les matériaux alentours, l'aimantation du fluide M_f et l'aimantation de la bille M_b .

$$\vec{M}_f = \chi_f \vec{H}_{bob} \quad \text{d'où} \quad \vec{B}_f = \mu_0 \chi_f \vec{H}_{bob} \quad [2.16]$$

$$\vec{M}_b = \chi_b \vec{H}_{bob} \quad \text{d'où} \quad \vec{B}_b = \mu_0 \chi_b \vec{H}_{bob} \quad [2.17]$$

Etant données des valeurs des susceptibilités magnétiques, nous pouvons omettre les effets dus au fluide et à la bille. Nous avons donc :

$$\vec{B}_{total} = \vec{B}_{bob} = \mu_0 \vec{H}_{bob} \quad [2.18]$$

Nous pouvons ici remplacer l'excitation magnétique H par le champ magnétique B pour plus de simplicité par la suite.

$$\vec{F}_m = \frac{V_b \chi_b}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} \quad [2.19]$$

2.2 Conception des bobines d'actionnement

2.2.1 Travaux antérieurs

Les travaux de cette thèse s'inscrivent en continuité des travaux de Rémi Fulcrand (Fulcrand, 2009). Dans cette thèse, plusieurs géométries de bobines permettant la création de la force magnétique avaient été retenues. Nous sommes repartis de ces travaux auxquels nous avons apporté un certain nombre de modifications.

Les résultats obtenus pour des bobines en cuivre avec des spires de 10µm de large, 5µm de haut et 10µm d'espace entre spires sont rappelés dans les tableaux 4 et 5. Toutes les valeurs sont données à une distance de 15µm au dessus de la bobine et avec une alimentation en courant de 100mA.

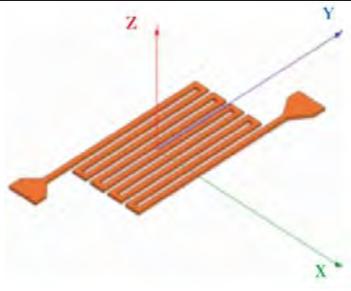
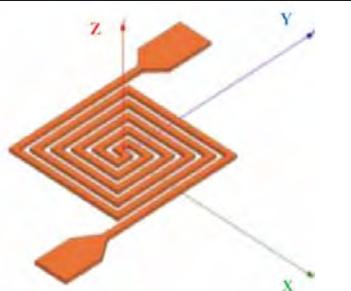
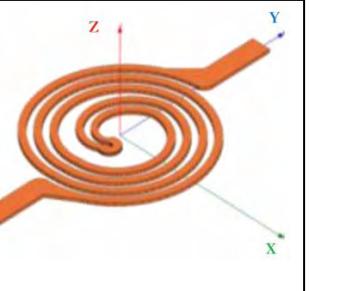
	Serpentin	Double carrée	Double circulaire
Schéma			
Champ à 15 µm	$B_{Xmax} = 1,25mT$ $B_{Zmax} = 1,15mT$	$B_{Xmax} = 1,48mT$ $B_{Zmax} = 1,27mT$	$B_{Xmax} = 1,38mT$ $B_{Zmax} = 1,35mT$
Gradient à 15 µm (T/m)	$dB_x/dx = 250$ $dB_z/dx = 225$ $dB_x/dz = 200$ $dB_z/dz = 180$	$dB_x/dx = 150$ $dB_z/dx = 220$ $dB_x/dz = 200$ $dB_z/dz = 150$	$dB_x/dx = 150$ $dB_z/dx = 170$ $dB_x/dz = 175$ $dB_z/dz = 150$

Tableau 4. Récapitulatif des simulations pour les designs serpentin, double carrée et double circulaire

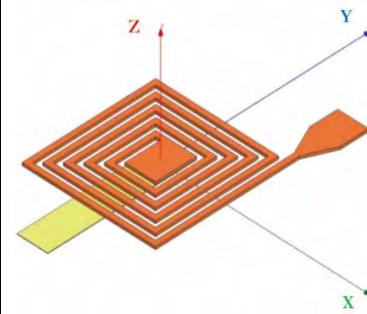
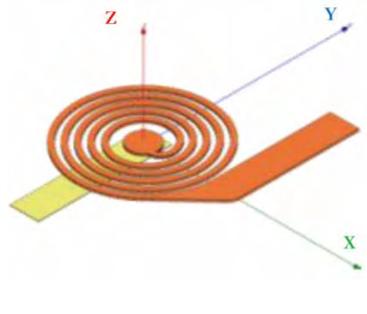
	Carrée	Circulaire
Schéma		
Champ à 15 µm	$B_{Xmax} = 2,88mT$ $B_{Zmax} = 4,67mT$	$B_{Xmax} = 2,75mT$ $B_{Zmax} = 4,35mT$
Gradient à 15 µm (T/m)	$dB_x/dx = 125$ $dB_z/dx = 150$ $dB_x/dz = 150$ $dB_z/dz = 125$	$dB_x/dx = 100$ $dB_z/dx = 125$ $dB_x/dz = 125$ $dB_z/dz = 100$

Tableau 5. Récapitulatif des simulations pour les carrée et circulaire

Dans les différents designs testés nous pouvons noter que la bobine carrée produit le champ le plus fort mais que c'est le design serpentin qui donne les gradients les plus grands. Nous avons vu que la force magnétique dépend de la valeur du champ et de celle du gradient et dans notre cas c'est le design carré qui permet la plus grande force magnétique. Ce design sera donc privilégié par rapport aux autres.

D'autres paramètres ont pu être testés à savoir les dimensions des spires (largeur et hauteur), leur espacement et le nombre de spires (voir tableau 6).

Largeur * Hauteur * Espacement	10 μ m * 5 μ m * 10 μ m	5 μ m * 5 μ m * 5 μ m
Champ	$B_{x_{max}} = 2,88\text{mT}$ $B_{z_{max}} = 4,67\text{mT}$	$B_{x_{max}} = 4,59\text{mT}$ $B_{z_{max}} = 6,48\text{mT}$
Gradient (T/m)	$dB_x/dx = 125$ $dB_z/dx = 150$ $dB_x/dz = 150$ $dB_z/dz = 125$	$dB_x/dx = 225$ $dB_z/dx = 300$ $dB_x/dz = 225$ $dB_z/dz = 225$

Tableau 6. Récapitulatif des simulations pour l'étude des paramètres de la largeur et de l'espacement des spires

Il en ressort que, plus la densité de courant est importante et plus le champ produit par la bobine est grand, il faut ainsi réduire la largeur des spires au maximum. De plus, rapprocher les spires favorise le phénomène de superposition.

Le paramètre de la hauteur des spires a pu lui aussi être testé et plus les spires sont hautes (avec la même densité de courant), plus le champ est grand. Nous notons une augmentation de 2,3 fois la valeur initiale du champ en doublant la hauteur des spires (voir tableau 7).

Largeur * Hauteur * Espacement	10 μ m * 5 μ m * 10 μ m	10 μ m * 10 μ m * 10 μ m
Champ	$B_{x_{max}} = 2,88\text{mT}$ $B_{z_{max}} = 4,67\text{mT}$	$B_{x_{max}} = 6,71\text{mT}$ $B_{z_{max}} = 10,74\text{mT}$

Tableau 7. Récapitulatif des simulations pour l'étude du paramètre de la hauteur des spires

Cependant nous verrons dans la suite que techniquement, la réalisation de spires très hautes et rapprochées est limitée. Nous devons donc nous contenter d'un design avec des spires de 5 μ m de large, 5 μ m de haut et 5 μ m d'espacement.

Un autre paramètre a été testé, c'est le nombre de spires : l'augmentation du nombre de spires n'augmente que peu la valeur du champ résultant mais permet de générer un champ sur une plus grande surface.

Nous pouvons noter d'ores et déjà que le choix d'une bobine spirale et non méandre impose un niveau supplémentaire de métal pour amener le courant au centre de la bobine et donc des étapes de fabrication supplémentaires.

2.2.2 Approfondissement de l'étude des structures

Nous avons fait le choix de reprendre quelques simulations pour confirmer le choix du design de base. Les simulations ont été réalisées avec COMSOL Multiphysics afin de pouvoir simuler les couplages entre les effets magnétiques et fluidiques. Nous avons, dans un premier temps, validé la supériorité du design simple spirale carré de la bobine vis-à-vis des autres designs. Nous avons donc souhaité approfondir les simulations avec des spires de $5\mu\text{m}$ de large, $5\mu\text{m}$ de haut et espacées de $5\mu\text{m}$.

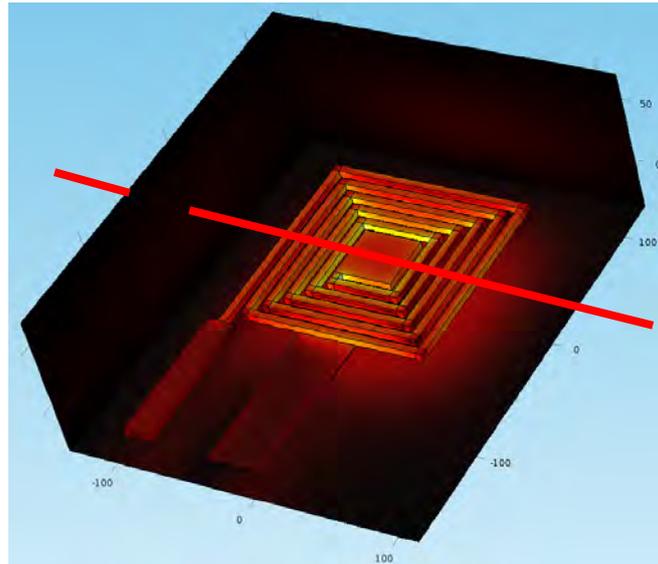
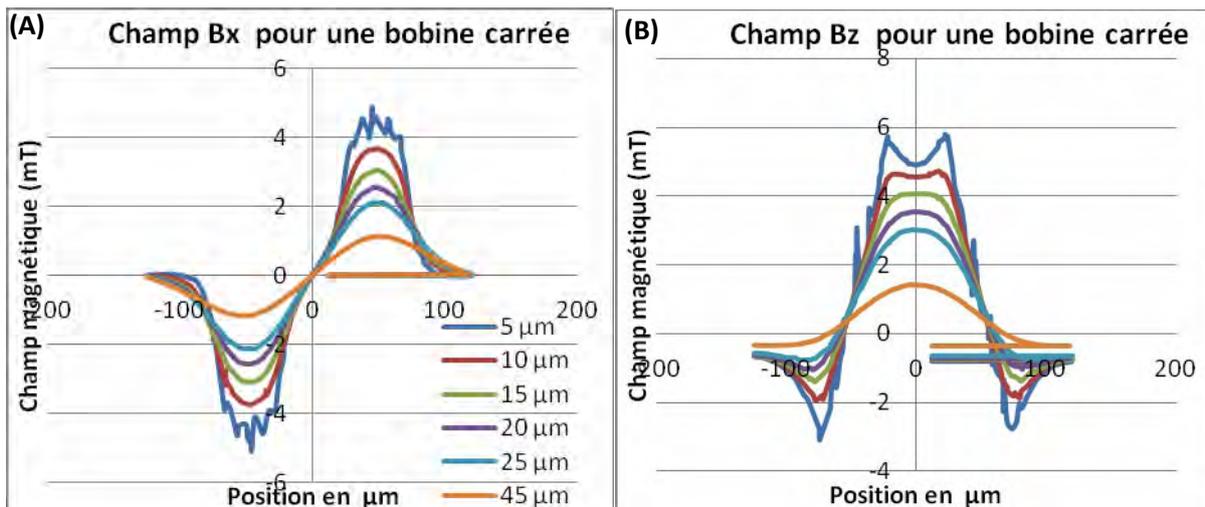


Figure 35. Schéma d'une bobine pour une simulation COMSOL

Nous avons regardé, en particulier, les variations du champ et de son gradient selon l'axe de l'écoulement x , au centre de la bobine pour différentes valeurs de z , correspondant à différentes hauteurs au dessus de la bobine.



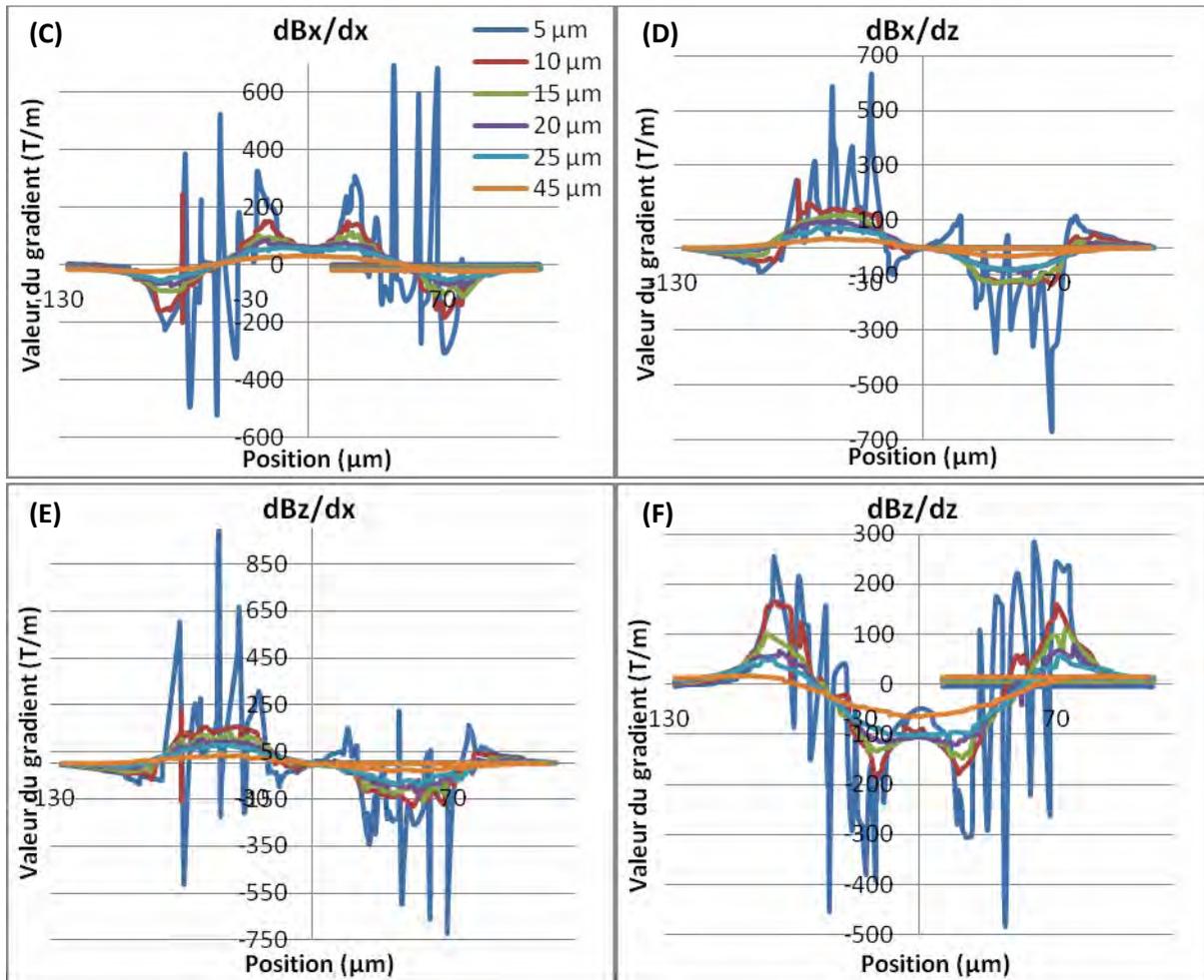


Figure 36. Simulations pour une bobine de 5 tours de spires de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ espacées de $5\mu\text{m}$, pour une alimentation de 0,1. (A) Le champ selon x, (B) le champ selon z, (C) Le gradient dBx/dx , (D) le gradient dBx/dz , (E) le gradient dBz/dx , (F) le gradient dBz/dz .

Les valeurs des hauteurs de $5\mu\text{m}$ à $45\mu\text{m}$ correspondent à la hauteur à partir du dessus de la bobine, si nous regardons les variations du champ et de son gradient nous notons une rapide diminution avec l'éloignement de la bobine et plus particulièrement sur les valeurs de gradient. Nous pouvons avoir un résultat plus quantitatif en regardant la variation des valeurs maximales du champ et de son gradient, données qui sont regroupées dans le tableau 8.

	Max Bx (mT)	Max Bz (mT)	Max dBx/dx (T/m)	Max dBx/dz (T/m)	Max dBz/dx (T/m)	Max dBz/dz (T/m)
$5\mu\text{m}$	4.88	5.80	693	633	991	285
$10\mu\text{m}$	3.70	4.74	244	242	221	165
$15\mu\text{m}$	3.07	4.07	115	123	133	111
$20\mu\text{m}$	2.56	3.55	86	93	99	77
$25\mu\text{m}$	2.13	3.02	62	77	81	57
$45\mu\text{m}$	1.12	1.43	36	35	40	16

Tableau 8. Valeurs maximales du champ et du gradient obtenus pour une bobine 5 tours avec des spires de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ espacées de $5\mu\text{m}$.

Nous notons que le champ diminue d'un facteur 4 entre 5 μm et 45 μm au dessus de la bobine et que son gradient lui diminue d'un facteur 20. Notons aussi, donc, que l'influence du champ pour une distance supérieure à 50 μm est très faible.

Nous avons vu la variation du champ et de son gradient regardons maintenant la force magnétique (figure 37) créée sur une bille de 5 μm de diamètre et de susceptibilité magnétique χ égale à 0,1 (ces paramètres étant les plus proches de nos conditions expérimentales).

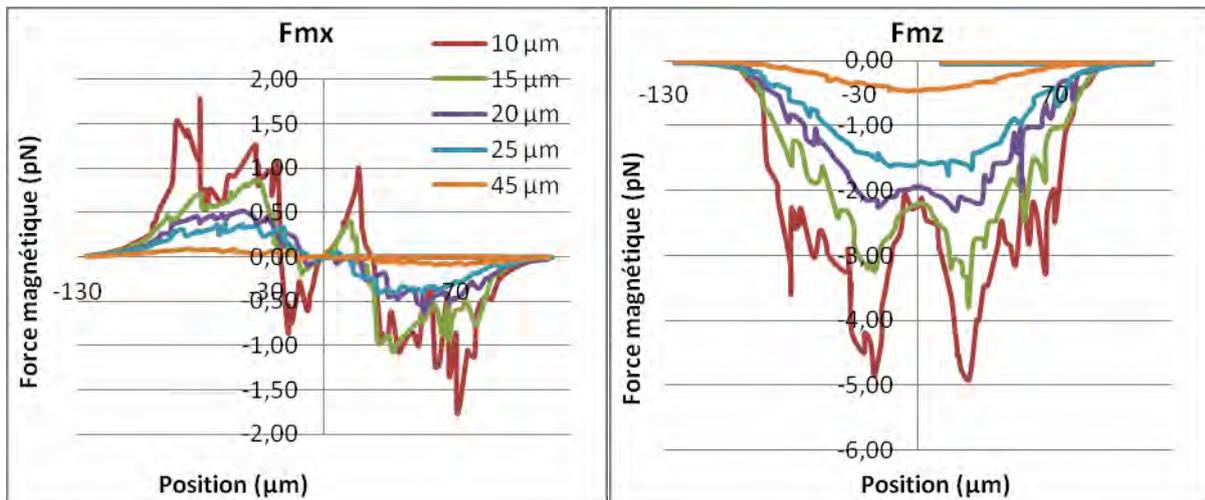


Figure 37. Résultats de simulations pour le calcul de la force magnétique pour le design une bobine de 5 tours avec des spires de 5 μm *5 μm et espacées de 5 μm .

La force créée à 5 μm au-dessus de la bobine est très élevée (~10pN) Nous focaliserons l'étude sur des éloignements plus importants qui conditionnent fortement l'efficacité de piégeage.

L'intérêt ici est de regarder en particulier la composante en z de la force qui attire la particule vers le fond de la canalisation et celle en x qui va ralentir la particule en s'opposant à l'écoulement. Les valeurs minimales sont regroupées dans le tableau 9.

	Min Fmx (pN)	Min Fmz (pN)
5 μm	-8,55	-26,10
10 μm	-5,00	-4,90
15 μm	-1,07	-3,78
20 μm	-0,62	-2,31
25 μm	-0,41	-1,77
45 μm	-0,09	-0,48

Tableau 9. Valeurs minimales de la force magnétique pour le design une bobine de 5 tours avec des spires de 5 μm *5 μm et espacées de 5 μm .

La force magnétique est de l'ordre de quelques pN de plus elle diminue très vite avec l'éloignement de la bobine ainsi la force en z est 50 fois plus faible à 45 μm qu'à 5 μm au dessus de la bobine et celle en x près de 100 fois plus faible.

2.3 Optimisation des structures

Les simulations précédentes montrent clairement une limitation forte, à savoir, que le champ généré par une bobine est faible et diminue très rapidement quand nous nous éloignons de la bobine : à $50\mu\text{m}$ le champ résiduel est négligeable.

Nous allons donc chercher à augmenter cette limite d'action dans la hauteur de la canalisation mais aussi à multiplier la force magnétique en tout point du canal.

2.3.1 Diminution du plot central

Une des première idées que nous avons eu est de diminuer la taille du plot central. En effet dans les travaux précédents, le plot central avait une taille de $60\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$. Le plot central permet de prendre le contact entre la piste d'amenée du courant en or en dessous et la bobine en cuivre au dessus. Cette taille n'est fixée que par la faisabilité technologique. Nous avons simulé plusieurs tailles de plot variant de $40\mu\text{m}$ jusqu'à $5\mu\text{m}$. Nous nous plaçons à une hauteur de $15\mu\text{m}$ au dessus de la bobine.

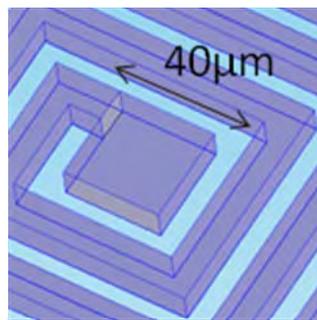
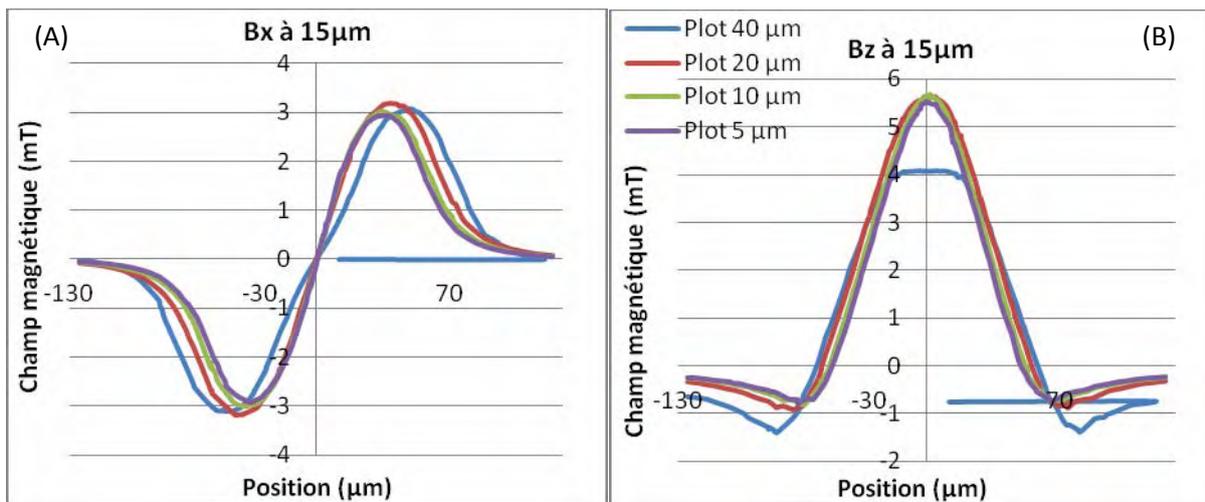


Figure 38. Illustration du plot central de la bobine



Les modifications du champ sont faibles, seule la composante B_z est notablement modifiée au centre de la bobine, où la « pointe » du champ n'est plus « cassée » par le plot (figure 39).

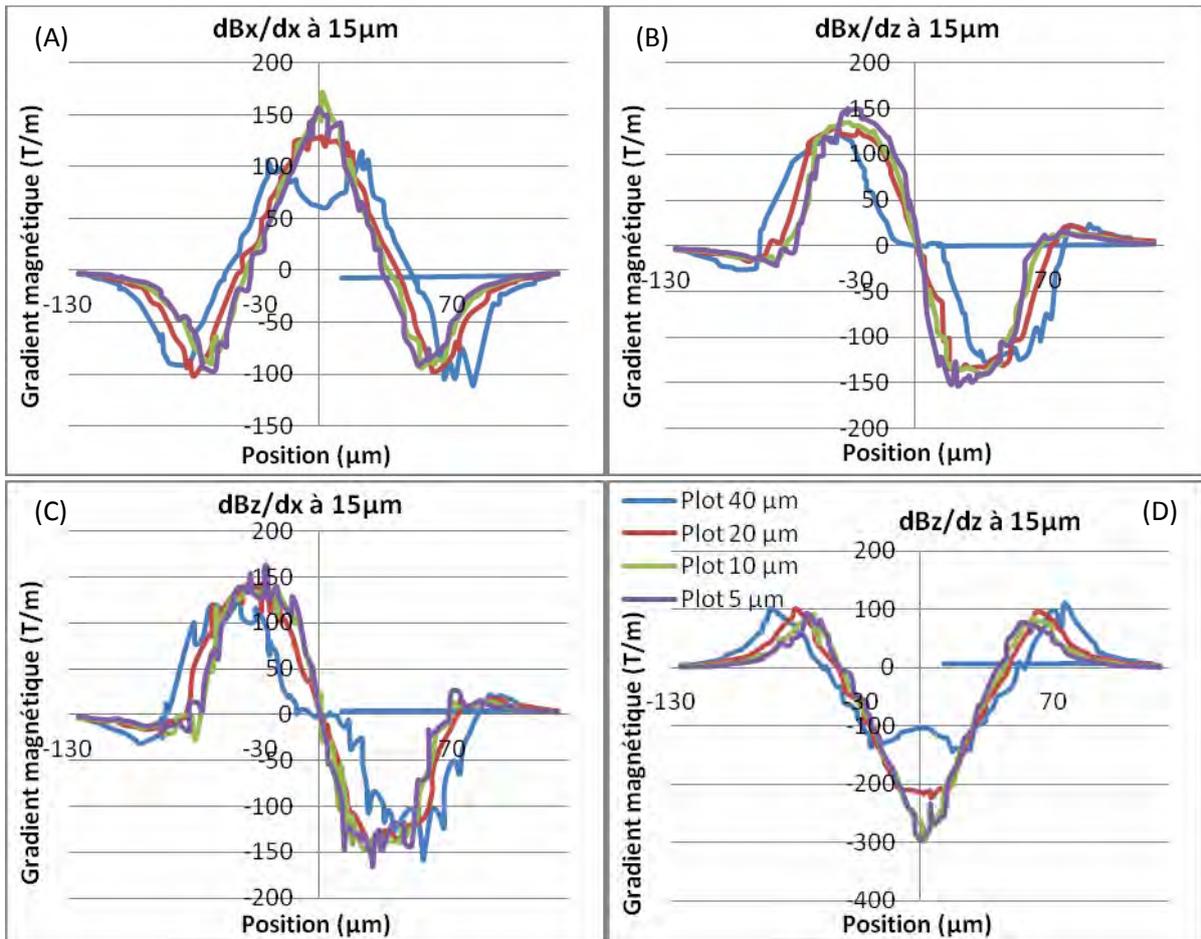


Figure 40. Résultats de simulation pour le design une bobine de 5 tours avec des spires de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ et espacées de $5\mu\text{m}$ et un plot variant de $40\mu\text{m}$ à $5\mu\text{m}$ (A) le gradient dBx/dx , (B) le gradient dBx/dz , (C) le gradient dBz/dx , (D) le gradient dBz/dz à une hauteur de $15\mu\text{m}$ au dessus de la bobine.

Dans le cas du gradient, les conclusions sont comparables, les modifications apparaissent localement autour du zéro (figure 40).

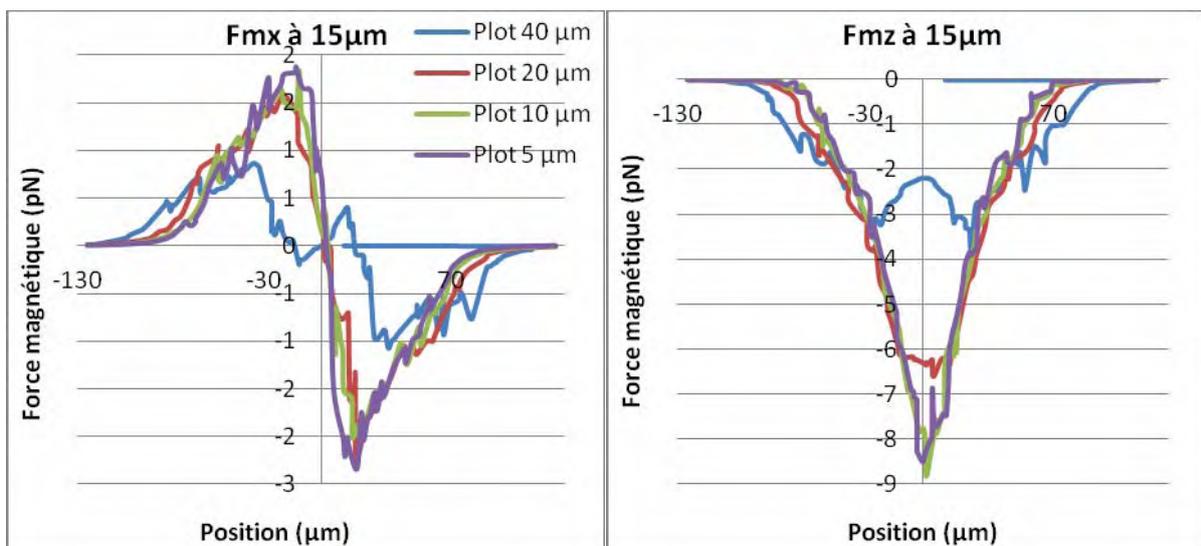


Figure 41. Résultats de simulation pour le design une bobine de 5 tours avec des spires de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ et espacées de $5\mu\text{m}$ et un plot variant de $40\mu\text{m}$ à $5\mu\text{m}$ (A) la force F_{mx} , (B) la force F_{mz} à une hauteur de $15\mu\text{m}$ au dessus de la bobine.

Nous avons vu que l'impact de la diminution de la taille du plot central sur le champ ou son gradient était limité mais sur la force, en revanche, l'impact est bien plus présent, comme nous pouvons le vérifier dans le tableau 10 qui regroupent les valeurs maximales ou minimales des précédentes courbes.

	Plot de 40 μm	Plot de 20 μm	Plot de 10 μm	Plot de 5 μm
Champ max (mT)	$B_x = 3,07$ $B_z = 4,07$	$B_x = 3,18$ $B_z = 5,65$	$B_x = 3,02$ $B_z = 5,67$	$B_x = 2,92$ $B_z = 5,52$
Gradient max (T/m)	$dB_x/dx = 115$ $dB_x/dz = 123$ $dB_z/dx = 133$ $dB_z/dz = 111$	$dB_x/dx = 132$ $dB_x/dz = 128$ $dB_z/dx = 142$ $dB_z/dz = 101$	$dB_x/dx = 172$ $dB_x/dz = 135$ $dB_z/dx = 138$ $dB_z/dz = 92$	$dB_x/dx = 157$ $dB_x/dz = 151$ $dB_z/dx = 163$ $dB_z/dz = 95$
Force min (pN)	$F_{mx} = -1,07$ $F_{mz} = -3,78$	$F_{mx} = -2,31$ $F_{mz} = -6,61$	$F_{mx} = -2,02$ $F_{mz} = -8,82$	$F_{mx} = -2,34$ $F_{mz} = -8,50$

Tableau 10. Récapitulatif des valeurs maximales de champ, gradient et force magnétique générées par la bobine en fonction de la taille du plot central.

L'influence du changement de taille du plot central est très localisée. Le champ et le gradient augmentent de façon certaine en $x=0$, la force magnétique est elle augmentée de plus d'un facteur 2.

En regardant la variation de la force créée par la bobine en fonction de la taille du plot et de l'écart à la bobine, nous constatons la même tendance (figure 42).

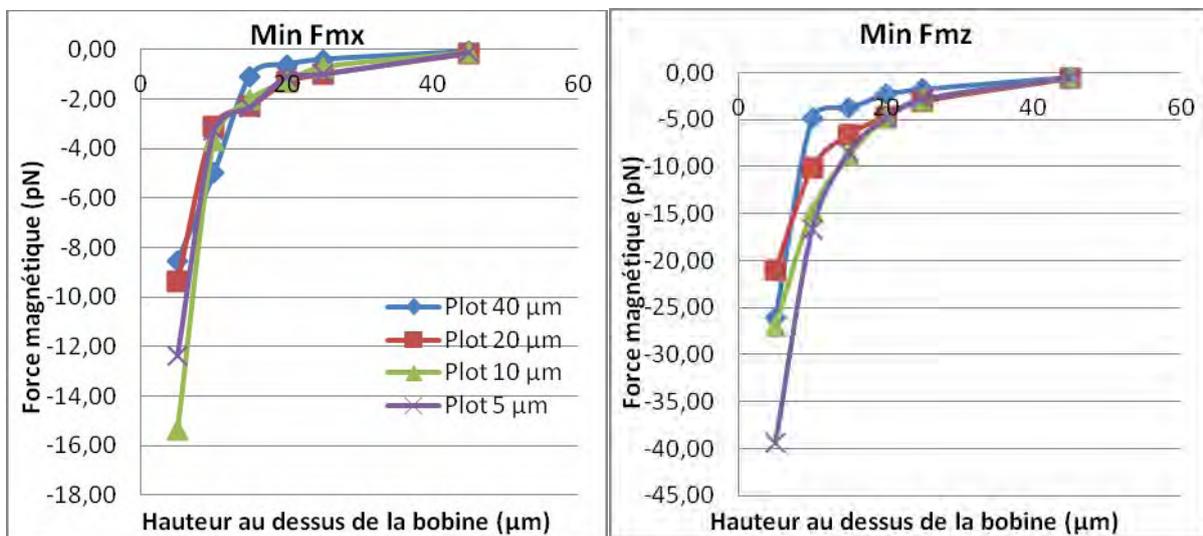


Figure 42. Evolution du minimum de la force magnétique avec l'éloignement à la bobine en fonction de la taille du plot central.

L'augmentation de la force magnétique se fait très localement autour du centre de la bobine mais aussi proche de la bobine ainsi la force devient toujours négligeable à 50 μm au dessus de la bobine.

La diminution de la taille du plot central est donc une mesure efficace localement au centre de la bobine, cela est très utile dans une optique de piégeage des particules afin de maintenir les particules sur la bobine mais ne propose pas de solution à grande distance de la bobine.

2.3.2 Augmentation du nombre de spires

Nous nous sommes intéressés à l'impact du nombre de tours sur la force magnétique. La conclusion des premiers travaux réalisés par Rémy Fulcrand est que, une augmentation du nombre de spires élargit la surface où s'applique le champ sans réelle modification de sa valeur. Nous allons apporter plus de précisions ici.

Pour plus de rapidité et de simplicité dans les calculs, nous avons réalisé les simulations en 2D. Les résultats ne sont pas directement comparables avec une simulation en 3D mais les ordres de grandeur sont les mêmes et il est tout à fait pertinent de comparer des simulations 2D entre elles.

Les paramètres de simulations restent les mêmes avec une alimentation de la bobine à 0,1A. Nous regardons dans un premier temps l'influence du nombre de tours sur le champ magnétique produit par la bobine. Nous nous plaçons à 15 μm au dessus de la bobine dans les différentes configurations. Les données extraites de COMSOL sont représentées sur la figure 43.

Deux constats sont à faire : la zone d'action de la bobine est, effectivement, d'autant plus grande que la bobine l'est, mais ce n'est pas tout, les valeurs maximales des champs sont elles aussi plus importantes. On retrouve ici le résultat classique pour un solénoïde infini, dont le champ magnétique est proportionnel aux nombres de spires, (paragraphe 2.1.2.2).

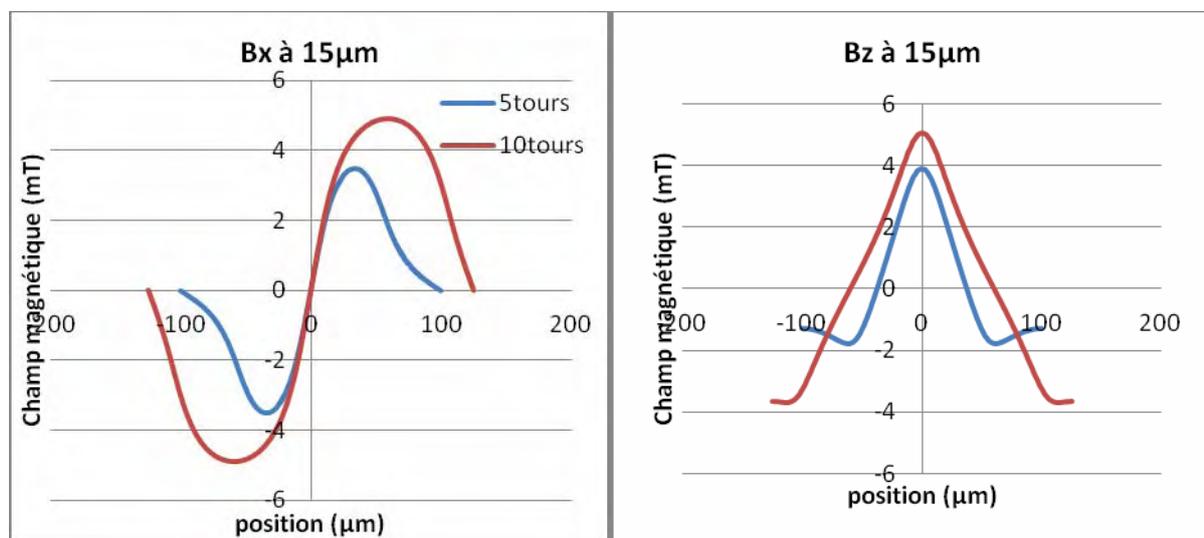


Figure 43. Résultats de simulation montrant l'influence du nombre de tours de la bobine sur le champ magnétique.

Ce gain dans la force varie en fonction de la position verticale au dessus de la bobine. Dans la tranche qui nous intéresse de 5 à 50 μm au dessus de la bobine, le gain vaut en moyenne 1.4x la valeur nominale des 5tours.

En ce qui concerne la force magnétique, elle aussi apparaît plus grande pour le design avec 10 spires, avec une multiplication de la force par 1,6 en moyenne. Si nous représentons les variations de la force magnétique le long de l'axe x pour une hauteur fixée comme illustré figure 44 nous notons que

l'allure de la force est très différente entre le design 10 spires et le design 5 spires. Ce n'est, néanmoins, pas dérangeant pour l'efficacité du dispositif.

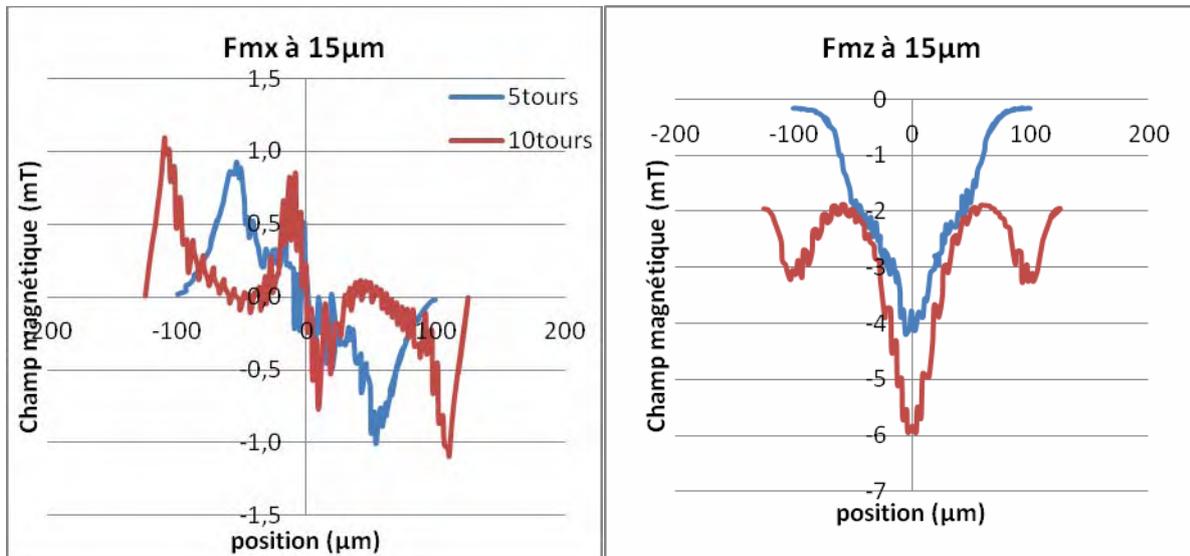


Figure 44. Résultats de simulation montrant l'influence du nombre de tours de la bobine sur la force magnétique.

En conclusion, le nombre de spires influence la zone d'action de la bobine mais aussi la valeur de la force magnétique générée. Créer plus de spires peut être une solution pour augmenter la force magnétique mais il faut relativiser par l'augmentation de la résistance et donc de l'échauffement que cela entraîne.

2.3.3 Ajout d'un matériau ferromagnétique

Une autre possibilité pour augmenter le champ magnétique, est de placer, un élément ferromagnétique à proximité de la bobine celui-ci peut être des micro-plots, des nano-plots, une plaque...

En effet, les matériaux ferromagnétiques sont caractérisés par une forte perméabilité magnétique ou encore une grande susceptibilité magnétique. De ce fait, quand ils sont soumis à un champ magnétique, une aimantation est créée, comme nous avons pu le voir dans le paragraphe 2.1.1.1, et le champ résultant est amplifié.

Toutefois, nous souhaitons conserver la possibilité « d'éteindre » le champ magnétique comme et avec les bobines. Ainsi le matériau utilisé doit présenter un faible champ coercitif pour ne pas s'aimanter de façon permanente et une grande perméabilité magnétique afin d'avoir la plus forte aimantation possible.

Plusieurs études ont déjà été réalisées sur l'implantation de nano-plots (Y-Y. Huang, 2012) ou des micro-plots (P. Tseng, 2009) (Q. Ramadan, 2006). Cependant les modifications restent très locales, de l'ordre du μm au dessus des bobines, et nous retrouvons ce comportement lors de nos simulations. Nous sommes donc partis sur une plaque ferromagnétique positionnée en dessous de la bobine, et de même taille que celle-ci.

Nous avons procédé à des simulations avec COMSOL pour voir l'influence d'une plaque ferromagnétique positionnée en dessous de la canalisation. Nous avons choisi une plaque de $7\mu\text{m}$ d'épaisseur située à $3\mu\text{m}$ de la bobine. Tout comme pour l'étude sur l'influence du nombre de tours nous choisissons de travailler en 2D. Nous avons choisi une susceptibilité magnétique de 400 qui correspond à un ordre de grandeur raisonnable que nous pourrions obtenir avec des matériaux réalisés au laboratoire.

Nous visualisons d'abord l'influence sur le champ magnétique. L'ajout d'une plaque ferromagnétique permet d'augmenter la valeur du champ de façon quasi constante sur notre gamme d'étude, c'est-à-dire de 5 à $50\mu\text{m}$ au dessus de la bobine. Le champ est alors multiplié par 1,5. De plus, nous pouvons voir, figure 45, que l'allure du champ n'est pas modifié.

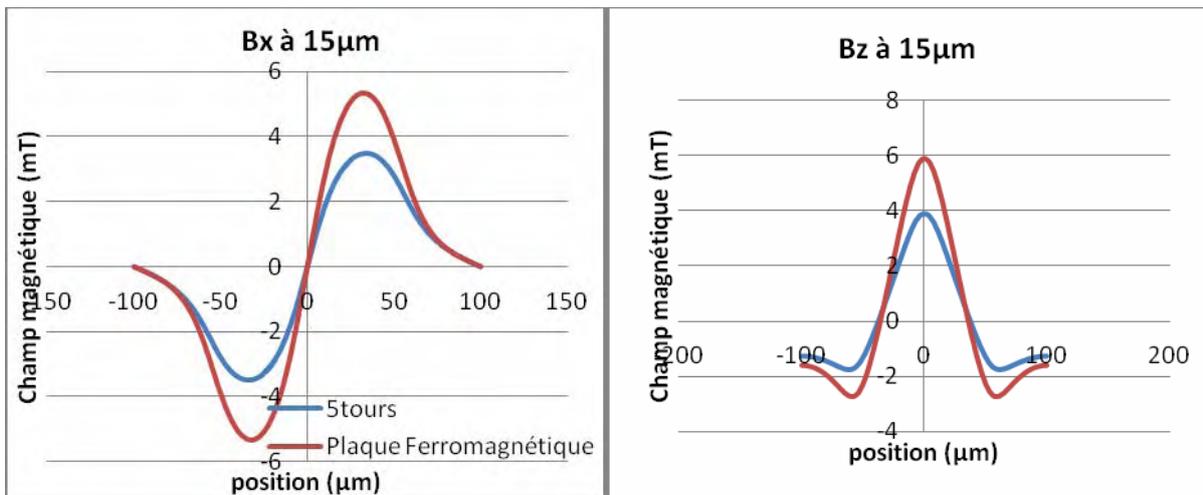


Figure 45. Résultats de simulation montrant l'influence de l'ajout d'une plaque ferromagnétique sur le champ magnétique.

La force magnétique est, elle, plus que doublée (multipliée par 2,16) entre le design sans plaque ferromagnétique et avec. De plus comme pour le champ magnétique, l'allure de la force selon l'axe x reste inchangée.

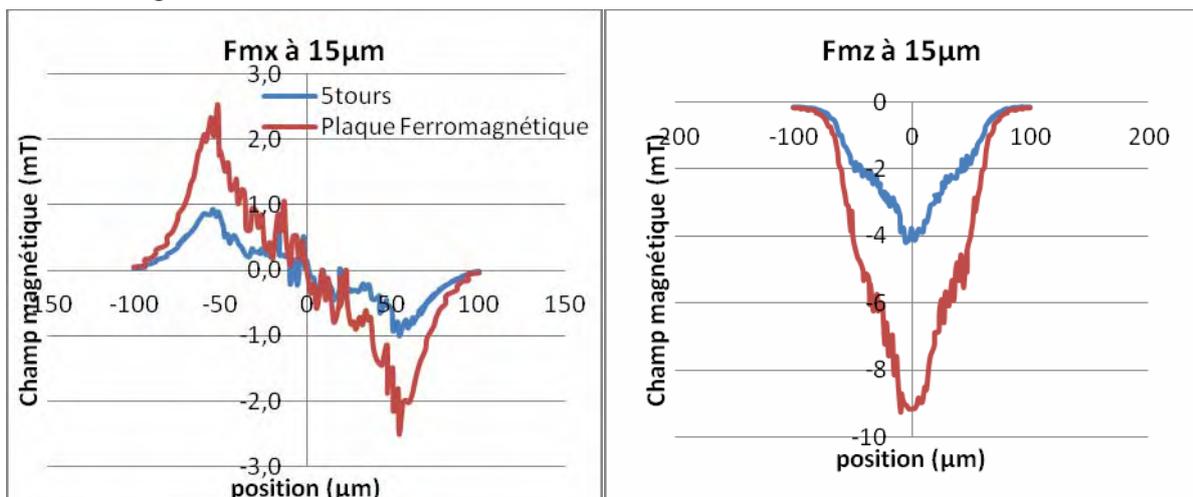


Figure 46. Résultats de simulation montrant l'influence de l'ajout d'une plaque ferromagnétique sur la force magnétique.

En conclusion, l'ajout d'une plaque ferromagnétique permet de doubler la valeur de la force magnétique et cela qu'importe le positionnement au dessus de la bobine. Ce phénomène global pourrait être une bonne piste pour augmenter la force magnétique générée par la bobine. De plus, sa réalisation comme nous le verrons dans le chapitre 4 est assez simple.

2.4 Bobines en vis-à-vis et perspectives

Une dernière possibilité pour palier aux limitations d'une génération par bobine planaire pourrait être d'intégrer, en vis-à-vis, deux bobines l'une en dessous et l'autre au dessus de la canalisation. Ainsi, chacune des deux pourront agir sur une demi-hauteur de canalisation et ainsi permettre d'augmenter ce paramètre tout en conservant les propriétés de piégeage.

Nous proposons ici d'utiliser l'avantage que nous avons au laboratoire sur le savoir faire de dispositifs en3D. Les technologies associées à la fabrication en 3D seront explicitées en détail dans le chapitre 3.

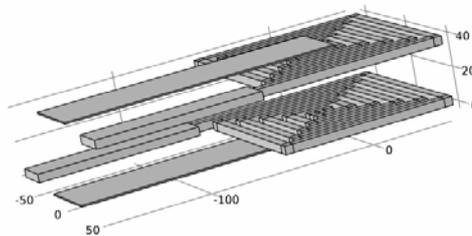


Figure 47. Schéma du positionnement des bobines en vis à vis pour les simulations.

Dans un premier temps nous allons étudier l'influence de la deuxième bobine sur le champ magnétique. Comme pour les précédentes simulations, nous utilisons le même logiciel à éléments finis COMSOL Multyphysics.

Pour ce faire, nous superposons les mêmes modèles de bobines, le modèle de base avec un plot central de $40\mu\text{m}$ de coté, 5 spires de largeur $5\mu\text{m}$, de hauteur $5\mu\text{m}$ et espacées de $5\mu\text{m}$. Nous considérerons dans un premier temps qu'elles sont parfaitement alignées l'une par rapport à l'autre.

Nous allons d'abord étudier en détail deux bobines espacées de $35\mu\text{m}$, pour comprendre les modifications entrainées par l'ajout de la bobine supérieure.

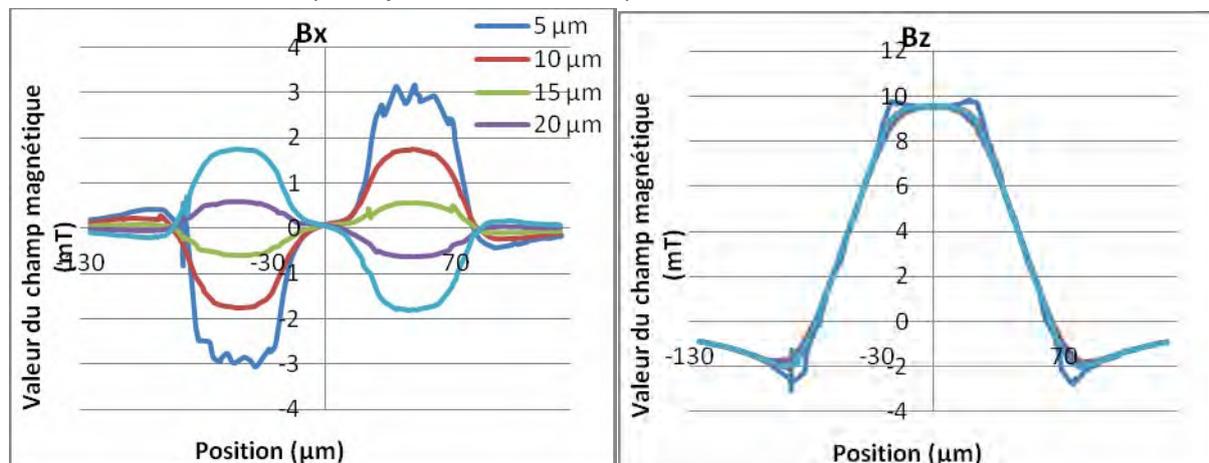


Figure 48. Résultats de simulation pour deux bobines en vis-à-vis (variation du champ), les deux bobines sont identiques, espacées de $35\mu\text{m}$ et constituées de 5 tours et des spires de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ espacées de $5\mu\text{m}$ alimentée par $0,1\text{A}$.

Comme prévu, nous pouvons noter que le champ B selon x s'inverse progressivement entre la bobine inférieure et la bobine supérieure en s'annulant à équidistance des deux bobines, laissant présager une force nulle en ces points. De façon plus intéressante, nous voyons que le champ en z généré est homogène sur l'ensemble de l'espace entre les bobines alors qu'il était divisé par 2 pour une simple bobine.

La visualisation des gradients n'apporte pas grand-chose de plus. Nous nous contenterons de noter que tout comme le champ Bz, les gradients dBx/dz et dBz/dz restent constants dans l'espace entre les bobines.

	Max Bx (mT)	Max Bz (mT)	Max dBx/dx (T/m)	Max dBx/dz (T/m)	Max dBz/dx (T/m)	Max dBz/dz (T/m)
5 μm	3.16	9.85	337	489	468	433
10 μm	1.74	9.57	118	242	246	139
15 μm	0.55	9.55	47	233	240	59
20 μm	0.58	9.56	41	234	234	40
25 μm	1.76	9.57	150	249	247	115

Tableau 11. Récapitulatif des résultats de simulation (champ et gradient) pour deux bobines en vis-à-vis, les deux bobines sont identiques, espacées de 35 μm et constituées de 5 tours et des spires de 5 μm *5 μm espacées de 5 μm alimentée par 0,1A

Intéressons nous maintenant à la force magnétique générée par nos deux bobines en vis-à-vis.

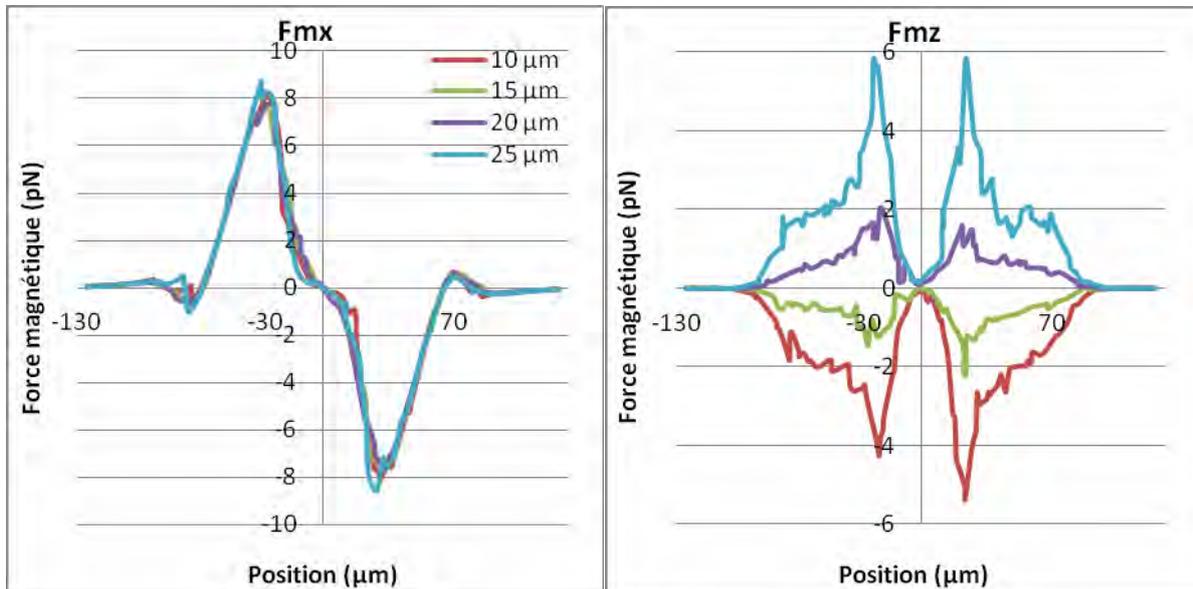


Figure 49. Résultats de simulation pour deux bobines en vis-à-vis (variation de la force), les deux bobines sont identiques, espacées de 35 μm et constituées de 5 tours et des spires de 5 μm *5 μm espacées de 5 μm alimentées par 0,1A.

Comme nous pouvions le prévoir, la force selon l'axe z est symétrique et s'annule à l'équidistance des deux bobines. Il faut en tenir en compte car si un élément paramagnétique se situe dans cette zone il ne sera pas ou très peu déplacé.

Il est très intéressant de voir qu'avec un tel montage nous obtenons une force magnétique en x uniforme dans tout l'espace entre les bobines (mise à part les zones très proches des bobines), conséquence direct de l'uniformité du champ et des gradients mis en relief précédemment.

	Simple bobine		Double bobine	
	Min Fmx (pN)	Min Fmz (pN)	Min Fmx (pN)	Min Fmz (pN)
5 μm	-8,55	-26,10	-15,89	-16,10
10 μm	-5,00	-4,90	-8,12	-5,36
15 μm	-1,07	-3,78	-7,60	-2,23
20 μm	-0,62	-2,31	-7,58	2,03
25 μm	-0,41	-1,77	-8,54	5,83
45 μm	-0,09	-0,48	N/A	N/A

Tableau 12. Récapitulatif des résultats de simulation (force) pour deux bobines en vis-à-vis, les deux bobines sont identiques, espacées de 35 μm et constituées de 5 tours et des spires de 5 μm *5 μm espacées de 5 μm alimentées par 0,1A

Evidement la force en z est localement plus faible car s'annule avant de s'inverser mais permet d'avoir une force de 5,83 pN à 25 μm au lieu des 1,77 pN soit plus de trois fois supérieure. Mais la principale amélioration est la force en x créée qui est constante et bien plus élevée que dans le cas d'une simple bobine. Ainsi à une distance de 15 μm au dessus de la bobine nous avons seulement 1,07 pN alors que nous atteignons 7 fois plus avec 7,60 pN avec les bobines en vis-à-vis.

Nous avons regardé l'influence de l'espacement entre les bobines, en le faisant varier de 30 à 60 μm .

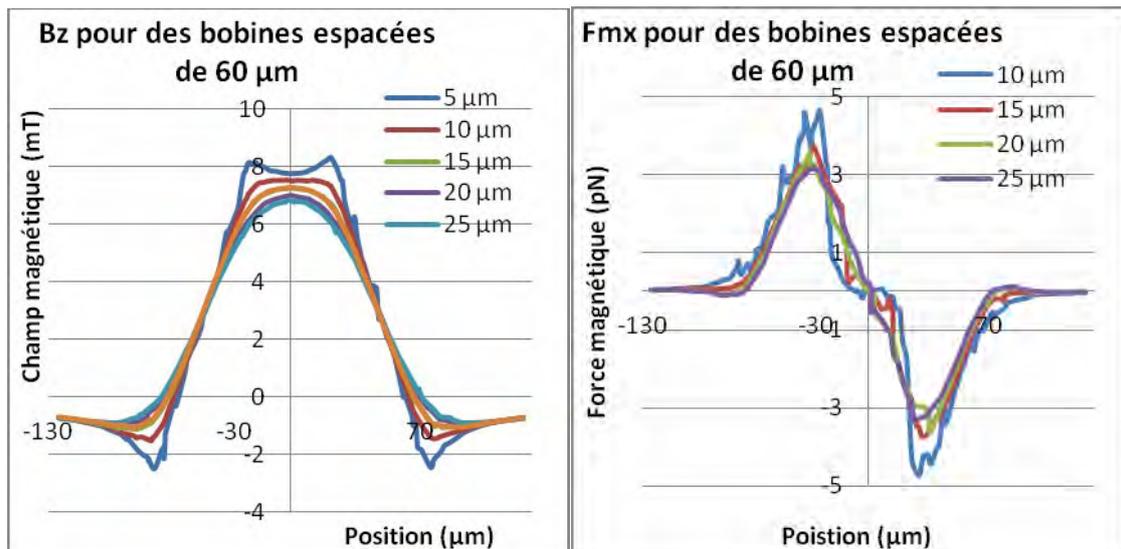


Figure 50. Résultats de simulation pour deux bobines en vis-à-vis (champ et force magnétique), les deux bobines sont identiques, espacées de 60 μm et constituées de 5 tours et des spires de 5 μm *5 μm espacées de 5 μm alimentées par 0,1A

Quand les bobines sont séparées de 60 μm nous avons toujours un champ quasi uniforme selon l'axe z avec une variation de seulement 1 mT, de même la force magnétique selon x reste à peu près constante dans l'espace entre les bobines même si l'effet est plus faible.

Vu que la force magnétique est quasi constante selon x pour tous les designs testés nous pouvons nous intéresser à l'évolution de cette force moyennée, avec l'espacement entre les bobines.

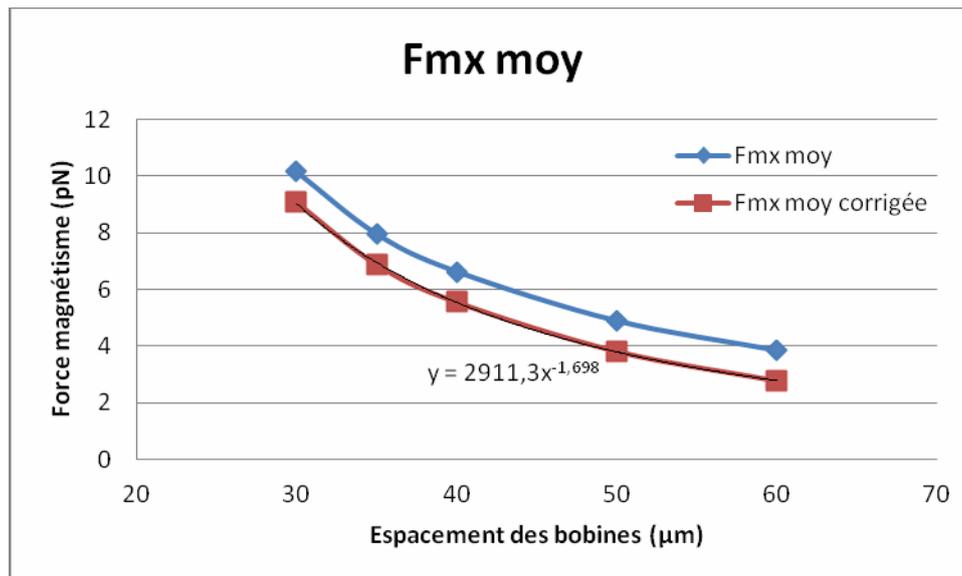


Figure 51: Evolution de la force magnétique moyenne en fonction de l'éloignement des bobines dans un design de bobines en vis-à-vis.

Pour voir les variations de l'augmentation de la force magnétique dues à la présence de la seconde bobine, il faut soustraire la force magnétique créée par la première bobine seule. Comme cela, si nous plaçons la seconde bobine à une distance infinie, nous retrouvons la valeur du champ créé par la bobine du dessous seule. Cette variation de force magnétique varie en puissance -1,7 de la distance d'espacement des bobines ce qui laisse présager une forte augmentation quand la seconde bobine est proche de la première puis une diminution lente avec l'éloignement.

En conclusion, c'est sur la composante en x que l'effet est le plus visible, ce n'est pas forcément ce qui était recherché car l'objectif est de déplacer les billes de la canalisation supérieure à la canalisation inférieure. Cependant une grande force selon x signifie aussi que la bille sera fortement ralentie dans le flux, elle aura donc plus de temps pour être attirée par les bobines.

Toutefois, cette possibilité d'une deuxième bobine en vis-à-vis ouvre la porte à d'autres idées, comme la création de plugs magnétiques ou le mélange magnétique (voir figure 52).

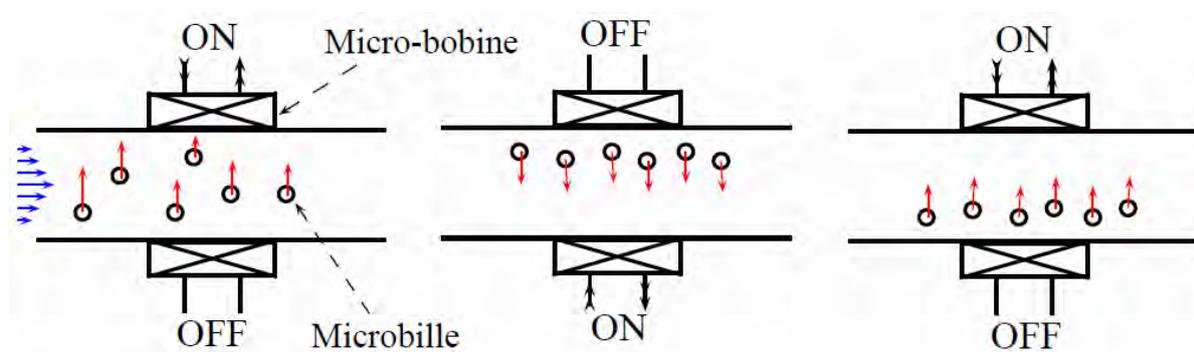


Figure 52. Schéma de principe de mélange magnétique réalisé par un design de bobine en vis-à-vis.

Lors des étapes de fabrication nous verrons qu'un des enjeux est l'alignement des niveaux l'un par rapport à l'autre. Il est important de savoir comment est modifiée l'efficacité de notre dispositif si

l'alignement n'est pas parfait. Nous avons, pour ce faire, simulé notre système avec divers décalages entre les deux bobines suivant l'axe x, allant de 10 à 50 microns de décalage.

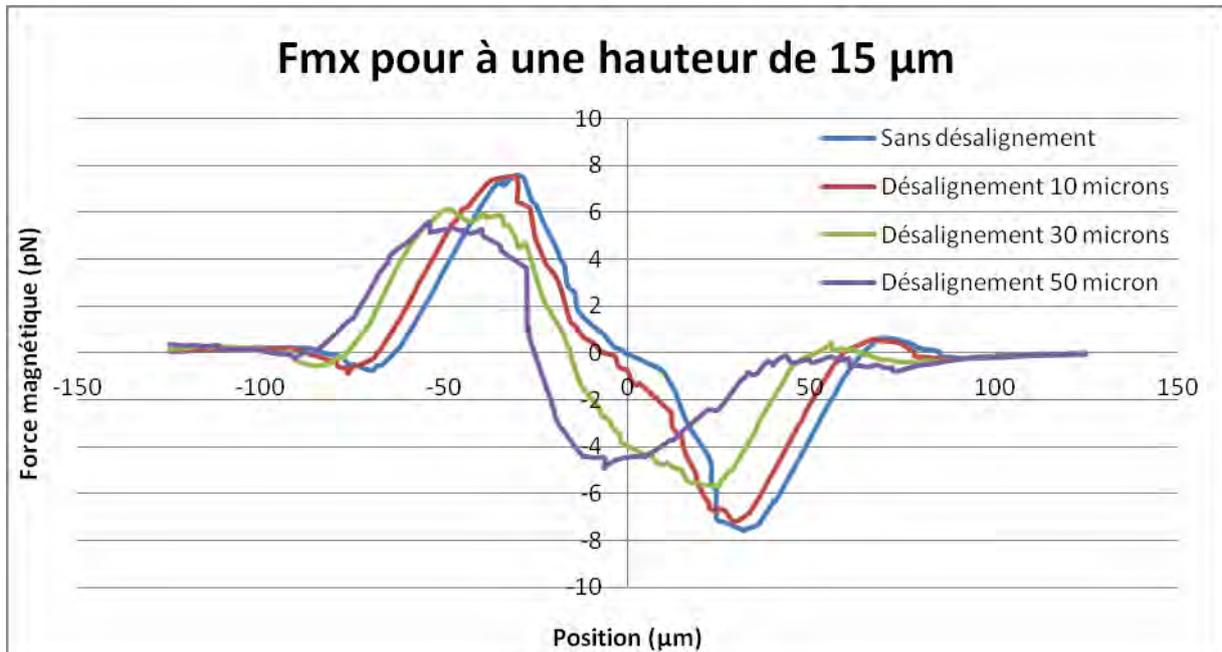


Figure 53. Variation de la force magnétique selon l'axe x à une hauteur de 15µm au dessus de la bobine inferieure, dans le cas d'un design de bobine en vis-à-vis, en fonction du décalage entre les deux bobines.

La force magnétique selon l'axe x diminue d'un rapport 1,5 pour un désalignement de 50µm mais possède un maximum à 5pN ce qui est toujours supérieur de 5 fois à la force magnétique générée à cette hauteur pour une seul bobine. En revanche si nous regardons l'évolution de la force magnétique en z, elle ré-augmente avec le décalage comme exposé dans le tableau 15. Mais n'est plus symétrique.

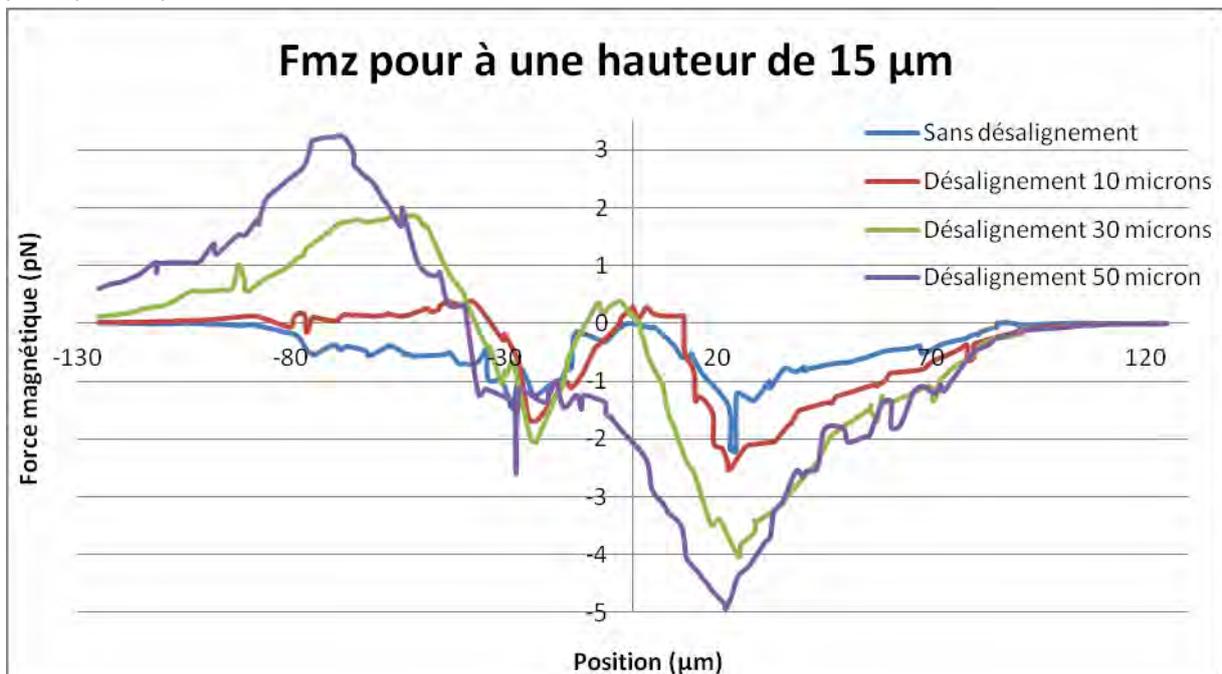


Figure 54. Variation de la force magnétique selon l'axe z à une hauteur de 15µm au dessus de la bobine inferieure, dans le cas d'un design de bobine en vis-à-vis, en fonction du décalage entre les deux bobines.

Design	Min Fmx	Min Fmz
Simple bobine	-1,1 pN	-3,8 pN
Décalage 0 μm	-7,6 pN	-2,2 pN
Décalage 10 μm	-7,2 pN	-2,5 pN
Décalage 30 μm	-5,7 pN	-4,1 pN
Décalage 50 μm	-4,9 pN	-4,9 pN

Tableau 13. Récapitulatif des valeurs minimales de la force magnétique selon l'axe x et z à une hauteur de 15 μm au dessus de la bobine inférieure, dans le cas d'un design de bobine en vis-à-vis, en fonction du décalage entre les deux bobines

Il faudra donc faire attention lors des réalisations des dispositifs afin d'aligner au mieux les deux bobines. Cependant même avec un décalage important, les effets bénéfiques d'une bobine en vis-à-vis sont présents et toujours intéressants.

Conclusion

Nous avons pu passer en revue les différents paramètres critiques dans l'établissement d'une force magnétique. Avec l'étude de différents designs et en s'appuyant notamment sur les simulations numériques nous avons pu optimiser la structure de dispositifs totalement intégrés et compatibles avec une technologie de fabrication microélectronique.

Nous avons mis en évidence une façon simple d'augmenter fortement le champ et donc la force localement au centre de la bobine en jouant sur la taille du plot central, un atout qui pourra se révéler d'une importance capitale pour le piégeage magnétique. Nous avons aussi montré une amplification plus générale du champ grâce à l'ajout d'une plaque ferromagnétique permettant un gain certain dans la force magnétique.

Nous avons pu étudier une architecture originale en plaçant des bobines en vis-à-vis. Ce choix apporte de grandes modifications dans l'allure des champs magnétiques et donc de la force résultante, permettant ainsi de créer une force selon x importante et quasi constante dans l'espace entre les bobines. De plus même si l'alignement des bobines a une répercussion significative sur les valeurs de champs, les performances du dispositif sont augmentées de façon importante même en cas de désalignement.

Chapitre 3 : Manipulation d'écoulements fluidiques dans des géométries 3D originales en SU8

Introduction	59
3.1 Procédé de fabrication	60
3.1.1 La photolithographie	60
3.1.2 La SU8 : un matériau incontournable	62
3.1.3 Technologie de structuration de la SU8.....	64
3.1.4 Le procédé de laminage : réaliser un puce tout en SU8	66
3.1.5 Amélioration du procédé de fabrication	67
3.2 Le laminage une technique irremplaçable	68
3.2.1 Quelques difficultés liées à l'utilisation du laminage	68
3.2.2 Optimisation du procédé de laminage	70
3.2.3 Autres moyens de faire du 3D :	70
3.3 L'écoulement en microfluidique	73
3.3.1 L'écoulement mis en équation	73
3.3.1.1 1 ^{er} cas particulier : Résolution de Navier-stokes en 2D	75
3.3.1.2 2 ^{ième} cas particulier : Analogie avec une canalisation circulaire	75
3.3.2 Analogie avec les circuits électriques	76
3.3.3 Les phénomènes de diffusion : A ne pas toujours négliger	76
3.4 Co-écoulements dans les structures 3D	77
3.4.1 Principe de fonctionnement	77
3.4.2 Modélisation des écoulements dans les structures 3D	78
3.4.2.1 Ecoulement dans les angles : Etudes 2D	78
3.4.2.3 Etude de l'option directe.....	79
3.4.2.3 Etude en 3D option avec couche intermédiaire.....	80
3.4.3 Validation expérimentale	81
3.4.3.1 Option directe	82
3.4.3.2 Option couche intermédiaire	83
3.4.4 Vers le concept de multIsensor.....	86
3.4.4 Application à l'étude de l'agrégation d'amyloïde beta.....	90
3.4.4.1 L'étude de l'agrégation de l'amyloïde bêta : un enjeu dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer	90
3.4.4.2 Agrégation en fond de canalisation.....	91
3.4.4.3 Ecoulement laminaire et agrégation	93
Conclusion	96

Introduction

Une des innovations présentes dans ce travail est l'utilisation de microfluidique 3D pour l'amélioration ou la réalisation de nouvelles fonctions.

La majorité des travaux microfluidiques se basent aujourd'hui sur des approches 2D et ont démontré la possibilité de réaliser de nombreuses fonctions de base utilisant les propriétés hydrodynamiques des fluides. Parmi elles, le mélange, la focalisation, la séparation par taille qui ont été largement étudiés, des fonctions qui interviennent dans des domaines très variés tels que la biologie, la chimie...

Cette limitation au 2D est principalement due aux procédés de fabrication actuellement utilisés qui permettent certes une réalisation facile et rapide de dispositif planaire microfluidique mais qui sont peu adaptés pour une architecture plus complexe en 3D. Bien que la technologie 2D soit bien maîtrisée, elle reste limitée et nous verrons que l'utilisation de géométrie 3D permet d'apporter des améliorations dans la fonctionnalité des dispositifs.

Le matériau le plus utilisé en microfluidique reste le PDMS (H. Becker, 2008), car c'est un polymère peu cher et facilement utilisable avec un minimum d'équipement. En effet, des puces microfluidiques peuvent rapidement être réalisées grâce à un moule en SU8 fait par procédé de lithographie douce. Cependant le PDMS présente plusieurs limitations : il est poreux aux gaz, résiste mal aux solvants organiques, déformable et difficilement ajustable pour du 3D. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers des dispositifs tout en SU8.

Notons ici que des travaux récents ont montré la possibilité de réaliser des dispositifs microfluidiques en 3D, ils sont principalement faits en PDMS (Y-H. Chang, 2012) ou hybrides, PDMS et SU8, (M. Feldmann, 2004), voire en verre (Y. Liao, 2011). Les travaux les plus aboutis dans la littérature sont sans doute ceux de (Y-J Chiu, 2013) qui a réalisé un dispositif pour focaliser en 3D, fluides ou particules, mais dans un dispositif en PDMS.

Dans ce chapitre, nous présenterons les technologies développées pour réaliser des dispositifs 3D tout en SU8, et donnerons un exemple d'utilisation que nous explorons dans cette thèse.

3.1 Procédé de fabrication

Comme nous avons pu le voir dans la préface de ce chapitre, il existe de nombreuses façons pour réaliser des puces microfluidiques et de nombreux matériaux aussi (Verre, Si, Résines, Polymères ...). Dans le cadre de ces travaux nous nous intéresserons principalement à des puces en résine photosensible SU8. Nous discuterons aussi de l'utilisation du PDMS pour la réalisation de puces, succinctement dans le corps de la thèse et plus en détail en annexe.

3.1.1 La photolithographie

La photolithographie est le procédé technique permettant de reporter une image sur un substrat. Les étapes de fabrication sont toujours sensiblement les mêmes : une résine photosensible est d'abord déposée sur un substrat, une première fois recuite, insolée au travers d'un masque, une seconde fois recuite et enfin développée.

Toutes ces étapes évoluent bien sûr en fonction de la résine utilisée et de l'application visée. La figure 55 regroupe ces principales étapes.

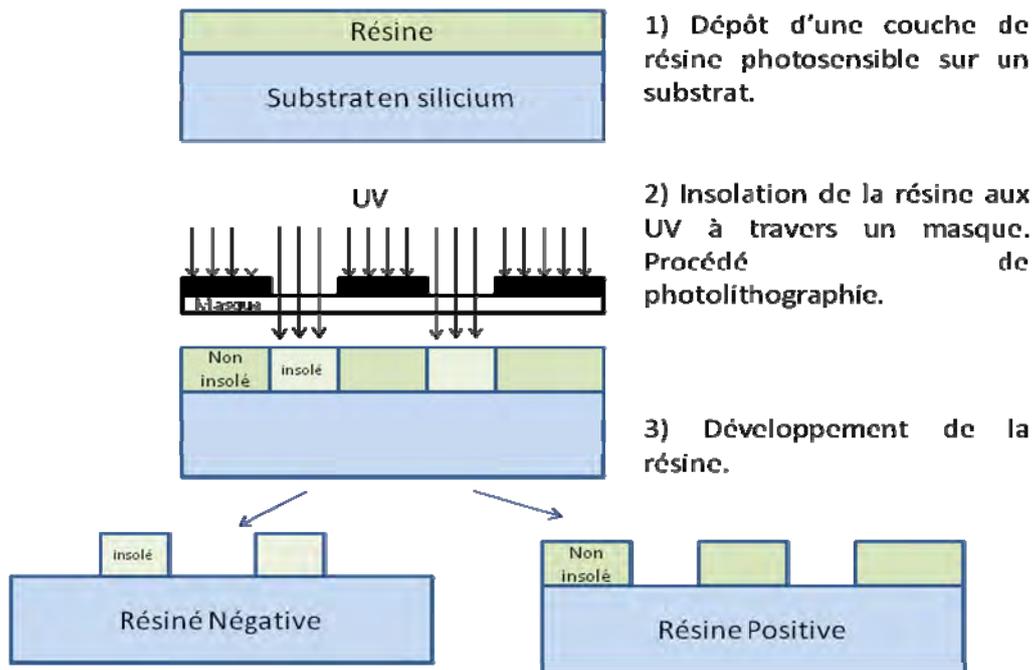


Figure 55. Schéma de principe expliquant le fonctionnement de la photolithographie

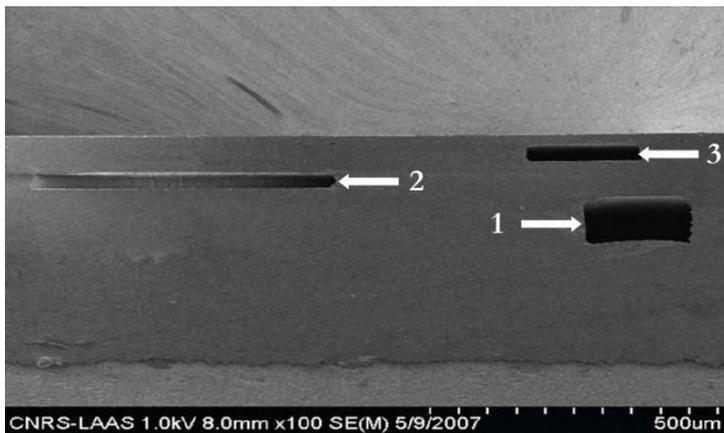
Les résines utilisées peuvent être divisées en deux grandes familles, les résines positives dont la partie insolée reste après développement et les résines négatives dont la partie insolée se dissout dans le développeur. Outre la polarité, le choix de la résine est régi par l'application souhaitée, elle doit pouvoir permettre une certaine résolution, un certain rapport de forme, offrir des résistances mécaniques ou chimiques particulières pour une future étape de gravure par exemple.

Le dépôt de la résine sur un substrat peut se faire de différentes façons, la méthode de loin la plus utilisée est le spin coating qui consiste à déposer une résine sous forme liquide sur le substrat posé

sur une tournette. La vitesse, l'accélération de rotation du substrat, la viscosité de la résine vont définir l'épaisseur du dépôt.

Il existe aussi le spray coating, qui consiste à projeter la résine toujours sous forme liquide à travers une buse sur le substrat. Le principal avantage du spray est de pouvoir déposer une couche de résine uniforme sur une forte topographie.

Enfin, nous pouvons déposer par laminage lorsque nous manipulons des films « secs » de résine. Ce procédé est pleinement décrit dans la partie 3.1.3 et son avantage principal est de pouvoir créer des structures suspendues.



Canal	Largeur	Hauteur
1	200µm	80µm
2	500µm	25µm
3	200µm	30µm

Figure 56. Exemple de construction 3D grâce à la technique du laminage de film sec

Le design de la structure se fait par l'intermédiaire d'un masque. Il existe plusieurs types de masques. Les masques durs sont réalisés dans la centrale technologique du LAAS, en verre et chrome. Le design est initialement réalisé sur ordinateur et gravé à l'aide d'un laser sur une résine protégeant une pleine couche de chrome, puis le chrome est attaqué chimiquement laissant apparaître les motifs. Ce type de masque permet d'avoir une très bonne résolution de l'ordre du micron et des motifs très propres (Lignes rectiligne, très bonne transparence du verre sans chrome,...). Cependant le coût est à la hauteur de la performance et il faut compter environ 400 euros par masque.

Les masques « souples » sont, eux, imprimés sur un film transparent en plastique. La résolution maximale obtenue sur un masque devient alors la résolution maximale de l'imprimante et est de l'ordre de la dizaine de microns. Les masques souples utilisés durant cette thèse ont été réalisés en externe par la société Tec Photogravure sur des films Red Sensitive Film de chez Digidot HND (base en polyester de 100µm). La résolution maximale est de 30µm, suffisante pour des applications microfluidiques et à un coup dérisoire de 5 euros par masque. Il faut toutefois relativiser au vu des nombreux défauts présents sur la partie transparente du film et de la mauvaise définition des bords de canalisation.

La présence de ces défauts sur le film n'empêche pas complètement les UV de passer mais en absorbe une partie comme nous pouvons le voir dans le tableau 16.

De plus ces petits défauts se retrouvent sur la résine rendant sa surface plus rugueuse et des flans de mur irréguliers comme illustré figure 58.

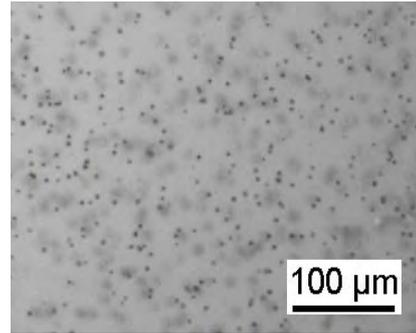


Figure 57. Image au microscope optique d'un film sec

Echantillon	Puissance transmises	Pourcentage de perte
A vide (Etalon)	20.1 mW/cm ²	0
Masque souple	17.1 mW/cm ²	-14.9%

Tableau 14. Perte de puissance due à l'ajout du masque souple pour une longueur d'onde de 365 nm.

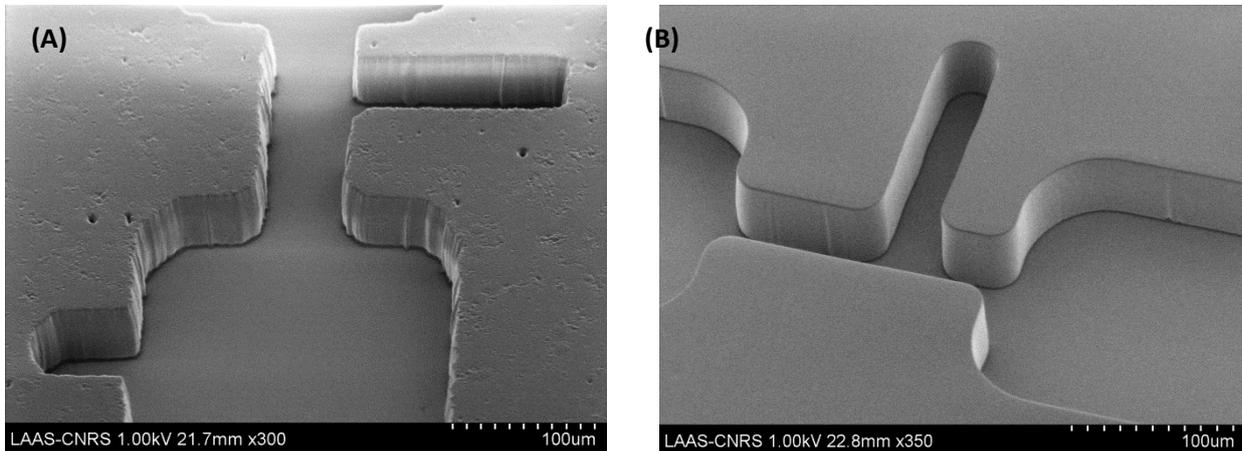


Figure 58. Imagerie au MEB d'une structure microfluidique réalisée avec un masque souple (A) ou un masque dur (B).

3.1.2 La SU8 : un matériau incontournable

La SU8 a été développée et brevetée par IBM en 1989 pour des applications de microélectronique. Le matériau a ensuite été adapté en 1996 par l'EPFL et IBM pour des applications MEMS puis rapidement repris par de nombreux groupes de recherche (J. Zang, 2001) (E. H. Conradie, 2002).

La SU8 est une résine photosensible négative de type époxyde. Elle tient d'ailleurs son nom car possède 8 groupements époxyde dans sa molécule « primaire » exposé figure 59. Elle se compose de trois éléments dont principalement la résine époxyde puis un solvant le GBL (γ -butyroaléctone) et un photo-initiateur, le triarylium-sulfonium. L'époxyde est un groupement chimique constitué de ployépoxyde qui est lui-même une substance comportant un oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone.

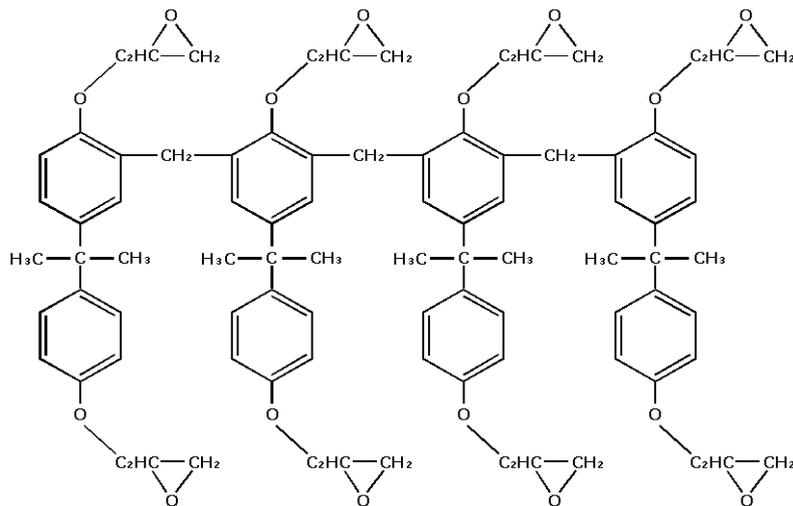


Figure 59. Monomère sous forme semi-développée plane de la SU8.

La SU8 est un polymère thermodurcissable qui va réticuler selon certaines conditions. La réticulation est le processus qui transforme les différents monomères plus ou moins libres en un réseau macromoléculaire dense. Le polymère passe donc d'un état semi liquide à un état solide. Dans le cas de la SU8, la réticulation se fait grâce à un photo-initiateur qui « s'active » sous irradiation d'UV comme le montre la réaction figure 60, l'insolation permet de créer des acides de Lewis et ainsi permettre la liaison des monomères entre eux comme présenté sur le schéma réactionnel.

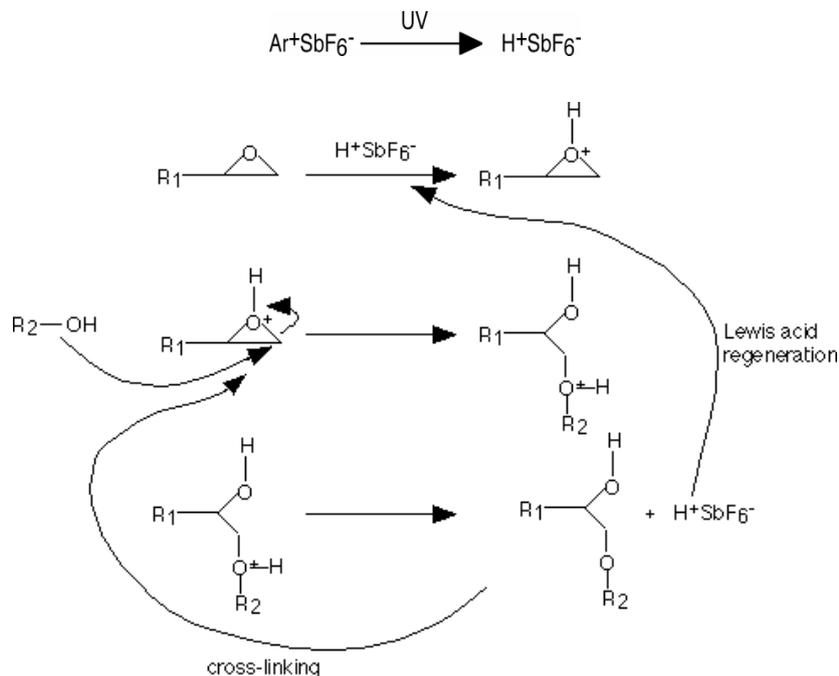


Figure 60. Procédé de réticulation de la SU8

Si la création de l'acide de Lewis se fait grâce aux UV, il faut un apport énergétique autre pour maintenir la réaction de réticulation, d'où la nécessité d'un recuit après l'insolation.

La SU8 possède une excellente résistance aux produits chimiques, et une bonne biocompatibilité (G. Voskerician, 2003) ce qui en fait un matériau de choix. Cette bonne résistance est due à sa fonction aromatique et à sa structure hautement réticulée (H. Lorenz, 1997) (H-K. Chang, 2000). Sa

température de transition vitreuse après réticulation est de 200°C et la température de destruction du polymère est de 380°C (K. Y. Lee, 1995).

La SU8 est une résine qui absorbe peu d'énergie ce qui permet de fortes épaisseurs (J. M. Shaw, 1997) tout en obtenant des designs avec de forts rapports de forme jusqu'à 100 pour 1 (A. L. Bogdanov, 2000). Outre le rapport de forme, la SU8 permet l'obtention de flancs verticaux.

Il existe plusieurs gammes de résines telles que la 3005, la 3025 ou encore la 3050. Selon le produit, la résine possède plus ou moins de solvant ce qui modifie sa viscosité (65cSt pour la 3005 et 12000 cSt pour la 3050). Ces différences permettent d'obtenir des épaisseurs de résine dans une large gamme qui peuvent aller de quelques centaines de nm (800nm) à plusieurs centaines de μm (500 μm) en une seule étape de fabrication.

Un autre paramètre dont nous n'avons pas encore parlé mais qui est important en microfluidique, est la mouillabilité de la surface. Cette donnée est acquise par la mesure de l'angle de contact, θ , entre une goutte d'un fluide et la surface. En fonction de cette valeur, nous pouvons dire que ce fluide mouille ($\theta < 90^\circ$) ou ne mouille pas ($\theta > 90^\circ$) la surface. Quand le fluide est de l'eau, on parle de surface hydrophile ou hydrophobe. La SU8 est une résine plutôt hydrophobe avec un angle de contact après recuit autour de 80° (S. Kobayashi, 2011). Cet angle peut néanmoins être modifié par différents traitements plus ou moins permanents. Un traitement au plasma O_2 pendant 30 secondes à 200 watts avec un débit d'oxygène de $1000\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, suffit à modifier l'angle de contact jusqu'à une valeur inférieure à 10° , mais ce traitement est réversible et dure moins de 24 heures.

Notons enfin que comparée à d'autres matériaux classiquement utilisés dans le monde de la microfluidique, la SU8 est un bon candidat pour la réalisation de films secs d'épaisseur variable (jusqu'à quelques centaines de microns).

3.1.3 Technologie de structuration de la SU8

Le dépôt se fait sur un substrat qui peut être du silicium, du verre ou même un film plastique tel que du PET (polyéthylène téréphtalate).

Le choix du support n'est pas si aisé, il faut en effet que la résine mouille et adhère suffisamment au substrat pour assurer un dépôt uniforme et résistant dans le temps. En effet pour un angle de contact supérieur à 85° la résine ne reste pas en couche uniforme sur l'intégralité du wafer. Il existe des moyens pour augmenter l'adhérence par des traitements plasma ou chimique.

Le dépôt est réalisé par spin coating. Cette étape consiste à centrifuger un volume de résine déposé sur un wafer ce qui a pour conséquence de l'étaler sur ce dernier. Le type de résine et notamment sa viscosité, la vitesse de rotation, l'accélération ainsi que le temps du dépôt influencent l'épaisseur du dépôt et permettent d'obtenir des épaisseurs très calibrées et reproductibles.

La résine subit alors un premier recuit appelé soft-bake, il permet d'évaporer une partie des solvants pour durcir la résine et permet de figer le dépôt pour les manipulations futures du wafer. Les recuits se font sur des plaques chauffantes programmables afin de réaliser des montées et des descentes en

températures progressives comme décrites sur la figure 61. La rampe de température positive permet de contrôler la vitesse d'évaporation des solvants et la rampe négative empêche les chocs thermiques au sein de la couche (souvent responsables des fissures).

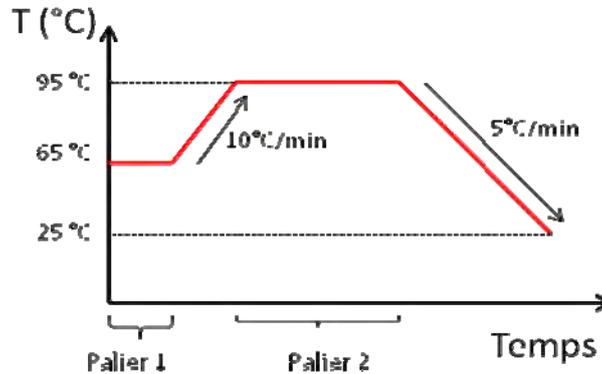


Figure 61. Exemple de programme de température pour un recuit de SU8

Après le soft-bake et selon l'épaisseur de la résine, il y a une étape de détourage. Cette étape a pour but de supprimer le bourrelet présent en bord de wafer. En effet, lors de l'enduction, la résine est poussée vers le bord du wafer et, à cause des effets de tension de surface, forme un bourrelet qui peut atteindre plusieurs dizaines de microns pour les résines très visqueuses. Le détourage s'effectue à une vitesse de 5000 tr.min^{-1} avec un jet d'acétone projeté à l'aide d'une seringue en direction du bourrelet.

La résine est ensuite insolée à travers un masque pour y imprimer les motifs. La dose d'UV permet d'initier la réticulation de la résine. Le temps d'insolation dépend de la dose d'UV à fournir et donc dépend de l'épaisseur de la résine et de l'équipement utilisé. Nous avons utilisé préférentiellement une insoleuse MA-6 de chez Suss MicroTech, l'insolation se fait à une longueur d'onde de 365 nm.

Après l'insolation, la résine est recuite de nouveau. Cette étape, appelée post exposure bake (PEB), a pour effet d'accélérer la réticulation de la résine. Là aussi, comme pour le soft bake, l'augmentation et la diminution en température se font progressivement sous forme de rampe. L'utilisation d'une rampe de température est très importante car permet à la résine de s'adapter progressivement, à l'échelle moléculaire, aux contraintes induites par le changement de température. En effet, la résine SU8 est une résine très contrainte une fois réticulée ce qui peut conduire à une courbure ou flèche du wafer assez importante.

La dernière étape est le développement de la résine non durcie durant l'insolation et le PEB. Le développement de la SU8 se fait à l'aide d'un développeur spécial constitué principalement de PGMEA. Le développement se fait dans un cristalliseur avec 50ml de développeur. Le temps de développement dépend de l'épaisseur de la résine à développer. Une fois le développement fini, il est important de rincer le wafer à l'isopropanol. Le wafer est ensuite séché. Les différents paramètres pour la réalisation d'épaisseurs courantes sont regroupés dans le tableau 15.

Epaisseur		800 nm	2,8 μm	10 μm	25 μm	50 μm
Résine		2000.5	3005	3005	3025	3050
Induction	Vitesse (tr/min)	1000	5000	900	3800	3200
	Rotation (tr/min/s)	300	5000	5000	3000	1500
	Temps (s)	30	60	30	30	30
	Capot	Ouvert	Fermé	Ouvert	Ouvert	Ouvert
Soft bake	Température (°C)	105	95	95	95	95
	Temps (min)	1	3	7	15	27
Insolation	Temps (s)	7	3	4,5	8,5	10
PEB	Température (°C)	105	95	95	95	95
	Temps (min)	1	3	3	3	3
Développement	Temps (min)	1	3	5	9	12

Tableau 15. Récapitulatif des paramètres de réalisation de couches de SU8 de différentes épaisseurs.

3.1.4 Le procédé de laminage : réaliser un puce tout en SU8

Pour réaliser des dispositifs microfluidiques à plusieurs niveaux nous procédons par laminage de films secs de SU8. Ce procédé a été mis au point au sein de laboratoire en 2006 par Abgrall *et al.* Cette technologie permet d'ajouter les niveaux un à un et de les structurer par lithographie classique. Nous avons ainsi à chaque niveau les mêmes avantages que pour un premier niveau, à savoir, une bonne résolution (dépend de l'épaisseur de la résine) et un bon alignement. D'autres technologies de laminage existent utilisant différentes résines, ou d'autres appareils pour réaliser les connexions entre niveaux (R. C. Meier, 2010), nous proposons là des dispositifs entièrement en SU8 et réalisés par des procédés classiques de photolithographie.

Nous commençons par la réalisation d'un fil sec, comme décrit figure 63. Le wafer support est d'abord recouvert d'adhésif puis d'une triple couche de PET/adhésif/PET ARclear DEV-8796 de Adhesive Research (50 μm /25 μm /75 μm) par laminage à 3 bars et à température ambiante avec une vitesse des rouleaux de 1m.min⁻¹. La surface inférieure du PET du dessus est traitée antiadhésive permettant ainsi un retrait facile du film par la suite.

Nous déposons ensuite la couche de résine SU8 sur le PET, les paramètres de dépôt étant fixés par l'épaisseur souhaitée du film. Les paramètres sont ici les mêmes que pour un dépôt sur substrat nu. Le premier recuit est plus long, classiquement le double du temps habituel pour l'épaisseur choisie. Cela permet de durcir davantage la SU8 afin qu'elle ait moins tendance à fluer lors du laminage. Le film sec ainsi créé est stable dans le temps et peut être conservé au noir pendant plusieurs jours.

Le procédé complet du laminage est résumé figure 62. Un premier niveau de SU8 est réalisé par photolithographie standard sur un substrat. Ce premier niveau terminé, il subit un traitement doux au plasma oxygène (200 W, 30s) pour promouvoir l'adhérence. Le film sec de SU8 non réticulé, précédemment réalisé, est laminé au dessus de la structure grâce à une lamineuse Shipley 350HR de chez Rohm and Haas Electronic Materials. Le substrat est aligné avec le masque puis exposé aux UV, il subit ensuite un PEB adapté à l'épaisseur de résine.

Ce n'est qu'après le PEB que le film de PET, peut être pelé. En effet avant le PEB, l'adhérence entre le film sec de résine et le film de PET est sensiblement la même qu'entre le film sec et la résine du

dispositif et donc peler le film de PET avant le PEB conduit à un arrachement de la résine. Finalement, le film est développé dans du PGMEA pour retirer la résine non insolée.

Avec cette technologie, nous pouvons obtenir des structures en 3D complexes en répétant ces étapes autant de fois que de niveaux voulus.

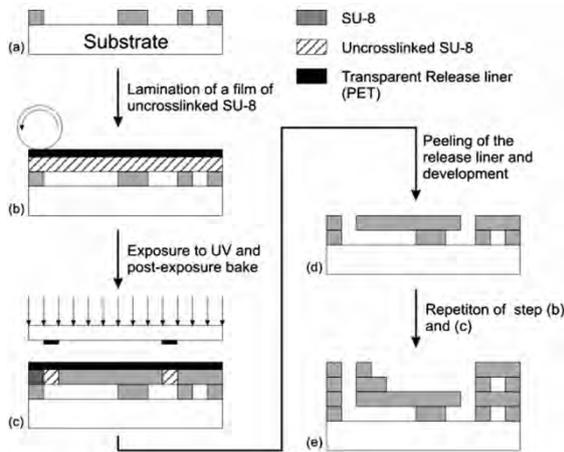


Figure 62. Description du procédé de fabrication par laminage. Partant d'un wafer de silicium avec une première couche de SU8 structurée (a) un second niveau de SU8 déposée sur un film PET est laminée (b), et exposée au UV à travers un masque (c). Après le PEB et après avoir peler le film PET, la couche de SU8 est développée (d). Les étapes (b-d) peuvent être répétées pour former une structure en 3D (e).

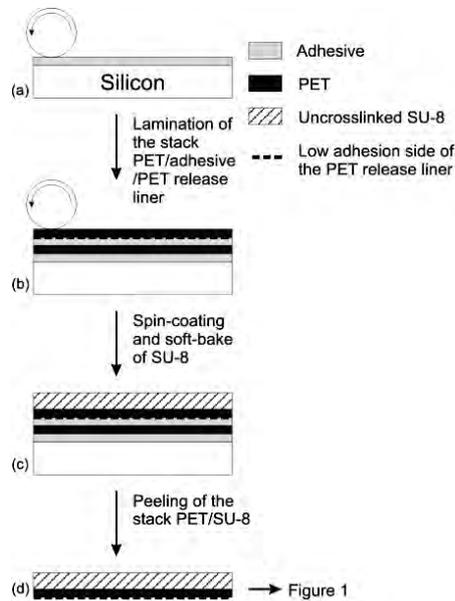


Figure 63. Procédé de fabrication d'un film sec de SU8. Partant d'un wafer en silicium, un film adhésif (50µm ARClear 8932) (a) et un tricouche PET/adhésif/PET sont laminées (b). Une couche de SU8 est déposée puis recuite (c) finalement le PET et la SU8 sont pelés de la structure (d). Le même support peut être réutilisé en laminant un nouveau film PET.

Comme décrit dans le procédé il n'y a pas de limitation théorique au nombre de niveaux superposables. Une réalisation de 8 couches a déjà été faite au laboratoire pour preuve de concept voir figure 56, et un empilement fonctionnel de 5 couches est couramment réalisé pour des dispositifs microfluidiques.

3.1.5 Amélioration du procédé de fabrication

Ce procédé de fabrication, bien que continuellement réajusté depuis sa création en 2006, a connue de nombreuses améliorations durant cette thèse, surtout au niveau des paramètres de développement de la résine.

En effet, lors du développement, la résine diluée s'écoule dans les canalisations et réservoirs. Une fois dans les canalisations, elle est difficile d'accès et le rinçage à l'isopropanol est très délicat. Nous observons alors souvent des bouchons proches des entrées/sorties fluidiques rendant les dispositifs inutilisables.



Figure 64. Exemple de bouchon de résine porche d'une sortie fluidique.

Une solution est de souffler de l'azote dans les canalisations pour forcer les bouchons de résine à s'évacuer, mais ce procédé très brutal engendre de nombreuses fissures dans les capots de SU8, se qui se manifeste par des fuites lors des expériences.

Nous avons donc imaginé de développer le wafer à l'envers en espérant que la résine plus lourde tombe au fond du cristalliseur. Cependant, un des risques possibles est que la capillarité plus forte fasse que la résine rentre quand même dans les canalisations et ce fut le cas.

Nous avons donc pensé à travailler en présence d'ultra-sons. Il s'agit d'un traitement violent qui peut décoller la SU8 du substrat le choix des paramètres est donc important. Nous utilisons un équipement de chez Elma de type elmasonic Ti-H-S et nous nous plaçons à une fréquence de 135kHz, et une puissance de 50%, en mode sweep du bain. Cette solution permet d'éliminer la résine non réticulée dans quasi 100% des cas sans détériorer nos dispositifs.

3.2 Le laminage une technique irremplaçable

Nous avons vu dans le chapitre 3 les possibilités qu'offrait la technique de laminage dans la construction de dispositif 3D en résine SU8. Nous allons voir ici quelques désagréments de cette technique et voir s'il est possible de s'en affranchir par d'autres moyens.

3.2.1 Quelques difficultés liées à l'utilisation du laminage

Effondrement dans les canaux :

Lors du laminage d'un film sec de SU8 au dessus de canalisation, il y a un risque que la résine flue et tombe dans les canalisations. Ce problème a été mis à jour dès le début des tests de validation de capotage par laminage par Rémy Fulcrand en 2006. Pour s'affranchir de ce désagrément, la vitesse de rotation, la pression et la température des rouleaux ont été optimisés. De plus nous avons pu constater qu'un alignement des canaux avec le sens de laminage permettait d'obtenir de meilleurs résultats.

Désalignement lors du PEB :

Des désalignements importants ont parfois été observés entre les couches de SU8. Nous obtenons ainsi des flancs qui peuvent être très inclinés avec un décalage entre le haut et le bas pouvant atteindre 90 μ m dans certains cas (figure 65).



Figure 65: Exemple de désalignements dus à la déformation du PET lors du PEB

Nous notons que le désalignement n'est pas unidirectionnel et dépend de la position du motif sur le wafer. Une carte des désalignements suivant les zones du wafer est illustrée figure 66.

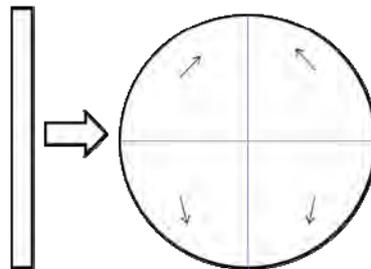


Figure 66. Cartographie de la direction des désalignements selon le sens de laminage du film

Deux raisons peuvent être invoquées. La première est en relation avec la présence du PET. Comme nous avons pu le voir dans la partie 3.1.3, l'insolation est effectuée avec le film PET, il en est de même pour le PEB. En effet, l'accroche de la SU8 avec le film PET est trop grande pour que ce dernier puisse être retiré après le laminage ou après l'insolation. L'obligation de garder le film PET pour le recuit peut entraîner de lourdes conséquences. En effet, le dessous du capot en SU8 suit l'expansion de la SU8 réticulée en dessous, et le dessus du capot suit l'expansion du PET. Et vu que les coefficients thermiques d'expansion du PET et de la SU8 peuvent être différents, en effet on note un CTE de 52 ppm.K⁻¹ (MicroChem) pour la SU8 et de 20 à 80ppm.K⁻¹ pour les films PET (Goodfellow, 2013), cela peut provoquer ces désalignements.

Il semblerait aussi que lors du laminage, le film PET ainsi que le film de SU-8 soient alignés dans des directions privilégiées qui se répercutent dans la relaxation de la SU-8 lors de l'étape de PEB. Ainsi la SU-8 sous la chaleur va s'étendre dans une direction particulière, ce qui crée un décalage avec les motifs inférieurs.

Cette observation nous conduit à la deuxième possibilité pour expliquer ce phénomène qui est le désalignement entre les deux rouleaux du lamineur qui peut engendrer des contraintes de cisaillement entre les faces inférieures (substrat) et supérieures (PET) de l'empilement. Nous avons pu constater qu'un réglage régulier et précis de l'alignement des rouleaux réduisait significativement les risques de déformation des couches.

3.2.2 Optimisation du procédé de laminage

Plusieurs tests ont été menés pour réduire, ou mieux supprimer, le désalignement créé lors du PEB de la résine. Les principaux résultats sont regroupés dans le tableau 16.

Test	Descriptif	Résultats
1	Recuit de 60°C sur plaque avant PEB pendant 1 à 5 minutes	Nous avons essayé de retirer le film PET après le traitement pour éviter de le conserver lors du PEB mais sans succès, une partie de la SU8 est retirée avec le film, de plus nous notons que le désalignement commence déjà à apparaître.
2	Recuit de 60°C en étuve avant PEB pendant 1 à 5 minutes	Même conclusion que pour le traitement sur plaque chauffante.
3	Repos d'environ 1 heure après laminage et avant insolation	Le temps de repos entre le laminage et l'insolation a apporté les meilleurs résultats sans toutefois être parfait.

Tableau 16. Récapitulatif des tests visant à améliorer le laminage

Pour limiter l'effet du désalignement lors du PEB, il est donc conseillé de laisser le wafer se reposer 1 heure après laminage et avant l'insolation. Cependant ce phénomène n'est pas entièrement maîtrisé à l'heure actuelle car intervient à des fréquences et des amplitudes aléatoires.

3.2.3 Autres moyens de faire du 3D :

Nous pouvons envisager d'autres moyens de mettre en contact le film sec et la SU8 autre que le laminage. Certaines techniques comme le wafer bonder ou la nanoimprint permettent de mettre en contact de façon plus ou moins intime des substrats de natures différentes. Nous verrons comment détourner ces techniques pour la construction en 3D de canalisations fluidiques.

Le wafer bonder :

Le wafer bonder rentre dans les appareils de packaging, il permet de sceller plusieurs types de substrats entre eux tels que le silicium et le verre. Il offre la possibilité de contrôler la pression, la température, le temps de mise en contact des substrats, il est aussi possible de faire circuler un courant pour faire de la soudure anodique par exemple.

La nanoimprint :

La lithographie par nanoimprint est classiquement utilisée pour fabriquer des moules à l'échelle du nanomètre. Le moule est créé par impression d'une résine qui est pressée par un moule mis en contact de façon très intime. Le moule est déplacé grâce à des membranes déformables qui épousent au mieux toutes les aspérités permettant une répartition uniforme de la pression.

Il est possible de paramétrer le niveau de vide et donc la pression exercée, la température et le temps de mise en contact.

Pour tester ces différents appareils, nous avons imaginé un masque de test représenté figure 67.

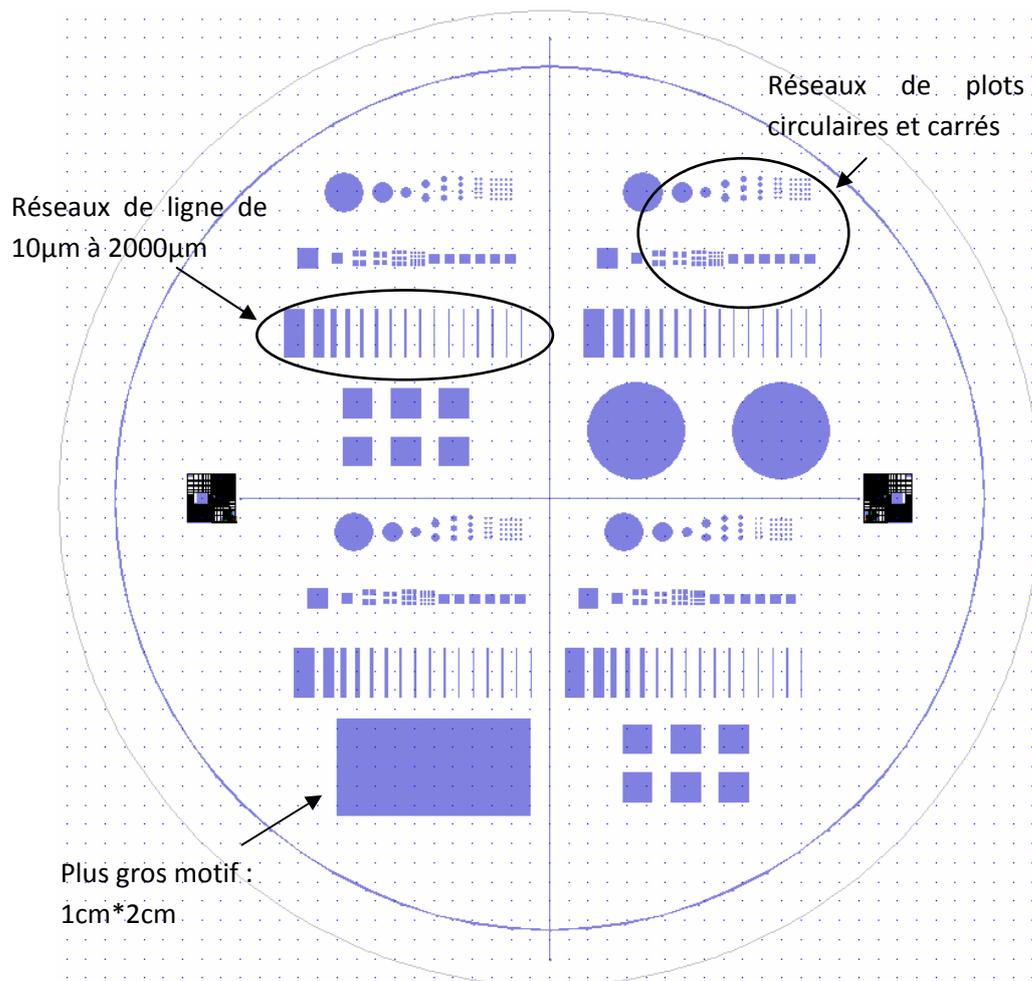
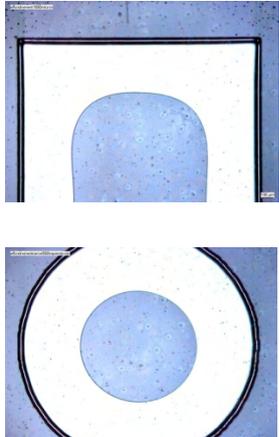
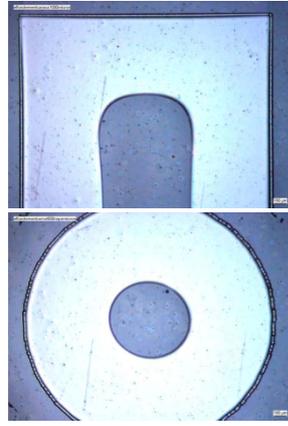


Figure 67. Design test pour la réalisation de structures en 3D avec le wafer bonder et le nanoimprint.

Wafer Bonder	Nanoimprint
<p>Paramètres :</p> <p>Dépôt du capot sans pression sur le wafer</p> <p>Vide</p> <p>Chauffage 40°C</p> <p>Pression de 0,15 bar</p>	<p>Paramètres :</p> <p>Dépôt du capot sans pression sur le wafer</p> <p>Vide</p> <p>Chauffage 40°C</p> <p>Pression de 3,1 bar</p>
<p>Détails</p>  <p>Nous voyons un effondrement à l'intérieur des canaux pour une dimension critique de 300µm. Même problème pour les cercles avec une limite au dessus de 500µm de rayon.</p>	<p>Détails</p>  <p>Effondrement à l'intérieur des canaux pour une dimension critique de 500µm. Même problème pour les cercles avec une limite au dessus de 500µm de rayon.</p>

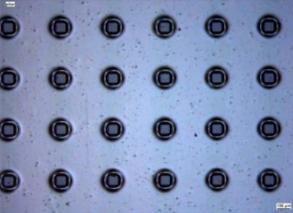
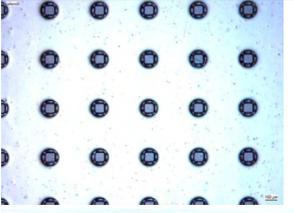
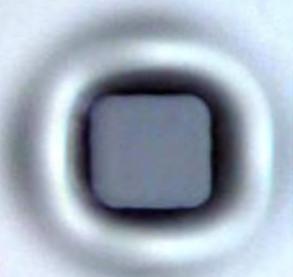
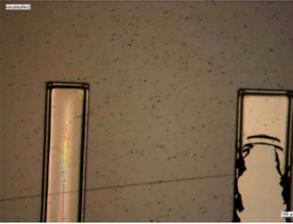
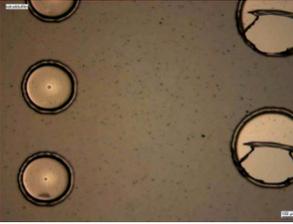
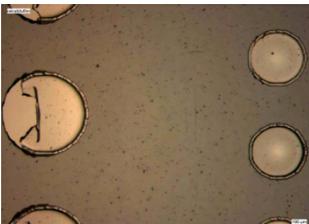
	<p>De grandes surfaces peuvent être couvertes en y plaçant un réseau de plot.</p>		<p>De grandes surfaces peuvent être couvertes en y plaçant un réseau de plot.</p>
	<p>La pression étant trop grande il apparaît que les piliers ont chassé la résine sur le bord...</p>		<p>La pression étant trop grande il apparaît que les piliers ont chassé la résine sur le bord...</p>
	<p>Le film a été retiré sans insolation. Au dessus de 300µm la couche de SU-8 se déchire sur les parties suspendues et ici on voit clairement que même pour 300µm la résine a flué à l'intérieur des canaux.</p>		<p>Le film a été retiré sans insolation. Au dessus de 300µm la couche de SU-8 se déchire sur les parties suspendues.</p>
	<p>Décollement pour des trous de 600µm de diamètre.</p>		<p>Décollement pour des trous de 600µm de diamètre.</p>

Tableau 17. Résultats des tests pour la réalisation de capotage avec les technique de wafer bonder et de nanomimprint

Les premiers résultats ne sont guères concluants (voir tableau 17). En conclusion nous voyons que la pression est trop forte dans les deux cas, ce qui entraîne l'effondrement de la résine en fond de canaux mais aussi le déplacement de la résine au niveau des piliers. Nous mettons en cause le vide qui « aspire » la résine en fond des canaux. La technique de nanoimprint qui ne peut se passer de vide pour fonctionner doit donc être éliminée.

Des tests complémentaires ont été réalisés avec le wafer bonder, avec de nouveaux paramètres :
 Pression : 0,12 bar ; Température : 65°C ; Temps : 2min ; Vide : Aucun

Le résultat bien que meilleur n'est toujours pas suffisant. Le problème majeur est que la pression ne s'applique pas de façon uniforme sur le wafer, il y a donc des zones qui ne sont pas scellées. Nous

pourrions, peut être, augmenter la pression pour essayer de forcer le contact partout mais sans le vide le couvercle du wafer bonder se soulève et il faut le maintenir manuellement, ce qui limite donc la pression utilisable.

Cependant, nous avons réussi à capoter de grandes surfaces avec des trous de 1cm de diamètre... Toutefois, il semble que le contact est trop fort à certains endroits et nous pouvons observer un effondrement sur les bords des canaux (figure 68).

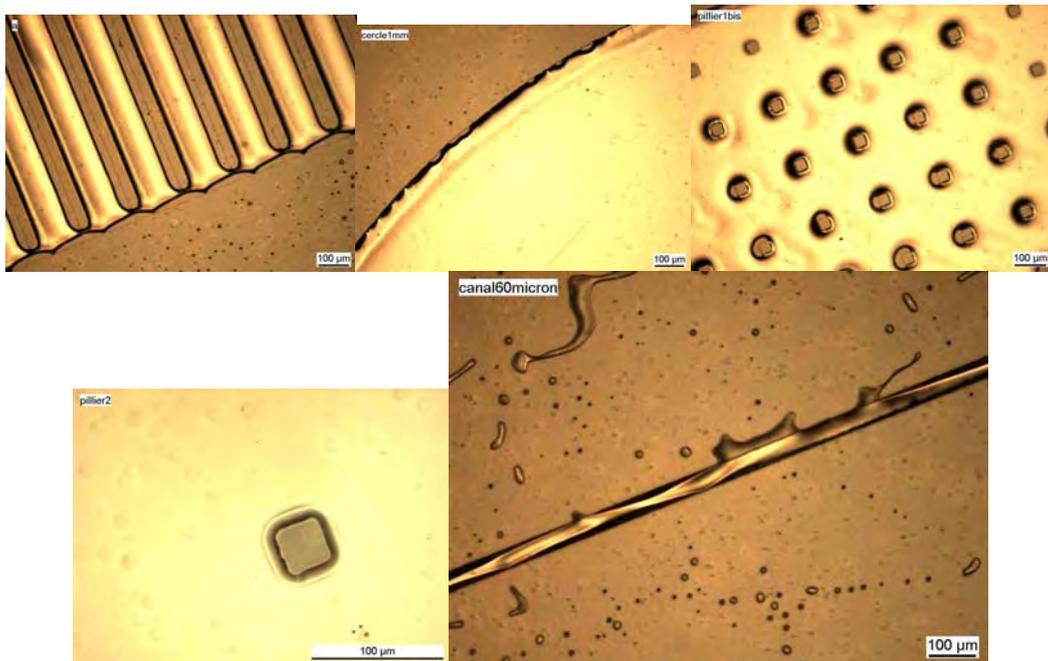


Figure 68. Défauts présents suite au capotage d'une couche de SU8 par la technique du wafer bonder.

Nous notons toujours un bourrelet autour des plots même s'il est plus petit. Une photo d'un canal de 60µm montre que la résolution pour un tel procédé doit être vraiment très grossière. Les contours d'à peu près tous les motifs ne sont pas nets. Tous ces petits défauts, que nous n'avons pas réussi à corriger nous fait douter de la possibilité de remplacer le laminage ...

3.3 L'écoulement en microfluidique

3.3.1 L'écoulement mis en équation

La microfluidique est la science qui étudie les écoulements des fluides dans des canaux micrométriques, pour être plus précis dont au moins une des grandeurs caractéristiques est micrométrique.

En mécanique des fluides, les équations de Navier-Stokes, qui sont des équations aux dérivées partielles non-linéaires, décrivent le mouvement des fluides tout en considérant l'approximation des milieux continus.

L'équation de continuité :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{v}) = 0 \quad [3.1]$$

Avec ρ la masse volumique (kg.m^{-3}), v la vitesse de l'écoulement (m.s^{-1}) et t le temps (s)

L'équation de bilan de la quantité de mouvement :

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v} = -\frac{1}{\rho} \vec{\nabla} p + \nu \Delta \vec{v} + \vec{f} \quad [3.2]$$

Effet de la pression

Effet de convection
Effet de viscosité

Avec ν la viscosité cinématique ($\nu = \mu/\rho$), p la pression et f la somme des forces extérieures.

L'équation de Navier-Stokes est le résultat de plusieurs effets qui peuvent être comparés les uns aux autres. Nous pouvons introduire ainsi le nombre de Reynolds qui permet de comparer les forces inertielles et les effets visqueux.

$$Re = \frac{\text{Forces inertielles}}{\text{Forces visqueuses}} = \frac{\rho * L_{\text{caract}} * v_{\text{moy}}}{\mu} \quad [3.3]$$

Avec ρ la masse volumique, v_{moy} la vitesse moyenne du fluide, L_{caract} la longueur caractéristique de la canalisation et μ la viscosité.

Selon la valeur du nombre de Reynolds on définit trois régimes d'écoulement en mécanique des fluides, un régime appelé laminaire, un régime turbulent et entre les deux, un régime transitoire. Le régime est dit laminaire si $Re < 2000$. Du fait des tailles micrométriques des canaux, Re est quasiment toujours inférieur à 100 voire même à 1 ce qui implique que le régime est laminaire.

Les forces extérieures intervenant sont souvent réduites à la gravité dont l'effet peut être négligé à

ces échelles. De plus si nous nous plaçons dans le cas du régime stationnaire ($\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$), l'équation de Navier-Stokes se simplifie comme suit :

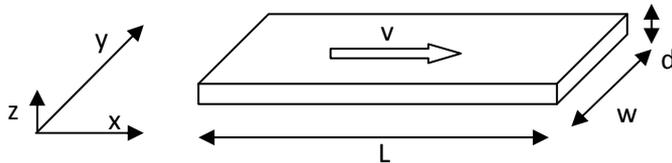
$$\vec{\nabla} p = \mu \Delta \vec{v} \quad [3.4]$$

L'équation est linéaire, d'où le régime laminaire de l'écoulement.

Cette équation ne peut être résolue simplement sauf dans un certain nombre de cas particuliers que nous allons voir.

3.3.1.1 1^{er} cas particulier : Résolution de Navier-stokes en 2D

Lorsque la largeur de la canalisation est bien supérieure à la profondeur, les variations selon l'axe y peuvent être négligées et l'écoulement peut être considéré en 2D. En nous plaçant toujours dans le régime stationnaire l'équation de continuité donne : $\text{grad} \vec{v} = \mathbf{0}$.



Nous déduisons des équations de Navier-Stokes :

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \mu \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \quad [3.5]$$

$$\frac{\partial p}{\partial y} = 0 \quad [3.6]$$

$$\frac{\partial p}{\partial z} = 0 \quad [3.7]$$

Après intégration il est possible d'écrire la valeur du débit :

$$Q = \frac{w d^3 \Delta P}{6 \mu L} \quad [3.8]$$

Avec Q le débit de fluide ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), μ la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), w, d et L la largeur, profondeur et longueur de la canalisation en m.

3.3.1.2 2^{ème} cas particulier : Analogie avec une canalisation circulaire

Dans le cas d'une canalisation circulaire, les équations de Stokes peuvent être résolues complètement en coordonnées polaires grâce à l'axe de symétrie. Nous pouvons alors faire l'analogie avec une section quelconque en remplaçant le diamètre par le diamètre hydraulique.

En introduisant le nombre de Poiseuille Po (Dutkowski, 2008) :

$$Po = f * Re = \frac{S D_h^2 \Delta P}{2 \mu Q L} \quad [3.9]$$

Avec S la section de la canalisation = $w \cdot d$ (m^2)
f le facteur de frottement

Nous obtenons :

$$Q = \frac{2 w^2 d^3 \Delta P}{\mu (w + d)^2 Po L} \quad [3.10]$$

Grâce aux équations 3.8 et 3.10, nous voyons que le débit est proportionnel à une différence de pression. Nous pouvons retrouver ce principe, comme en macro, en considérant les pertes de charges dans une canalisation. En effet, tout fluide circulant dans une canalisation subit des pertes de charge, ou en d'autres termes, de pression dues à la viscosité du fluide. Les pertes de charge sont de

deux types, soit de type régulier, soit de type singulier (provenant des singularités de la canalisation). Nous ferons l'impasse sur les pertes de charge singulières en nous plaçant dans un canal rectiligne.

Les pertes de charges régulières s'expriment de la façon suivante :

$$\Delta P = K \frac{L v^2 \rho}{2 D_h} \quad [3.11]$$

Où D_h est le diamètre hydraulique de la canalisation (m)

$$D_h = \frac{2 w d}{(w + d)} \quad [3.12]$$

En remplaçant K par $Re/64$ puisque le système est en régime laminaire et en faisant intervenir Q qui vaut $v \cdot S = v \cdot w \cdot d$ nous trouvons :

$$Q = \frac{w^3 d^3}{16(w + d) \mu L} \frac{\Delta P}{L} \quad [3.13]$$

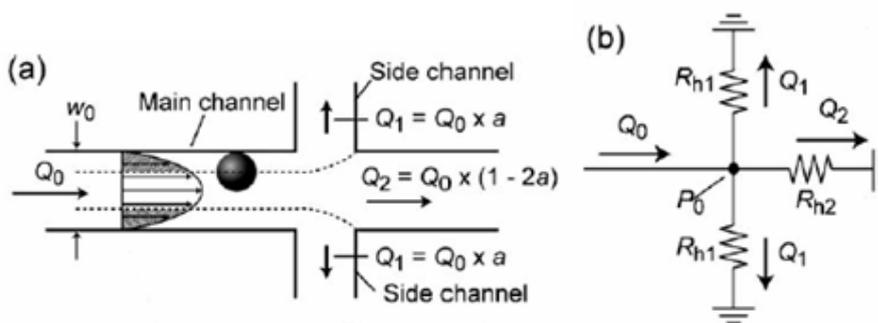
Nous retrouvons les mêmes résultats à un facteur multiplicatif près qui résulte des différentes approximations faites à chaque fois.

3.3.2 Analogie avec les circuits électriques

Nous avons vu dans la partie précédente que nous pouvons relier le débit et la différence de pression dans les microcanaux de la façon suivante :

$$Q = \frac{\Delta P}{R} \quad [3.14]$$

Nous pouvons alors faire l'analogie avec un circuit électrique avec le débit comme courant et la différence de pression comme tension. (figure 69)



Cette analogie est fondamentale dans la microfluidique car elle permet d'utiliser les mêmes théorèmes tels que la loi des mailles ou la loi des nœuds et souvent de calculer simplement le comportement des microdispositifs.

3.3.3 Les phénomènes de diffusion : A ne pas toujours négliger

Dans un écoulement laminaire les lignes de champs sont parallèles il n'y a donc pas de mélange convectif mais seulement diffusif. Les phénomènes de diffusion sont régis par la loi de Fick :

$$J_d = -D \cdot \nabla C \quad [3.15]$$

Où J_d est la densité de flux de particule ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), D le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et C la concentration ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

Le phénomène de diffusion dépend donc de la concentration de chaque espèce et de leur coefficient de diffusion dans le milieu concerné. La diffusion est donc inévitable. Un nombre adimensionnel, le nombre de Peclet, permet d'évaluer l'importance des effets de diffusion.

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad [3.16]$$

Avec U la vitesse de l'écoulement, l la longueur d'étude et D le coefficient de diffusion.

Le nombre de Peclet compare donc l'advection créée par l'écoulement du fluide aux phénomènes diffusifs. Ainsi plus le Peclet est petit et plus le phénomène de diffusion est important. Il n'y a pas de valeur classique du Peclet en microfluidique comme pour le nombre de Reynolds, cela dépend de chaque situation. Il faut juste garder en mémoire que l'effet de la diffusion ne peut être systématiquement écarté mais doit être regardé au cas par cas.

3.4 Co-écoulements dans les structures 3D

Comme expliqué dans le chapitre 1, un de nos objectifs est de faire une séparation verticale des monocytes au sein du dispositif. Pour cela nous avons besoin de transférer les éléments magnétiques et seulement eux, de la canalisation supérieure à la canalisation inférieure, et sans mélange advectif entre les deux niveaux.

Il est donc important de savoir comment vont se comporter des fluides superposés. Des écoulements laminaires, co-latéraux et multiniveaux plus complexes sont-ils possibles et dans quelles conditions ? C'est à ces questions que nous allons répondre dans ce chapitre.

3.4.1 Principe de fonctionnement

Nous avons exploré la possibilité de créer des écoulements laminaires superposés de façon plus générale que dans le cas de notre dispositif en étudiant des écoulements à 2, 3 voire plus d'entrées. Notre but étant de créer des profils d'écoulement tels que schématisés dans la figure 70 sur une certaine longueur de canalisation.

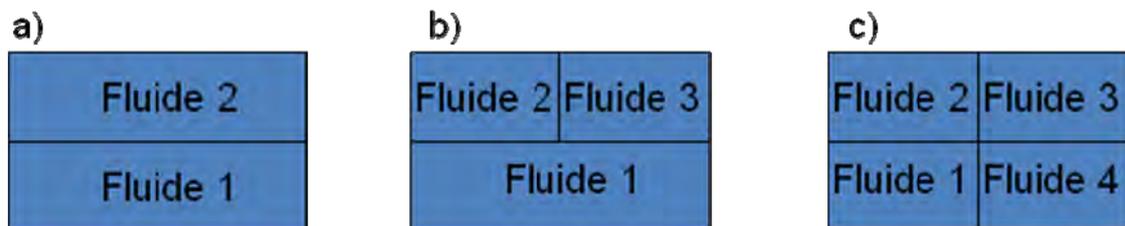


Figure 70. Profils d'écoulement pouvant être obtenus grâce à une structure en 3D avec (a) deux fluides, (b) trois fluides et (c) quatre fluides.

Les possibilités d'application de telles configurations sont multiples : extension du concept de T-sensor à plusieurs composantes « mult-sensor », multiplication des conditions de criblage, etc ...

Nous voyons aussi qu'avec de tels profils d'écoulement les murs n'ont plus d'influence au point de jonction des fluides, des murs qui peuvent être critiques car points initiateurs d'agrégation ou catalyseur d'une réaction.

3.4.2 Modélisation des écoulements dans les structures 3D

Afin d'avoir une bonne compréhension des écoulements au sein des dispositifs, nous avons effectué des simulations par éléments finis à l'aide du logiciel COMSOL 4.2 Multyphysics. Les équations de Stokes sont résolues pour des fluides Newtoniens non compressibles et une condition de non glissement à la paroi.

3.4.2.1 Ecoulement dans les angles : Etudes 2D

La première étape a été de visualiser le profil des champs de vitesse lors de « virages » dans les canalisations et d'étudier l'influence de l'angle de bifurcation. Des bifurcations d'un angle de 45° et de 90° ont été étudiées, pour différentes vitesses d'écoulements (à savoir 0.03m.s^{-1} et 0.3m.s^{-1} correspondant à des débits de $1\mu\text{l.min}^{-1}$ et $10\mu\text{l.min}^{-1}$). La figure 71 montre les résultats obtenus.

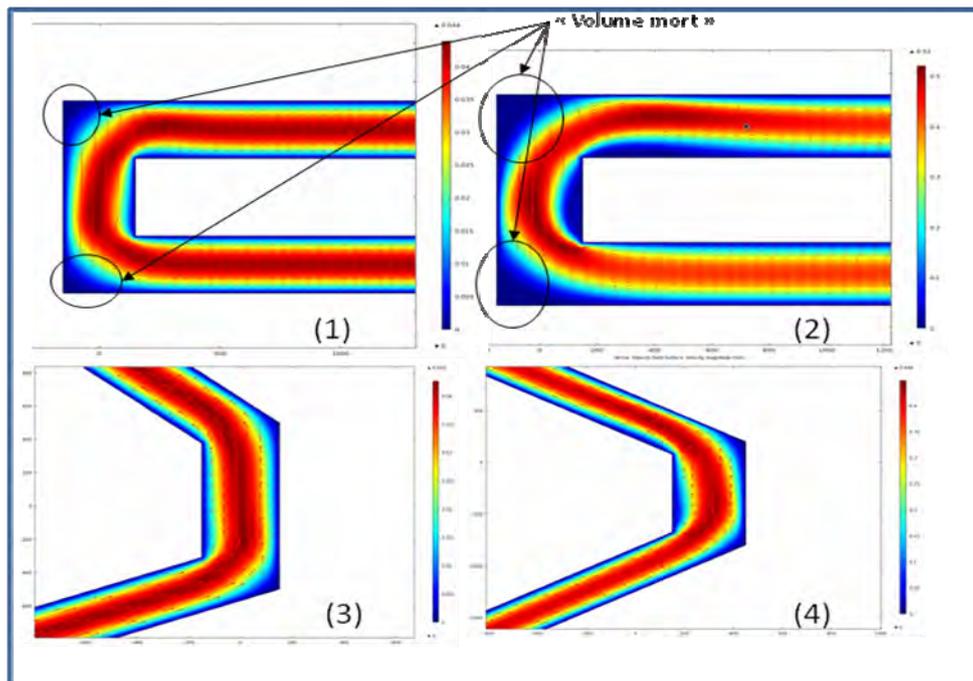


Figure 71. Résultats des simulations 2D des écoulements fluidiques dans des canalisations comportant des coudes. (1) pour un coude à 90° et un débit de $1\mu\text{l.min}^{-1}$, (2) pour un coude à 90° et un débit de $10\mu\text{l.min}^{-1}$, (3) pour un coude à 45° et un débit de $1\mu\text{l.min}^{-1}$, (4) pour un coude à 45° et un débit de $10\mu\text{l.min}^{-1}$

Sur cette figure sont représentées les vitesses d'écoulement qui varient entre 0 m.s^{-1} représentée par la couleur bleue et 0.05 m.s^{-1} (figure 71.1 et 71.3) et 0.5 m.s^{-1} (figure 71.2 et 71.4) par la couleur rouge. Nous constatons la présence d'un volume mort, plus ou moins important, dans lequel la vitesse du fluide est très faible. Ces volumes morts apparaissent en particulier dans les angles.

Ce phénomène dépend de la vitesse de l'écoulement, ainsi un débit plus grand conduit à des volumes morts plus importants. Il en va de même avec l'angle du canal, plus l'angle est grand et plus

le volume mort est important. Nous verrons que ce phénomène sera déterminant dans le reste de l'étude.

3.4.2.3 Etude de l'option directe

Nous avons choisi d'explorer dans un premier temps deux designs simples décrits dans les figures 72 et 73, superposant simplement deux niveaux de canalisations et en faisant varier l'angle de la mise en contact des fluides. Ainsi 2 types de géométries seront étudiés : superposition avec un angle de 45° et avec un angle de 90° au niveau de la jonction entre les deux canalisations.

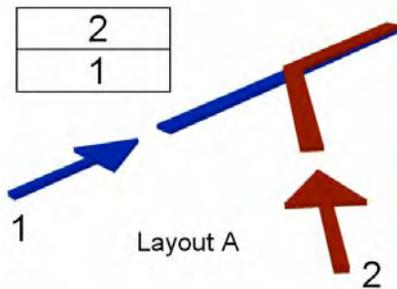


Figure 72. Layout A, Superposition de deux canaux (100µm de large et 25µm de haut). Les deux canaux se rencontrent à leur intersection formant un angle de 45°. Le canal de sortie fait 100µm de large et 50µm de haut.

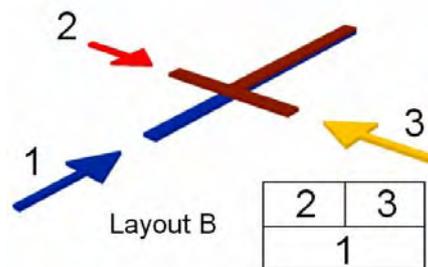


Figure 73. Layout B, Superposition de trois canaux (100µm de large et 25µm de haut). Le canal inférieur est rectiligne, les deux canaux supérieurs forment un T et se rejoignent avec le canal inférieur à leur intersection. Le canal de sortie fait 100µm de large et 50µm de haut.

Notre but étant d'avoir des écoulements coplanaires, superposés et de ne pas avoir d'échange entre les niveaux, il est nécessaire de s'assurer de deux choses : la première est que les débits de sortie sont égaux, dans le cas contraire cela impliquerait un changement de niveau pour une partie des fluides, la deuxième est qu'il n'y a pas d'instabilité dans l'écoulement.

Conservation des débits de sortie :

Pour avoir conservation des débits en entrée et en sortie, il faut seulement regarder les résistances fluidique des sorties. En effet, nous avons vu dans la partie 3.2 que lors d'une bifurcation la distribution du débit du canal mère dépend du rapport des résistances des canaux filles.

Dans notre cas, toutes les largeurs des canaux sont identiques ainsi que les profondeurs, c'est donc le rapport des longueurs qui définit le rapport des résistances. Il faut donc avoir la même longueur des canaux de sortie.

Etude des instabilités :

Nous avons vu que la présence de coudes dans les canalisations engendrent de fortes variations des profils de vitesse. Il est donc intéressant de regarder si ces variations sont génératrices d'instabilité lors de la mise en contact des deux fluides superposés. Nous nous intéresserons principalement à la composante verticale (en z) du champ de vitesse appelé V_z , et plus particulièrement nous regarderons l'allure de V_z dans le plan d'intersection entre les deux fluides. L'existence d'une

composante Vz dans ce plan aurait en effet pour conséquence le transfert du fluide du niveau inférieur vers le niveau supérieur ou inversement.

Les résultats avec une jonction à 45° sont présentés figure 74. Nous pouvons observer une vitesse Vz non nulle en entrée et sortie de la partie commune entre le canal supérieur et inférieur. Ces instabilités en z atteignent des valeurs de $0.0022\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ à comparer avec la vitesse maximale horizontale (selon le sens de l'écoulement) de $0.0067\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui n'est pas du tout négligeable (30%).

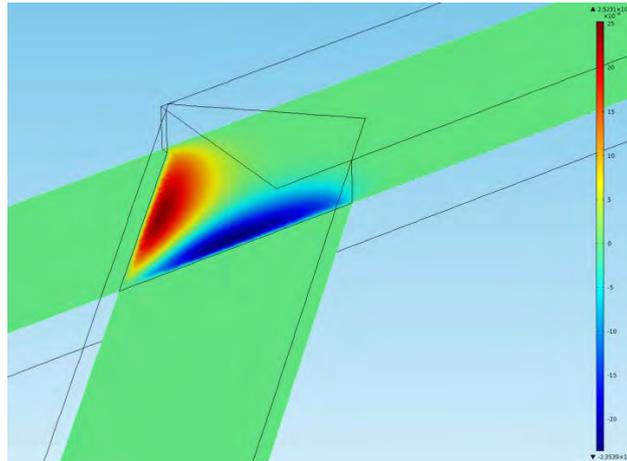


Figure 74. Simulation COMSOL montrant la composante en z de la vitesse de l'écoulement Vz dans le plan central de la canalisation. Les zones en vert correspondent à une vitesse nulle, la partie bleue à une vitesse négative et en rouge à une vitesse positive.

Ainsi dans ce cas précis, une partie du fluide du dessous remonte au dessus et une partie du fluide de dessus descend en dessous. Nous avons aussi observé qu'augmenter l'angle de jonction des fluides accentue ce phénomène.

Ce comportement est facilement explicable à partir des simulations 2D de l'écoulement dans les virages. En raison des volumes morts dans les virages, le profil de vitesse n'est plus vraiment parabolique et surtout différent de celui dans une canalisation rectiligne. Donc quand les deux fluides se rencontrent, ils ne présentent pas les mêmes profils de vitesse localement, et cette dissymétrie crée l'instabilité observée. De plus, les volumes morts étant plus importants avec une jonction à 90°, l'instabilité est plus grande avec une jonction à 90° que 45°.

Une géométrie de canalisations simplement superposées ne semble donc pas adéquate pour gérer une microfluidique multiniveau stable et reproductible.

3.4.2.3 Etude en 3D option avec couche intermédiaire

Pour réduire les instabilités mises en évidence dans la partie 3.3.2.2 nous avons pensé à rajouter un niveau de résine intermédiaire entre les deux niveaux de canalisation, permettant ainsi de superposer les canaux sans qu'ils soient en contact au niveau de l'insertion c'est-à-dire de superposer les fluides exclusivement dans la partie rectiligne de la canalisation (figure 75).

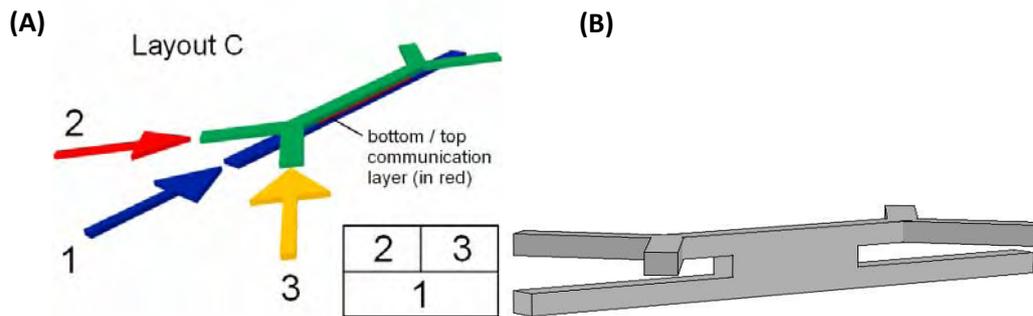


Figure 75. LayoutC. (A) Les canaux font tous $100\mu\text{m}$ de large et $25\mu\text{m}$ de haut. Le canal inférieur est rectiligne. Les canaux supérieurs en vert forment un y. Comparé au layout A et B, une couche de SU8 de $10\mu\text{m}$ supplémentaire a été rajoutée entre les deux niveaux de canalisation (B) ainsi les canaux ne se rencontrent que dans la partie rectiligne du dispositif.

Comme pour l'option directe, nous devons égaliser les résistances fluidiques de sortie pour éviter toute inhomogénéité dans la distribution des débits. La simulation nous permet de vérifier les valeurs de la composante selon z (V_z) du champ de vitesse. Les résultats de la simulation sont visibles figure 76.

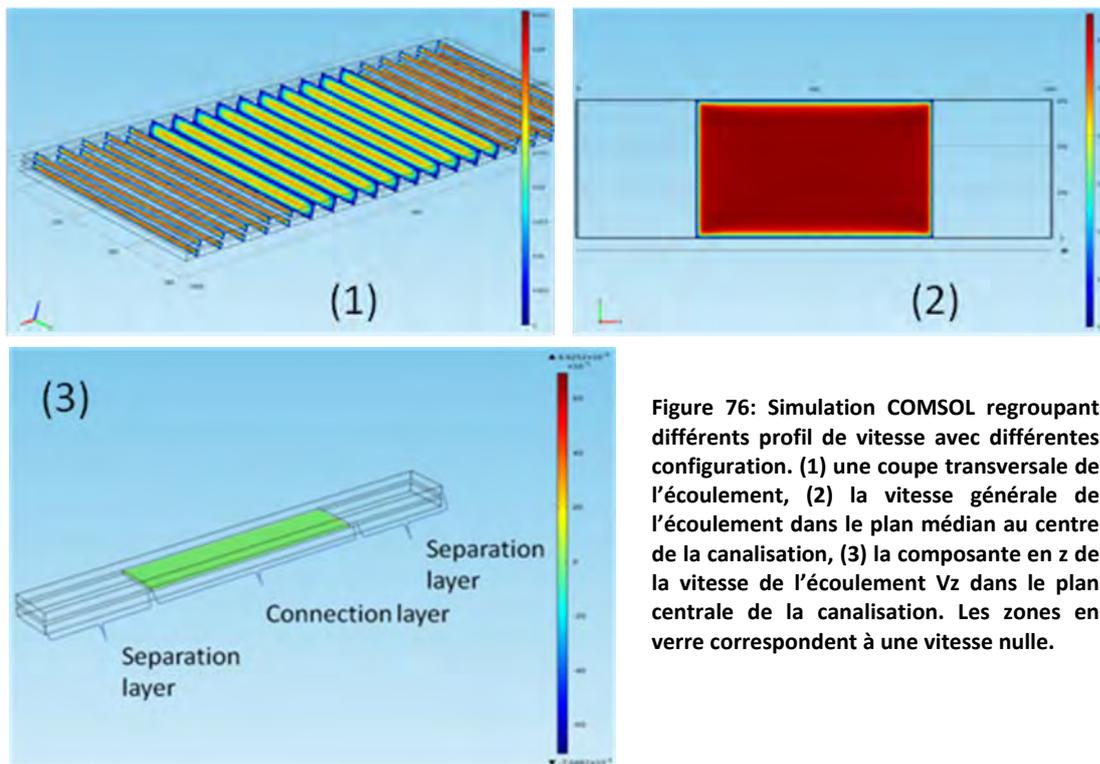


Figure 76: Simulation COMSOL regroupant différents profil de vitesse avec différentes configuration. (1) une coupe transversale de l'écoulement, (2) la vitesse générale de l'écoulement dans le plan médian au centre de la canalisation, (3) la composante en z de la vitesse de l'écoulement V_z dans le plan centrale de la canalisation. Les zones en verre correspondent à une vitesse nulle.

Contrairement à l'option directe, la vitesse selon z est complètement nulle à l'interface des fluides, il n'y a donc pas d'échange de fluides entre les canalisations supérieures et inférieures. C'est ce que nous recherchions : la création d'écoulements coplanaires laminaires superposés.

3.4.3 Validation expérimentale

Afin de valider expérimentalement les comportements simulés, 2 types de dispositifs ont été réalisés en SU8. Leur schéma de principe est donné figure 77.

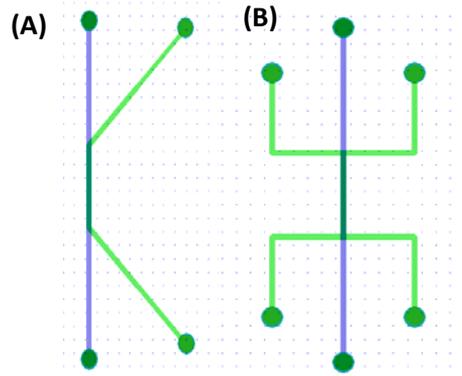


Figure 77. Designs réalisés pour tester l'écoulement dans des structures 3D, le bleu correspond au niveau de canalisation inférieure et le vert au niveau supérieure. (A) dispositifs à deux entrées, deux sorties. (B) dispositifs à trois entrées, trois sorties.

Les écoulements ont été étudiés par microscopie à fluorescence en utilisant trois types de fluides : de l'éthanol pur, de l'éthanol + fluorescéine et de l'éthanol + rhodamine.

3.4.3.1 Option directe

Le design A a été réalisé, avec des canaux de 100 μm de large et 25 μm de haut, l'angle à la jonction fait 45°. Les fluides injectés sont de l'éthanol pur (fluide 1) et de l'éthanol avec 6mM de fluorescéine (fluide 2). Le débit est fixe à 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les deux entrées.

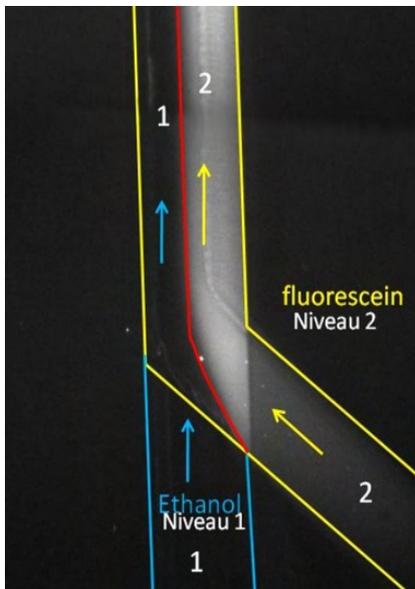


Figure 78. Photo expérimentale d'un écoulement dans un dispositif à deux entrées en option directe.

Nous notons lors de l'expérience que la fluorescéine présente dans la canalisation supérieure (niveau 2), au lieu de recouvrir toute la largeur de la canalisation supérieure, est poussée contre la paroi à droite. Du coup nous retrouvons de l'éthanol (incolore) dans toute la hauteur de la canalisation sur le côté gauche du canal.

Dans le cas d'une jonction à 90° avec le design B, les dimensions des canalisations sont les mêmes que pour le design 1, 100 μm de large et 25 μm de haut. Le fluide 3 est constitué d'éthanol avec 50. mM de rhodamine.

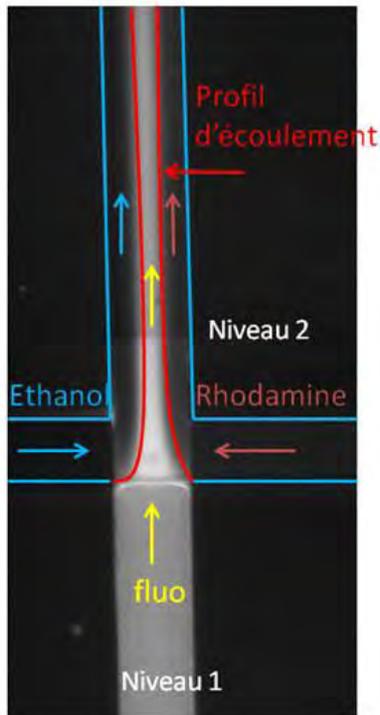


Figure 79. Photo expérimentale d'un écoulement dans un dispositif à trois entrées en option directe.

L'image de l'expérience figure 79, ne permet de visualiser que la fluorescéine et, donc seulement le fluide 1 situé dans la canalisation inférieure, mais cela est suffisant pour interpréter les résultats. Le profil de l'écoulement du fluide 1 est renforcé par le tracé rouge, qui nous montre que, au lieu de s'étendre sur toute la largeur de la canalisation, il est centré dans la partie commune. A l'inverse la rhodamine semble plaquée à droite et l'éthanol à gauche.

Nous voyons que dans les deux designs, nous n'avons pas de fluides laminaires superposés, la fluorescéine est plaquée sur un mur ou recentrée sur toute la hauteur de la canalisation.

Les expériences montrent effectivement une instabilité à l'entrée des jonctions qui fait que les fluides, au lieu d'être superposés sont côte à côte. Différentes conditions expérimentales des débits en entrée ont été testées sans pour autant réussir à supprimer l'instabilité. Cette solution est donc à écarter définitivement.

3.4.3.2 Option couche intermédiaire

Nous avons ensuite réalisé la structure C (structure double A), en utilisant une couche séparatrice de $10\mu\text{m}$ entre les deux canalisations. De ce fait nous avons un dispositif avec quatre couches de SU8 au lieu de trois pour les designs A et B.

Les écoulements sont caractérisés de la même manière, en injectant de l'éthanol avec 50mM de rhodamine dans la canalisation du dessous à $2\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, et de l'éthanol pur ainsi que de l'éthanol avec 6mM de fluorescéine dans les deux canalisations du dessus à un débit de $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ chacune.

Pour une meilleure compréhension, les écoulements sont représentés en fausses couleurs grâce au logiciel Image J.

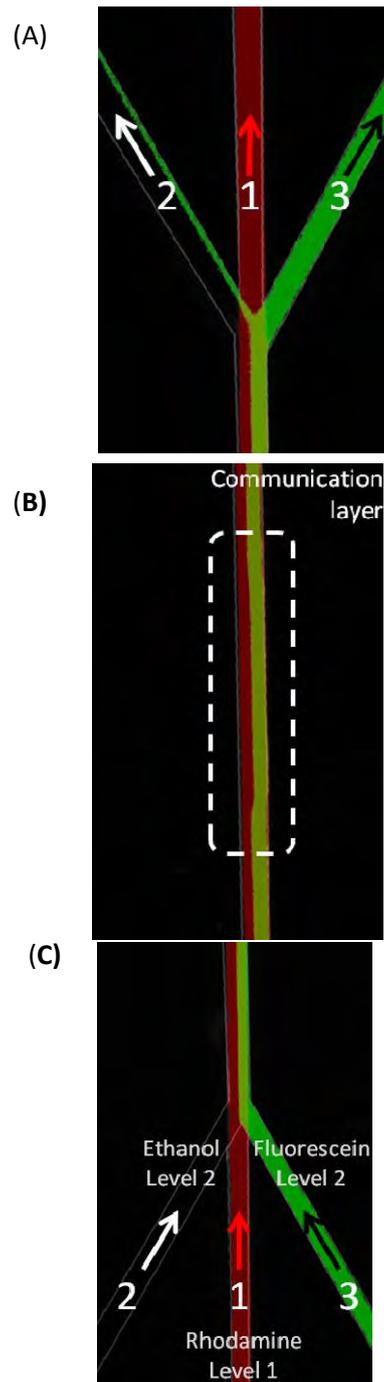
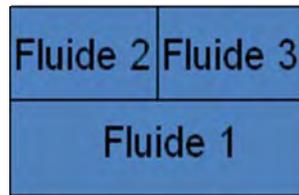


Figure 80. Image de fluorescence avec la rhodamine (dans la canalisation inferieure en rouge), l'éthanol pur (dans la canalisation supérieure à gauche) et la fluorescéine (dans la canalisation supérieure à droite). Nous observons trois zones du dispositif : (A) la sortie, (B) la partie commune et (C) l'entrée.

En mesurant les profils d'intensité des différents colorants, nous constatons que les fluides respectent le schéma attendu. En effet, la rhodamine injectée dans la canalisation du dessous reste en fond de canalisation et la fluorescéine et l'éthanol des canalisations supérieures restent au dessus. Ces observations sont en parfait accord avec nos simulations.

Layout C



Attendue et mesuré

Figure 81. Profil des écoulements attendus pour une coupe située dans la zone commune des fluides après l'intersection. Ce dispositif permet donc la coexistence de trois écoulements laminaires partageant une même interface.

Cependant une observation attentive révèle qu'une partie de la fluorescéine passe dans les sorties 1 et 2 et il en est de même avec la Rhodamine dans les sorties 2 et 3. Ce phénomène est certainement dû à la diffusion des espèces le long de la canalisation mais il convient de nous en assurer.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'intensité lumineuse est mesurée en entrée et en sortie du dispositif, ces résultats sont présentés figure 82. Nous mesurons les différents taux de fluorescence entre les sorties. Nous constatons ainsi que 14% de la fluorescéine est déviée dans la canalisation de gauche (la sortie 2) et 11% dans la canalisation du dessous (la sortie 1).

Nous pouvons comparer ces résultats aux résultats théoriques obtenus en résolvant l'équation de la diffusion. C_0 est la concentration initiale, D le coefficient de diffusion, v la vitesse du fluide, y la position dans le canal perpendiculairement à l'écoulement et x la position dans le sens de l'écoulement. Le coefficient de diffusion de la Fluorescéine dans l'éthanol a pu être mesuré précédemment à une valeur de $5,2 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

$$C(y, x) = \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{y}{2\sqrt{D\frac{x}{v}}}\right) \quad [3.17]$$

Le taux de diffusion selon l'axe y ainsi calculé pour une longueur de canalisation de $5300\mu\text{m}$ vaut 17% de la concentration initiale et le taux de diffusion selon l'axe z à travers la section commune de $500\mu\text{m}$ est de 10,5%. Ces taux sont à comparer respectivement au 14% et 11% trouvés expérimentalement. Nous avons trouvé des résultats similaires avec la rhodamine.

Les taux de diffusion mesurés sont en bon accord avec la théorie et montrent bien que les échanges observés sont dus à de la diffusion et non à un quelconque mécanisme d'advection.

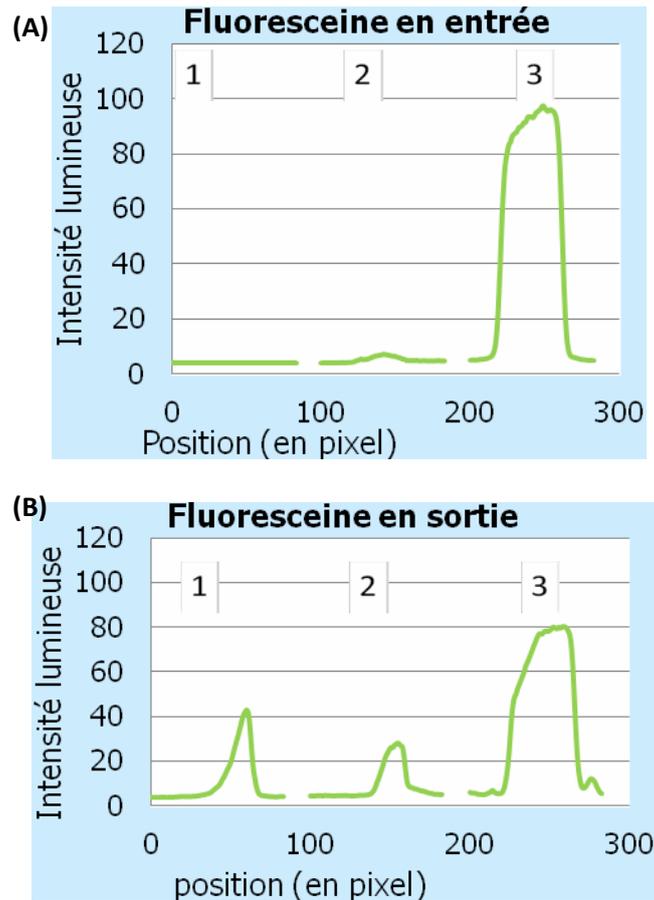


Figure 82. Profil des intensités lumineuses mesurées pour le design C, (A) en entrée, avant la zone commune, (B) en sortie, après la zone commune.

3.4.4 Vers le concept de multSensor

Avant de parler de multSensor, voyons ce qu'est un T-sensor. Il tire son nom de sa géométrie en forme de T ou de Y, comme sur la figure 83 (A. E. Kamholz, 1999), le T-sensor permet de mesurer des coefficients de diffusion ou encore des viscosités. En effet, le but est de mettre en contact deux fluides et de regarder comment se comporte leur interface, sachant que le mélange n'est alors régi que par la diffusion.

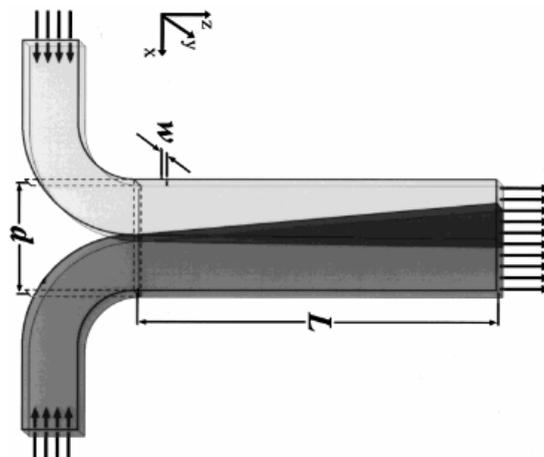


Figure 83. Présentation d'un T-sensor

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que les écoulements superposés et collatéraux de fluides dans de telles structures 3D sont stables et peuvent être modélisés simplement par des représentations standards. Ces propriétés d'écoulement sont indispensables dans l'implémentation des fonctions de séparation que nous envisageons, mais de nombreuses autres applications sont également possibles.

Afin d'aller plus loin dans ce sens, nous avons réalisé des simulations du design C avec COMSOL en intégrant cette fois les phénomènes de diffusion. Nous attribuons pour l'heure le même coefficient de diffusion à tous les fluides, celui de la Fluorescéine à savoir $5,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Nous nous intéresserons particulièrement à trois plans ou sections dans la partie commune, en entrée, au milieu et en sortie comme décrit dans la figure 84.

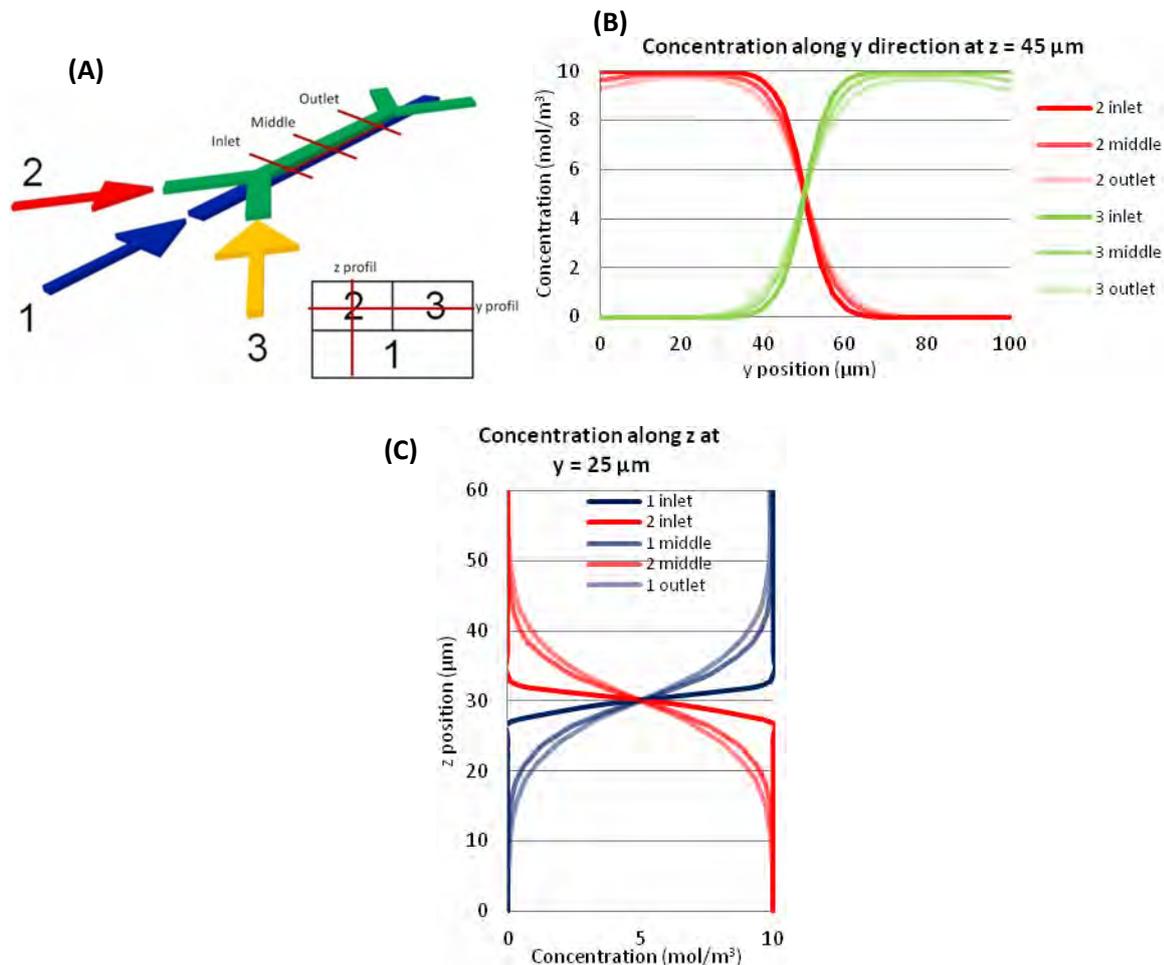


Figure 84. (A) structure C montrant les plans où les profils de concentration ont été calculé. (B) un profil de concentration selon l'axe y pour le fluide 2 (en vert) et 3 (en rouge). (C) Profil de concentration selon z pour le fluide 2 et le 1 (en bleu).

Nous regardons l'évolution des profils de diffusion pour les différents composés aux différents plans d'intérêts. Les profils de diffusion pour les composés 2 et 3 suivant l'axe y sont en accord avec des profils standards de diffusion dans un T-sensor. Nous remarquons une légère inflexion proche des murs indiquant que la concentration ne reste pas à sa valeur maximale à cause de la dilution avec le composé 1 du dessous qui diffuse aussi. De plus la diffusion est faible pour la longueur de canalisation considérée.

De même pour le profil de diffusion le long de l'axe z avec la diffusion des éléments 2 et 1. Au détail près qu'il n'y a pas d'artéfact aux fortes concentrations, juste car le composé 3 n'a pas le temps de diffuser en $y=25\mu\text{m}$.

Nous vérifions que les profils de diffusion selon les axes y et z sont en accord avec les profils standards de diffusion dans un T-sensor basique. Nous allons maintenant porter une plus grande attention à l'intersection des trois fluides. La figure 85 donne les iso-concentrations de chaque espèce dans les différents plans définis précédemment.

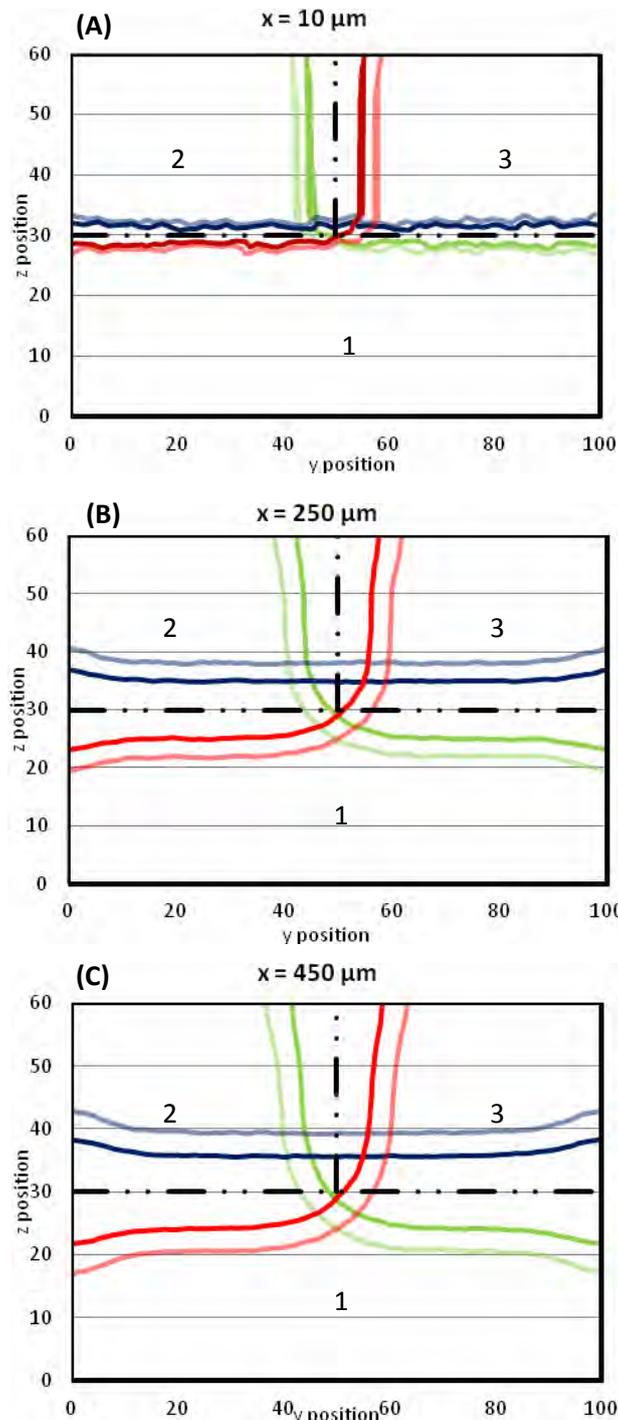


Figure 85. Nous regroupons ici les iso-valeurs pour les concentrations des différents fluides à l'entrée (A) au milieu (B) et à la sortie (C) de la zone commune des trois fluides. La couleur la plus foncée indique une concentration à 2/10 de la concentration initiale et la couleur la plus claire à 1/10.

Comme attendu, nous pouvons voir sur la figure 85.A que les espèces 2 et 3 ont déjà interdiffusé avant d'atteindre l'intersection avec le fluide du bas. Nous pouvons aussi voir que l'ajout de la couche intermédiaire introduit une faible perturbation en entrée de la zone commune. Dans la partie centrale, la diffusion entre les différents composants s'est bien installée et nous pouvons distinguer 4 zones de mélange : fluide 1 + fluide 2, fluide 1 + fluide 3, fluide 2 + fluide 3, et enfin plus intéressant fluide 1 + fluide 2 + fluide 3 au milieu de la canalisation. Nous pouvons voir que ces zones de réaction sont stables et évoluent de façon similaire à l'approche T-sensor.

Tout comme le T-sensor, l'allure des zones de réactions ainsi que le temps de résidence peuvent être facilement contrôlés en jouant sur les différents débits d'entrée. De même grâce aux deux niveaux de canalisation, nous pouvons créer un T-sensor à hauteur variable. En effet, en utilisant une solution inerte comme fluide 1 (en dessous de la canalisation), et en définissant son débit, nous pouvons concentrer les diffusions entre les fluides 2 et 3 dans la hauteur de canalisation voulue.

Afin de valider expérimentalement ces résultats, nous avons repris les expérimentations précédentes en faisant varier le débit de la canalisation 1.

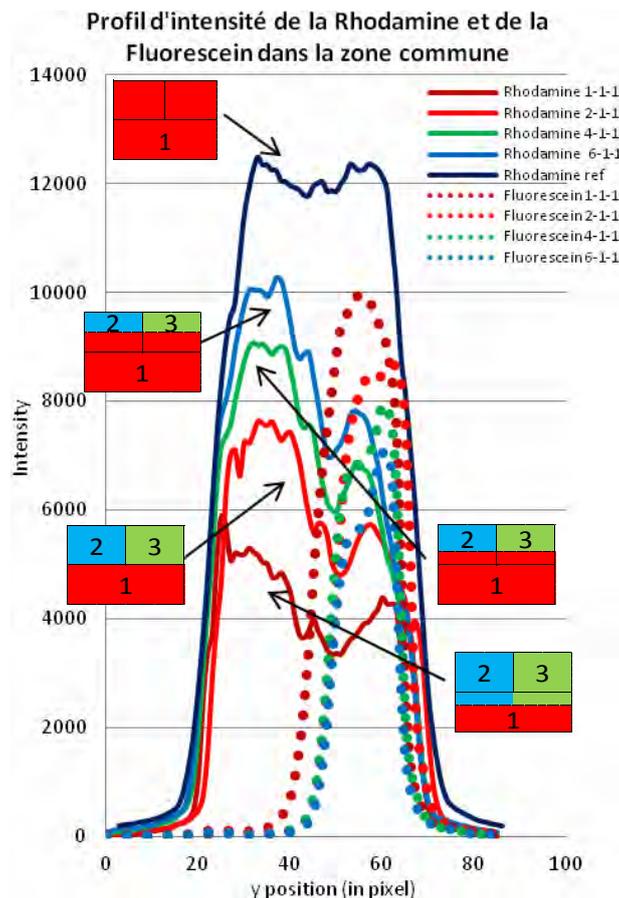


Figure 86. Les profils d'intensité de la Rhodamine et de la Fluoresceine dans la zone commune avec différents débits de rhodamine. A côté du nom de l'élément tracé ce trouve les valeurs des débit en $\mu\text{l.min}^{-1}$ dans l'ordre suivant : Débit en rhodamine-Débit en fluorescein-Débit en éthanol.

Nous maintenons le débit d'éthanol et d'éthanol + fluorescéine (fluides respectivement 2 et 3) constant à $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Et nous faisons varier le débit de Rhodamine afin de changer la hauteur virtuelle où sont condensés les fluides 2 et 3. Nous mesurons alors l'intensité de la rhodamine et de la fluorescéine dans la largeur de la canalisation, la valeur de l'intensité nous donne la hauteur sur laquelle la rhodamine est regroupée dans la canalisation. Connaissant la profondeur de la fluorescéine et de la rhodamine, nous pouvons remonter à la position de l'interface.

La correspondance avec la théorie est excellente comme nous l'indique la figure 87.

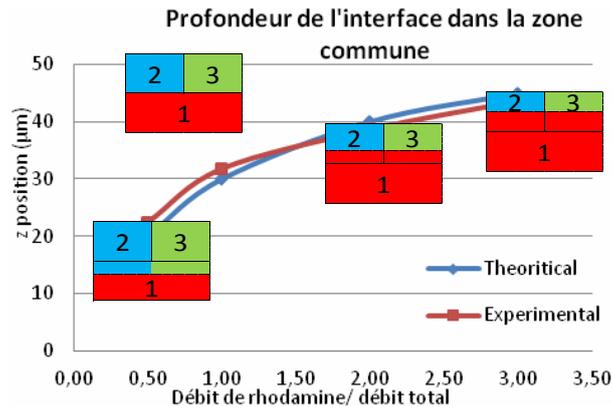


Figure 87. La position de l'interface dans la profondeur de la canalisation au niveau de la zone de connexion, pour différents rapports de débit de rhodamine sur débit total allant de 0,5 à 3.

3.4.4 Application à l'étude de l'agrégation d'amyloïde beta

3.4.4.1 L'étude de l'agrégation de l'amyloïde bêta : un enjeu dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer

Dans le cadre d'un autre projet du laboratoire, des études ont été menées sur l'agrégation d'un peptide modèle pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde Beta. En effet, l'agrégation de l'amyloïde- β provoquerait des pertes synaptiques et la mort de neurones. Ce sont ces pertes qui créent des troubles de mémoire, de démence ou perte d'autonomie chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Les tests consistaient principalement à mettre en contact dans une puce de type T-sensor, une solution de peptide stable avec une solution contenant un déclencheur de l'agrégation. Un des problèmes auquel ces études se sont confrontées, était l'agrégation non contrôlée et non désirée sur les murs de la canalisation. En effet, des agrégats indésirables apparaissaient alors sur les parois supérieures et inférieures de la canalisation formant des taches très lumineuses en croissance rapide.

L'idée est ici d'utiliser une géométrie 3D pour supprimer la présence des murs au lieu même où se passe la réaction. Nous sommes donc partis sur une géométrie 3D avec trois fluides qui se superposent, deux fluides en haut, un fluide en bas.

La première étape a été de mesurer le coefficient de diffusion du peptide et de voir son évolution quand il y a agrégation. En effet, quand le peptide s'agrège dans le flux, il forme de petits agrégats qui ne sont pas visibles car le contraste n'est pas assez grand. Ces petits agrégats sont néanmoins

plus gros que le peptide libre et de ce fait ont un coefficient de diffusion plus petit, c'est ce qui mesuré jusqu'à présent. Les agrégats ne sont visibles que quand ils se fixent à la paroi, ils vont alors grossir et avoir une intensité de fluorescence suffisante pour être détectée.



Figure 88. Schéma du dispositif utilisé pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde bêta = dispositifs 3D à 3 entrées.

Le dispositif est fabriqué en SU8 par le procédé de laminage de film sec expliqué précédemment. (Figure 88) Il se compose de 4 niveaux de SU8, deux niveaux de canalisation de 25 μ m et deux niveaux de 10 μ m pour la couche séparatrice et le dernier capot. Les canaux font 200 μ m de large et la partie commune fait 2000 μ m de long.

Nous rajoutons des graduations sur le côté de la canalisation afin de connaître la position lors des expériences. Les graduations sont disposées tous les 100 μ m, et font 20 μ m de large.

Les solutions utilisées sont :

Fluide 2 : Zinc dans de l'eau à 50mM

Fluide 1 : tampon d'Hepes à 100mM et à pH 7,4.

Fluide 3 : Solution peptide Abeta14-23 à haut pH (10 ou 12) à 300 μ M

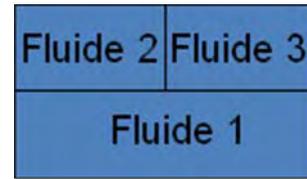


Figure 89. Profil d'écoulement dans une section du dispositif

En effet, l'agrégation se produit lors de la mise en contact du peptide avec un ion métallique (ici le zinc) et lorsque le pH est neutre. Ainsi en introduisant 3 solutions, la première contenant l'ion métallique, l'autre le peptide maintenu à pH élevé pour empêcher l'agrégation et la dernière une solution à pH neutre, les conditions d'agrégations seront prioritairement remplies au point d'intersection des fluides et ainsi loin des murs.

Pour visualiser le peptide, un mélange 1/10 de peptide marqué avec de la TRITC / peptide non marqué est réalisé. La TRITC (Tetra-methylRhodamineIsoThioCyanate) est une molécule fluorescente dérivée de la rhodamine.

3.4.4.2 Agrégation en fond de canalisation

Lors des expériences, nous avons vu la difficulté d'obtenir des écoulements stables, équilibrés et sans bulle au remplissage. En effet, la puce est une première fois remplie avec du tampon puis nous injectons en même temps les solutions pour l'agrégation. A ce point très précis, si une bulle est injectée ou si un morceau de PDMS de la connectique se retrouve dans la canalisation et notamment au niveau de la jonction des fluides, l'instabilité occasionnée peut perturber l'expérience de façon irrémédiable.

Cependant ces problèmes ont données lieu à des phénomènes intéressants.

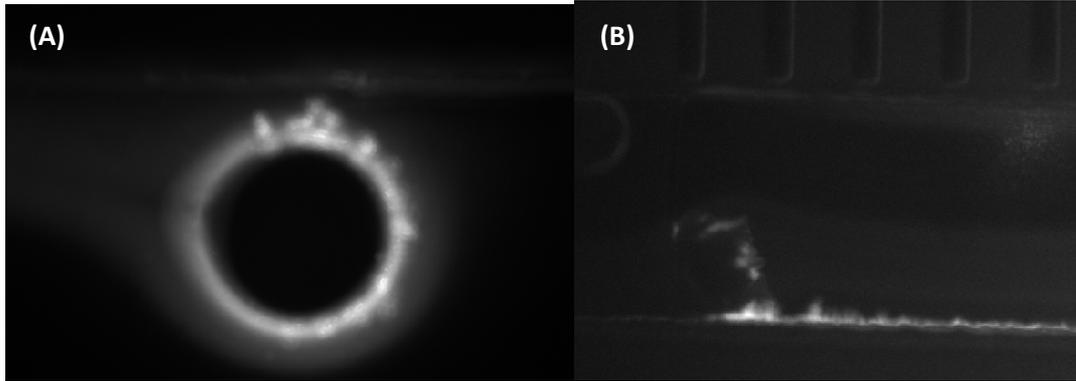


Figure 90. Défauts présents à la jonction des trois fluides. (A) une bulle, (B) un morceau de PDMS

Sur la figure 90 nous voyons que, en raison de l'instabilité créée par une bulle ou un morceau de PDMS, le flux d'amyloïde bêta a été brièvement en contact avec le fond de la canalisation avant que les fluides ne se stabilisent. Ce court moment a permis l'ensemencement de la surface par le peptide. Des cristaux se développent alors avec le temps et de façon continue en fond de canalisation.

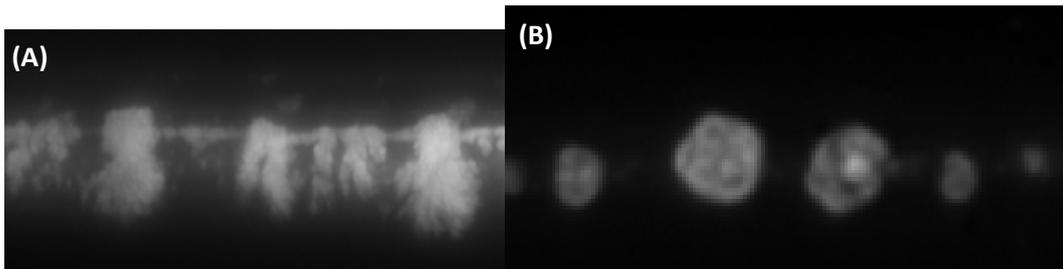


Figure 91. Différentes formes de cristallisation du peptide. (A) sous forme d'arbres, (B) sous forme de cristaux compacts.

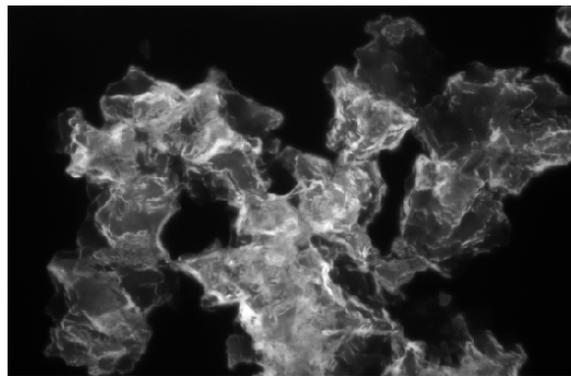


Figure 92. Cristallisation du peptide en volume

Nous notons aussi que les cristaux obtenus lors de deux expériences différentes semblent être de types différents (figure 91A et figure 91B). Les premiers sont fibrillaires, en forme d'arbres, les deuxièmes forment des cristaux compacts. Nous pouvons aussi les comparer aux cristaux obtenus en gros volume dans des tubes de 1ml, représentés figure 92, les cristaux sont encore différents, plus anarchiques et se développant sous forme de plaques. A ce niveau de l'étude nous ne connaissons pas les raisons ou les paramètres influençant ce type d'agrégation.

3.4.4.3 Ecoulement laminaire et agrégation

Nous avons pu à plusieurs reprises réaliser des co-écoulements laminaires superposés sans défaut. Cependant, la diffusion est importante surtout pour de petites molécules comme le Zn et qui atteignent rapidement les parois.

Ainsi, nous pouvons observer que le signal de fluorescence apparaît à une distance de 1050µm du premier point de formation du point triple. Cette zone est diffuse et s'élargit le long de la canalisation. Elle confirme bien que l'agrégation opère lorsque les 3 conditions de concentration et pH sont remplies. Toutefois nous constatons que cette agrégation apparaît au contact de la paroi supérieure (figure 93).

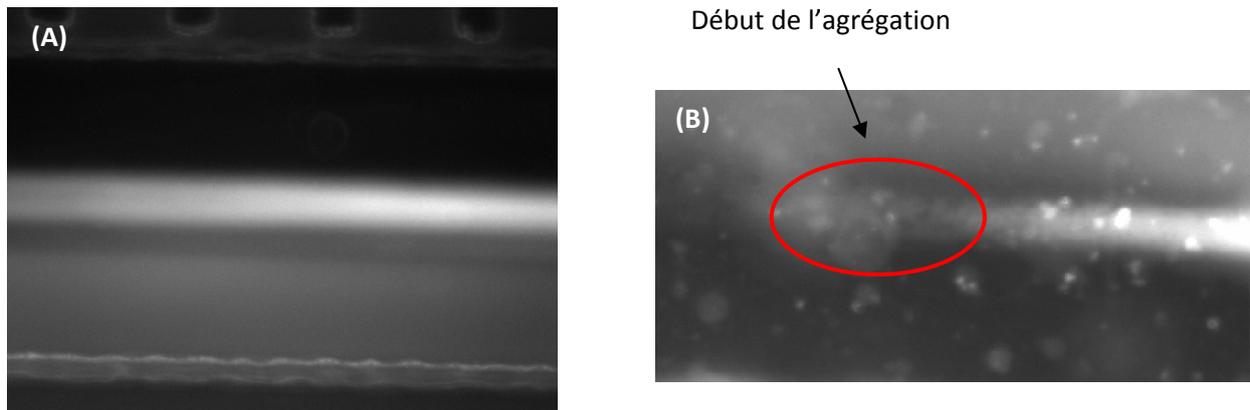


Figure 93. Agrégation de l'amyloïde bêta au sommet de la canalisation (A), et qui commence en un point donné (B)

Cependant, il est intéressant de noter que le point où débute l'agrégation est fixe, reproductible et semble pouvoir donner une information pertinente. En effet, en calculant les concentrations au point d'apparition de la fluorescence, nous pouvons déduire les conditions d'agrégation. Pour ce faire, nous effectuons des simulations avec le logiciel COMSOL et déterminons ainsi les profils de concentration dans tout l'espace d'écoulement.

Le coefficient de diffusion du peptide est de $2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, cette grandeur a été déterminée dans le cadre de travaux antérieurs. Pour le Zn, nous choisissons d'utiliser la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad [3.18]$$

Avec R le rayon de la molécule, ici de l'atome qui vaut $1.22 \cdot 10^{-10} \text{ m}$, k_B la constante de Boltzmann qui vaut $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$, η la viscosité du fluide à $10^{-3} \text{ pa} \cdot \text{s}$ et T la température prise à 295 K

$$\text{D'où } D_{\text{Zn}} = 1.77 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Une première remarque peut être faite en comparant les coefficients de diffusion :

$$K = \frac{D_{\text{Zn}}}{D_{\text{peptide}}} = 8.85 \quad [3.19]$$

Le zinc, étant plus petit, diffuse bien plus vite que le peptide d'un facteur presque dix.

Les conditions de l'écoulement sont reproduites à l'identique sur COMSOL avec les coefficients de diffusion précédemment définis.

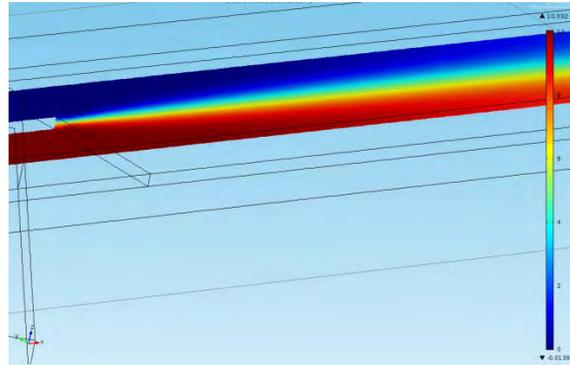


Figure 94. Profil de diffusion du Zn simulé sur COMSOL, le rouge indiquant une concentration maximale de 50mM et le bleu indiquant une concentration nulle.

Nous pouvons donc nous placer aux points si particuliers, de début d'agrégation au dessus de la canalisation, que nous avons vu lors des expériences. Les résultats de simulation nous donnerons donc les conditions pour l'apparition de l'agrégation. (figure 95 et 96)

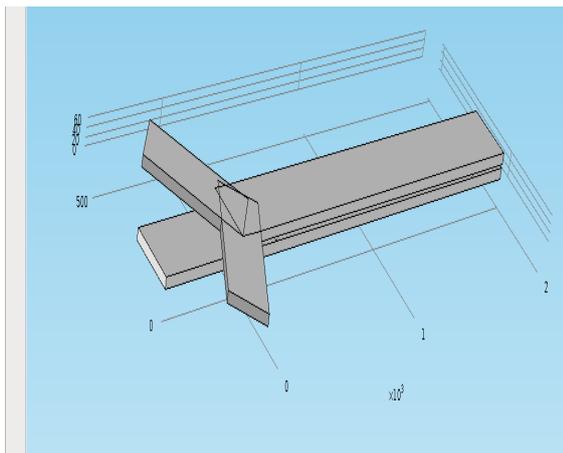


Figure 95. Schéma global du dispositif deux niveaux simulé sur COMSOL pour l'étude de l'agrégation de l'Amyloïde-β.

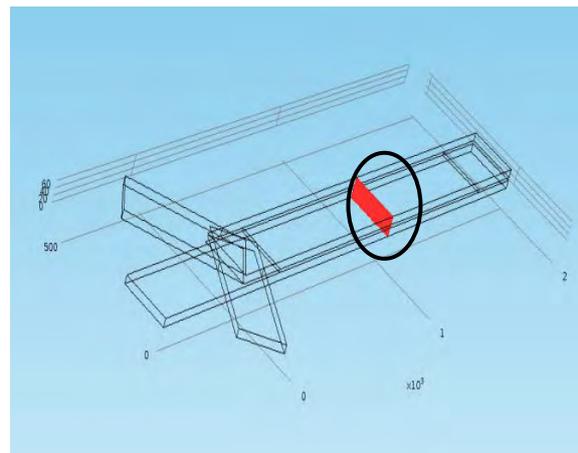


Figure 96. Visualisation du plan de mesure au point d'agrégation trouvé expérimentalement

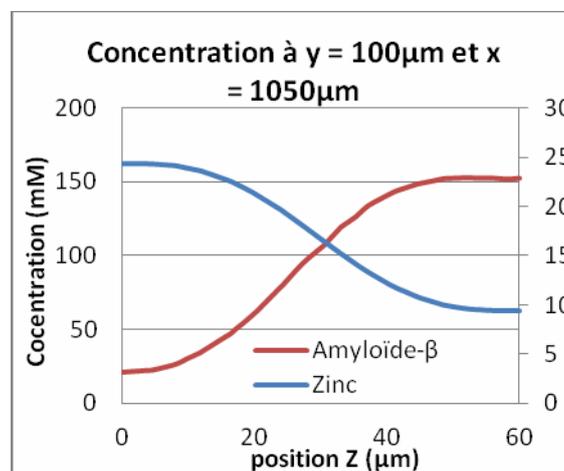


Figure 97. Profils des concentrations de l'Amyloïde-β (Axe de gauche) et du zinc (axe de droite) donnés par les simulations COMSOL au point d'agrégation à x= 1050μm

Au vu des courbes figures 97, il suffit de nous placer à $Z = 60\mu\text{m}$ (en haut de la canalisation) pour connaître les concentrations d'Amyloïde- β et de Zinc nécessaire pour provoquer l'agrégation. Nous mesurons donc une condition d'agglomération pour une concentration de peptide de $153\mu\text{M}$ et une concentration de zinc de $9,4\mu\text{M}$.

Nous pouvons conclure de que les trois conditions doivent absolument être réunies pour avoir de l'agrégation car il n'y a pas d'agrégation quand le peptide et le tampon sont en contact, le zinc est donc indispensable. Cependant cette expérience demande à être approfondie.

Nous voyons ici que nous avons un outil, de « screenage » continue, original. En effet, de par le fait de la diffusion nous accédons à toutes les conditions de mélange possible à partir du moment de la mise en contact jusqu'à la séparation des fluides. C'est une façon originale de tester différentes conditions de mélange, cela nous donne la valeur minimale de concentration de chacune des espèces afin d'avoir le phénomène d'agrégation.

Conclusion

Dans ce troisième chapitre, nous avons vu comment il est possible de fabriquer des dispositifs microfluidique en 3D grâce à une technologie de laminage de film sec qui permet d'empiler les niveaux de résine et de les structurer au fur et à mesure. Cette technique a pu être mise à l'épreuve mais se révèle être toujours la plus performante pour de telles constructions.

Nous avons aussi pu valider les propriétés des écoulements des fluides dans des micro canaux. Ces notions de base sous bas Reynolds nous ont permis d'appréhender les écoulements 3D existants dans une géométrie multi-niveaux.

Nous avons enfin pu étudier plusieurs géométries de dispositifs dans le but de réaliser des co-écoulements laminaires qui se superposent puis se séparent sur une distance bien contrôlée. Ces études complètes liant la simulation et l'expérimentation ont bien démontré la pertinence de l'approche.

Ces études sont primordiales pour la création du dispositif de séparation magnétique dont cette thèse fait l'objet. De plus, elles ont abouti à l'émergence d'un Multisensor assurant le même rôle que le T-sensor mais réglable en profondeur ou multiparamètres. Nous avons aussi pu appliquer ces connaissances pour une étude de l'agrégation de l'amyloïde- β , qui nous renseigne un peu plus sur les paramètres responsables de ce phénomène.

Chapitre 4 : Conception et réalisation de dispositif de séparation magnétique

Introduction	98
4.1 Conception du module de tri magnétique vertical	99
4.1.1 Design des micro bobines	99
4.1.2 Design des micro canalisations	100
4.2 Fabrication	102
4.2.2 Comportement de la SU8 non réticulée	103
4.2.3 Etapes de fabrication	108
4.2.3.1 Isolation du wafer en Si	108
4.2.3.2 Premier niveau de connectique électrique	108
4.2.3.3 Via électrique et couche isolante	110
4.2.3.4 Croissance électrochimique du cuivre.....	110
4.2.3.5 Couche de protection et via électrique	114
4.2.3.6 Canal microfluidique	115
4.2.3.7 Croissance de bobines supérieures	115
4.2.3.8 Protection et via électriques	116
4.2.3.9 Prise des contacts électriques	117
4.2.4 Minimisation des contraintes mécaniques	118
4.3 Connectiques fluidiques et électriques	119
4.3.2 La connectique fluidique.....	119
4.3.3 La connexion électrique.....	122
Conclusion	123

Introduction

Nous avons vu dans le chapitre 2 le meilleur design pour les micros bobines de cuivre et dans le chapitre 3, les possibilités fluidiques que nous offre notre technologie. Nous allons voir, dans ce chapitre, comment il est possible d'allier la fluidique et le magnétisme pour construire des dispositifs de tri innovants et performants.

4.1 Conception du module de tri magnétique vertical

Notre premier objectif est de réaliser une séparation verticale des éléments magnétiques, attirés par des bobines situées en dessous des canalisations. Le schéma de fonctionnement est donné figure 98.

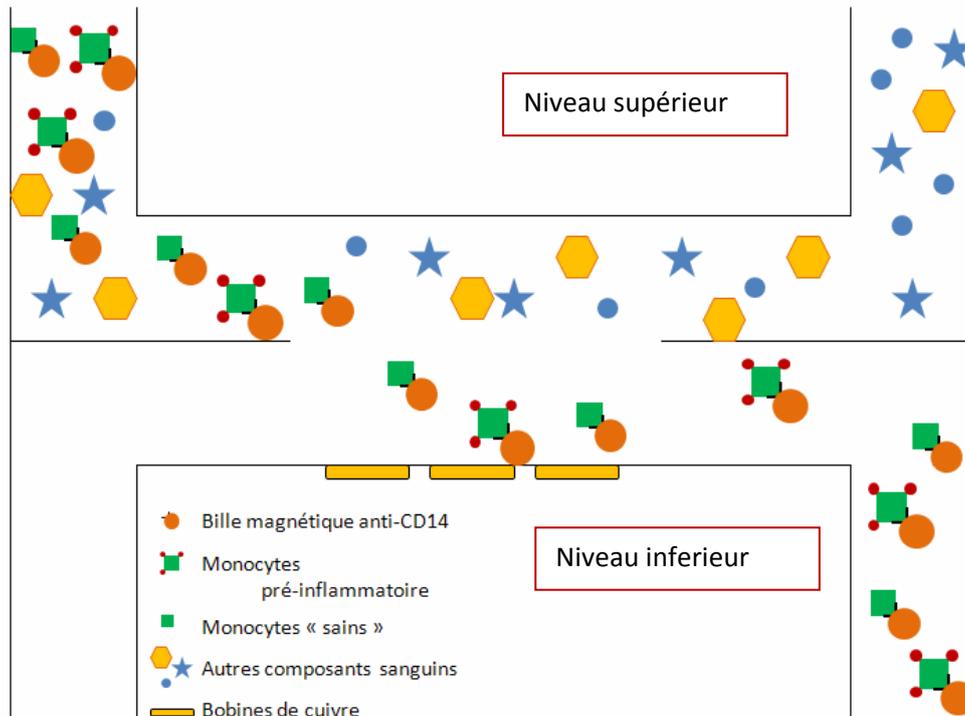


Figure 98. Schéma de principe du dispositif de séparation verticale magnétique

Les monocytes accrochés aux billes magnétiques sont attirés de la canalisation supérieure vers la canalisation inférieure, et les autres composants sanguins sont évacués dans la canalisation supérieure.

Nous avons réalisé une première structure dite de première génération que nous exposons maintenant.

4.1.1 Design des micro bobines

Les bobines sont constituées de 10 spires, de 5 μ m de large, 5 μ m de haut et espacées de 5 μ m. C'est en effet ce design qui offre la meilleure réponse magnétique au vu des résultats du Chapitre 2. Les bobines sont au nombre de trois espacées entre elles de 220 μ m. L'espacement est fixé de façon à ce que l'étude de l'influence des bobines puisse se faire séparément (voir figure 99).

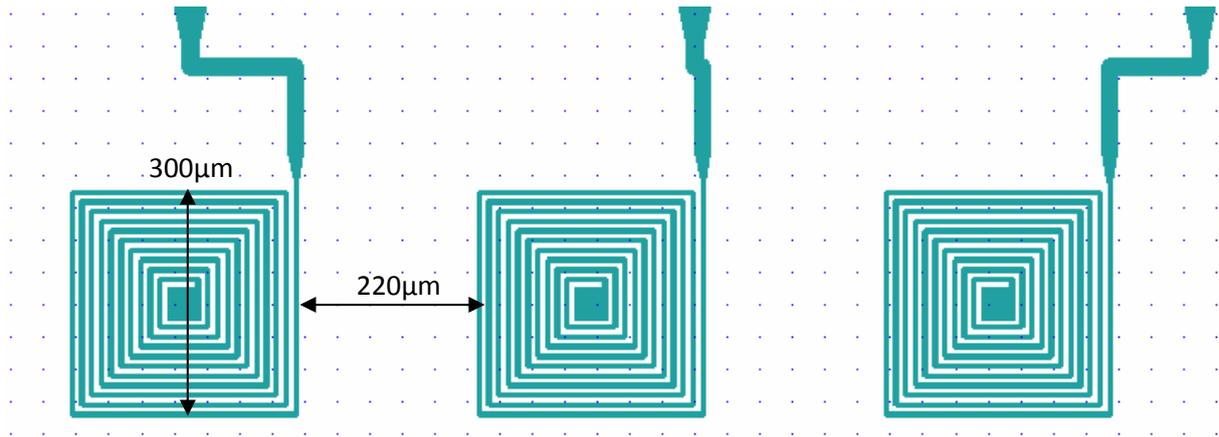


Figure 99. Design des bobines

Chacune des bobines est alimentée indépendamment, mais possèdent une masse commune.

Nous prévoyons de commander les bobines grâce à une nappe 8 voies comme expliqué plus en détail dans la suite du chapitre, partie 4.3.3. Il faut donc prévoir la place du connecteur et les lignes de courant pour s'y raccorder (figure 100).

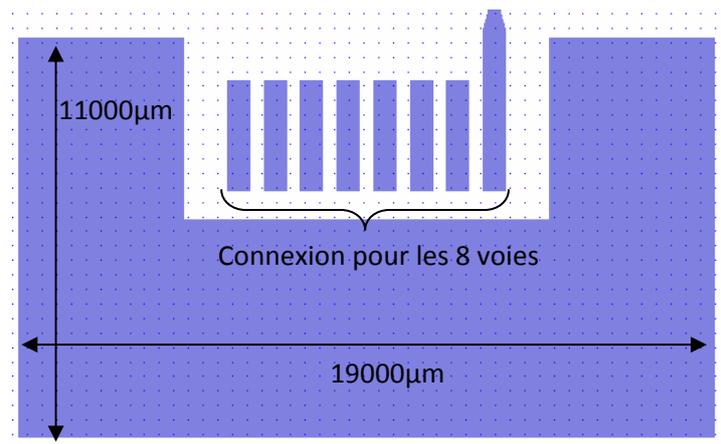


Figure 100. Design de la connexion entre le microdispositif et la carte de commande

4.1.2 Design des micro canalisations

Comme nous avons vu dans le chapitre 3 nous partons sur un écoulement en 3D avec deux niveaux de canalisations superposés et une couche en SU8 intermédiaire pour permettre la mise en contact des fluides dans une partie rectiligne de canalisation. Les sorties fluidiques possèdent la même résistance hydrodynamique afin de s'assurer d'un partage équitable des fluides en sortie, comme recommandé dans le chapitre 3. Le design fluide est schématisé figure 101.

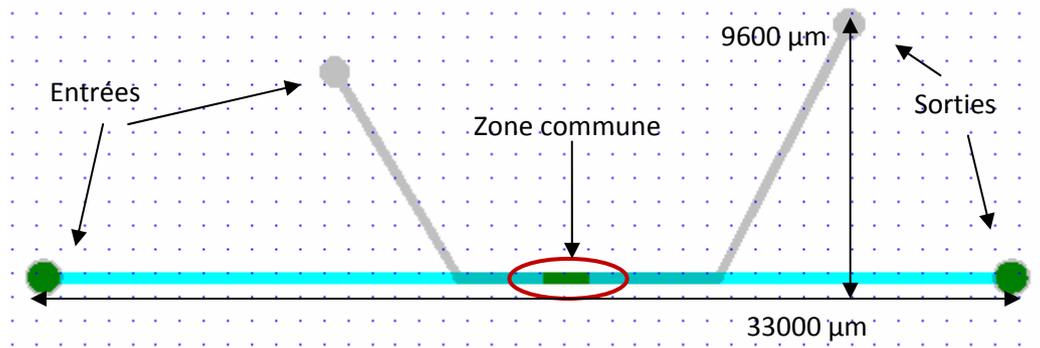


Figure 101. Design fluide du dispositif 1-3D3

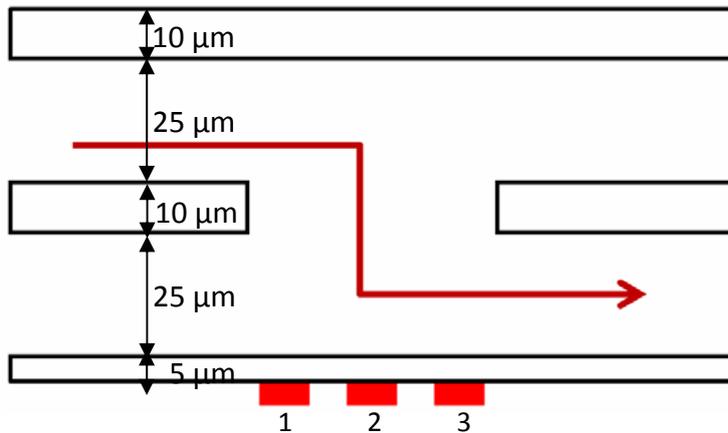


Figure 102. Schéma en coupe du dispositif 1-3D3 avec les épaisseurs des couches de résine SU8.

Nous faisons le choix de faire des canalisations de la même taille que les bobines à savoir $300\mu\text{m}$ de large.

La hauteur des canalisations est fixée à $25\mu\text{m}$, La zone commune entre les deux niveaux de canalisation recouvre entièrement les trois bobines soit une longueur totale de $1470\mu\text{m}$.

La hauteur des canalisations est assez grande pour permettre l'écoulement des billes magnétiques et des monocytes sans risque de bouchage, mais limitée à $25\mu\text{m}$ pour avoir un champ magnétique suffisamment important dans toutes les canalisations.

Au final pour la réalisation du premier design, nous devons utiliser 8 niveaux de masques pour la réalisation des bobines inférieures et de la partie fluide plus 3 masques si nous ajoutons les bobines supérieures.

Le design global pour une puce est représenté figure 103. Nous réaliserons 4 dispositifs par wafer de 4 pouces pour ce premier design.

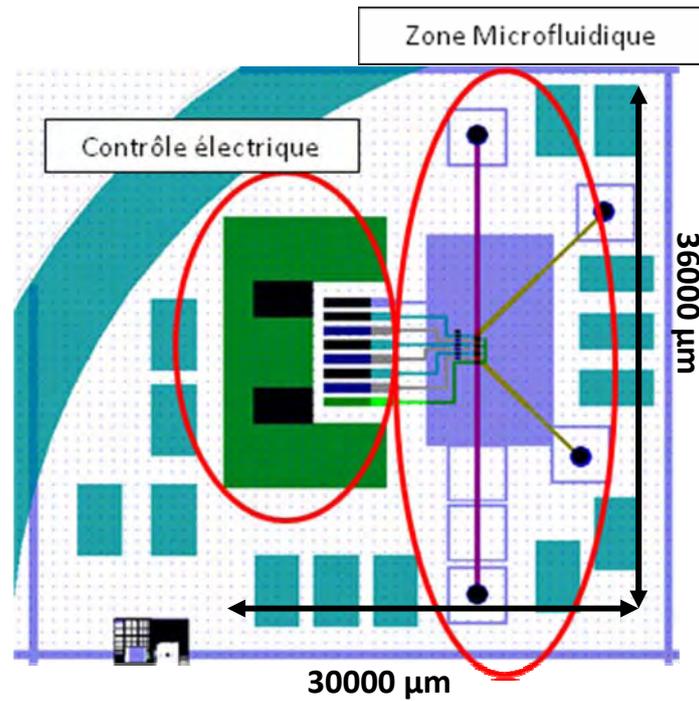


Figure 103. Schéma complet du dispositif de première génération

4.2 Fabrication

Nous présenterons tout d'abord le procédé général de fabrication avec les différentes étapes succinctement expliquées pour une meilleure compréhension de ce chapitre.

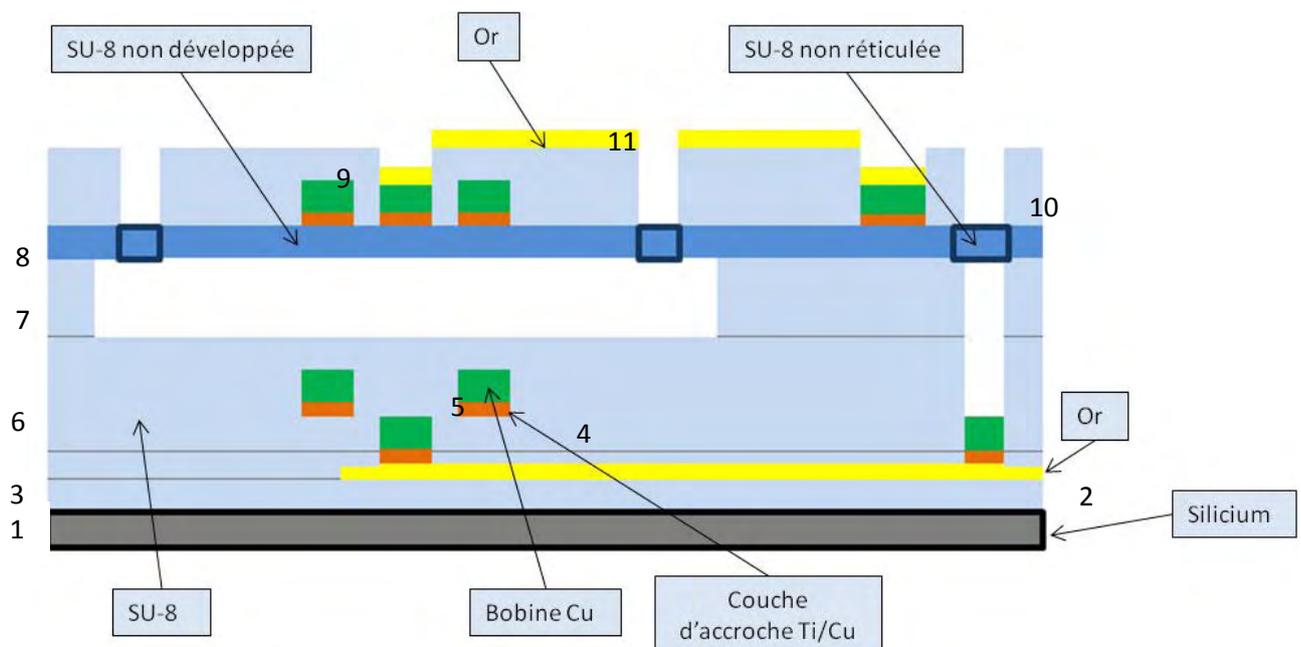


Figure 104. Schéma global du procédé de fabrication du dispositif de première génération avec les bobines en vis-à-vis.

La première étape consiste à isoler le wafer en silicium par un dépôt de résine SU8 (1). Cette étape est éliminée si nous travaillons sur un substrat de verre ou de polymère. Puis la piste d'amenée de courant en or est réalisée (2), encapsulée par de la SU8 en laissant ouverts les plots qui permettent la

connexion électrique avec les bobine de cuivre (3). Une première couche d'accroche Ti/Cu est alors nécessaire (4), afin de réaliser la croissance des bobines en cuivre par électrochimie (5). Celles-ci sont ensuite recouvertes de SU8, afin de replanéariser le wafer en ne laissant apparaître que les connectiques électriques supérieures (6). La construction de la partie fluide est alors possible (7). Le dernier capot de la partie fluide est particulier car il n'est pas développé lors de son procédé de fabrication pour laisser la résine non insolée protéger les canalisations fluidiques des étapes suivantes (8). Les bobines supérieures peuvent alors être réalisées par croissance de cuivre après dépôt de la couche d'accroche (9), les bobines sont encapsulées de résine SU8 (10), enfin, une dernière étape de reprise des contacts de la bobine supérieure est nécessaire pour commander les bobines à distance et toutes les connectiques, électriques et fluide sont libérées (11).

Dans la suite de ce chapitre, chaque étape du procédé est représenté dans un tableau regroupant le numéro de l'étape, le type d'action réalisé, si c'est une photolithographie, une métallisation, les mesures de contrôle à effectuer, une partie du masque pour les photolithographies et un schéma en 3D simplifié (figure 105).

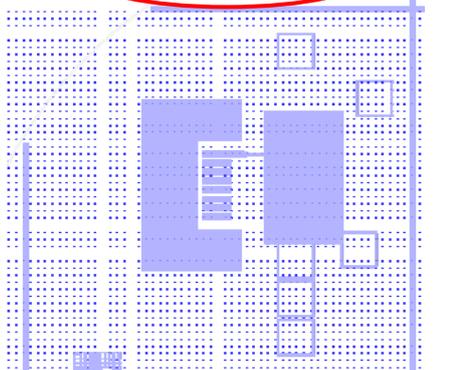
Infos	Schéma masque	Schéma 3D
<p><u>Numéro d'étape :</u> 2</p> <p><u>Type :</u> Métallisation Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique</p>		

Figure 105. Exemple du tableau récapitulatif pour chacune des étapes de fabrication du dispositif 1-3D3

4.2.2 Comportement de la SU8 non réticulée

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction de la partie 4.2 nous souhaitons construire des bobines à différents niveaux des canalisations fluidiques, nous allons donc avoir des étapes de métallisation, de dépôt de résine au dessus de la canalisation. Nous voyons ici que si les canalisations sont ouvertes toutes les solutions des étapes suivantes vont s'infiltrer dans les canaux et potentiellement abimer, contaminer les parois.

Une solution pour palier à ce problème serait de ne pas révéler la SU8 après le capotage de la canalisation, réaliser les étapes de métallisation et de ne développer la résine qu'une fois les structures métalliques réalisées.

Ceci suppose d'avoir une meilleure connaissance du comportement de la résine SU8 non réticulée et en particulier de s'assurer que cette dernière n'est ni dégradée ni réticulée lors des étapes de métallisation.

Les tests ont été effectués sur un wafer d'une première couche de SU8 de 50µm structurée jusqu'à terme du procédé et d'une deuxième couche de SU8 de 10µm non insolée. Les designs choisis pour les tests possèdent toutes les caractéristiques géométriques que nous retrouvons dans tous les designs actuels.

Tenue de la SU8 non réticulée dans le temps :

Au cours du procédé de fabrication, la première question est celle de la tenue de la SU8 non réticulée dans le temps, en effet, les wafers peuvent attendre plus ou moins longtemps entre deux étapes. Nous avons donc voulu nous assurer de la tenue de la SU8 non réticulée dans le temps. Ainsi nous avons vérifié que deux mois après le dépôt, il est toujours possible de révéler la SU8 non insolée sans perte de résolution.

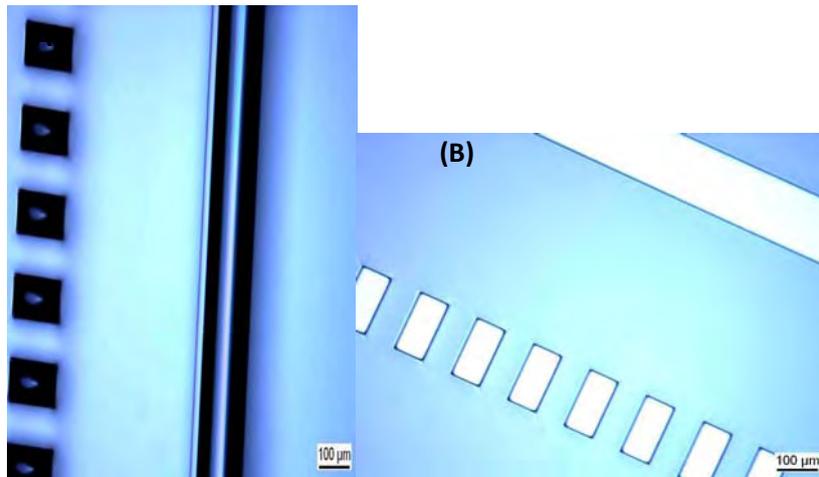


Figure 106. Image au microscope optique de la résine avant développement (A) et après (B).

Tenue de la SU8 non insolée face aux différents produits chimiques :

Lors des différentes étapes de fabrication, le substrat est en contact avec plusieurs produits chimiques et notamment les développeurs des résines de photolithographie. Nous avons donc étudié la tenue de la résine non insolée face à ces développeurs. Le tableau 18 regroupe les tests réalisés sur une couche de 10µm de résine SU8 non insolée.

Bain	Temps	Observations
Bain développeur SU8	5 min	SU-8 développée
Bain AZ développeur	2 min	Pas de dissolution
Bain AZ400K	2 min	Pas de dissolution
Bain MF-CD-26	2 min	Pas de dissolution

Tableau 18. Récapitulatif des bains chimiques subis par la SU8 non réticulée

En dehors du développeur SU8, les autres produits sont des développeurs de résines positives notamment celles utilisées pour faire les moules pour la croissance électrolytique du cuivre. Au vu des résultats, il apparaît clairement que la SU8 non insolée a une très bonne résistance face aux développeurs des résines positives.

Impact du plasma O₂ sur la SU-8 non insolée :

Le traitement plasma est une étape très utilisée dans tous nos procédés, notamment avant le dépôt métallique, avant la croissance électrochimique,... Il est donc important de connaître le comportement de la résine SU8 non insolée face au traitement plasma.

Nous choisissons de commencer par un traitement doux avec les paramètres expérimentaux les plus bas possibles, avec utilisation de la cage de Faraday soit un débit de 1000ml.min⁻¹ d'O₂, une puissance de 200W pendant 30 secondes.

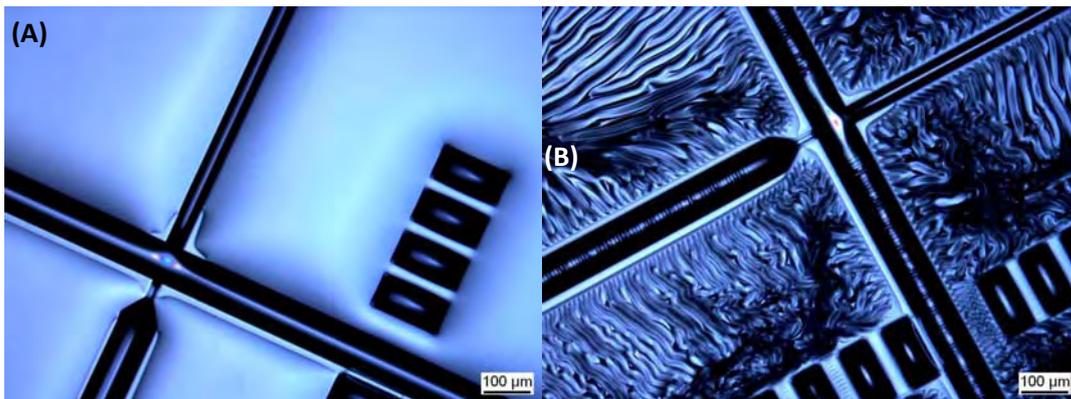


Figure 107. Image au microscope optique de la SU8 non réticulée avant (A) et après traitement plasma 200W 30s (B)

A l'observation au microscope, le wafer apparaît « fripé » (Figure 107.B). La SU-8 reste sur le wafer et semble avoir perdu ses solvants. Après 15 min dans un bain de développer SU-8, la résine n'a pas bougé.

Après deux jours dans le développeur SU-8, une bonne partie de la résine a pu être enlevée mais pas celle située dans les canalisations. Il apparaît donc que le nettoyage de la résine SU-8 non réticulée après un passage dans le plasma est très difficile et que cette étape doit être évitée.

Compatibilité de la SU8 non réticulée avec le procédé de fabrication des bobines de cuivre :

Comme vu précédemment, les bobines de cuivre sont obtenues par croissance électrochimique dans un moule de résine, la 40XT (ce chez MicroChemicals GmbH). Il est donc primordial de vérifier que les étapes thermiques de cette résine n'altèrent pas les propriétés de la résine SU-8 non réticulée.

Le recuit le plus contraignant de cette résine est un passage pendant 2 minutes à 126°C. Un échantillon avec une couche de SU-8 non réticulée est soumis à ce traitement thermique pour voir son influence sur la dureté et la solubilité de cette dernière. Les résultats sont clairs, aucune modification du comportement de la SU-8 n'a été relevée. Le développement s'est déroulé sans accroche.

Compatibilité de la SU8 non réticulée avec le procédé de métallisation :

Il existe deux techniques de métallisation utilisées dans notre procédé, l'évaporation thermique et la pulvérisation cathodique appelée aussi sputtering. La première technique consiste à chauffer le métal à déposer, préalablement placé dans un creuset en tungstène qui résiste à de très fortes températures (la température de fusion du tungstène est de 3400°C). Le métal est alors vaporisé et vient se déposer sur le substrat. La deuxième technique consiste à placer le substrat à l'anode, le métal à déposer à la cathode, le tout dans un plasma de gaz neutre. En appliquant un fort potentiel négatif à la cathode, les ions positifs du plasma vont bombarder la cathode et arracher les atomes de métal qui vont se déposer sur le substrat.

Nous voyons que dans la technique de pulvérisation, la présence d'un plasma est indispensable or l'utilisation de plasma en présence de résine non insolée n'est pas compatible. Nous ne pouvons donc utiliser que la métallisation par évaporation.

Des dépôts de titane et de cuivre respectivement de 100nm et 50nm ont donc été réalisés par évaporation sur 10 microns de résine SU8 non insolée. Le résultat du dépôt est parfait, sans présence de défauts comme nous le montre la figure 108.



Figure 108. Image au microscope optique du dépôt de Ti/Cu sur de la résine SU8 non réticulée

Tenue de la résine SU8 non insolée à l'attaque des métaux :

Une fois la métallisation effectuée, elle sert de protection à la résine qui est en dessous. L'étape de croissance électrochimique en bain ne devrait donc pas poser de problème. Cependant il faut, une fois la croissance électrolytique effectuée, dissoudre le moule de résine et graver la couche d'accroche pour libérer les bobines sans dégrader la SU8

Nous réalisons dans un premier temps l'attaque du cuivre dans une solution de 1ml d'HCl, 1ml d'H₂O₂ et 98ml d'eau DI pendant 2 min. Tout le cuivre de la couche de 50nm a pu être retiré de cette façon laissant apparaître la couche de titane de 100nm comme illustrée figure 109.

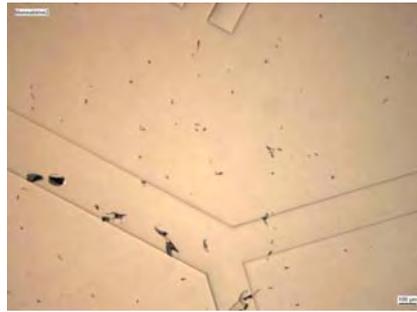


Figure 109. Image au microscope optique de la couche de Ti après attaque du cuivre sur de la résine SU8 non réticulée

Nous pouvons noter certains défauts sur le dépôt du titane. Ces défauts sont certainement dus à la présence de la résine non insolée en dessous. Cependant ce n'est pas un souci car la couche de cuivre était parfaite, sans défaut.

Nous réalisons ensuite l'attaque du titane qui se fait dans une solution de HF 5%, pendant 30 secondes, le temps habituel de l'attaque. Le titane est entièrement attaqué et laisse apparaître la résine SU8 non insolée et non développée.

Nous avons poussé le temps dans le bain de HF 5% à 5 minutes sans aucune modification. La SU8 non réticulée ne se dissout pas et conserve le même aspect comme illustré figure 110.



Figure 110. Résine SU8 non réticulée après l'attaque du cuivre et du titane

Après toutes ces étapes, il faut vérifier que la résine puisse encore être révélée. La révélation s'effectue dans un bain de SU8 développeur pendant 5 minutes. La résine a pu alors être complètement développée démontrant l'innocuité de toutes les étapes précédemment effectuées.



Figure 111. Après développement de la résine SU8 non réticulée ayant subi une métallisation Ti/Cu et deux attaques chimiques, une du cuivre, l'autre du titane.

En conclusion, tous ces tests nous ont permis de démontrer qu'une couche de SU8 non réticulée peut subir un procédé complet de métallisation sans altération de ses propriétés, nous pouvons donc affirmer qu'il est possible de réaliser des bobines à différents niveaux de canalisation en construisant sur de la résine SU8 non insolée sans en dégrader ses propriétés physiques.

4.2.3 Etapes de fabrication

Nous allons voir dans ce paragraphe les différentes étapes de fabrication en détail. Nous avons déjà fait une première présentation succincte en introduction de la partie 4.2, ici nous verrons les paramètres des étapes de fabrications.

4.2.3.1 Isolation du wafer en Si

Dans un premier temps nous devons nous assurer de l'isolation électrique entre le substrat et nos futures bobines de cuivre. Dans le cas de substrat isolant en verre, cette étape n'est pas nécessaire mais pour un substrat en silicium, la couche isolante est importante.

Dans la littérature les isolants couramment utilisés sont : l'oxyde de silicium (SiO_2) (H. Rostaing, 2007), l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3), les nitrures de silicium (SiN_x , Si_3N_4), les couches minces de silicium amorphe (a-Si) (F. Lacharme, 2008) et des polymères de type résines photosensibles ou bien des polyesters et des polyimides (M. Woytasik, 2006). Nous avons utilisé indifféremment deux techniques d'isolation, l'une avec du nitrure de silicium (80 nm) et l'autre avec de la SU8 (800nm). Les deux jouent parfaitement leur rôle. Nous utilisons classiquement la SU8 quand nous réalisons nous même l'étape de métallisation mais nous avons aussi à disposition des wafers Ti/Au déjà métallisés avec une couche de nitrure comme isolant.

Infos	Schéma masque	Schéma 3D
<p><u>Numéro d'étape :</u> 1</p> <p><u>Type :</u> Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie électronique Profilomètre mécanique</p>	<p>Pas de masque Insolation pleine plaque</p>	

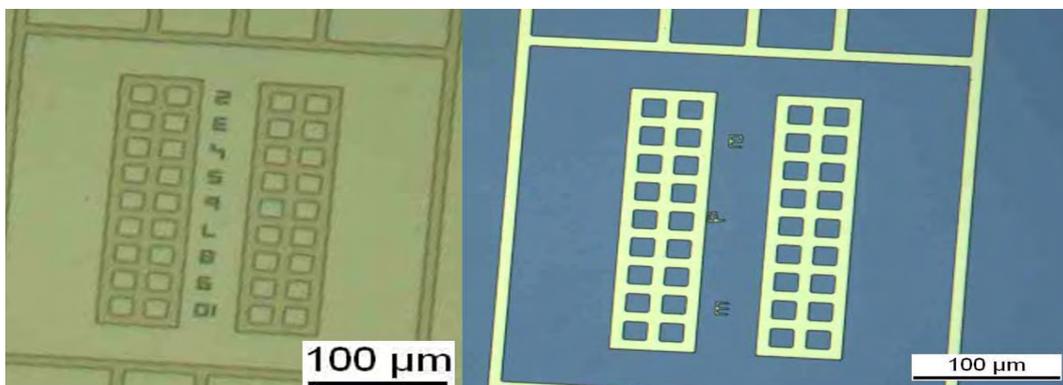
Tableau 19. Tableau récapitulatif pour l'étape d'isolation du wafer du dispositif de première génération

4.2.3.2 Premier niveau de connectique électrique

Une fois le wafer isolé, il nous faut réaliser une première piste de courant qui servira à amener le courant en dessous, au centre de la bobine. Nous choisissons de la réaliser en Ti/Au, le titane, servant de couche d'accroche sur la résine, et l'au permet de réaliser des couches fines conductrices sans risque d'oxydation. En effet, nous aurons à réaliser des traitements par plasma O_2 afin d'assurer l'adhérence des diverses couches de résine.

Il existe deux façons principales de structurer une couche métallique, soit par gravure chimique directe soit par lift-off. Le principe du lift-off est de déposer le métal sur une couche de résine déjà structurée et de décoller le métal non accroché sur le substrat en dissolvant la résine piégée en dessous. Bien que le lift-off offre une bien meilleure précision dans le respect des côtes, il est plus difficile à mettre en œuvre car l'étape proprement dite de lift, où la résine et le métal sont éliminés du wafer peut prendre beaucoup de temps et est plus délicate à maîtriser. A l'inverse, la gravure chimique directe est simple et efficace. Toutefois, elle est isotrope, et des phénomènes de sur-gravure peuvent intervenir au pied de la résine diminuant d'autant les largeurs des pistes en or. Dans notre cas, nous n'avons pas besoin de précision quand à la largeur des pistes, il est donc tout naturel d'avoir choisi cette option.

La métallisation est faite sur toute la surface du wafer par évaporation thermique, puis une résine photosensible (ici de l'ECL 2.3µm) est déposée, structurée et révélée. L'or mis à nu peut alors être gravé par une solution d'attaque or ($K+I_2$). Enfin la résine est nettoyée à l'acétone.



112.(A) Moule en résine pour l'attaque de l'or, (B) Sur-gravure de l'or à cause de la particularité isotrope de l'attaque chimique de l'or.

La figure 112 illustre le phénomène de sur-gravure du au choix de l'attaque de l'or par gravure humide et non pas par lift-off. Sur la photo au microscope 112.A d'une mire d'alignement du substrat, nous voyons la résine ECL servant de protection pour l'or parfaitement développée avec une très bonne résolution. En revanche sur la photo 112.B la sur gravure a diminué la taille des lignes en or et a même décollé certains chiffres.

Infos	Schéma masque	Schéma 3D
<p><u>Numéro d'étape :</u> 2</p> <p><u>Type :</u> Métallisation Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique</p>		

Tableau 20. Premier niveau de connectique électrique du dispositif de première génération

4.2.3.3 Via électrique et couche isolante

La piste d'amenée du courant doit être maintenant isolée du futur enroulement de la bobine tout en créant des vias électriques pour alimenter celle-ci. Pour cela nous utilisons la résine photosensible SU8. Cette étape est critique car tout défaut de recouvrement est source de court circuit entre les deux couches métalliques et est donc une cause irrémédiable de défaillance.

La couche de résine choisie de 2,8 - 3µm est déposée à la tournette. La résine utilisée est de la SU8 3005, la vitesse de rotation 5000 tr.min⁻¹, l'accélération de 5000tr.min⁻¹.s⁻¹ pendant 30 secondes et avec le capot de la tournette fermé. Le capot fermé permet de ralentir l'évaporation des solvants lors du dépôt et donc d'avoir une viscosité plus faible lors de la rotation de la tournette ce qui permet d'obtenir une épaisseur finale plus faible.

Tous les paramètres choisis sont les paramètres optimaux pour obtenir une couche la plus fine possible avec la résine de type 3005. Ce choix permet d'obtenir des dépôts d'environ 3µm. cette épaisseur permet de recouvrir de façon certaine l'ensemble de l'or et prévient ainsi de tout risque de court circuit avec les bobines.

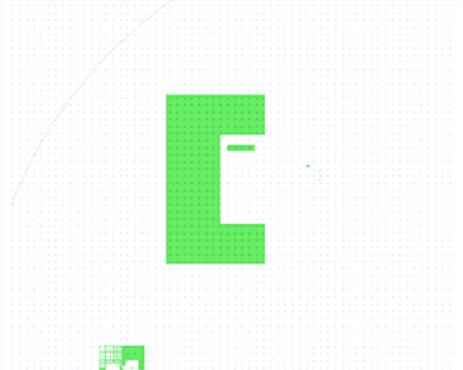
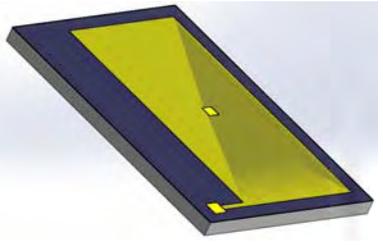
Infos	Schéma masque	Schéma 3D
<p><u>Numéro d'étape :</u> 3</p> <p><u>Type :</u> Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique Profilomètre mécanique</p>		

Tableau 21. Etape de construction des vias électriques et de la couche isolante du dispositif de première génération

4.2.3.4 Croissance électrochimique du cuivre

Les bobines sont réalisées en cuivre par croissance électrochimique. La croissance électrochimique ou électrolytique consiste à faire croître un métal dans une solution chargée en ions métalliques correspondants en imposant un courant.

Couche d'accroche Ti/Cu :

Afin de contrôler le potentiel de la surface du wafer, une première couche d'accroche de métal est déposée par évaporation thermique. Cette couche servira à faire croître le cuivre des bobines mais devra être attaquée chimiquement après afin de supprimer tous courts-circuits entre les spires. Pour plus de facilité pendant l'attaque chimique, la couche d'accroche doit être la plus fine possible, nous avons choisi de déposer 100 nm de Ti et 50 nm de cuivre.

La réalisation du moule de croissance :

Nous choisissons d'utiliser une résine positive, de l'AZ40XT, pour la réalisation du moule de croissance des bobines de cuivre. La hauteur du moule doit dépasser la hauteur des bobines souhaitées. Nous souhaitons avoir des bobines de 5µm de haut et au vu des différentes hauteurs pré calibrées de résine AZ40XT nous choisissons un dépôt de 13µm de haut.

La résine est déposée par spin coating, à une vitesse 500rpm, une accélération de 1700rpm.s⁻¹, pendant 30 secondes, recuite une première fois à 126°C pendant 2 minutes, puis insolée aux UV 425 nm pendant 18s (MA6 de chez Karl Suss), recuite à 105°C pendant 80 secondes et enfin révélée dans du MFCD26 pendant 60 secondes. Attention l'étape de détournage après le soft-bake et avant l'insolation est primordiale.

Le but de cette étape étant de fabriquer le moule pour la réalisation de la bobine et de faire la liaison avec la piste d'amenée du courant en or du dessous, il faut impérativement que le centre du moule soit bien révélé. Si la couche de SU8 d'isolation de l'or est trop haute, la hauteur de résine à l'endroit du contact augmente d'autant passant de 13µm à 16µm voire plus. Cette augmentation d'épaisseur locale de la résine est très critique car la dose d'insolation et le temps de recuit de la résine est calculé pour une hauteur de 13µm. Ainsi, il arrive que la résine ne soit pas suffisamment insolée et donc ne se développe pas, ou pour un temps trop long.

La hauteur de la couche de protection d'or est ainsi critique et peut rendre les bobines non opérationnelles lorsqu'elle est trop épaisse. L'illustration du phénomène est faite figure 113.

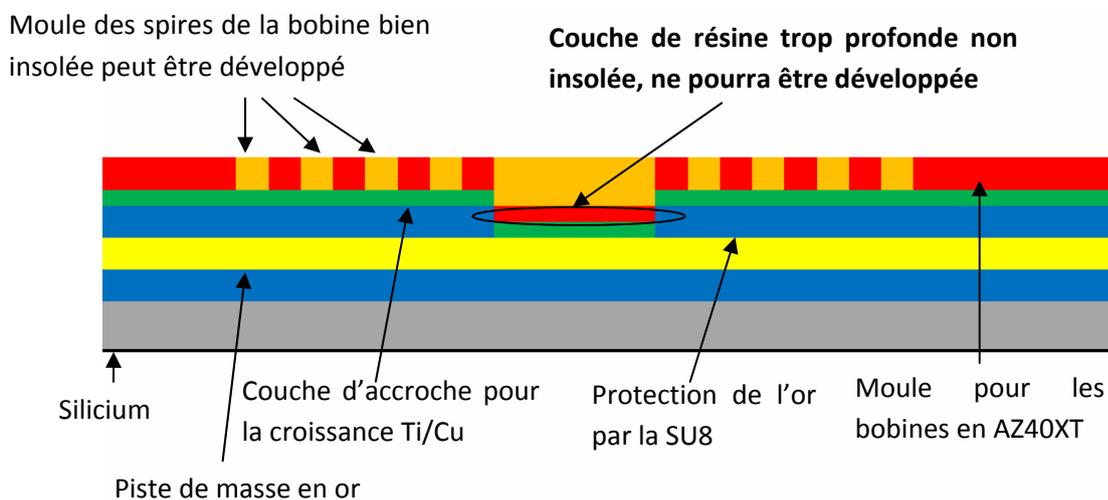


Figure 113. Moule de croissance des bobines en AZ40XT.

Afin de s'affranchir de ces limitations nous avons alors choisis de déposer la résine pour le moule par pulvérisation (spray-coating). En effet, le dépôt de résine par spray permet de suivre la topographie du substrat et de déposer exactement la même hauteur de résine partout. Ainsi la hauteur du moule ne souffre plus de surépaisseurs. La résine déposée est une résine positive AZ6999. Le procédé permet de déposer 7µm de résine et ce procédé peut être répété plusieurs fois pour avoir un dépôt plus important. Nous décidons dans notre cas, de déposer 14µm de résine, et avec un premier recuit de 2 minutes à 90°C et une insolation pendant 24 secondes à 420nm, nous obtenons un

développement total de la résine insolée avec la résolution suffisante pour la croissance des bobines de cuivre.

Procédé de dépôt électrochimique :

Le procédé de croissance électrolytique du cuivre consiste à plonger le wafer dans un bain de sels de cuivre et à imposer un potentiel entre la surface du wafer et une contre électrode, afin de transformer les ions métalliques au contact de la surface.

Électrode de travail + wafer

Contre-électrode

Agitation + plaque chauffante

Nous utilisons un bain commercial microfabCU200, sa composition est résumée dans le tableau 22.

Composants	Quantités
Acide sulfurique	1 L
Cuivre	25 g.L ⁻¹

Tableau 22. Composition du bain pour la croissance électrochimique du cuivre.

Figure 114. Schéma de principe de la croissance électrochimique en bain.

Plusieurs paramètres définissent la vitesse du dépôt ainsi que son état (rugosité, homogénéité,...) tels que la composition du bain, la densité de courant, le temps du dépôt, les surfaces mises en jeu, l'agitation, la température. Cette technique permet un dépôt pleine plaque ou localisé de quelques μm à plusieurs centaines de μm .

Paramètres	Valeurs
Température	25°C
Agitation	1100 tr/min
Densité de courant	1 A/cm ²
Temps du dépôt	~25min (dépend de la hauteur du dépôt souhaitée)

Tableau 23. Paramètres de croissance du cuivre pour la création des bobines.

La hauteur du dépôt est mesurée avant l'enlèvement de la résine afin de pouvoir poursuivre l'électrodéposition si nécessaire.

Révélation et libération des bobines :

Une fois les bobines réalisées, la résine qui servait de moule est enlevée par un nettoyage acétone. Puis la couche d'accroche est gravée pour libérer les spires de la bobine. Pour cela nous procédons à deux attaques humides, l'une pour le cuivre et l'autre pour le titane.

Le cuivre s'attaque avec une solution composée de 1ml d' H_2O_2 , 1ml d'HCl et 98 ml d'eau DI. Nous rajoutons à la solution un tensioactif, du SDS (dodécylsulfate de sodium), afin de faciliter la gravure entre les spires des bobines. La vitesse d'attaque du cuivre n'est pas constante dans le temps, elle dépend de la concentration du bain en cuivre. Pour un bain neuf, 50 nm de cuivre se gravent en ~2min. Cette étape doit être réalisée avec beaucoup de soin pour ne pas qu'il reste de cuivre entre les spires et provoquer ainsi des courts-circuits et non plus sans que les spires ne se décollent du substrat.

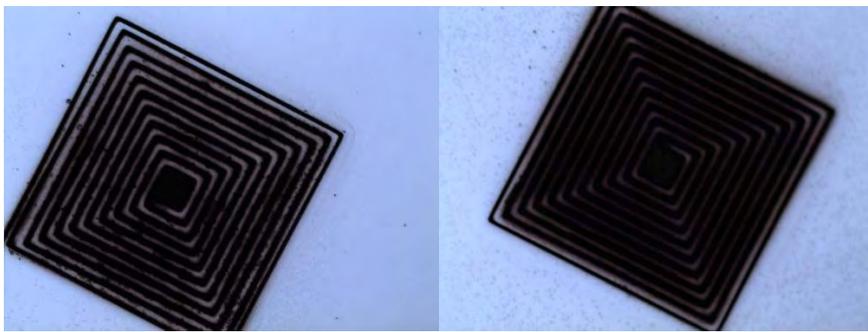


Figure 115. Image de bobines avec une mauvaise libération, la couche d'accroche Ti/Cu n'a pu être retirée au centre de la bobine.

Comme il est visible sur les photos de la figure 115, des problèmes de développement peuvent être assez importants. En effet nous voyons qu'aux bords des bobines les spires sont très fines et donc sur-gravées mais qu'au centre de la bobine la couche d'accroche n'est pas suffisamment gravée. Nous avons donc sur la même bobine de la sous-gravure et de la sur-gravure. Ce problème est principalement dû à la présence de bulles d'air qui rendent difficile la progression de la solution d'attaque cuivre entre les spires et cela malgré l'utilisation d'un tensioactif.

Pour remédier à ce problème il faut agiter de manière plus uniforme possible et surtout avant l'attaque faire un traitement plasma O_2 ($1000ml.min^{-1}$, 200W, pendant 30 secondes) pour rendre la surface plus hydrophile.



Figure 116. Libération parfaite des bobines de cuivre après l'ajout d'une étape de traitement au plasma O_2 avant l'attaque chimique.

L'attaque du titane est bien plus simple, elle se fait dans un bain de HF 5% pendant quelques secondes (<10s). Nous obtenons alors des bobines fonctionnelles, comme illustré par la photo MEB figure 117.

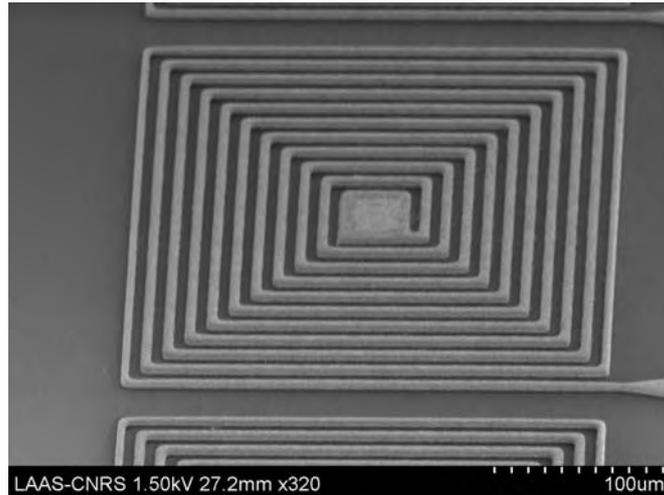


Figure 117. Photo MEB d'une bobine de cuivre une fois la couche d'accroche attaquée.

Infos	Schéma masque	Schéma 3D
<p><u>Numéro d'étape :</u> 4 et 5</p> <p><u>Type :</u> Métallisation Procédé photolithographie Croissance électrochimique Gravure humide</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique Profilomètre mécanique Microscopie électronique Mesure sous pointes</p>		

Tableau 24. Tableau récapitulatif pour l'étape de croissance des bobines de cuivre du dispositif de première génération

4.2.3.5 Couche de protection et via électrique

Une fois la micro bobine de cuivre réalisée et la couche d'accroche attaquée, il faut encapsuler la bobine pour la protéger du fluide qui circulera dans les futures canalisations. De plus, cette étape permet de planariser la surface du wafer. La résine SU8 a déjà démontré par le passé une très bonne performance à planariser même de grosses irrégularités (T. Kohlmeier, 2002). Cette couche doit être suffisamment importante pour niveler les hétérogénéités présentes sur le wafer, à savoir la hauteur de la bobine de $5\mu\text{m}$, mais ne doit pas être trop grande non plus pour ne pas trop éloigner la canalisation du champ magnétique créé par la bobine. En effet nous avons vu dans le chapitre 2 que le champ magnétique diminuait fortement avec l'éloignement de la bobine. Une épaisseur de résine de $10\mu\text{m}$ est donc choisie permettant un bon compromis avec une bonne planarisation et un éloignement du canal de $5\mu\text{m}$ seulement.

Infos	Schéma masque	Schéma 3D
-------	---------------	-----------

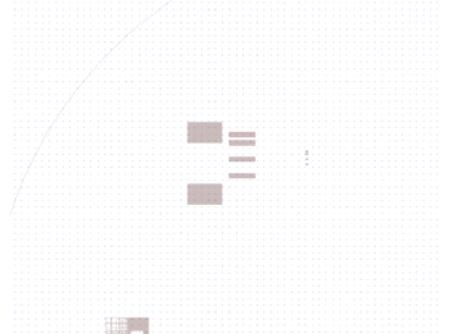
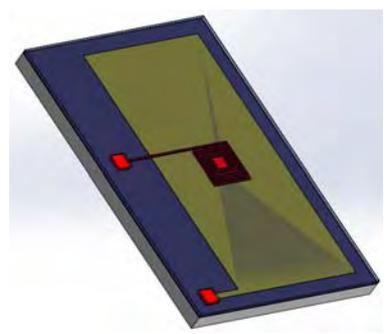
<p><u>Numéro d'étape :</u> 6</p> <p><u>Type :</u> Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique</p>		
---	---	---

Tableau 25. Tableau récapitulatif pour l'étape de couche protectrice des bobines de cuivre et la création de via électrique du dispositif de première génération

4.2.3.6 Canal microfluidique

A cette étape nous avons un wafer presque plat. Il est alors simple d'y superposer des canalisations microfluidiques par le procédé déjà expliqué au paragraphe 3.1.3.

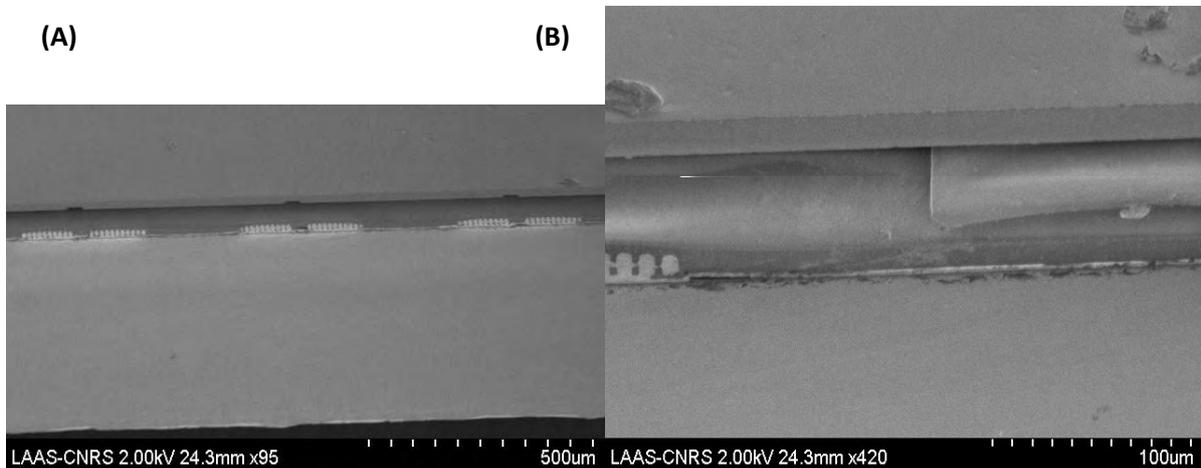


Figure 118. Photo MEB d'une coupe du dispositif une fois les bobines inférieures et la partie fluide terminée. (A) visualisation des bobines dans la partie commune des deux niveaux de fluide, (B) Jonction des deux niveaux de canalisation.

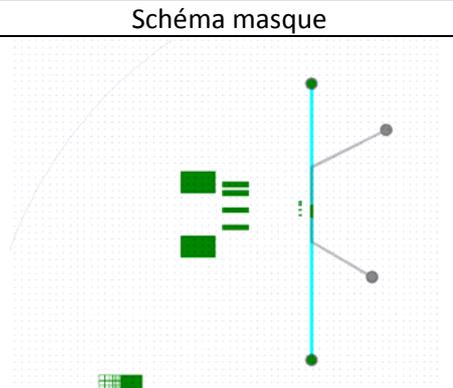
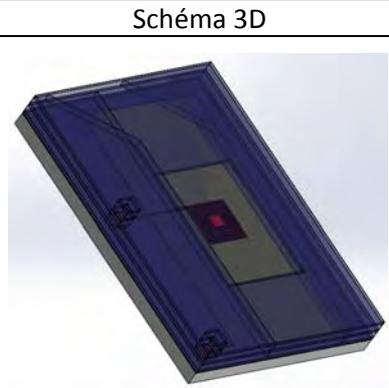
<p>Infos</p> <p><u>Numéro d'étape :</u> 7</p> <p><u>Type :</u> Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique</p>	<p>Schéma masque</p> 	<p>Schéma 3D</p> 
--	--	--

Tableau 26. Tableau récapitulatif pour la création de la partie fluide du dispositif de première génération

4.2.3.7 Croissance de bobines supérieures

Une fois les canalisations fermées nous nous retrouvons comme au début avec un wafer relativement plat. Nous pouvons maintenant réaliser les bobines du dessus si nous le souhaitons. Pour cela nous partirons dans le sens inverse de la réalisation des bobines du dessous à savoir nous réalisons d'abord les bobines de cuivre avant de prendre les contacts électriques.

Le procédé est le même que pour les bobines du dessous, mais l'empilement des différentes couches engendre une augmentation des contraintes et diminue la précision. En raison de cela, nous choisissons de faire des spires plus larges et plus espacées, à savoir, 10 μ m de large et 10 μ m d'espacement.

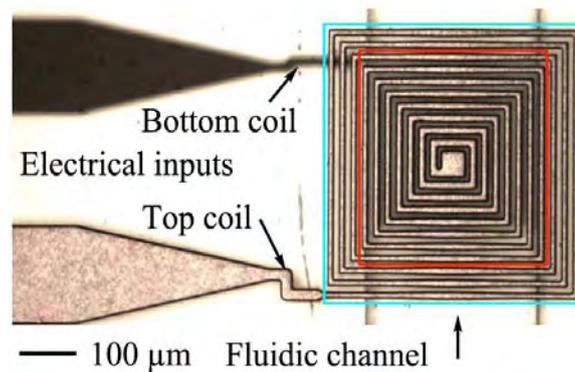


Figure 119. Photo au microscope de bobines en vis à vis, au-dessous et au-dessus d'une canalisation fluidique.

Infos	Schéma masque
<p><u>Numéro d'étape :</u> 8 et 9</p> <p><u>Type :</u> Métallisation Procédé photolithographie Croissance électrochimique Gravure humide</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique Profilomètre mécanique Microscopie électronique Mesure sous pointes</p>	

Tableau 27. Tableau récapitulatif pour l'étape de croissance des bobines supérieures du dispositif de première génération

4.2.3.8 Protection et via électriques

Comme décrit précédemment, les bobines sont ensuite planarisées et le contact de la bobine est ouvert.

Infos	Schéma masque
-------	---------------

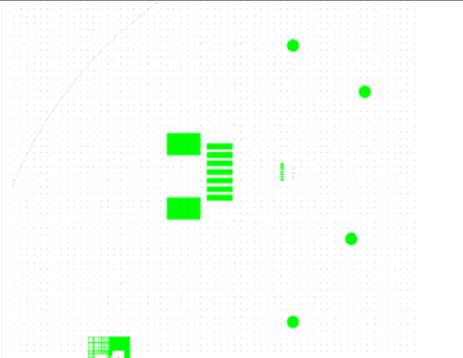
<p><u>Numéro d'étape :</u> 10</p> <p><u>Type :</u> Procédé photolithographie</p> <p><u>Contrôle :</u> Microscopie optique</p>	
--	---

Tableau 28. Tableau récapitulatif pour l'étape de protection finale et l'ouverture de toutes les connectives fluidiques et électriques du dispositif de première génération

4.2.3.9 Prise des contacts électriques

La dernière étape est la prise de contact au centre de la bobine afin de reporter le contrôle vers les pistes d'amené du courant. Pour cela nous effectuons une première métallisation Ti/Au pleine plaque, il est important que la métallisation se fasse sur les flancs de la résine pour assurer le contact électrique. La résine qui sert de protection à l'or doit bien couvrir les flancs pour éviter que le contact soit rompu lors de l'attaque chimique. C'est pourquoi nous utilisons le spray coater pour déposer cette résine. Nous avons testé deux épaisseurs de résine : 7 ou 14 μ m. Seule une épaisseur de 14 μ m permet de recouvrir l'intégralité des flancs du contact comme nous le montre les figures 120.

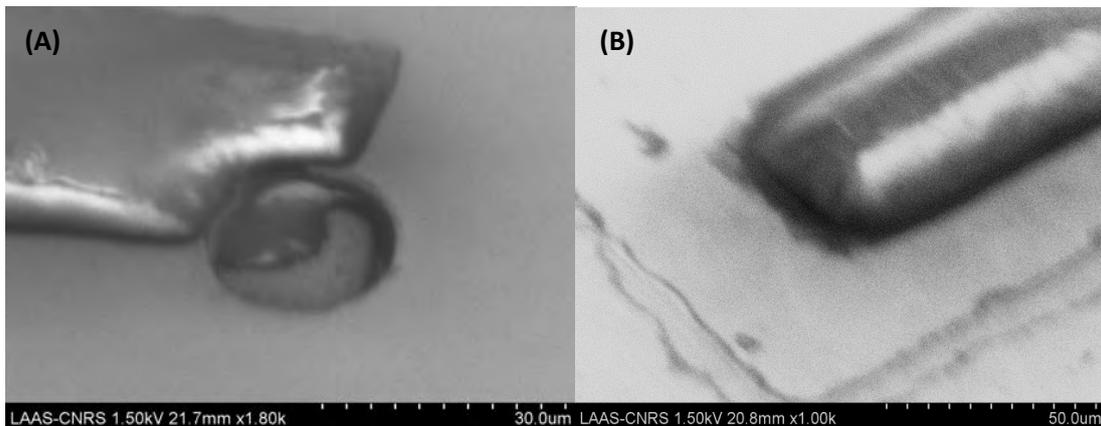


Figure 120. Image MEB de la résine de protection pour l'attaque de la prise de contact en or pour les bobines supérieures. (A) protection insuffisante sur les flancs du plot. (B) le plot est entièrement recouvert.

Outre le désalignement visible sur la figure 120.A, il apparaît que la résine est présente sur les deux niveaux, dans le contact et sur la surface supérieure mais elle est discontinue. Il est donc fort probable que lors de l'attaque chimique, la continuité électrique soit perdue entre les deux niveaux. En revanche la figure 120.B, montre que le contact est entièrement recouvert, l'augmentation de l'épaisseur de 7 à 14 μ m permet de s'affranchir de la différence de topographie.

Une fois la résine mise en forme l'attaque de l'or et du titane s'effectue de la même façon qu'à l'étape n°5.

Infos	Schéma masque
-------	---------------

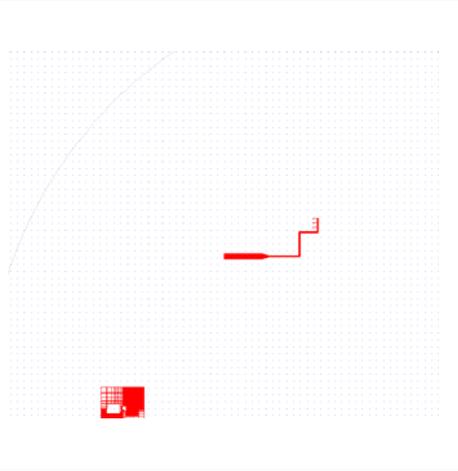
<p><u>Numéro d'étape :</u></p> <p style="text-align: center;">11</p> <p><u>Type :</u></p> <p style="text-align: center;">Métallisation Procédé photolithographie Gravure humide</p> <p><u>Contrôle :</u></p> <p style="text-align: center;">Microscopie optique Profilomètre mécanique Microscopie électronique Mesure sous pointes</p>	
--	---

Tableau 29. Tableau récapitulatif pour l'étape de prise de contacts électriques du dispositif de première génération

4.2.4 Minimisation des contraintes mécaniques

L'un des problèmes majeurs lors de la réalisation des dispositifs est la contrainte mécanique générée par l'empilement des différentes couches. En effet, une couche de SU8 de 100 μm par exemple sur un wafer vierge crée une contrainte de 20,43 MPa, mesurable par la flèche du wafer qui en résulte. Les résines ne sont pas les seules à rajouter de la contrainte, les métallisations même si elles sont déposées en couche fine rajoutent beaucoup de contraintes.

Pour les résines, les contraintes augmentent avec l'épaisseur, ainsi pour un empilement de nombreuses couches il vaut mieux, si possible, favoriser des couches de fine épaisseur. Nous voyons ici une limitation pratique à l'empilement des couches par laminage, limitant le nombre de niveaux empilés. Le tableau 30 regroupe quelques valeurs de mesures de contraintes sur de la SU8 pour différentes épaisseurs de résine (157 μm , 90 μm et 30 μm) en différents temps du procédé de fabrication. Ces valeurs ont été mesurées au LAAS pour des études antérieures.

Contrainte en MPa	157 μm	90 μm	30 μm		157 μm	90 μm	30 μm
Avant insolation	5,60	-1,26	0,9		7h		9,3
Après insolation	5,60	-1,23	0,85		14h	17,43	
Après PEB	18,43	15,16	13,23		18h	17,37	
Après Hard Bake	21,82	20,43	12,63		21h	17,13	8,91
Après 1h	20,95				23h		8,5
3h		15,22			24h	16,95	
3h30			9		26h		
6h		15,58	9,3		29h		8,2

Tableau 30. Différentes contraintes mesurées pour des couches de résines SU8 de diverses épaisseurs après des temps de repos plus ou moins long.

L'accumulation des contraintes peut provoquer des fissures, des déformations du wafer, la résine peut se décoller ou se délaminer entre les différents niveaux. Finalement, les contraintes peuvent aboutir à la destruction des dispositifs ou à une impossibilité d'alignement si le wafer est trop déformé.

Pour limiter les contraintes résiduelles dans le wafer, il existe plusieurs méthodes :

La première est de laisser le wafer relaxer. Nous notons par exemple une diminution jusqu'à 35% des contraintes après un jour de repos (Fulcrand, 2009).

Les problèmes de contrainte sont fortement liés aux différents recuits thermiques. En effet, la contrainte augmente de façon importante après le PEB et le Hard Bake. De plus, comme nous avons pu le voir dans le paragraphe 3.2.1, chaque matériau possède un coefficient d'extension thermique (CTE) différent, et quand la résine s'étend en se réchauffant et en se rétractant, le support lui se déforme différemment. De plus, plus le changement de température est violent et plus les déformations mécaniques arriveront rapidement. Il faut donc absolument éviter les chocs thermiques lors des procédés de fabrication.

Les contraintes s'appliquent sur l'ensemble du wafer, ainsi si localement la résine ne se dilate pas de la même façon que son support ce n'est pas grave mais si ce phénomène est présent sur la totalité du wafer, la dilatation ou la rétraction de la résine provoquent une déformation du wafer. Nous pouvons imaginer de séparer les différents dispositifs par des rainures permettant aux contraintes de relaxer sans créer une déformation générale du wafer. Ce principe semble idéal sur le papier mais a deux conséquences majeures et néfastes pour le procédé : en créant des angles dans les motifs de résine, les contraintes se concentrent en leur extrémité et la résine peut se décoller du substrat. De plus ces rainures dans la résine gênent lors de la métallisation et lors de la croissance électrolytique, la densité de courant est très inhomogène sur la surface du wafer générant des vitesses de croissance très différentes et donc des épaisseurs de dépôts inhomogènes.

4.3 Connectiques fluidiques et électriques

4.3.2 La connectique fluidique

Les plots en PDMS :

Les dispositifs en SU8 possèdent au final une très faible hauteur, soit une centaine de μm et il est impossible de connecter un tube directement dessus. Notre première idée a été de placer un plot de PDMS au dessus des entrées et sorties fluidiques en SU8. Ces plots en PDMS ont l'avantage d'être dans un matériau très bien connu, peu cher et facilement réalisables.

Pour la fabrication des plots en PDMS, nous utilisons un moule spécifique en aluminium constitué de deux parties mobiles. Une partie avec des picots servant à faire les trous dans les plots et une autre constitué de trous déterminant la forme du plot comme illustré figure 121.

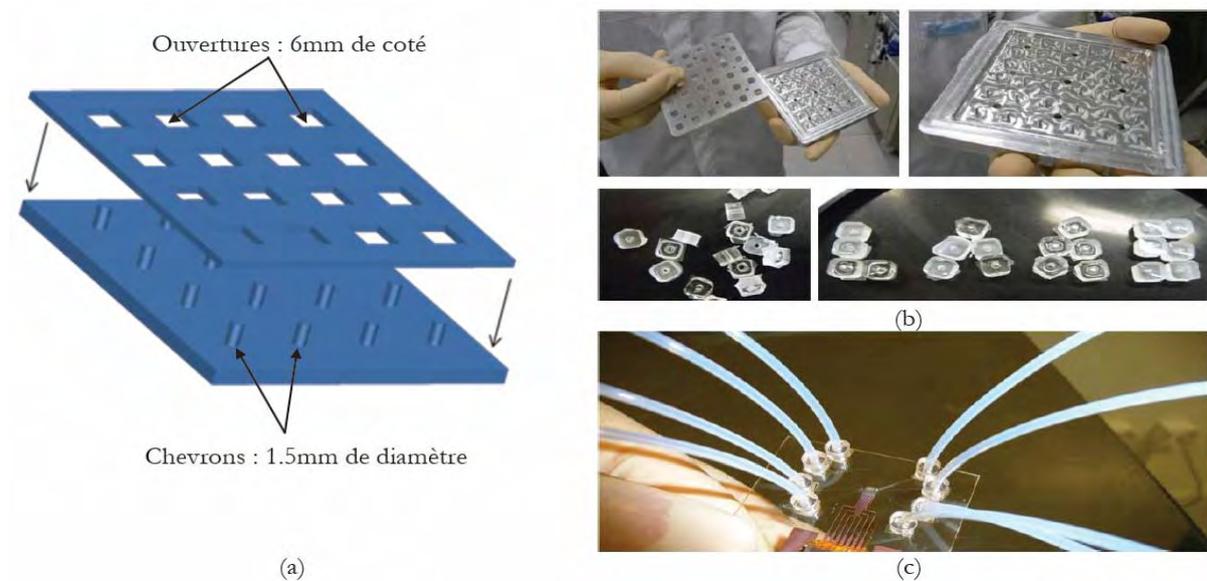


Figure 121. Connectique microfluidique. (a) représentation schématique du moule en aluminium pour la création des plots en PDMS, (b) exemples de réalisation et de collage (c).

Une première solution pour fixer les plots en PDMS sur le dispositif en SU8 est d'utiliser une colle époxy photosensible qui se réticule à l'ultra-violet.

Le procédé actuel débute par un nettoyage des plots en PDMS dans un bain à l'isopropanol aux ultrasons pendant 10 minutes, puis les plots subissent un plasma O_2 de 200 watt pendant 30 secondes avec un débit en oxygène de $1000 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Les plots sont ensuite encollés et reportés sur le dispositif. Le tout est insolé pendant 30 secondes à 365nm puis recuit à 90°C pendant 5 minutes.

Cette solution est toutefois source de nombreux problèmes. En effet, s'il y a trop de colle, celle-ci peut couler dans les canalisations. De plus lors du positionnement du plot la moindre hésitation peut mettre de la colle dans la canalisation. Dans les deux cas la canalisation est bouchée et ne peut plus être utilisée.

Une deuxième solution est de réaliser un scellage par plasma O_2 uniquement. La SU8 étant une résine époxyde, elle présente un oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone. Il est alors possible de créer des liaisons Si-O-O-. Le procédé de scellage des plots est alors le suivant : le dispositif en SU8 ainsi que les plots en PDMS subissent un traitement plasma de 200 watt pendant 30 secondes avec un débit d'oxygène de $1000 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, les plots sont positionnés au niveau des connectiques fluidiques et le dispositif complet est recuit à 110°C pendant 20 minutes. Le tableau 31 résume les résultats obtenus.

Plots	Pression max	Commentaire
1	1 bar	Semble décollé sur les bords mais ok
2	1 bar	Semble décollé sur les bords mais ok
3	1 bar	Ok
4	1 bar	Ok
5	Fuite	Sans pression -> pas d'accroche
6	500 mbar	Suffisant pour les tests
7	1 bar	Ok

Tableau 31. Récapitulatif des essais de tenue en pression des plots PDMS collés sur la SU8 par simple traitement plasma

Cependant ces résultats sont faiblement reproductibles d'une série à l'autre. De ce fait le scellement par plasma est trop aléatoire pour être maintenu.

Les plots magnétiques :

Il est possible d'utiliser un plot magnétique en positionnant un anneau aimanté centré sur la connectique fluide et un second aimant en dessous de wafer assurant l'étanchéité (J. Atencia, 2010). Les plots choisis sont des anneaux magnétiques de diamètre intérieur 2mm, de diamètre extérieur 4 mm et une hauteur de 3,5 mm, ils peuvent soulever un poids de 0.68kg.

Bien qu'il soit facile avec cette méthode de déplacer les plots et donc d'aligner au mieux les connectiques, seul une faible pression peut être appliquée, de l'ordre de 100mbar, sans fuites. Cette solution s'avère donc inadaptée à nos besoins expérimentaux.

Utilisation d'adhésif :

L'utilisation d'un adhésif a d'abord été envisagée afin d'améliorer l'étanchéité des connectiques magnétiques mais une application directe sur des plots en PDMS est également possible. L'adhésif est donc découpé à la taille du plot puis percé et collé sous le plot. Une fois le plot positionné sur la puce, il peut tenir une pression de 1bar ce qui est suffisant pour nos applications.

Un avantage mais qui est aussi finalement un inconvénient est que l'adhésif est facilement éliminé à l'éthanol. Le plot en PDMS peut donc être déplacé ou réutilisé mais cela veut dire également que nous ne pouvons pas utiliser de solvant comme fluide lors des expériences. C'est une contrainte majeure qui limite l'intérêt de cette méthode.

Modification du design du plot :

Finalement après avoir fait le tour des différentes options que nous avons, la colle photosensible reste la meilleure option, offrant une résistance sans comparaison possible avec le reste. Afin de limiter les inconvénients évoqués plus haut, nous avons modifié le design des plots en PDMS, l'ouverture extérieure étant fixée par le diamètre des tubes de connexion, nous pouvons modifier l'ouverture inférieure.

Nous réalisons ainsi des plots coniques d'ouverture 2mm en dessous et toujours 1,5mm au dessus.



Ce nouveau design apporte une réelle amélioration au moment du collage des plots.

4.3.3 La connexion électrique

Le choix des connectiques électriques est vaste, cependant par soucis de simplicité nous reprendrons les mêmes connectiques électriques utilisées lors des travaux précédents. Nous utilisons donc un connecteur CMS (Composant Monté en Surface) de type FFC. Le composant choisi est fabriqué par JST (Japan Solderless Terminals) sous la référence 08FMS-1.0SP-TF(LF)(SN). Ce contacteur, de 1cm de large pour 2,8mm de haut et 6,3mm de long, est composé de 8 voies et peut recevoir une nappe souple de type FFC (figure 122). Le contacteur est raccordé sur notre dispositif grâce à une colle conductrice chargée en argent (E4110-PFC), facile à mettre en place. L'enrobage du composant est facultatif, la colle conductrice étant suffisante pour fixer correctement le connecteur sur la puce.

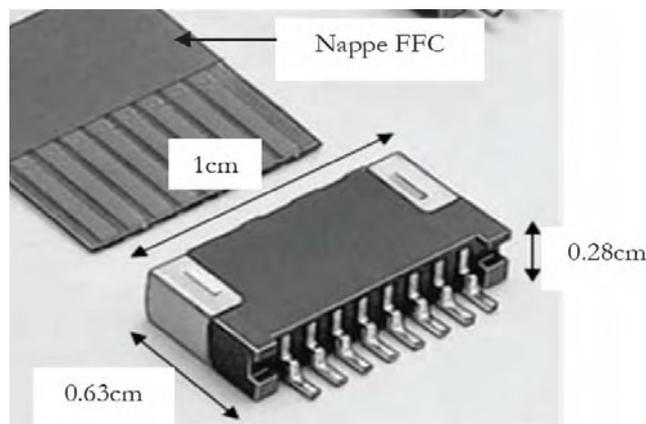


Figure 122. Représentation schématique du connecteur de type FFC utilisé dans nos dispositifs.

Il est possible, si le connecteur est collé longtemps après la fin du procédé, que les pistes d'amenée du courant en cuivre de la puce soient oxydées et que le contact ne puisse se faire avec le connecteur FFC. Il faut alors déposer une goutte d'attaque cuivre (voir étape 5 du procédé de fabrication) pour attaquer l'oxyde avant de faire le collage.

Une fois les plots en PDMS et le connecteur électrique collés, notre dispositif est fini et prêt à être testé. Une photo d'un dispositif final est montrée figure 123.

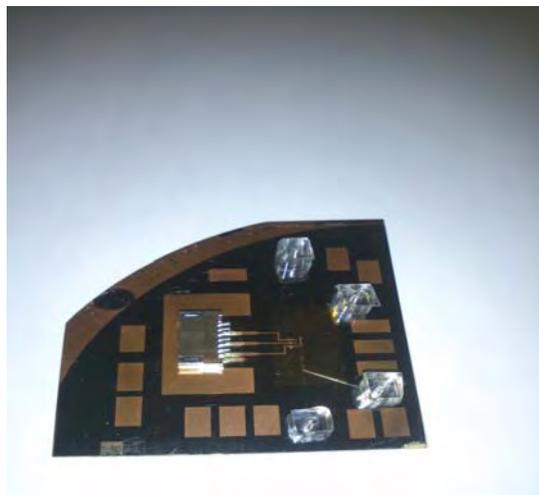


Figure 123: Photo du dispositif fini avec les connexions pour la fluïdique et le contrôle électrique.

Conclusion

Ce chapitre nous a permis de retracer toutes les étapes de fabrication des dispositifs de séparation magnétique imaginées dans le chapitre 2 et 3.

Nous avons pu démontrer que la réalisation d'une bobine au dessus d'une canalisation microfluidique était possible ce qui ouvre de nombreuses perspectives fonctionnelles.

Nous avons aussi pu présenter les différentes connectiques qui nous permettront de travailler aisément par la suite.

Chapitre 5 : Manipulation des microbilles magnétiques

Introduction	125
5.1 Présentation du banc de caractérisation	126
5.1.1 Contrôle des fluides	126
5.1.1.1 Contrôle en pression	126
5.1.1.2 Contrôle en débit	126
5.1.2 Contrôle électrique :	127
5.1.3 Système d'observation	128
5.2 Séparation verticale de microbilles magnétiques	129
5.2.1 Bilan des forces : un équilibre vite renversé.....	129
5.2.1.1 Le poids et la poussée d'Archimède.....	130
5.2.1.2 Bilan des forces sur une bille magnétique.....	131
5.2.2 Mise en œuvre expérimentale.....	133
5.2.2.1 Suppression de l'agrégation	133
5.2.2.2 Suppression des bulles	134
5.2.2.3 Elimination des problèmes de sédimentation des billes magnétiques	134
5.2.3 Caractérisation de la fonction de piégeage avec des billes magnétiques	135
5.2.4 Caractérisation de la fonction de séparation avec des billes magnétiques.....	138
5.2.4.1 Premières expériences et premières conclusions :	138
5.2.4.2 Deuxième génération de puce	142
5.3 Etude de l'échauffement	149
5.3.1 Partie expérimentale	149
5.3.2 Partie théorique.....	154
Conclusion	156

Introduction

Les chapitres précédents nous ont permis de poser les bases de notre laboratoire sur puce avec un écoulement fluide contrôlé et un actionnement magnétique optimisé. De plus nous avons montré la faisabilité technologique de la réalisation des prototypes. Il est temps de tester ces puces dans différentes conditions que nous verrons dans ce chapitre.

La première étape du travail de validation fonctionnelle des dispositifs a été effectuée à l'aide de solutions modèles, en l'occurrence des solutions de billes magnétiques de tailles et concentrations différentes.

Bien que tous les dispositifs aient pu être réalisés, certains résultats jugés préliminaires ne seront pas présentés dans cet ouvrage mais seront toutefois évoqués dans les perspectives et en annexe.

5.1 Présentation du banc de caractérisation

Le banc de caractérisation se compose de trois grandes parties, un module pour le contrôle des fluides, un module pour le contrôle électrique des bobines et enfin un module de visualisation et d'enregistrement des expériences.

5.1.1 Contrôle des fluides

Dans les dispositifs microfluidiques, il est commun de pouvoir remplir les canaux par simple capillarité, cependant dès que l'on souhaite imposer une vitesse d'écoulement il faut utiliser un actionneur. Il existe deux principaux types d'actionneur qui diffèrent suivant leur mode de contrôle, les contrôleurs de pression et les contrôleurs de débit. Il existe bien sûr d'autres moyens pour entrainer un fluide comme l'utilisation de champ électrique (flux électroosmotique) ou la force centrifuge que nous n'évoquerons pas.

5.1.1.1 Contrôle en pression

Les contrôleurs en pression fonctionnent, comme leur nom l'indique, en imposant une différence de pression entre l'entrée et la sortie du dispositif microfluidique. La solution la plus simple est d'imposer une pression positive en entrée et laisser la sortie à l'air libre, mais d'autres combinaisons sont envisageables, comme imposer deux pressions, en entrée et en sortie, avec un delta, ou bien des pressions négatives.

Le contrôle en pression possède de nombreux avantages mais aussi quelques inconvénients comme nous allons le voir. Il permet un contrôle continu dans la gamme d'utilisation de l'appareil employé avec une précision pouvant être inférieure au mbar. La réponse à une consigne est très rapide. Cependant en contrôlant la pression, le débit dépend de la résistance associée. La résistance n'est pas toujours bien connue et surtout peut évoluer dans le temps si les canaux se bouchent partiellement ou si des bulles sont piégées dans les dispositifs. De ce fait il est presque impossible de contrôler simplement la vitesse de l'écoulement.

Il est toutefois possible de mesurer la vitesse en injectant des traceurs (billes fluorescentes) dans la solution ou en utilisant des modules de mesure de débit vendu par la plupart des fournisseurs de contrôleur en pression. Ces modules fonctionnent sur le principe de la convection thermique, le fluide est chauffé et sa température est mesurée indiquant la quantité de chaleur évacuée et donc la vitesse à laquelle circule le fluide.

En conclusion, le contrôle en pression offre une très bonne précision de contrôle des flux mais les résultats sont plus difficilement exploitables. Nous utiliserons par la suite un contrôleur pression de chez Fluigent avec 2 voies dans la gamme 0-25 mbar avec une précision de 0.1 mbar.

5.1.1.2 Contrôle en débit

Nous pouvons citer deux actionneurs permettant le contrôle en débit d'un fluide à savoir, la pompe et le pousse seringue.

Le fonctionnement du pousse seringue est simple, un moteur entraine une vis sans fin qui pousse le piston de la seringue, ainsi à chaque tour de vis, le piston se décale d'un pas de la vis et autant de volume (le pas*le diamètre de la seringue) est injecté. En jouant sur le diamètre de la seringue et la vitesse de la vis, une grande gamme de débits peut être atteinte avec une grande précision. Le point faible de ce fonctionnement est l'existence d'à-coups, visibles dans l'écoulement. De plus le temps de réponse est assez long et dépend du débit. Ainsi si nous stoppons le débit qui était initialement à $1\mu\text{l}/\text{min}$ il faudra quelques minutes pour que le fluide s'arrête effectivement.

Nous utiliserons un pousse seringue Nemesys de chez Cétoni, avec des seringues en verres de $250\mu\text{l}$, nous pouvons alors obtenir des débits contrôlables jusqu'à $0,1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.1.2 Contrôle électrique :

L'électronique de commande a été développée dans le cadre des travaux précédents. Elle est illustrée figure 124. Elle permet le contrôle individuel de 7 microbobines dans une plage de courant allant de 0 à 115 mA avec une précision de 0,1mA. Deux potentiomètres, réglage grossier et réglage fin, permettent de fixer la consigne pour chaque source de courant. Un étage mémoire permet de fixer de façon permanente la valeur du courant souhaité aux bornes de chaque microbobine. L'actionnement des différentes voies se fait à l'aide de boutons tactiles placés sur le PCB (Printed Circuit Board). Cette carte de commande rend plus facile le contrôle des microbobines.

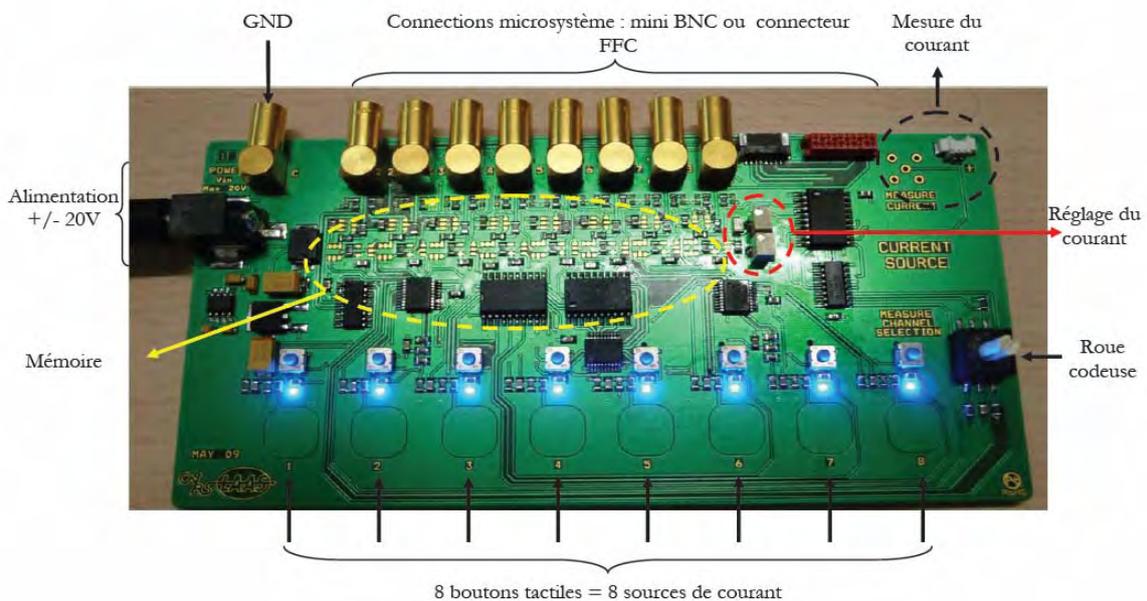


Figure 124. Carte de commande électrique du microsystème intégré.

Il y a trois moyens de relier la carte de commande aux connecteurs présents sur la puce. Soit en connectant directement par FFC, soit en utilisant le raccord intermédiaire et enfin en utilisant les câbles mini-BNC et le raccord intermédiaire. L'avantage de ce dernier montage est de pouvoir

attribuer n'importe quelle sortie à une nappe du dispositif en s'affranchissant de l'ordre imposé par la nappe FFC. Les solutions 1 et 3 (figure 125) ont été utilisées indifféremment.

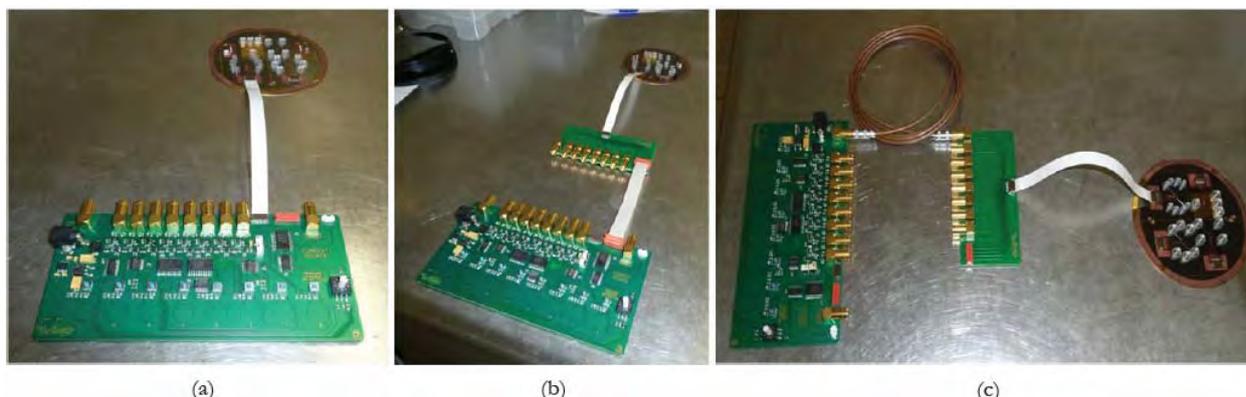


Figure 125. Photos illustrant les différentes connexions possibles. (a) Connexion directe par nappe FFC. (b) Connexion avec le connecteur intermédiaire. (c) Connexion avec les câbles mini-BNC.

5.1.3 Système d'observation

Afin de visualiser les phénomènes qui se passent à l'intérieur des dispositifs, nous utilisons un microscope droit de marque Olympus (BX51), utilisable en fluorescence.

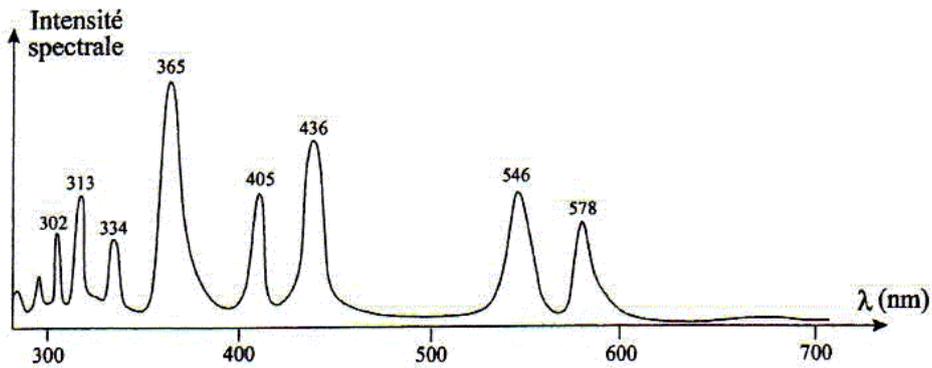
Sur le tableau 32 sont reportées les longueurs d'onde d'excitation et les filtres utilisés selon les fluorophores observés dans ces travaux de thèse.

Fluorophores	Excitation	Filtre d'excitation	Dichroïque	Filtre barrière
Fluorescéine (490/514)	475	470/40	495	525/50
Rhodamine (553/627)	540	545/25	570	609/54
Hoeschst (350/462)	Lampe à mercure	370	409	470

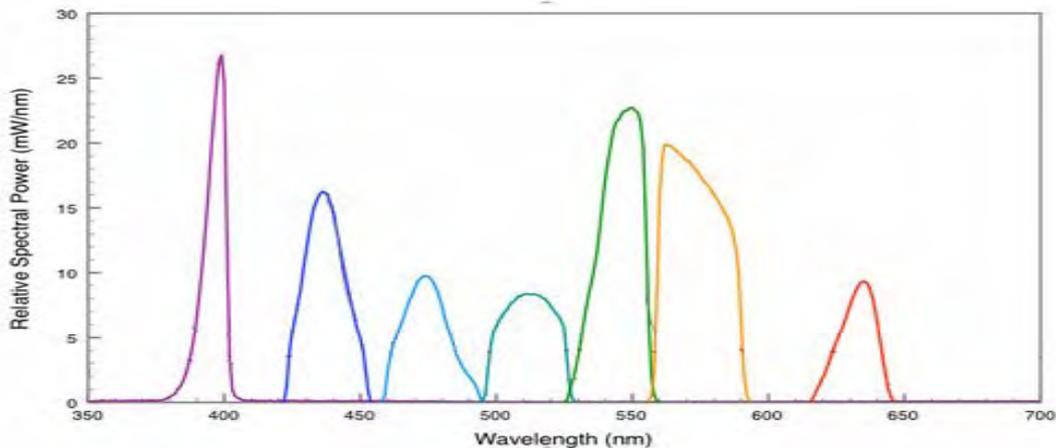
Tableau 32. Récapitulatif de l'excitation et des filtres à utiliser pour nos fluorophores couramment utilisés.

Les observations et l'acquisition des images sont faites à l'aide d'une caméra haute sensibilité EMCCD ANDOR. Sur ce type de caméra, les images sont obtenues grâce à un capteur et un numériseur, qui transforment un signal optique en signal électrique, puis en un signal numérique de gris.

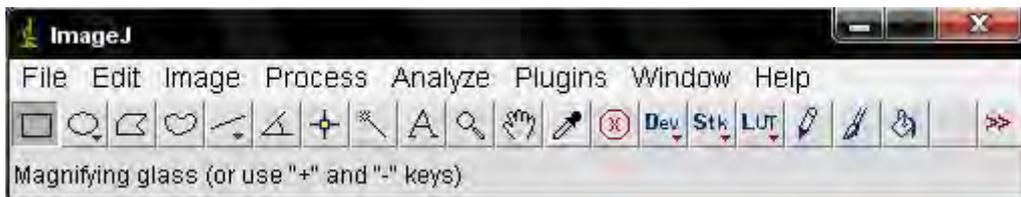
Deux sources lumineuses peuvent être utilisées, une lampe à mercure classique qui émet un spectre caractéristique avec plusieurs pics représentés dans la figure 126.



Nous avons également à notre disposition une source lumineuse de marque LUMENCOR fonctionnant avec sept diodes laser, offrant une meilleure précision et une plus grande puissance d'excitation (figure 127).



Pour analyser les films et images enregistrés durant chaque expérience, nous utilisons le logiciel ImageJ. Il s'agit d'un logiciel de traitement et d'analyse d'images.



La plupart des opérations courantes de traitement d'images sont réalisables avec ImageJ : visualisation et ajustement de l'histogramme de niveaux de gris, suppression du bruit, correction d'éclairage,...

5.2 Séparation verticale de microbilles magnétiques

5.2.1 Bilan des forces : un équilibre vite renversé

Grâce à des modèles analytiques complets, il est possible de simuler le bilan total de toutes les forces appliquées sur les billes magnétiques qu'il s'agisse des interactions avec le fluide ou le champ magnétique (K. Nandy, 2008). Nous présenterons ici un bilan simplifié pour comprendre l'influence de chacune des forces et les comparer entre elles pour voir apparaître les tendances.

Les différentes forces qui s'appliquent sur la bille magnétique sont schématisées sur la figure 129. Deux forces s'opposent au piégeage et à la séparation, il s'agit de la poussée d'Archimède et de la force de Stokes, et deux forces favorables au piégeage, le poids et la force magnétique. L'objet de ce paragraphe est de pouvoir comparer ces différentes forces afin de comprendre et de prévoir le comportement des billes magnétiques dans nos dispositifs magnétofluidique.

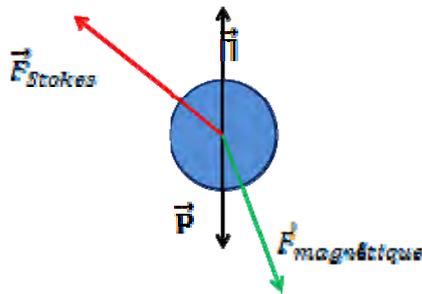


Figure 129. Bilan des forces appliquées sur une bille magnétique

5.2.1.1 Le poids et la poussée d'Archimède

Dans les chapitres 2 et 3 nous avons essayé de comprendre les phénomènes magnétiques et fluidiques qui interviennent dans une canalisation microfluidique. Nous allons maintenant étudier leur influence sur les éléments qui circulent dans la canalisation et plus particulièrement sur les billes magnétiques.

Le poids est donné par :

$$P = \rho \frac{4}{3} \pi R^3 g \quad [5.1]$$

Pour une masse volumique de 2250 kg.m⁻³ correspondant à la masse volumique des billes magnétiques que nous utilisons et pour un diamètre de 1 μm, par exemple, le poids des billes est de 0,01pN. La force d'Archimède est donnée par :

$$\Pi = \rho_{eau} \frac{4}{3} \pi R^3 g \quad [5.2]$$

Ce qui correspond à une poussée de 0,005pN pour des billes de 1μm. Les vitesses de sédimentation ont été calculées pour différentes tailles de billes et reportées dans le tableau 33.

Diamètre bille (μm)	Vitesse de sédimentation dans l'eau (μm.s ⁻¹)	Perte de hauteur dans la partie commune (d'une longueur de 1470μm) pour un débit usuel de 1μl.min ⁻¹
1	0,7	1,1 μm
2,3	3,6	5,7 μm
5	17,0	27 μm
8	43,6	69,2 μm

Tableau 33. Déplacement d'une bille magnétique dû à son poids en fonction de son diamètre.

Sachant qu'une canalisation fait 25µm de haut et que dans la partie commune la hauteur de la canalisation vaut 60µm nous en déduisons que la gravité peut poser de gros problèmes quant à l'obtention d'une bonne spécificité de séparation.

De plus, vu que les canalisations en amont et en aval de la partie commune sont bien plus longues que la partie commune nous voyons que la majorité des billes va déjà être plaquée sur le fond de la canalisation d'entrée avant d'être séparée. Il existe d'ailleurs des dispositifs utilisant cet effet de sédimentation pour réaliser de la séparation (D. Sugiyama, 2012) (I. K. Dimov, 2011). C'est un phénomène important à ne pas négliger.

5.2.1.2 Bilan des forces sur une bille magnétique

Nous pouvons considérer deux phases très différentes quant au comportement d'une bille magnétique dans nos dispositifs. En effet, nous distinguerons le déplacement de la bille sous le champ magnétique, quand elle se rapproche des bobines et son comportement quand elle est à la surface de la canalisation arrêtée par le champ magnétique. En d'autres termes nous allons étudier sa séparation d'une part et son piégeage et décollement d'autre part.

Nous mettons de coté les effets de sédimentations car même s'ils ne sont pas négligeables dans le comportement général, la force résultante est très faible et n'influencera que très peu le bilan des forces.

Par contre, la force de stokes qui correspond à l'action du fluide sur la bille est importante. Elle s'écrit comme suit :

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta r_{bille}(\vec{v}_{bille} - \vec{v}_{fluide}) \quad [5.3]$$

Avec η la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s), v_{bille} la vitesse propre de la bille et v_{fluide} , la vitesse du fluide porteur à l'endroit de la bille. Nous considérerons que la vitesse de la bille en dehors du champ d'action des bobines est égal à la vitesse du fluide, la force de stokes est donc nulle.

Séparation d'une bille magnétique :

Dans cette première phase, la bille est entraînée dans le fluide, sa vitesse est proche de celle du fluide et donc la force de Stokes est faible. Bien évidemment quand la bille se rapproche de la bobine, elle va être accélérée ou freinée par le champ magnétique la composante en x de sa vitesse va donc changer, de plus étant attirée vers le fond de la canalisation la bille acquière une composante z de sa vitesse. Il apparaît alors une force de stokes opposée au mouvement. Le tableau 35 regroupe les forces de stokes calculées pour différentes tailles de billes et vitesses de déplacement des billes.

	Force de stokes en fonction de la taille des billes (pN)			
Vitesse des billes	1 µm	2.3 µm	5 µm	8 µm
1 µm.s ⁻¹	0.01	0.02	0.05	0.08

5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.05	0.11	0.24	0.38
10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.09	0.22	0.47	0.75
20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.19	0.43	0.94	1.51
50 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.47	1.08	2.36	3.77
100 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	0.94	2.17	4.71	7.54

Tableau 34. Force de stokes en fonction de la taille des billes.

Pour que la bille soit séparée il faut que la force magnétique soit supérieure à la force de Stokes. Nous voyons ici que les valeurs des forces mises en jeu sont loin d'être négligeables. Il est judicieux de se demander s'il sera possible de séparer toutes les billes.

Afin de valider ces valeurs, des expériences de piégeage de billes ont été réalisées en statique : une goutte contenant des billes est placée sur une bobine et quand celle-ci est activée la vitesse de déplacement des billes est mesurée. Nous pouvons alors voir que la vitesse des billes augmente lorsque elles se rapprochent de la bobine. C'est un premier résultat attendu car la force magnétique devient plus grande au contact de la bobine. Les billes ont une vitesse allant de 20 à 100 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La force de stokes engendrée par ce déplacement pour des billes de 5 μm de diamètre varie alors de 0,9 à près de 4,7 pN.

Dans tous les cas nous voyons que pour dévier lentement des billes magnétiques, à 1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ par exemple, la force de Stokes est faible. Toutefois le temps où la bille est soumise au champ magnétique, c'est-à-dire le temps où elle passe au dessus de la bobine doit être pris en compte. Ce temps de vol se calcule facilement en fonction du débit et des grandeurs géométriques de la puce, quelques valeurs sont données dans le tableau 35 pour une canalisation rectangulaire de 300 μm de large et 25 μm sur une distance selon le l'écoulement de 300 μm . Il faut par exemple 0,14 seconde à une bille de 5 μm pour parcourir 300 μm pour un débit de 1 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Débit ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	Temps de vol pour 300 μm (s)
0.1	1.35
0.25	0.54
0.5	0.27
0.75	0.18
1	0.14
2	0.07
4	0.03

Tableau 35. Temps de vol d'une bille magnétique de 5 μm de diamètre en fonction du débit

Vitesse des billes ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	Temps pour parcourir 25 μm (s)
1	25
5	5
10	2.5
20	1.3
50	0.5
100	0.3

Tableau 36. Temps que met une bille de 5 μm soumise qu'à son poids pour parcourir 25 μm en fonction de sa vitesse.

Le tableau 36 regroupe quant à lui le temps qu'il faut à la bille de 5 μm pour parcourir 25 μm selon sa vitesse de déplacement. Il faut par exemple 1,3 seconde à une bille de 5 μm pour parcourir 25 μm quand elle se déplace à une vitesse de 20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces deux tableaux doivent être lus ensemble, en effet imaginons que nous souhaitons séparer une bille de 5 μm dans un écoulement de 0,1 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ par exemple. Pour être sûr de séparer toutes les billes, il faut les dévier de plus de 25 μm (hauteur de la canalisation) dans le temps de vol au dessus de la bobine sur 300 μm . Ainsi nous disposons de 1,35 seconde pour le faire (tableau 35) et il faut donc déplacer les billes plus vite que 20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (tableau 36), ce qui correspond à une force magnétique minimale de 0,94pN (tableau 34).

Ces tableaux permettent donc d'avoir un ordre de grandeur des forces magnétiques que nous devons être capable de générées afin de réaliser une séparation des billes selon différents paramètres de l'écoulement.

Nous pouvons comparer ces calculs aux résultats donnés par les simulations COMSOL et exposés dans le chapitre 2. Le tableau 9 nous prédit une force magnétique allant de 26pN (à 5µm de la bobine) à 0,5 pN (à 45µm de la bobine). Ce qui nous laisse présager le bon fonctionnement de nos dispositifs. Toutefois les valeurs simulées sont à prendre avec précautions car dépendent de paramètres pas toujours égalent à ceux de l'expérience.

Décollement d'une bille piégée :

Lorsque la bille s'est immobilisée sur la bobine, la force exercée par le fluide sur la particule est la force de stokes avec comme vitesse, l'intégrale du champ de vitesse pour la taille de la bille. Nous pourrions imaginer une force de frottement ou en tout cas une force d'affinité entre la bille et la surface, cependant nous nous placerons ici dans le cas le plus défavorable c'est-à-dire sans autre force. Le tableau 37 nous donne les valeurs calculées des forces de stokes appliquées à une bille ou une cellule arrêtée dans le flux pour des débits de fluides différents.

Débit de fluide (µl.min ⁻¹)	Vitesse moy écoulement (µm.s ⁻¹)	Bille 5 µm		Cellule 15 µm	
		Vitesse du fluide pour Stokes (µm.s ⁻¹)	Force de Stokes (pN)	Vitesse du fluide pour Stokes (µm.s ⁻¹)	Force de Stokes (pN)
0,025	55,56	28,89	1,36	60	8,48
0,05	111,11	57,78	2,72	120	16,96
0,1	222,22	115,56	5,45	240	33,93
0,25	555,56	288,89	13,61	600	84,82
0,5	1111,11	577,78	27,23	1200	169,65
0,75	1666,67	866,67	40,84	1800	254,47
1	2222,22	1155,56	54,45	2400	339,29
2	4444,44	2311,11	108,91	4800	678,58

Tableau 37. Bilan des forces magnétique nécessaires pour garder piégée une bille de 5µm ou une cellule de 15µm en fonction du débit de fluide.

Il est bien sûr plus facile de décoller des cellules qui font 15µm même pour un débit de 0,1µl.min⁻¹ puisque il faut une force de plus de 33pN pour la retenir contre 5,5 pN pour une bille de 5µm. D'ailleurs notons que 33pN est une valeur supérieure aux estimations faites lors des simulations. Nous pouvons en conclure que le débit de l'écoulement sera déterminant pour l'efficacité de nos dispositifs.

5.2.2 Mise en œuvre expérimentale

5.2.2.1 Suppression de l'agrégation

Avant d'utiliser nos dispositifs nous effectuons un traitement afin d'éviter que les billes magnétiques ne se collent aux parois. Nous utilisons classiquement un tensioactif du Tween20 ou du Span80 mais le résultat n'était pas parfait (Life Technologies). L'emploi de BSA pour recouvrir les parois est aussi très utilisé en microfluidique mais nous gardons cette méthode quand nous travaillons avec des éléments biologiques. En effet, pour les billes nous préférons un coating des parois au PVP à 0,1%.

Pour réaliser la protection nous faisons écouler une solution de PVP 0,1% dans les canalisations à $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, pendant au moins 15 minutes. De plus nous suspendons nos solutions de billes dans du PVP 0,1% aussi pour éviter que les billes ne se collent entre elles et vu que le traitement de PVP peut partir avec le temps, le PVP contenu dans la solution remplace en continu celui des parois.

5.2.2.2 Suppression des bulles

Un autre point très important pour les expériences est l'absence de bulle d'air dans le dispositif. En effet, si une bulle d'air se retrouve dans une des canalisations, elle modifie grandement la résistance fluidique de cette dernière modifiant ainsi l'équilibre des écoulements. Malheureusement nous stabilisons les bulles dans nos dispositifs par l'ajout de tensioactif. De plus dans le design 3D, la partie commune offre à la bulle un espace plus grand, elle peut donc se rapprocher de sa forme la plus stable qui est la sphère. Pour la chasser, il faut alors vaincre les forces dues aux tensions de surface et pour cela pousser l'écoulement avec une surpression assez forte, risquant parfois de détériorer le dispositif.

5.2.2.3 Elimination des problèmes de sédimentation des billes magnétiques

Nous avons vu dans la partie précédente que la sédimentation peut jouer un rôle important dans l'efficacité de la séparation mais le problème de la sédimentation des solutions est un problème bien plus vaste. En effet, dans toutes les parties du dispositif expérimental, les seringues, les tubes, les connectiques, les billes peuvent se déposer sur les parois et peuvent boucher les connectiques rendant la puce inutilisable.

Il est ainsi très courant de voir que la concentration en billes de la solution dans la puce n'est pas celle de la solution préparée initialement.

Une des solutions est de modifier la densité de la solution pour approcher de celle des billes. Classiquement cette modification se fait par ajout d'un certain pourcentage de glycérol. Nous avons donc testé différentes concentrations de glycérol et mesuré la vitesse de sédimentation des billes de $5\mu\text{m}$ dans ces différentes solutions. Les résultats sont regroupés dans le tableau 38.

% de glycérol	Vitesse de sédimentation
0	$17\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
20	$11,8\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
40	$3,7\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
60	$3,2\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
80	$2\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

Tableau 38. Vitesse de sédimentation d'une bille de $5\mu\text{m}$ en fonction du pourcentage de glycérol dans la solution.

Notons tout d'abord que la vitesse ne diminue que faiblement pour un pourcentage de glycérol supérieur à 40%, ce qui correspond à la solubilité maximale du glycérol dans l'eau qui est de 0,8ml de glycérol pour 1ml d'eau. Notons aussi que pour un pourcentage de 40% de glycérol nous avons une diminution non négligeable de la vitesse par un rapport 4,5.

Cependant ces diminutions importantes de vitesse ne s'expliquent pas par le seul fait de l'augmentation de la densité de la solution mais plus par l'impact sur la viscosité du fluide. En effet, la viscosité n'affecte pas le résultat de la sédimentation mais joue sur sa dynamique, plus le milieu est visqueux et plus la sédimentation sera lente. C'est le rôle que joue le glycérol, en augmentant la viscosité du milieu il ralentit l'effet de la sédimentation.

5.2.3 Caractérisation de la fonction de piégeage avec des billes magnétiques

Les expériences de piégeage sont d'abord réalisées avec des dispositifs à une seule canalisation de 25 μ m de haut comportant trois bobines à la suite. Le contrôle de l'écoulement est effectué par le pousse seringue de chez Cétoni afin de connaître le débit circulant dans la puce. Nous avons testé des débits de 0,1 à 4 μ l.min⁻¹. Les bobines sont alimentées en courant avec une consigne à 100mA. La consigne est conservée pour toutes les expériences.

Plusieurs types de billes ont été testés, leurs caractéristiques sont reportées dans le tableau 39.

Taille (μ m)	Fournisseur	Fluorescence	Fonctionnalisation
1	Chemicell	Oui (green)	Amine
2,3	Sphérotec	Oui (green)	Carboxyl
5	Sphérotec	Oui (green)	Carboxyl
5	Invitrogene	Non	CD14
8,4	Sphérotec	Oui (green)	Carboxyl

Tableau 39. Récapitulatif des billes magnétiques à notre disposition avec leurs paramètres respectifs.

La réaction des billes de 1 μ m de chez Chemicell, dans nos dispositifs, n'est pas suffisante pour être observée et analysée. Nous écartons donc les billes de 1 μ m en tant qu'élément individuel.

Les billes Sphérotec ont montré des comportements faibles quant au piégeage magnétique, seul 28% des billes de 2,3 μ m ont pu être piégées pour le plus faible débit, c'est-à-dire 0.1 μ l.min⁻¹. Au-delà, il n'y a plus de piégeage. Cependant, les billes sont tout de même déviées de leur trajectoire ce qui présage un bon fonctionnement lors de la séparation.

Un comportement similaire est obtenu pour les billes Sphérotec de 5 μ m, en effet même si nous avons un taux de piégeage parfait de 100% pour un débit de 0,1 μ l.min⁻¹ il devient presque nul quand nous augmentons le débit. Nous voyons ici qu'au-delà de 0,1 μ l.min⁻¹ la force de stokes devient plus grande que la force magnétique et les billes ne sont plus piégées.

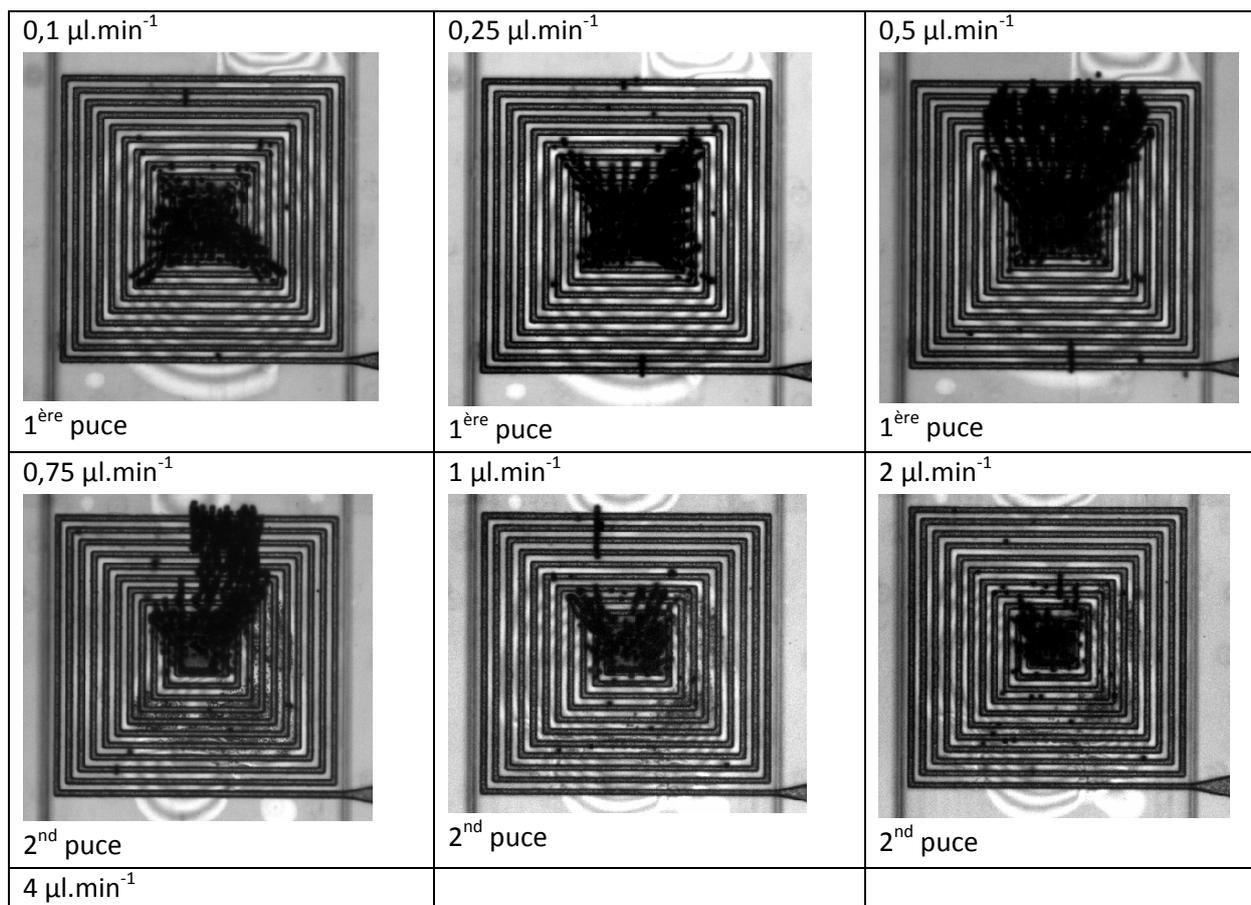
De même nous nous sommes aperçus que dans la gamme d'utilisation de nos dispositifs, (débit / intensité du courant), les billes de 8 μ m de donnaient pas ou très peu de réponse au champ magnétique.

En conclusion, les billes Sphérotec présentant des caractéristiques peu satisfaisantes, nous avons utilisé des billes de 5µm de chez Invitrogen, qui selon le fabriquant possède « une forte concentration en particules ferromagnétiques ». Les résultats de piégeage alors obtenus sont résumés dans le tableau 40.

Débit	Vitesse moy	Piégeage
0,1 µl.min ⁻¹	222 µm.s ⁻¹	100 %
0,25 µl.min ⁻¹	556 µm.s ⁻¹	100 %
0,5 µl.min ⁻¹	1111 µm.s ⁻¹	94 %
> 0,75 µl.min ⁻¹	> 1667 µm.s ⁻¹	~0 %

Tableau 40. Efficacité de piégeage en fonction du débit pour des billes de 5µm de chez Invitrogen.

Ces résultats montrent d’abord la bonne fonctionnalité des bobines et confirment la bien meilleure adéquation des billes Invitrogen à notre problématique. Grâce à cette expérience, nous voyons toutefois la limite de piégeage des microbobines en effet pour un écoulement de 0,5 µl.min⁻¹, nous piégeons 94% des billes, et au-delà d’un débit de 0,75 µl.min⁻¹ le piégeage est quasi nul, nous sommes donc à l’équilibre de la force de stokes et de la force magnétique. Ces résultats sont attendus pour une force magnétique générée de 27,23 pN (tableau 37) d’après les calculs et en accord avec les simulations et les 26 pN (tableau 9) à 5µm de la bobine.



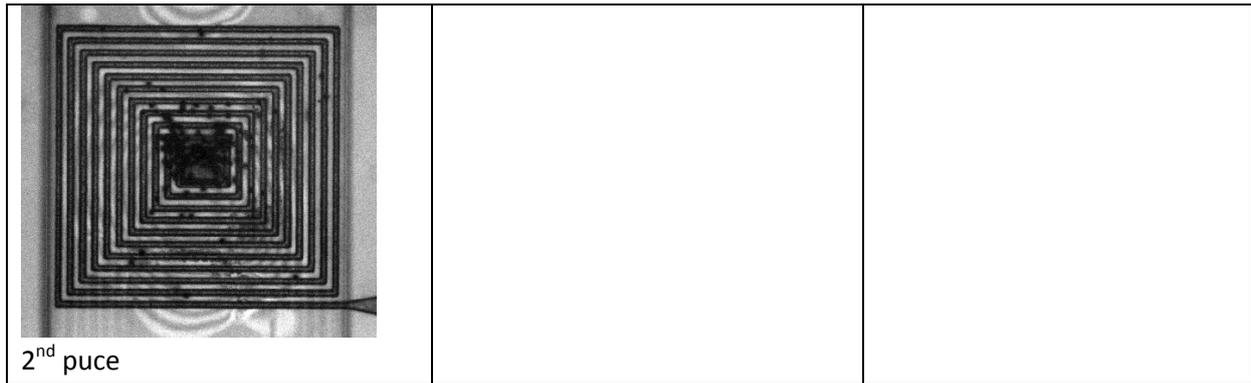


Figure 130. Figure de piégeage obtenue en fonction du débit pour des billes de $5\mu\text{m}$ de chez Invitrogen

Au-delà de la capacité de piégeage, nous avons pu observer des configurations de piégeage différentes suivant le débit imposé. Tout d'abord, pour des débits inférieurs ou égal à $0,5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, les billes sont préférentiellement piégées sur la première bobine alors que pour un débit plus important le piégeage s'effectue plus sur les bobines suivantes, la première bobine permettant de plaquer les billes sur le bas de la canalisation pour qu'elles soient piégées ensuite.

Pour un débit faible, les billes sont piégées en croix dans la première moitié de la bobine, puis décalées sur l'autre moitié de la bobine lorsque le débit augmente. Quand nous augmentons encore le débit, les billes sont piégées sous forme de filaments accrochés au centre de la bobine. Ce phénomène est dû à la magnétisation des billes qui se retiennent de proche en proche.

Nous avons noté un piégeage proche de 0% pour un débit de $0,75\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ or la figure de piégeage révèle qu'une partie des billes est pourtant piégée. C'est que l'efficacité de piégeage dépend d'un phénomène dynamique. En effet, une fois que la bobine est recouverte de billes, les autres ne peuvent plus être piégées. Dans le cas d'un débit inférieur à $0,5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, le régime temporaire est suffisamment long pour mesurer un taux d'efficacité, mais à $0,75\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, le régime stationnaire est rapidement atteint et si certaines billes peuvent s'accrocher et d'autres se détacher, au bilan il n'y a plus de piégeage.

En conclusion nous avons montré la possibilité de piéger des billes magnétiques avec de très bon taux d'efficacité pour de faibles débits, ce taux d'efficacité étant très dépendant de la nature des billes utilisées. En effet, nous notons une amélioration d'un facteur 5 entre les billes Sphérotec et Invitrogen pour les mêmes tailles.

De plus, nous voyons que, même si la force magnétique n'est pas assez forte pour piéger les billes, elle l'est pour les déplacer. Ainsi il semblerait que les bobines permettent de centrer les billes dans la canalisation. Ce comportement est visible sur la figure 131 qui retrace la répartition selon y de la densité des billes sans et en présence d'activation magnétique.

Nous définissons deux efficacités qui nous serviront à caractériser nos dispositifs. L'efficacité de piégeage et l'efficacité de séparation définies comme suit :

$$E_{\text{Piégeage}} = \frac{Q_{\text{piégées}}}{Q_0} \text{ et } E_{\text{Séparation}} = \frac{Q_{\text{piégées}} + Q_2}{Q_0} = E_{\text{Piégeage}} + \frac{Q_2}{Q_0} \quad [5.4]$$

Pour calculer ces valeurs, nous comptons le nombre de billes en entrée du dispositif, ainsi que les billes sortant dans les canalisations supérieures et inférieures. La différence entre l'entrée et la sortie correspond au nombre de billes piégées sur les bobines.

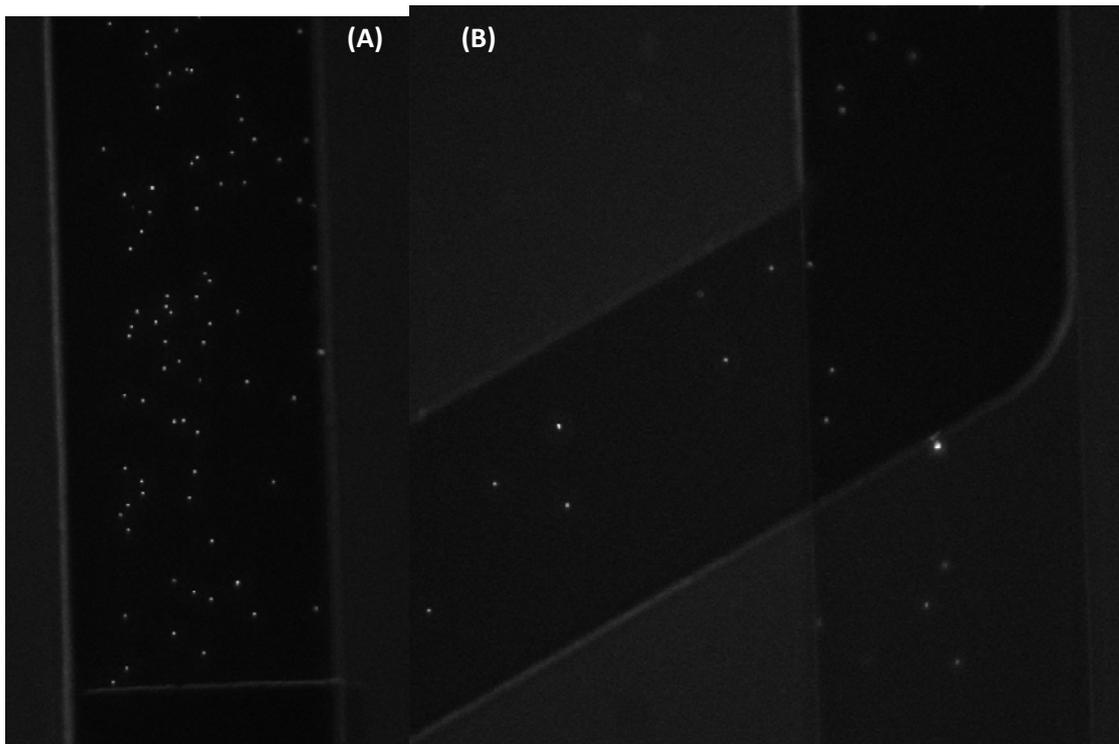


Figure 133. Photo d'expérience de séparation pour des billes magnétiques de 5 μm Sphérotec, avec un débit de 0,5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. (A) en entrée, (B) en sortie avec les bobines activées.

Comme pour l'étude du piégeage, nous débuterons les tests avec les billes magnétiques de chez Sphérotec. Certes ces billes sont moins réactives aux champs magnétiques mais nous disposons d'une plus grande gamme de tailles. Comme précédemment, les billes de 1 μm de diamètre comme les billes de 8 μm ne sont quasi pas influencées par le champ magnétique et nous écarterons ces tailles de l'étude. Les billes de 2,3 μm de diamètre montrent une réponse faible et pas suffisante. En effet, même pour les plus faibles débits inférieurs à 0,03 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, nous n'obtenons qu'une efficacité de séparation de 87% car les forces magnétiques appliquées aux billes situées en haut de la canalisation sont dérisoires. Ne pouvant obtenir une séparation de 100%, nous écartons aussi les billes de 2,3 μm de diamètre.

Nous avons vu que les billes de 5 μm de diamètre possèdent la meilleur réponse au piégeage et il en est de même pour la séparation, et nous allons alors étudier plus en détail leur comportement ici. Le courant d'alimentation des bobines est fixé à 100 mA et est constant pour toute l'étude. Nous

regarderons deux paramètres influençant les efficacités de piégeage et de séparation : le débit de fluide et le nombre de bobines actives.

Nous analysons dans un premier temps les efficacités de séparation et de piégeage en fonction de débit.

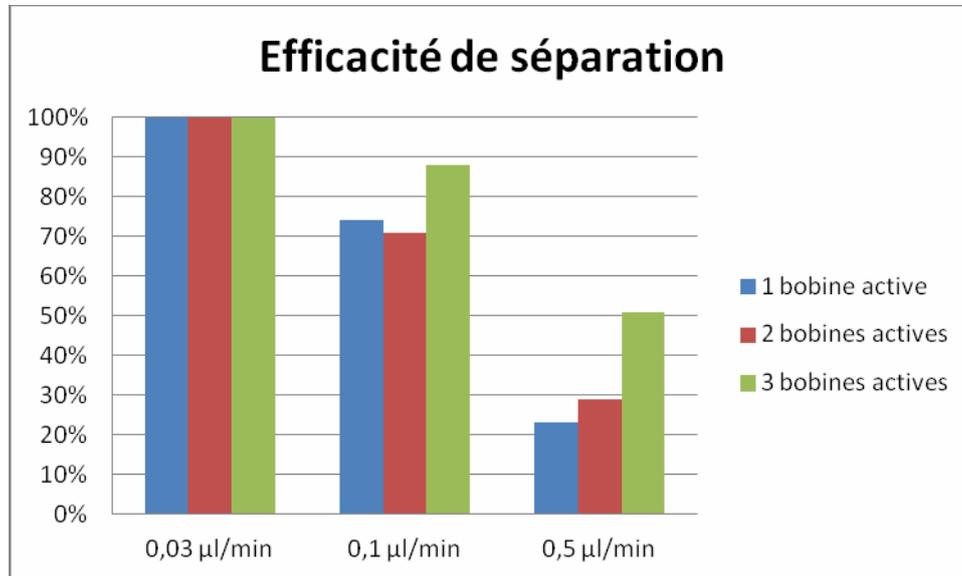


Figure 134. Efficacité du piégeage pour les billes de 5µm Spherotec en fonction du débit et du nombre de bobines actives. Le design utilisé est le 1-3D3.

Sur la figure 134, nous voyons que nous pouvons obtenir un taux d'efficacité de 100% pour un débit faible de 0,03 µl.min⁻¹, cependant ce pourcentage diminue fortement avec l'augmentation du débit pour descendre en dessous de 50% à un débit de 0,5µl.min⁻¹. Notons aussi que l'efficacité de séparation augmente avec le nombre de bobines actives.

Nous pouvons nous demander comment sont séparées ces billes, sont elles déplacées de la canalisation supérieure à la canalisation inférieure ? Ou sont elles piégées sur les bobines ? La figure 135 répond à ces questions.

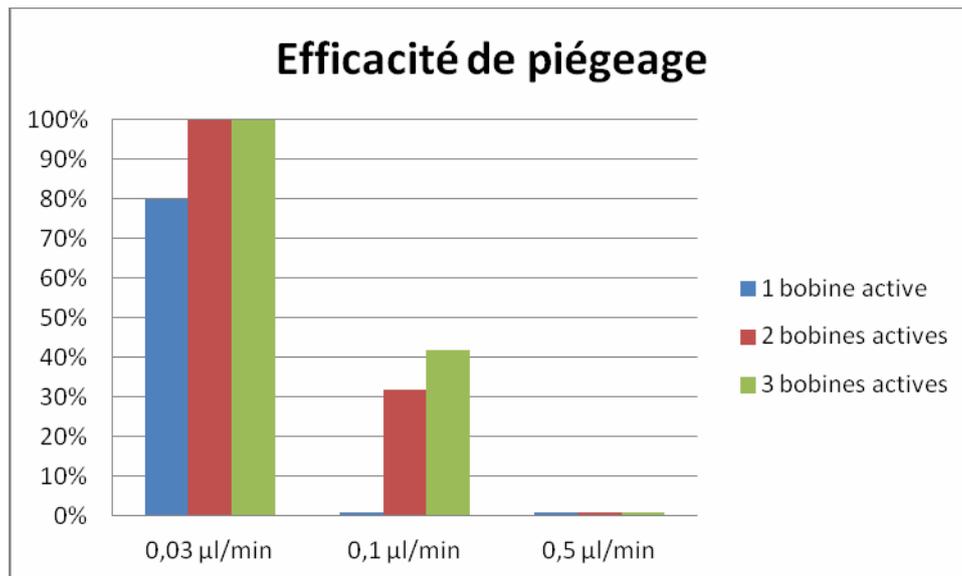


Figure 135. Efficacité du piégeage pour des billes de 5µm de chez Shpérotec en fonction de l'écoulement et du nombre de bobine actives. Le design utilisé est le 1-3D3.

Le taux de piégeage est très grand pour le plus faible débit mais diminue très fortement pour être quasi nul avec un débit de 0,5 µl.min⁻¹. Nous voyons donc que dans les conditions les plus favorables, c'est-à-dire pour un débit de 0,03 µl.min⁻¹, 100% des billes sont séparées mais elles sont en fait piégées sur la ou les bobines. Il faudra donc désactiver les bobines pour récupérer les billes.

Afin de visualiser un peu mieux cette compétition entre piégeage et séparation nous avons regardé en détail chaque cas avec une, deux ou trois bobines actives. Les résultats sont reportés sur la figure 136.

La partie bleue de l'histogramme représente le taux de piégeage et la partie rouge représente les billes séparées mais non piégées. Nous retrouvons le constat précédent, à savoir que pour la seule condition où nous avons 100% de séparation (pour un débit de 0,03µl.min⁻¹) les billes sont essentiellement piégées.

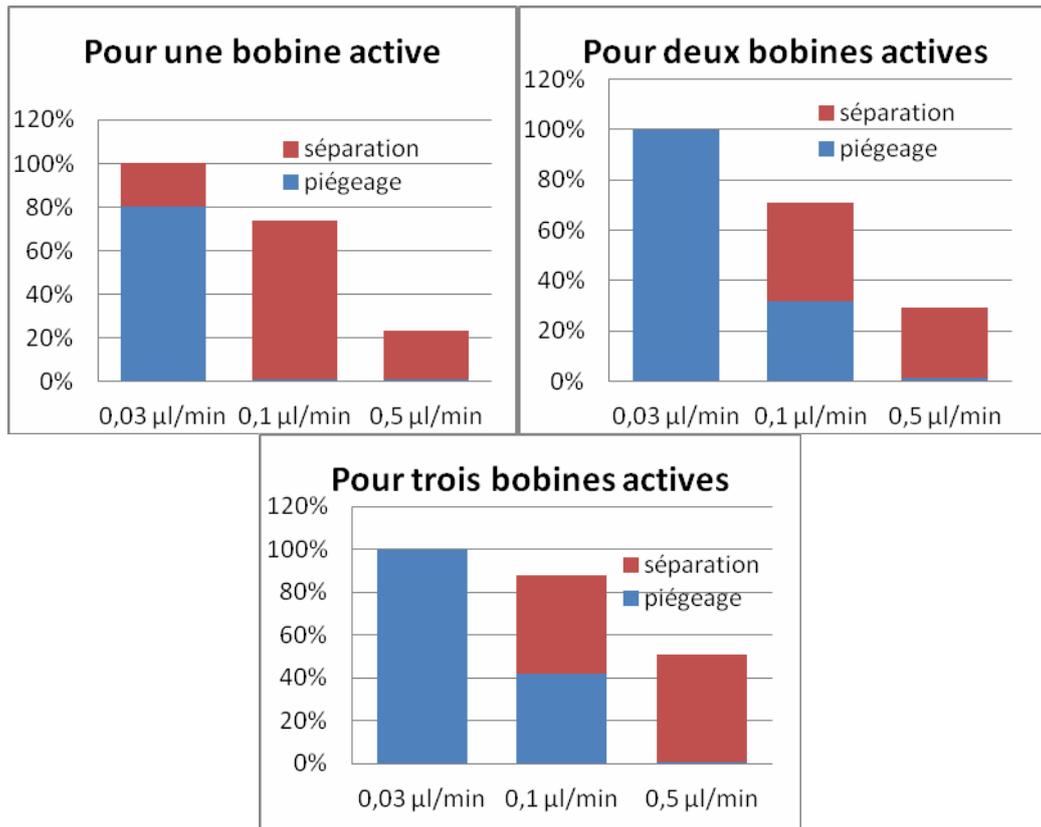


Figure 136. Efficacité de séparation et de piégeage en fonction du débit; (A) pour une bobine active, (B) pour deux bobines actives et (C) pour les trois bobines actives.

Il serait très intéressant de pouvoir effectuer une séparation en continu et donc de n'avoir que de la séparation sans piégeage. Le meilleur résultat a été obtenu pour la configuration une seule bobine active et un débit de $0,1 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$, où nous atteignons une efficacité de séparation de 74% sans piégeage.

La difficulté de ne pas pouvoir faire une séparation sans piégeage vient de la géométrie de nos dispositifs et est expliquée par la figure 137. Si nous souhaitons séparer la bille 1, située au sommet de la canalisation nous devons attirer la bille 2 au contact des bobines où elle risque de se faire piéger.

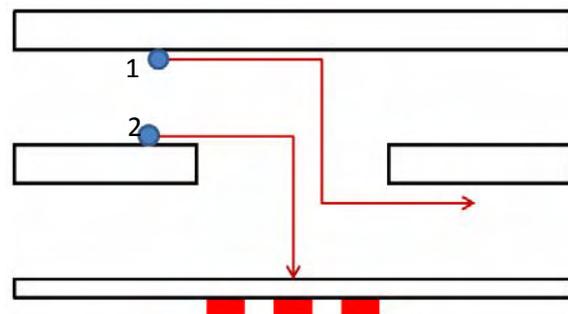


Figure 137. Schéma du piégeage non recherché des billes magnétiques.

Ces premières expériences de piégeage nous conduisent à deux conclusions : l'une est que les débits utilisables sont très faibles, ce qui empêche le traitement de volume d'échantillon significatifs et accroît les problèmes de sédimentation. La deuxième est qu'il n'est pas possible, avec ce dispositif, de réaliser de la séparation sans piégeage, obligeant un fonctionnement en batch non souhaité.

5.2.4.2 Deuxième génération de puce

Dans le cadre des puces de seconde génération nous avons voulu améliorer davantage le design 3D fluïdique ainsi qu'augmenter l'influence du champ magnétique dans la hauteur.

Amélioration du magnétisme pour augmenter la performance des dispositifs

Dans un premier temps le nombre de bobines a été multiplié par trois en faisant trois groupes de trois bobines actionnées simultanément. Nous plaçons ces bobines en série pour s'assurer de la valeur du courant, la même présente dans les trois bobines.

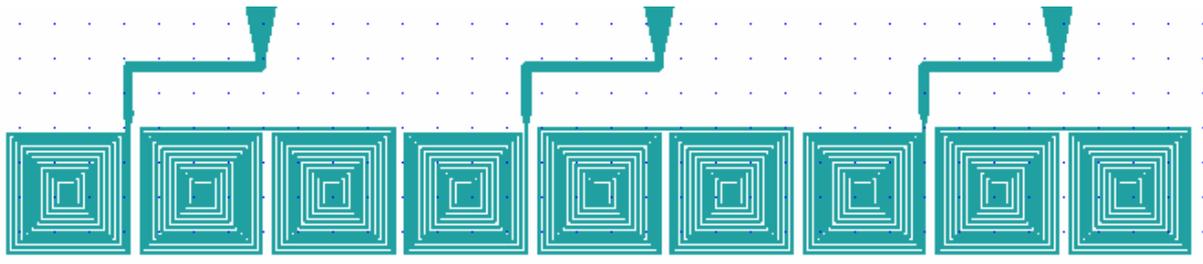


Figure 138. Schéma des bobines du design de deuxième génération.

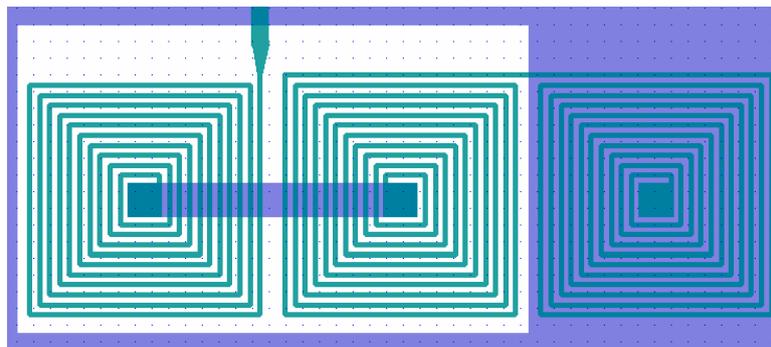


Figure 139. Zoom sur un jeu de trois bobines, contrôlable indépendamment des autres jeux de bobines, du design de deuxième génération, visualisation de la continuité du courant grâce à la piste de masse en or.

Pour réussir à mettre les trois bobines en série, il faut utiliser la piste de courant en or afin de déplacer le fil de cuivre sur deux niveaux. Ainsi, comme visible sur la figure 139, le courant arrive par la première bobine à gauche, puis passe au centre et rejoint le centre de la deuxième bobine en passant sous la SU8 de protection de la piste de masse en or. Enfin la connexion entre les bobines deux et trois se fait par le dessus et la troisième bobine reprend contact avec la piste d'or par son centre.

En plus de l'augmentation du nombre de bobines, nous avons ajouté des plaques ferromagnétiques en dessous des bobines de cuivre sur certains dispositifs. En effet, nous avons vu, lors des simulations du chapitre 3, que ce choix pouvait augmenter le champ magnétique total.

Pour ce faire, nous utilisons un alliage FeNiCo comme matériau. Il est déposé par électrochimie sur une couche d'accroche de Ti/Cu. Les paramètres de fabrication sont expliqués en détail dans la suite du chapitre, partie 4.4.3.

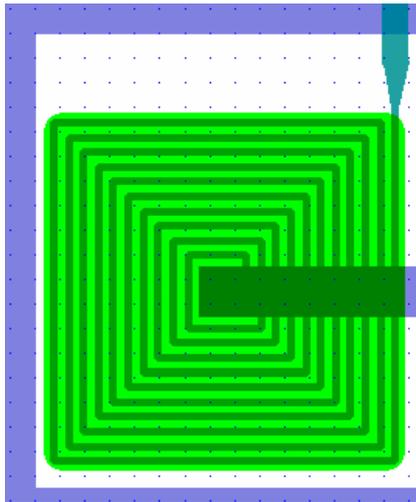


Figure 140. Visualisation de l'ajout d'une plaque ferromagnétique sous la bobine (en vert clair sur le schéma)

Comme nous l'avons simulé, nous plaçons une plaque de la taille de la bobine ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$) juste en dessous, alignée avec la bobine. Il faut penser à faire les bords arrondis pour diminuer les contraintes qui sont importantes dans ce genre de dépôt. Nous choisissons de faire un dépôt de $7\mu\text{m}$ de haut recouvert par $10\mu\text{m}$ de résine SU8. Nous plaçons ainsi la plaque à $3\mu\text{m}$ de la bobine.

Amélioration du design fluide pour augmenter la performance des dispositifs

Concernant le design fluide une seule chose a été modifiée c'est l'ouverture entre les deux niveaux de canalisation qui est réduite. En effet, la zone d'échange s'étend maintenant sur la largeur d'une ou deux bobines et donc est diminuée de $14770\mu\text{m}$ pour le design de première génération à $640\mu\text{m}$, ou $340\mu\text{m}$, selon les modèles.

Le fonctionnement visé est expliqué figure 141, l'objectif de ce nouveau dispositif est multiple. La zone de passage entre le niveau supérieur et inférieur est diminuée pour réduire les échanges par sédimentation. Il y a une première étape (Etape A) qui vise à plaquer les billes magnétiques au fond de la canalisation supérieure. Cette étape est rendue possible par la présence des 6 bobines en amont de la zone commune. Puis vient l'étape proprement dite de séparation, (Etape B) effectuée par le troisième et dernier groupe de bobine. La zone commune est restreinte à la taille d'une ou de deux bobines selon les dispositifs.

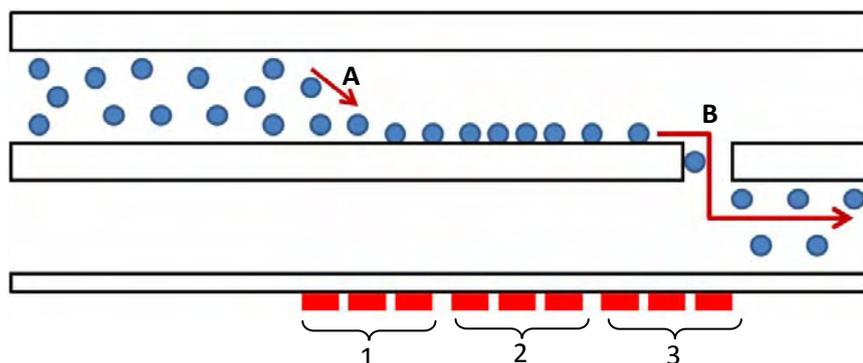


Figure 141. Schéma global du fonctionnement du dispositif de deuxième génération avec la mise en évidence des deux principales fonctions. A = la focalisation des billes, B = la séparation verticale des billes magnétiques.

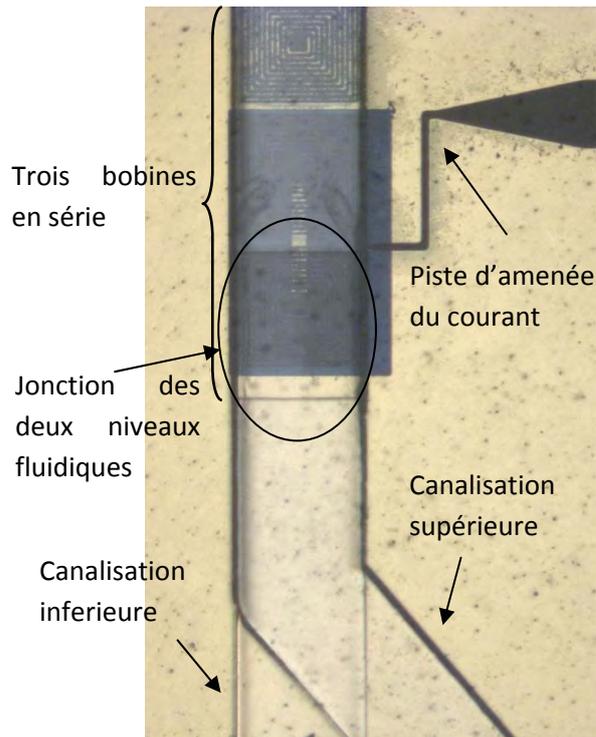


Figure 142. Photo du dispositif de deuxième génération fini.

Croissance du FeNiCo

Nous avons souhaité implanter des plaques de FeNiCo en dessous des bobines de cuivre. Pour cela nous procédons à de la croissance électrochimique sur cuivre. En effet le cuivre tout comme l'or sont deux couches d'accroche utilisables pour la croissance de FeNiCo, mais le cuivre étant moins cher, c'est lui qui a été retenu.

La croissance électrochimique se déroule de la même façon que pour la réalisation des bobines de cuivre, le moule est réalisé dans la même résine AZ40XT, les caractéristiques du bain et les paramètres de croissance sont regroupés dans les tableaux 41. Ceux-ci ont été déterminés dans le cadre de travaux antérieurs.

Paramètres	Valeurs
Température	40°C
Agitation	900 tr/min
Densité de courant	2 A/cm ²
Temps du dépôt	~10min
pH	1,5

Composants	Quantités
FeCl ₂	31,8 g.L ⁻¹
CoCl ₂	57 g.L ⁻¹
NiSO ₄	26,28 g.L ⁻¹
NiCl ₂	73,69 g.L ⁻¹
5-sulphosalicyclic acid	10,17 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	40,19 g.L ⁻¹
Nuphtalene 1,3,6 tri acid	1,54 g.L ⁻¹

Tableau 41. Récapitulatif des paramètres de croissance du FeNiCo et la composition du bain de croissance.

Les choix du bain et des paramètres de croissance ont été fait suite à des travaux antérieurs. En effet des premiers tests pour la croissance de FeNiCo ont déjà été réalisés. Nous souhaitons pour notre application une perméabilité maximale et un champ coercitif minimal. La composition visée était

donc de 24,94% pour le fer, 14,81% pour le nickel et 60,25% pour le cobalt. Ce qui nous donnerait un champ coercitif de 30 (A.m⁻¹), et une perméabilité magnétique de 400.

Nous avons d'abord effectué des tests de croissance pour s'assurer de la tenue du dépôt ainsi que de sa composition. Pour cela nous avons effectué un masque souple car ne nécessitait pas de définitions particulières, cela explique aussi les défauts importants sur les flancs de la croissance sur l'image 143.

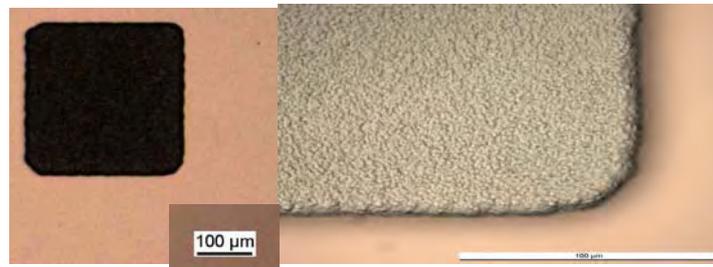


Figure 143. Photos au microscope optique de la croissance de FeNiCo.

Une première observation montre que le dépôt fonctionne bien et que de grandes surfaces peuvent être réalisées (des lignes de 500µm jusqu'à 1 cm de long).

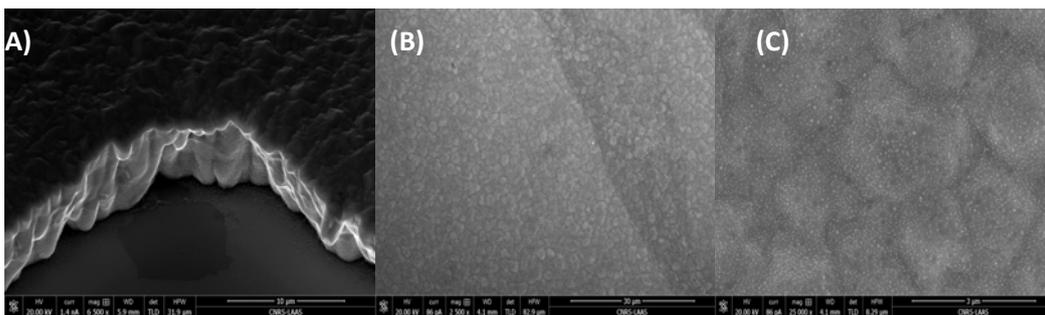


Figure 144. Image MEB du dépôt de FeNiCo. (A) pour un grossissement de 6500x, (B) un grossissement de 2500x (C) un grossissement de 25000x.

De l'observation visuelle, que ce soit au microscope optique ou au microscope électronique, nous notons une forte rugosité du dépôt et la présence de gros grains. Grâce au module de DRX (Diffraction Rayon X) du microscope électronique il a été possible de vérifier la composition en surface du dépôt. Nous nous sommes ainsi assuré de l'homogénéité entre les grains que nous voyons sur la surface et obtenons la composition de 24% de fer, 16% de nickel et 60% de cobalt. Ce qui est totalement en accord avec ce que nous souhaitons.

Un des matériaux magnétiques bien connus est le permalloy, c'est un alliage de Fe et de Ni qui possède une perméabilité magnétique élevée et une coercivité basse (Bozorth, 1993). Cependant certains composés peuvent être ajoutés à ce mélange pour obtenir des caractéristiques différentes, nous pouvons ainsi trouver du molybdène, du fer ou encore comme dans notre cas, du cobalt.

L'ajout de cobalt dans certaines proportions permet de créer un alliage appelé perminvar (Elmen, 1928), c'est notre cas dans cette étude. Cet alliage se caractérise principalement par une perméabilité quasi-constante lorsqu'il est placé dans de faibles champs magnétiques. Le diagramme de composition de l'alliage en fer, nickel et cobalt est donné figure 145, les proportions permettant l'obtention du perminvar y est représenté.

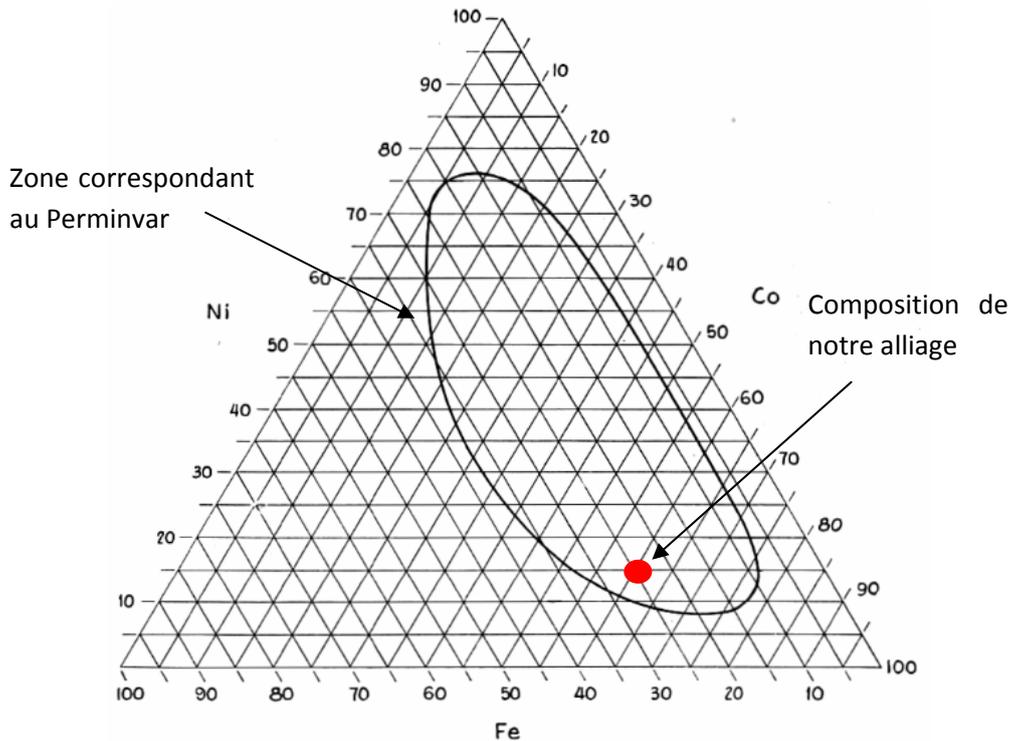


Figure 145. Diagramme de composition des alliages Fe-Ni-Co et emplacement du Perminvar.

Notre mélange n'est pas le plus utilisé, généralement une plus faible quantité de cobalt est ajoutée (plutôt dans les 25%) compensée par du nickel. Ce qui permet d'avoir un matériau avec une plus grande perméabilité magnétique donc meilleur pour notre application, cependant nous sommes partis sur le procédé qui était déjà connu au laboratoire pour plus de sécurité. Cela évite de devoir faire la calibration d'un procédé nouveau et c'est suffisant pour mesurer l'impact d'une plaque ferromagnétique sous la bobine.

Résultats expérimentaux :

Nous ne présenterons ici que les résultats portant sur les puces de secondes générations sans l'ajout de FeNiCo, les résultats pour cette dernière configuration étant trop préliminaires.

Nous avons décidé d'utiliser les billes de 5 μ m de diamètre Invitrogen répondant mieux aux champs magnétiques. Les expériences se déroulent de la façon suivante : nous augmentons le débit progressivement afin de tester l'efficacité de séparation en fonction de la vitesse de l'écoulement. Entre chaque nouvelle mesure, le débit total est amené au dessus de 80 μ l.min⁻¹ pour nettoyer correctement la puce et évacuer les billes qui pourraient s'être collées aux parois malgré le traitement initial. Le décompte des billes est effectuée comme précédemment pour définir les efficacités de piégeage et de séparation.

Les résultats des expériences pour des débits allant de 0,2 μ l.min⁻¹ à 3 μ l.min⁻¹ sont regroupés dans la figure 146. Les parties bleues représentent le piégeage des billes, les parties rouges représentent les billes séparées mais non piégées et la totalité de l'histogramme représente les billes séparées au sens général.

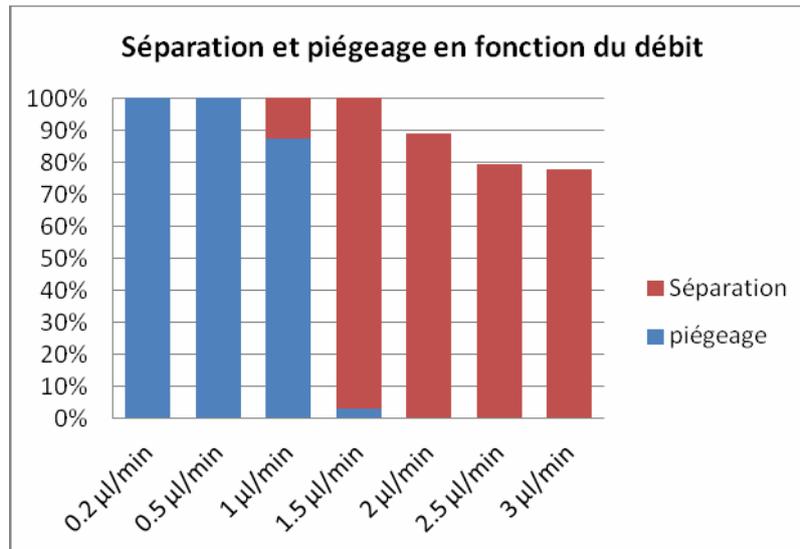


Figure 146. Efficacité de la séparation du design 2-3D9 en fonction du débit.

Nous notons plusieurs choses, tout d’abord nous obtenons des efficacités de séparation bien plus grandes que dans les expériences précédentes, puisque nous obtenons une séparation quasi-totale jusqu’à $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ contrairement à $0,1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pour le design de première génération. Cette différence est due au changement des billes mais pas seulement. Le changement de billes entre Sphérotec et Invitrogen nous a montré une augmentation d’efficacité de piégeage d’un facteur 5 dans les tests sur le piégeage, nous pouvons donc nous attendre à un rapport de cet ordre pour la séparation or nous avons une augmentation d’un rapport 20. Cette différence s’explique par l’efficacité de l’étape A qui permet de coller les billes magnétiques sur la paroi inférieure avant la séparation. Cette étape a deux rôles fondamentaux : le premier est de diminuer la distance que les billes auront à faire pour pouvoir être séparées dans la partie commune, l’autre rôle est de ralentir les billes.

Le ralentissement des billes est double, en effet, les billes se rapprochant de la paroi ralentissent de par la nature parabolique de la vitesse de l’écoulement en régime laminaire. De plus des forces magnétiques en x permettent d’exercer une force en opposition à l’écoulement.

Au regard de la figure 146, nous pouvons faire un autre constat très intéressant : en effet nous voyons que pour un débit de $1,5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ la quasi-totalité des billes magnétiques sont séparées et non piégées ! Ces conditions particulières se révèlent être le point de fonctionnement idéal pour un travail en continu du dispositif. Ce fonctionnement était impossible dans le design de première génération est maintenant facilement réalisable.

Nous pouvons souligner d’autres points supplémentaires démontrés par les expériences. Tout d’abord, comme le montre la figure 147, pour le débit minimal de $0,2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, nous arrivons à piéger les billes non pas dans la zone commune entre les deux canalisations mais en amont dans la canalisation supérieure au dessus des premières bobines, c’est-à-dire $40\mu\text{m}$ au dessus des bobines.

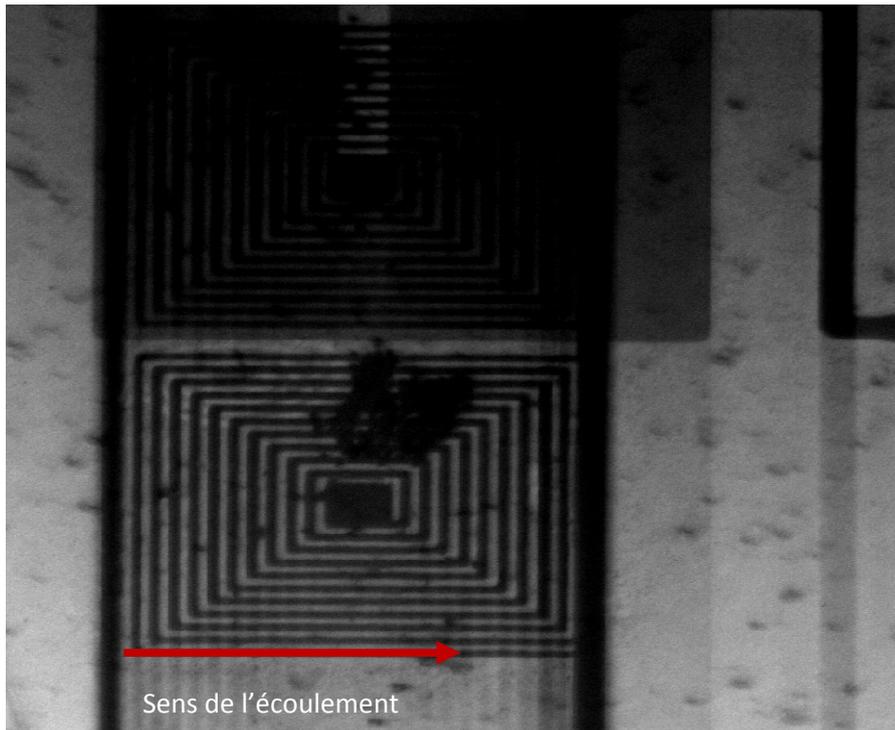


Figure 147. Illustration du piégeage pour de faible débit (0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$) au dessus de la couche séparatrice.

Nous avons essayé de n'activer que certaines bobines, et la non alimentation du groupe 3 rend inopérante l'étape B de séparation. Toutes les billes sont évacuées dans la canalisation supérieure, et cela, en dépit du fait qu'elles ont été plaquées au fond de la canalisation supérieure. Ce résultat montre bien la stabilité des écoulements dans la zone commune, nous confortant dans nos études fluidiques réalisées dans le chapitre 3. De plus nous voyons que l'effet de la sédimentation ne rentre plus en compte.

5.3 Etude de l'échauffement

5.3.1 Partie expérimentale

Une bobine est un enroulement d'un conducteur, dans notre cas du cuivre. Elle constitue une inductance mais aussi une résistance par nature. En faisant passer un courant au travers, nous obtenons un champ magnétique mais aussi des pertes par effet joule suivant la loi :

$$P = R \times I^2 \quad [5.5]$$

Le courant injecté est de l'ordre de 100 mA et la résistance de quelques ohms. On obtient donc une puissance dissipée de l'ordre de 30mW ce qui ramenée à la surface de la bobine d'environ 10^{-8}m^2 est très conséquent. Or nous travaillons dans l'optique de manipuler des fluides biologiques avec des

constituants organiques fragiles tels que les cellules. Nous devons nous assurer que l'augmentation de température induite par l'effet joule ne sera pas préjudiciable.

Pour mesurer l'échauffement, la méthode classiquement utilisée est la thermographie IR qui donne de meilleurs résultats pour des canaux ouverts et non en flux (P. Yi, 2012). Pour voir la modification de la température en flux nous choisissons d'utiliser un fluorophore sensible à la température. Nous avons décidé d'utiliser de la rhodamine B, fluorophore que nous utilisons déjà pour marquer différents flux en microscopie de fluorescence (B. Selva, 2010).

La rhodamine B est excitée à une longueur d'onde de 543 nm et émet à une longueur d'onde de 565 nm. Grâce à un microscope Olympus et une caméra CCD, nous pouvons observer ce phénomène. Nous utilisons une source de lumière Lumencore et un contrôleur de température pelletier. Nous utilisons aussi un contrôle de flux en débit grâce à un pousse seringue Nemesys de chez Cetoni.

Dans un premier temps nous observons effectivement une diminution de l'intensité lumineuse de la rhodamine avec l'activation de la bobine. Ce phénomène est principalement cantonné au dessus de la bobine. Pour essayer de quantifier l'augmentation de température nous calibrons notre système à l'aide d'un module Peltier. La rhodamine est conservée dans le noir afin qu'elle ne se détériore pas (bleaching) à la lumière, le shutter est refermé après chaque photo, un temps de stabilisation de 3 minutes est respecté entre chaque changement de température, avant la capture de la photo et tous les paramètres d'enregistrements sont inchangés au cours de toute l'expérience.

Stabilité dans le temps :

Nous avons testé la variation de température dans le temps (figure 148) pour une activation prolongée de la bobine. Le film a une durée d'environ trois secondes, les images étudiées à intervalles réguliers n'ont montré aucune variation de l'intensité une fois la bobine alimentée.

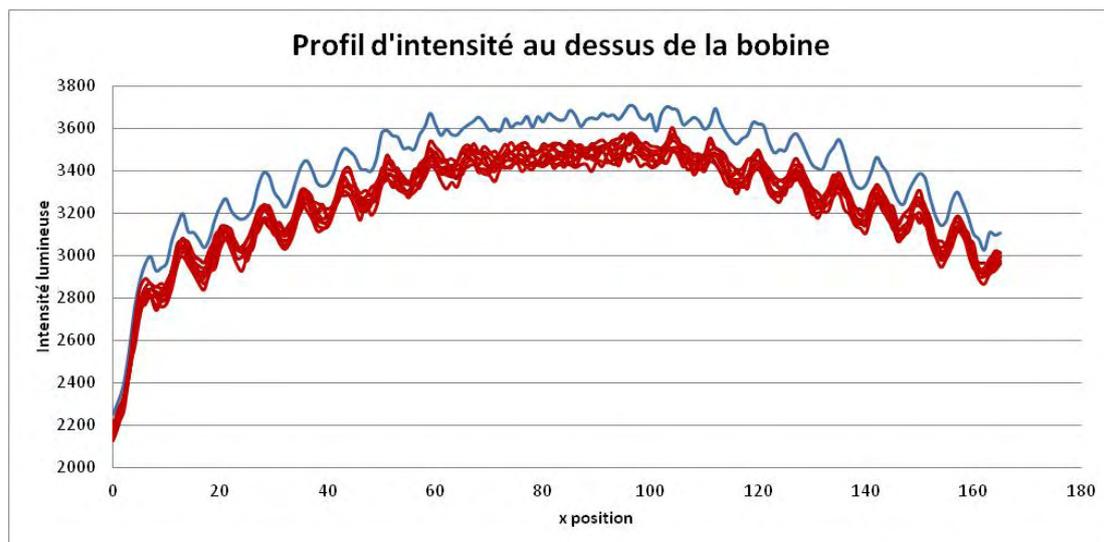


Figure 148. Profil d'intensité lumineuse de la rhodamine pour une bobine non alimentée (en bleu) et alimentée (en rouge).

Nous en concluons que la température se stabilise en une trentaine de ms et reste stable après.

Calibration et mesure de l'échauffement :

Nous avons fait varier la température entre 22°C (température ambiante) et 70°C. Les mesures ont été effectuées sous flux constant de $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pour pouvoir évacuer les bulles qui peuvent se piéger ou apparaître au niveau de la bobine. Nous prenons l'hypothèse que toute la solution de rhodamine possède les mêmes caractéristiques.

Les intensités lumineuses recueillies ici sont des moyennes d'intensité sur la totalité de la surface de la bobine. Elles ont été divisées par celle obtenue à 22°C pour avoir une intensité relative.

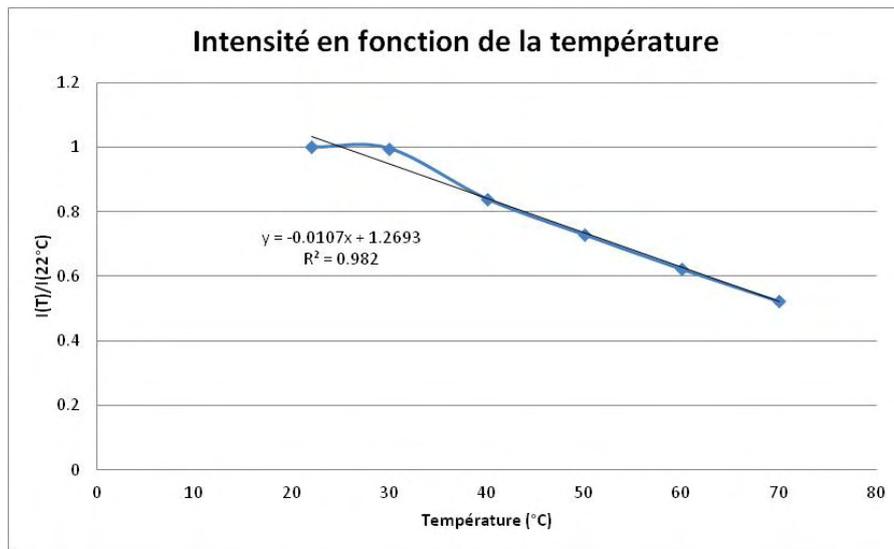


Figure 149. Etalonnage de la variation d'intensité lumineuse de la rhodamine en fonction de la température.

Nous obtenons un comportement linéaire comme décrit dans la littérature (M. A. Ali, 1991).

Nous avons alors effectué plusieurs tests d'activation de la bobine à différentes températures (22, 50, 60 et 70 °C) et nous avons noté une augmentation constante de 10°C dans chacun des cas quand nous alimentons la bobine.

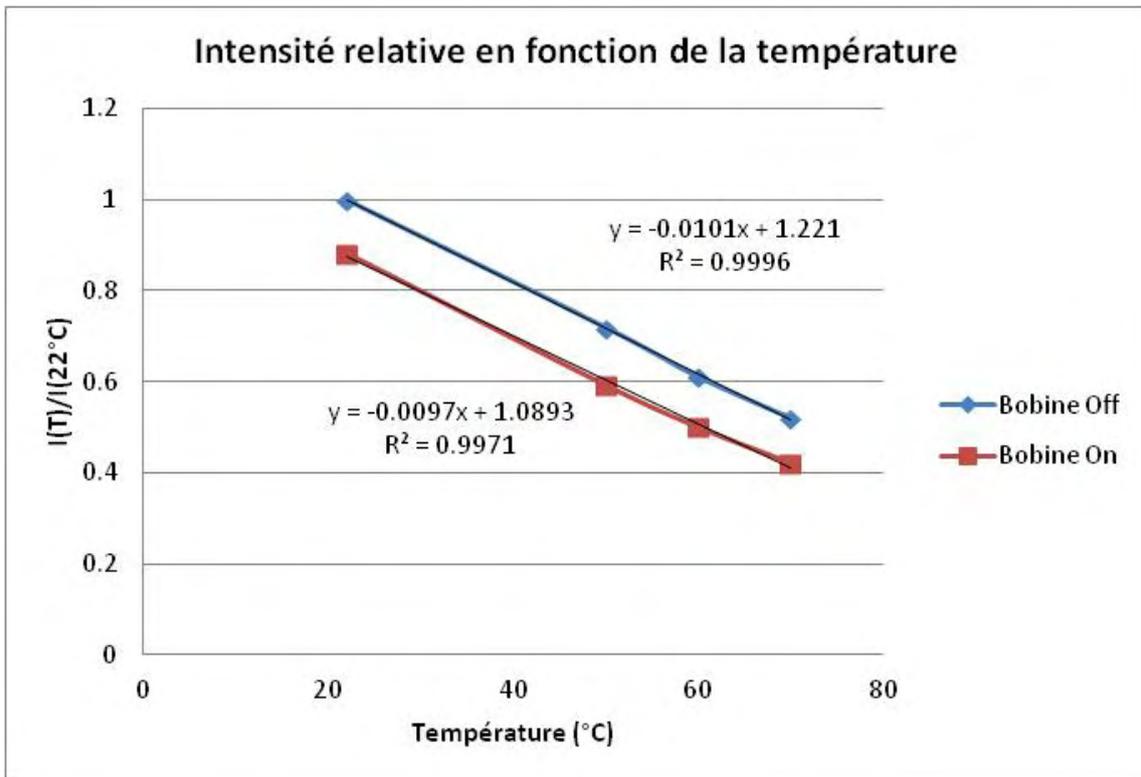


Figure 150. Mesure de l'écart de luminosité par l'activation de la bobine pour différentes températures ambiantes.

L'intensité relative est mesurée en fonction de l'intensité de la bobine éteinte, à 22°C. Pour les différentes températures testées, nous obtenons les courbes figures 150.

Nous retrouvons la même régression linéaire avec un coefficient de -0,01. L'écart des deux courbes est constant illustrant une augmentation de température constante quand on alimente la bobine. L'écart est de 0,132 en relatif soit une augmentation de la température de 13,2 °C.

Variation en fonction du courant d'alimentation :

Nous avons aussi mesuré l'influence du courant sur l'augmentation de la température. Pour cela nous avons d'abord fait une première étape de calibrage. Seules trois températures ont été testées car nous avons déjà prouvé la linéarité du phénomène.

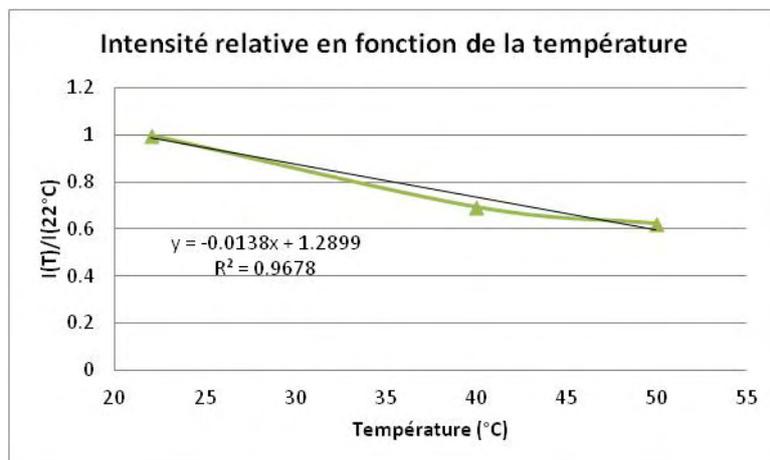


Figure 151. Nouvel étalonnage de la rhodamine.

Nous retrouvons effectivement une droite mais avec un coefficient directeur sensiblement différent plus proche des 0.014 que des 0.01 trouvé lors de la première expérience (figure 151).

Nous avons fait varier l'intensité de la bobine entre 100mA et 40mA par pas de 20mA. En dessous de 40mA aucune influence sur l'intensité n'a pu être mesurée. En utilisant la calibration précédente nous obtenons une différence de température pour chacune des intensités appliquées.

Intensité	Delta T
100 mA	10,9 °C
80 mA	5,7 °C
60 mA	3,3 °C
40 mA	1,0 °C

Tableau 42. Echauffement en fonction de l'intensité du courant.

La variation n'est pas linéaire, plutôt en carré de l'intensité (voir figure 152).

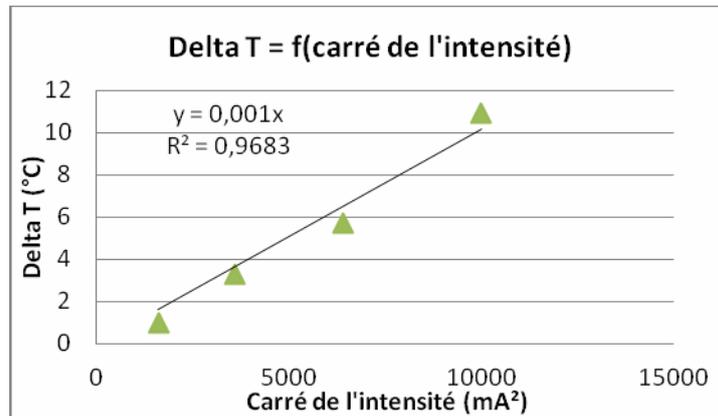


Figure 152. Echauffement en fonction du carré de l'intensité du courant d'alimentation de la bobine.

Ce qui concorde avec la formule de la puissance dissipée par effet joules, en effet la puissance dissipée est proportionnelle à la différence de température produite.

Conclusion :

Tout d'abord, la méthode est performante car nous arrivons à mesurer une différence de température de 1°C, nous avons donc une grande précision. De plus dans le cadre d'une même mesure, les résultats sont très fiables avec un faible écart type.

Cependant, la robustesse est faible et d'une mesure à l'autre la calibration doit être refaite car de petits changements dans les paramètres de la mesure changent de façon conséquente les résultats. Ainsi nous avons mesuré une augmentation de 10,9°C pour la dernière expérience et une augmentation de 13,2°C dans la première expérience pour une alimentation identique de 100mA.

Influence du débit :

Nous avons voulu comprendre un peu mieux le phénomène en évaluant l'influence de deux autres paramètres qui sont : le débit du fluide dans la canalisation et le débit d'air qui modifie le flux convectif au dessus de la puce. Les résultats sont présentés dans les figures 153 et 154.

Aucune de ces variations n'a entraîné de modification dans l'augmentation de température. Ce phénomène peut être surprenant mais nous en concluons que la dissipation d'énergie ne se fait pas principalement par le fluide mais plutôt par le substrat (ici le silicium).

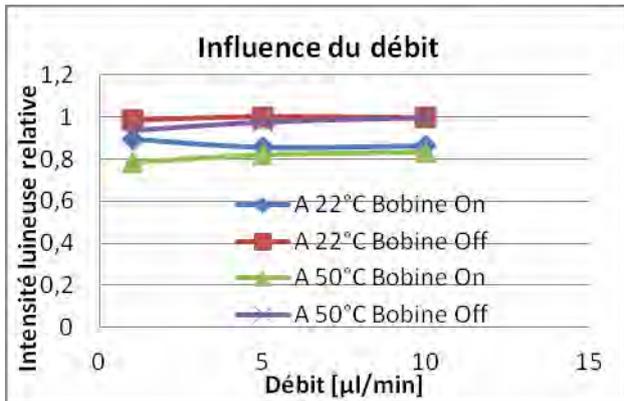


Figure 153. Influence du débit de fluide sur l'échauffement due à la bobine.

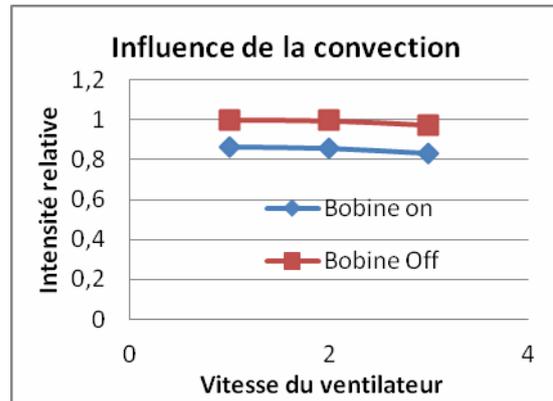


Figure 154. Influence du débit d'air au dessus de la canalisation sur l'échauffement due à la bobine.

5.3.2 Partie théorique

Nous venons de voir empiriquement que l'échauffement du fluide ne dépend ni du débit de liquide qui circule au dessus de la bobine, ni de la convection au dessus de la puce. Ces résultats nous laissent penser que la chaleur créée par la bobine doit s'évacuer essentiellement par le dessous de la puce c'est à dire par diffusion.

Nous pouvons considérer notre dispositif comme un empilement de couches avec des coefficients de diffusion thermiques différents. Au dessus de la bobine, il y a un écoulement, il y a donc en plus de la diffusion, de la convection mais à ces échelles les coefficients de convection thermique sont très grands et seule la diffusion peut être limitante.

Donc l'évacuation de la température va dépendre essentiellement des conductivités thermiques des constituants du dispositif. Les différentes conductivités thermiques mises en jeu dans les dispositifs sont répertoriées dans le tableau 43.

Composants	Conductivité thermique ($W.m^{-1}.K^{-1}$)
Eau	0.6
Or	317
SU8	0.2
Si	148
Ti	21.9

Tableau 43. Conductivité thermiques des différents composants présents dans le dispositif.

Chapitre5 : Manipulation des microbilles magnétiques

Nous voyons ici que la conductivité thermique de l'or et du silicium sont supérieurs de plus de deux ordres de grandeur à l'eau ou la SU8. De plus une fois que la chaleur a atteint la couche d'or ou le silicium, la diffusion est telle que la surface d'échange à considérer n'est plus la taille de la bobine mais est bien plus grande.

C'est pourquoi il est utile de créer des pistes d'amener en or de grande taille ce qui permettra d'évacuer plus facilement et rapidement la chaleur causée par l'alimentation des bobines.

En conclusion, la quasi intégralité de l'énergie thermique est diffusée dans le substrat ce qui ne pose pas de problème car nous utilisons un substrat thermiquement conducteur qu'est le silicium mais il faudra donc faire bien attention si dans l'avenir le substrat change pour être du verre ou un polymère dans l'idée de faire des dispositifs souples.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons d'abord décrit le dispositif expérimental mis en place pour la caractérisation de nos puces. Nous avons choisi de contrôler les écoulements en débit, pour avoir directement accès à la vitesse de déplacement du fluide.

Nous avons ainsi pu caractériser le fonctionnement de nos dispositifs avec de très bons résultats. En effet, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la qualité des billes magnétiques utilisées.

De plus nous avons pu démontrer qu'il était possible de piéger totalement des billes de $5\mu\text{m}$ jusqu'à un débit de $0,5\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Nous avons aussi pu montrer la focalisation des billes magnétiques dans la canalisation grâce aux bobines.

Mais le résultat le plus intéressant concerne la fonction de séparation réalisée dans les dispositifs 3D. En effet, grâce au dispositif de seconde génération, nous avons pu obtenir une efficacité de séparation de 100% des billes de $5\mu\text{m}$ de diamètre pour un débit de $1,5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, ceci quasiment sans piégeage sur les bobines. Ce point de fonctionnement bien particulier permet d'effectuer une séparation magnétique parfaite en continu.

Enfin, en dernière partie du chapitre nous avons pu mesurer l'échauffement produit par l'alimentation de la bobine. Nous trouvons une augmentation maximale de 10°C ce qui n'occasionne pas de gêne pour une manipulation d'éléments biologiques. De plus, nous avons noté que l'essentiellement de l'échauffement par effet joules était évacuée par le substrat.

Chapitre 6 : Manipulation d'éléments biologiques = séparation magnétique de monocytes

Introduction	158
6.1 Culture des monocytes	159
6.1.1 Les monocytes de culture THP1.....	159
6.1.2 Le milieu de culture	159
6.1.2.1 La constitution de base d'un milieu de culture	159
6.1.2.2 Notre milieu.....	160
6.1.3 Culture des monocytes	161
6.1.3.1 La culture cellulaire	161
6.1.3.2 Les manipulations de bases : Conservation, Comptage, Centrifugation	161
6.2 Billes magnétiques et fonctionnalisation	163
6.3 Marquage des monocytes	165
6.3.1 Marquage magnétique des monocytes	165
6.3.2 Marquage fluorescent des monocytes	167
6.4 Séparation/déviation bille + monocytes	169
6.4.1 Bilan des forces avec monocytes	169
6.4.1.1 Forces de gravité et d'Archimède dues aux différences de densité.....	169
6.4.1.2 Force de lift.....	170
6.4.1.3 Bilan des forces	171
6.4.2 Piégeage des billes et monocytes	172
6.4.3 Séparation en dispositif 3D.....	173
Conclusion	175

Introduction

Nous avons pu voir, dans le chapitre 5, les résultats de séparation dans les dispositifs microfluidiques avec comme entité de travail, des billes magnétiques. Même si les résultats sont satisfaisants, l'utilisation finale porte sur une entité billes+ monocytes. L'ajout d'un élément de grosse taille comparée à la taille des billes magnétiques va modifier de façon certaine les résultats, nous allons voir dans quelles mesures.

Le but est de travailler avec du sang complet mais la science avance par petits pas et il est évident que nous allons commencer avec des monocytes seuls. Pour cela nous utiliserons des monocytes de culture de type THP1, cela nous permet de nous affranchir des étapes de séparation sanguine et aussi de ne pas être limité dans les concentrations des échantillons.

Nous verrons dans ce chapitre toutes les étapes de préparation de l'échantillon biologique, à savoir, la culture des monocytes, la fonctionnalisation des billes magnétique, le marquage des monocytes par un colorant, le marquage des monocytes par les billes magnétiques...

Nous commenterons aussi les différents résultats expérimentaux sur le piégeage et la séparation des cellules marquées.

6.1 Culture des monocytes

6.1.1 Les monocytes de culture THP1

Nous utilisons une souche de chez ATCC, il s'agit de monocytes provenant d'un nourrisson de un an atteint d'une leucémie myéloïde chronique des monocytes, ce qui se caractérise par la prolifération sans blocage des monocytes.

La culture des monocytes est une culture en suspension en opposition aux cultures de cellules adhérentes. Les monocytes n'ont pas besoin d'être sur une surface pour vivre, ils se développent dans le volume de la solution. C'est un avantage certain dans la manipulation au quotidien de la culture.

6.1.2 Le milieu de culture

Le milieu de culture a pour but de reproduire aussi fidèlement que possible in vitro les conditions d'environnement que la cellule connaît in vivo. Historiquement, les milieux étaient faits de liquide biologique pur tel que la lymphe, puis Carrel eu l'idée d'ajouter des éléments complémentaires de base tels que les vitamines. C'est en 1948 que Fisher proposa le premier milieu synthétique. Depuis tous les milieux sont synthétiques et leur constitution diffère suivant l'utilisation.

6.1.2.1 La constitution de base d'un milieu de culture

Eléments nutritifs

Constituants minéraux :

Parmi les constituants minéraux, sept ions sont indispensables. Il s'agit du sodium, du potassium, du calcium, du magnésium, du phosphate, du carbonate et du chlore. Ils interviennent dans l'équilibrage de la pression osmotique mais aussi dans diverses réactions cellulaires. Certains milieux peuvent contenir des métaux à l'état de trace tels que le fer, le cuivre, le cobalt, le sélénium.

La substance énergétique de base :

La substance énergétique généralement utilisée est le D glucose.

Les Acides aminés :

D'après Eagle, 13 acides aminés sont indispensables pour la culture in vivo. Il y a tout d'abord la L-glutamine qui se dégrade avec le temps, il faut alors penser à réapprovisionner le milieu régulièrement. Puis 8 acides aminés essentiels : Ileu, Leu, Lys, Meth, Phé, Thréo, Trp, Val et enfin 4 autres acides aminés dont la capacité de synthèse a été perdue lors du passage in vitro : Tyr, Cys, Arg, et His.

Les vitamines :

Bien que le besoin en vitamine change selon les types cellulaires, nous pouvons citer 8 vitamines mises en avant par Eagle : choline, acide folique, thiamine, pyridoxal, riboflavine, acide nicotinique, inositol, acide panthoténique.

Sérum

Sans sérum les cellules ne font souvent que survivre. Celui-ci est indispensable pour déclencher la division cellulaire. Le plus utilisé est le sérum de veau fœtal (SVF) offrant pour l'heure les meilleures performances. Le sérum est un milieu complexe qui n'est d'ailleurs pas toujours identique suivant les lots. Il sert, entre autre, à apporter des facteurs de croissance, des hormones... Il est ajouté dans le milieu dans une proportion variant de 2 à 20%.

Antibiotique

Pour se préserver des infections bactériennes, il est fréquent d'utiliser des antibiotiques. Le mélange pénicilline-streptomycine (P/S) aux concentrations finales respectives de 100 UI/ml et 100µg/ml est couramment utilisé. Nous ajouterons les antibiotiques même si nous n'en n'avons pas besoin dans notre cas car les monocytes qui sont des phagocytes éliminent eux-mêmes toute contamination bactérienne.

Autres

Il peut y avoir beaucoup d'autres composés comme des facteurs de croissance supplémentaire, des facteurs d'attachement,... nous ne citerons qu'un dernier élément qui n'intervient pourtant pas dans le maintien des cellules en bonne santé mais est quand même très utile, c'est le rouge de phénol. En effet, il est un indicateur coloré du pH dont la zone de virage est 7,2-7,6. Etant donné que le pH pour les cultures doit être entre 7,2 et 7,4, un changement de couleur vers le violet (basique) ou vers le jaune (acide) indique un problème dans le milieu.

6.1.2.2 Notre milieu

Nous utilisons comme milieu synthétique de base un milieu RPMI1640 de chez ATCC, sans glucose car il est plus facile de rajouter du glucose suivant les applications souhaitées que d'en enlever. Le tableau 44 donne la composition pour une préparation de 50ml de milieu avec les concentrations finales.

Produits	C _{initial}	Volume pour 50ml de milieu	C _{final}
P/S	100UL/ml et 100µg/ml	500 µl	1%
Hepes	1M	50 µl	1mM
D-Glucose	Solution à 45%	500 µl	4,5g.l ⁻¹
L-glutamine	0,2M	500 µl	2mM
SFV		5 ml	10%
RPMI		43,5 ml	

Tableau 44. Composition du milieu de culture utilisé pendant ces travaux.

6.1.3 Culture des monocytes

6.1.3.1 La culture cellulaire

Les milieux riches pour la culture des cellules sont propices au développement de bactéries ou contaminants. Il est donc nécessaire d'éviter toute contamination, pour cela nous travaillons dans des conditions stériles.

La stérilité est assurée en travaillant sous un poste de sécurité microbiologique PSM. Le PSM permet de travailler sous flux d'air laminaire et filtré en amont par des filtre HEPA (Haute Efficacité pour les Particules de l'Air) n'apportant pas de nouveaux contaminants et plaquant les contaminants présents sur les surfaces. Une partie de l'air est aspirée de l'extérieur par la veine de garde (~30%) et 70% de l'air total est recyclé, le reste est évacué après être passé dans un autre filtre.

Les cellules se multiplient, vivent, meurent et donc consomment les nutriments du milieu. Un virage du milieu vers le jaune indique un appauvrissement du milieu qui doit alors être changé.

Nous réalisons la culture dans des flasques de 25cm² en plastique, avec un volume de solution de 10ml. Ainsi pour le changement de milieu, il suffit, après homogénéisation du milieu + monocytes, de retirer généralement 8ml (le volume est à adapter suivant la concentration des cellules) et de le remplacer par du milieu neuf.

La concentration des cellules après dilution dans le nouveau milieu doit être autour de 2 à 4.10⁵ cellules par ml. Le temps de doublement est d'environ 26h, dans ces conditions, il faut changer le milieu tous les 2 à 3 jours.

Il est intéressant ici de faire deux remarques, la première pour souligner la résistance des monocytes. En effet, nous avons eu l'occasion de soumettre la culture à plusieurs stress notamment la privation en ne changeant pas le milieu pendant 7 jours. Nous avons noté une forte mortalité mais qui ne dépassait pas 50%. La deuxième remarque est qu'après un certain nombre de divisions cellulaires, les monocytes ne se divisent plus, il faut alors repartir d'une souche surgelée. Nous avons observé ce phénomène après 120 jours de culture, nous estimons donc le nombre de divisions maximal à 110.

6.1.3.2 Les manipulations de bases : Conservation, Comptage, Centrifugation

Pour éviter de racheter à chaque fois de nouvelles souches, il est possible de congeler les cellules et de les conserver plusieurs années. Le taux de réussite de la congélation dépend fortement du taux de viabilité des cellules dans la solution avant congélation.

Les cellules sont centrifugées, séparées du « vieux » milieu puis re-suspendues dans du sérum avec 5% de DMSO (Dymethylsulfoxyde). Le DMSO sert d'agent protecteur lors de la congélation en limitant la formation de glace à l'intérieur des cellules. La condition optimale de congélation est d'abaisser la température de 1°C par minute. Lorsque les cryotubes ont atteint une température comprise entre -70 et -100°C, ils peuvent être rapidement transférés dans l'azote liquide afin de les maintenir à une température d'environ -180°C.

La décongélation des cellules à l'inverse de la congélation doit être rapide. Le principe consiste à placer le tube congelé directement dans un bain thermostaté à 37°C pendant 1 minute jusqu'à décongélation totale des cellules. Si nécessaire, les cellules sont rincées une première fois pour éliminer le DMSO puis mises en culture à l'étuve

Il faut savoir qu'un taux de mortalité de 70 à 90% est courant. Il faudra alors laisser le temps à la colonie de se reformer, pour nos monocytes il faut attendre deux semaines avant d'avoir de bonnes concentrations de monocytes et un bon taux de viabilité.

Le comptage et la centrifugation sont les deux étapes de bases les plus réalisées lors de la culture de cellule. Nous allons voir ici en quoi elles consistent.

L'étape de centrifugation :

Cette technique est basée sur la différence de masse volumique des constituants sanguins. Naturellement, si on laisse le sang « reposer » nous verrons apparaître les différentes couches dues à la force de pesanteur qui va séparer les éléments suivant leur masse volumique. Pour accélérer ce phénomène une force centrifuge est appliquée. Deux grandeurs sont alors importantes à connaître, le facteur d'efficacité Z et la vitesse de décantation.

Le facteur d'efficacité, ou encore effet centrifuge, Z correspond au rapport entre les forces de gravité et centrifuge.

$$Z = \frac{F_c}{F_g} = \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{w^2}{gr} = \left(\frac{2\pi n}{60}\right)^2 \frac{r}{g} \quad [6.1]$$

Où, n est la vitesse de rotation en tour.min⁻¹, r le rayon de giration des particules, w la vitesse tangentielle, ω la vitesse angulaire.

Z ne dépend que des caractéristiques de la centrifugeuse et non de la solution considérée. La vitesse de décantation (en régime laminaire) (Koller, 2009)est donnée par :

Sans force centrifuge :

$$U = \frac{(\rho_s - \rho_f)gd^2}{18\eta} \quad [6.2]$$

Avec force centrifuge :

$$U_i = \frac{(\rho_s - \rho_f)d^2 r \omega^2}{18\eta} \quad [6.3]$$

$$D'où : U_i = U.Z \quad [6.4]$$

La centrifugation rajoute donc un facteur multiplicatif à la simple sédimentation. Classiquement la centrifugation des cellules se fait à 1400rpm pendant 3 minutes. En sortie de centrifugeuse, les cellules sont condensées en fond de tube et constituent le culot. Il est alors possible d'extraire le milieu sans toucher aux cellules et de re-suspendre le culot dans un milieu de volume choisi.

L'étape de comptage :

Pour connaître la concentration de cellules dans un milieu, il n'y a pas beaucoup de solutions : il faut les compter. Il existe des machines telles que les FACS qui permettent de le faire automatiquement, il est aussi possible d'utiliser des mesures de densité optique pour des éléments qui ne sédimentent pas ou peu. Mais de façon plus traditionnelle en recherche, le comptage se fait à la main avec des hématimètres comme la cellule de Malassez par exemple.

Il existe différents designs d'hématimètre mais le fonctionnement reste le même. La solution est placée sur un quadrillage de dimensions connues et entre deux lames avec une hauteur fixe. En comptant les cellules sur un nombre de carreaux donnés et connaissant le volume de solution correspondant, nous remontons facilement à la concentration.

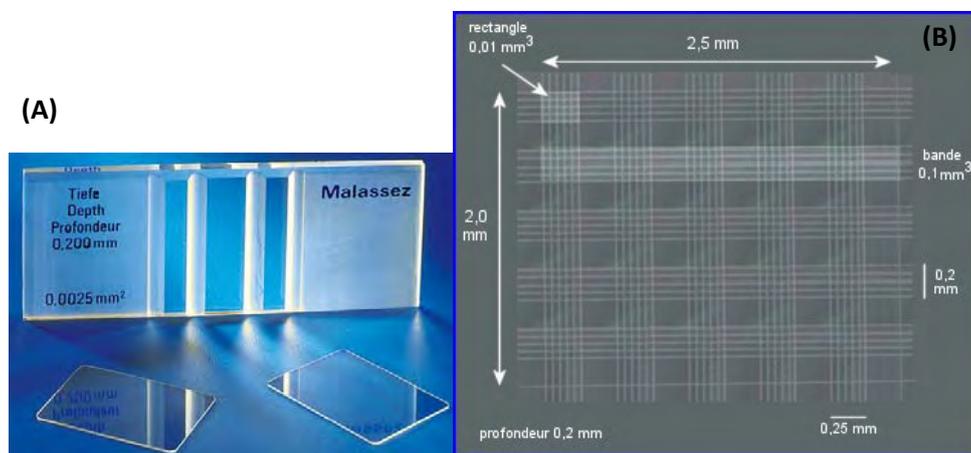


Figure 155. (A) Photo d'une cellule Malassez, (B) Schéma des zones de comptage pour une cellule de Malassez

La zone de comptage pour une cellule de Malassez est constituée de 25 rectangles de volume $0,01\mu\text{l}$. Dans ce cas là, nous faisons la moyenne sur dix rectangles et multiplions le résultat par 10 000 pour avoir une concentration en cellules/ml.

6.2 Billes magnétiques et fonctionnalisation

Notre but étant de séparer les monocytes du reste des éléments sanguins de par leur antigène CD14+ présent à leur surface, nous avons besoin de billes fonctionnalisées antiCD14. Nous sommes partis sur l'option de fonctionnaliser nous même des billes magnétiques. En effet, les billes magnétiques fonctionnalisées antiCD14 commerciales existent, mais ne sont pas fluorescentes, ne proposent pas une grande gamme de tailles et sont chères. Le fait de fonctionnaliser nous-mêmes les billes nous permet donc d'avoir accès à une gamme beaucoup plus grande de billes, à prix réduit. Nous avons toutefois acheté des billes de $5\mu\text{m}$ déjà fonctionnalisées antiCD14 afin de disposer d'une référence.

L'anticorps anti-CD14 fait partie du groupe des immunoglobulines G, et possède un site caractéristique Fc (pour fragment cristallisable), terminé en $-\text{COOH}$, ainsi que les récepteurs spécifiques à l'antigène CD14 (terminés par une liaison $-\text{NH}_2$). Une méthode de fonctionnalisation

serait de former une liaison peptidique entre une fonction amine primaire ($-NH_2$) et le fragment Fc de l'anticorps.

Le procédé de fonctionnalisation des billes $-NH_2$ de 1,2 μm proposé par Chemicell est donné de façon synthétique dans le tableau 45.

Etapes	Instructions
1	Prélever 20 μl de billes de la solution mère à $9 \cdot 10^{10}$ billes/ml soit $1.8 \cdot 10^6$ billes.
2	Rincer 3 fois les billes dans 1ml de MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) à 0,1M et à pH 6,0.
3	Re-suspendre les billes dans 250 μl de MES avec 2 mg d'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide).
4	Mélanger à température ambiante.
5	Ajouter 20 μl d'anticorps.
6	Mélanger pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.
7	Rincer les billes marquées avec du PBS 2 fois.
8	Faire le dernier rinçage avec PBS + EDTA 2mM

Tableau 45. Procédé de fonctionnalisation des billes NH_2 .

La solution est prête à être utilisée. Si elles ne doivent pas servir tout de suite, les billes marquées doivent être conservées dans un milieu de stockage particulier constitué de PBS avec 0,1% de BSA et 0,05 % d'Azoture de sodium (NaN_3). Pour une optimisation de la fonctionnalisation, la solution d'EDC doit être réalisée juste avant l'utilisation. De plus le pH du MES peut être optimisé entre 5,5 et 6,5.

Afin de mesurer l'efficacité des procédés de greffage, la mesure du potentiel zeta semble être la méthode la plus pertinente. En effet, trois possibilités se présentaient, une étude de la taille, une étude visuelle par fluo-microscopie ou une étude du potentiel de surface.

Les billes utilisées ont un diamètre de l'ordre du micromètre, donc bien supérieur aux tailles des molécules et des anticorps à greffer sur les billes. Une mesure de la taille n'est donc pas pertinente puisque la variation du diamètre des billes due à la présence des éléments greffés se confond avec la dispersité en taille des billes.

Une étude visuelle par microscopie par fluorescence aurait été possible si les fluorophores des billes et des anticorps étaient différents or les deux sont identiques. Donc seule une différence d'intensité pourrait être mesurée mais là encore la précision de mesure n'est pas suffisante pour avoir un résultat probant et fiable.

Les objets greffés sur les billes sont chargés négativement au pH utilisé, il y a donc de grande chance de modifier la valeur du potentiel zeta des billes et de voir une différence par la mesure de ce dernier.

Les mesures du potentiel zeta des billes sont effectuées grâce à un Zetasizer de chez Malvern Instruments. 1ml d'échantillon est placé dans une cuve et est inséré dans l'appareil. Durant toute la mesure la température est régulée. La durée de la mesure est variable car dépend de la stabilité de la

mesure : en effet, chaque point de mesure est automatiquement répété jusqu'à 100 fois de façon automatique jusqu'à convergence vers une valeur stable. Les mesures ont été faites dans de l'eau avec 0.1% de Tween pour éviter l'agrégation non spécifique des billes entre elles et sur les parois. Le milieu neutre permet d'éviter les instabilités liées à la présence de sels. Les mesures apparaissent comme stables.

Les mesures sont d'abord effectuées sur des billes pré-fonctionnalisées NH₂ nues. Juste après la mise en solution dans l'eau et le tween, c'est-à-dire après déconditionnement des billes de leur flacon d'origine, la valeur du potentiel zeta est positive et vaut environ 6,2mV. Puis une réaction acido-basique s'opère sur la surface en raison de la solution aqueuse du tampon et le potentiel zêta se stabilise à -15mV. C'est cette valeur qui sera prise en compte pour les billes NH₂ nues.

Les mesures du potentiel zêta pour les billes avec anticorps montrent une diminution du potentiel zêta à une valeur moyenne de -30.8mV. La fonctionnalisation est donc clairement identifiée dans ce cas. Cependant, les valeurs obtenues fluctuent autour de ces -30mV, laissant penser à une fonctionnalisation plus ou moins efficace. Dans tous les cas la variation est faible et cette seule mesure ne permet pas de dire dans quel pourcentage les billes sont effectivement marquées.

Toutefois, nous avons pu valider qualitativement le procédé de fonctionnalisation grâce à cette mesure. Pour avoir une idée quantitative il faut passer au test de marquages de monocytes et le comparer avec des billes déjà fonctionnalisées anti CD14 du commerce.

6.3 Marquage des monocytes

6.3.1 Marquage magnétique des monocytes

Le marquage des cellules d'intérêts se fait grâce à la forte affinité entre l'antigène et l'anticorps correspondant.

L'étape de marquage des monocytes par les microbilles est cruciale car va définir l'efficacité de séparation au final. La mise en contact des billes et des monocytes doit se faire dans des conditions bien particulières pour obtenir le meilleur taux de marquage. De plus le temps de marquage est un paramètre important car les monocytes sont des phagocytes (comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1), ils ont donc la capacité d'ingérer les corps étrangers. Or notre marquage s'effectue par une différenciation sur la surface, l'absorption des billes rendrait inactif notre moyen de sélection.

Afin de disposer d'une référence de marquage, les monocytes sont marqués en tube Ependorf. L'objectif est de valider les paramètres de marquage et d'avoir rapidement des solutions de monocytes marqués pour tester les appareils de séparation. Le protocole de marquage est reporté dans le tableau 46.

Etapes	Instructions
1	Centrifuger les cellules et récupérer le culot
2	Ajouter les billes magnétiques (nettoyées si nécessaire) suspendues dans 1ml de PBS et EDTA 2mM
3	Couvrir avec de l'aluminium pour protéger de la lumière.
4	Agiter pendant 30min à 35rpm avec un agitateur rotatif à température ambiante.
5	Séparer à l'aide d'un aimant les cellules marquées des non-marquées.

Tableau 46. Protocole de marquage des monocytes avec les billes magnétiques

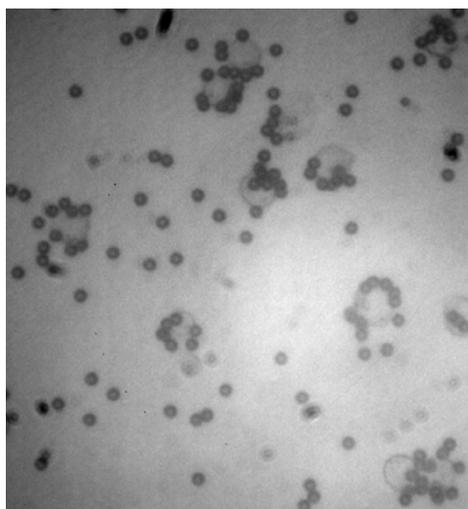


Figure 156. Image à la lumière blanche des monocytes après marquage.

Il est conseillé de réaliser le marquage à 4°C pour limiter l'activité biologique des cellules. Cependant il est difficile de concevoir le dispositif futur avec un tel contrôle de température, nous avons donc étudié le marquage à température ambiante, qui d'ailleurs ne devrait pas jouer sur l'efficacité de marquage.

Nous nous sommes rendu compte que l'efficacité de marquage était très variable, et que pour de mêmes conditions expérimentales les résultats peuvent varier de façon importante. Ainsi nous avons obtenu un taux de marquage moyen pour les billes commerciales fonctionnalisées CD14 de 67% avec un maximum à 80%. Pour les billes NH₂ que nous avons fonctionnalisées nous même, le taux de marquage est de 78% avec un maximum de 79%. Que ce soit avec les billes que nous avons fonctionnalisées nous même ou bien les billes commerciales, nous avons un résultat bien en dessous de ce que nous pouvions attendre. En effet, les taux de marquage annoncés par les fabricants de billes frôlent les 99%.

De plus, l'étape de marquage de monocyte est une étape très délicate car les monocytes s'activent et passent de monocytes CD14++ à CD14+CD16+ du simple fait du procédé de marquage. Cette difficulté, ne doit pas, à terme, être préjudiciable car l'étape de marquage sera réalisée sur la puce quelques minutes avant la séparation et ne laissera pas le temps au monocyte de s'activer.

Nous espérons pouvoir régler le problème de l'activation des monocytes ainsi que le taux de marquages insuffisant par un marquage en microfluidique. En effet, la microfluidique permet de mettre en contact de façon plus intime les billes et les monocytes d'où l'augmentation envisagée de

l'efficacité de marquage mais la microfluidique permet aussi de réaliser cette étape en un temps bien plus court (en quelques minutes pour plus d'une heure avant), ce qui ne laissera pas le temps au monocyte de s'activer.

Etant donné le taux de marquage que nous avons obtenu, nous avons souhaité vérifier l'expression de l'antigène à la surface des monocytes de culture. Pour ce faire, nous incubons les monocytes avec des anticorps fluorescents. Ainsi la présence ou non de fluorescence à la surface des monocytes nous donnera la réponse. 9M de monocytes suspendus dans 1ml sont incubés avec 50 μ l d'anticorps pendant 30 minutes à température ambiante.

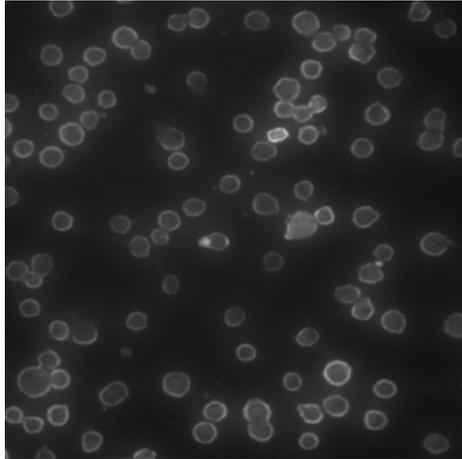


Figure 157. Test fonctionnalisation des parois des monocytes avec des anticorps CD14.

L'intégralité des monocytes présente une nette fluorescence sur la paroi indiquant une très bonne expression des antigènes CD14 à la surface (figure 157). Les monocytes ne sont donc pas à mettre en cause dans l'obtention d'un taux de marquage faible. Plusieurs possibilités sont alors à envisager dont la mise en contact des monocytes et des billes. En effet, peut être qu'une meilleure agitation entre billes et monocytes optimiserait le marquage.

6.3.2 Marquage fluorescent des monocytes

Dès les premières expériences avec les monocytes, que ce soit juste pour une observation sur lame ou pour un test de séparation en flux dans les microcanaux, il s'est révélé difficile d'observer correctement les monocytes. En effet, le contraste entre le milieu et les cellules est faible et il est facile à de fort grossissements (20x) de confondre le monocyte avec une bulle ou autre chose.

Il est donc important de pouvoir marquer le monocyte. Il existe de nombreuses techniques pour marquer une cellule, très différentes les unes des autres. Elles se caractérisent par un marquage de cellules vivantes ou mortes, avec une facilité plus ou moins grande pour pénétrer la membrane, intercalant de l'ADN... Idéalement, nous cherchons à avoir une molécule qui marque toutes les cellules (mortes et vivantes) sans avoir à perméabiliser les membranes.

Classifications des colorants :

Les colorants à notre disposition sont classés dans le tableau 47 selon qu'ils marquent ou non les cellules vivantes et/ou mortes, et si ce sont des intercalants de l'ADN.

Colorants	Cellules vivantes	Cellules mortes	Intercalant
DAPI		✓	
Bleu Tripan		✓	✓
Hoechst	✓	✓	
Calcein	✓		
Ethidium Homodimer-1		✓	

Tableau 47. Récapitulatif des fonctions des colorants à notre disposition.

Notre choix se porte sur le colorant de Hoechst. Il existe plusieurs types d'Hoechst. Nous choisirons le colorant Hoechst 33 342 qui a l'avantage de pénétrer la membrane sans qu'elle n'ait besoin d'être perméabilisée avant. De plus il se fixe à l'ADN par liaison électrostatique et n'est donc pas un intercalant de l'ADN. Il ne va pas modifier le fonctionnement de la cellule et il marque aussi bien les cellules vivantes que mortes.

Le protocole de marquage des monocytes à l'Hoechst est le suivant. Il faut d'abord récupérer les monocytes dans 1mL de PBS. Puis on ajoute 0.5µl de Hoechst de concentration 10mg/ml pour avoir une concentration finale de 5µg/ml. Le mélange est ensuite incubé à température ambiante dans le noir pendant 30min avec une agitation douce de temps en temps. Enfin une fois le marquage terminé, il faut nettoyer (deux fois) au PBS (centrifuger à 1400 rpm pendant 3 min) les monocytes pour éviter toute fluorescence due à un résidu de fluorophore.

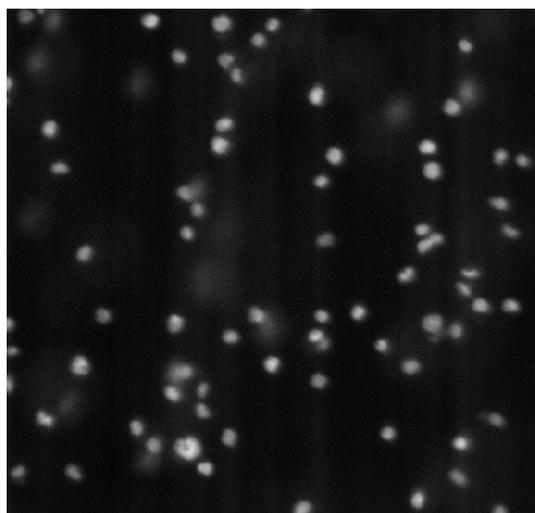


Figure 158. Image par fluorescence des monocytes après le marquage à l'Hoechst.

La figure 158, nous montre que le marquage au colorant Hoechst est très efficace car 100% des monocytes sont marqués et le contraste avec le milieu est très important.

Le marquage à l'Hoechst peut être réalisé pendant les 30 minutes d'incubation lors du marquage avec les billes. Les deux étapes pouvant être faites en parallèle, cela permet de gagner un temps

important avant l'utilisation des monocytes. En effet, plus nous mettons du temps à utiliser l'échantillon et plus l'état des monocytes se dégrade. Cela se manifeste par une diminution en taille des monocytes, l'apparition de taches noires dans la cellule et par la suite de la destruction de la cellule.

6.4 Séparation/déviatoin bille + monocytes

6.4.1 Bilan des forces avec monocytes

Dans le chapitre 5, partie 5.2.1 nous avons pu faire le bilan des forces qui s'exercent sur une bille magnétique, l'ajout d'un monocyte va changer plusieurs paramètres que nous devons voir ici. Nous allons donc reprendre l'étude en soulignant les modifications.

Nous retrouvons le même bilan des forces que pour une bille magnétique mais appliqué à une autre entité : le monocyte plus la ou les billes magnétiques. Le nombre de billes par monocyte est important cependant nous n'avons pas un nombre fixe de billes marquant le monocyte mais au vu des premières expériences nous pouvons déjà partir sur une bille de 5µm, cela nous donnera une idée générale.

6.4.1.1 Forces de gravité et d'Archimède dues aux différences de densité

Si nous ne considérons que le monocyte tout d'abord nous pouvons comparer son poids et la force d'Archimède correspondante :

$$P = \rho \frac{4}{3} \pi R^3 g = 17.7 \text{ pN} \quad [6.5]$$

Pour une masse volumique de 1024 kg.m⁻³ correspondant à la masse volumique du plasma (Q. Jin, 2007) et une taille de 15µm de diamètre.

$$\Pi = \rho_{\text{eau}} \frac{4}{3} \pi R^3 g = 17.3 \text{ pN} \quad [6.6]$$

Notons que ces deux forces se compensent et heureusement car elles sont du même ordre de grandeur que les forces magnétiques générées par les bobines.

A cela, il faut ajouter la densité de la bille magnétique fixée sur le monocyte. Les différents paramètres géométriques et physiques vont être modifiés, le tableau 48 montre dans quelle proportion.

Paramètres	Cellule non marquée	Cellule marquée d'une bille
Diamètre	15 µm	20 µm
Volume apparent	1,77*10 ⁻¹⁵ m ³	4,19*10 ⁻¹⁵ m ³
Densité	1024 kg.m ³	1073 kg.m ³
Poids	17,7 pN	19,3 pN
Archimède	17,3 pN	18 pN

Tableau 48. Comparaison entre une cellule non marquée et marquée d'une bille magnétique de 5µm de diamètre.

L'écart entre les deux forces, le poids et la poussée d'Archimède est plus important dans le cas d'une cellule marquée avec une valeur de 1,3 pN, mais cet écart reste faible au vu des forces magnétiques créées.

6.4.1.2 Force de lift

La force de lift est due à un gradient de vitesse qui crée une faible différence de débit entre le fluide passant au dessus et en dessous de la particule ce qui a pour conséquence d'éloigner la particule des parois (H. A. Nieuwstadt, 2011). Ainsi pour des particules au sommet de la canalisation la force de lift va dans le sens du piégeage magnétique mais à l'opposé lorsque la particule s'approche de la paroi inférieure et donc de la bobine, la force de lift s'oppose au phénomène de piégeage.

Suivant les conditions d'écoulement et notamment du nombre de Reynolds ($Re > 20$), la force de lift peut s'appliquer à des objets solides sphériques mais dans la plupart des cas concernant la microfluidique c'est-à-dire avec $Re \leq 1$, la force de lift ne s'applique qu'à des objets dissymétriques ou déformables (J. Zhou, 2013).

Les cellules en général et les globules blancs en particulier sont des éléments déformables (Shirai, 2008) donc susceptibles de subir une force de lift. Nous devons nous assurer que cette force ne nous empêche pas de pouvoir et séparer les cellules. La force de lift est directement proportionnelle au taux de cisaillement et donc au gradient de vitesse.

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial u}{\partial z} \quad [6.7]$$

Nous considérons le profil de vitesse de la canalisation dans la profondeur comme parabolique. Ce qui est la plupart du temps juste tant que la largeur reste supérieure à la profondeur. L'équation de la parabole est la suivante :

$$u = -\frac{4V_{max}}{h^2}z^2 + \frac{4V_{max}}{h}z \quad [6.8]$$

D'où

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial u}{\partial z} = \frac{6q}{wh^2}(h - 2z) \quad [6.9]$$

On voit bien ici que le cisaillement est maximal à la paroi et s'annule au centre de la canalisation donc la force de lift intervient principalement proche des parois.

La force de lift s'écrit alors (M. Abkarian, 2005) :

$$F_l = \eta \dot{\gamma} R^2 f\left(\frac{R}{h}, v\right) \quad [6.11]$$

Avec η la viscosité dynamique du fluide, R le rayon apparent de la particule, $R = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}}$ et v le

$$v = \left(\frac{V}{\left(\frac{4}{3}\right)\pi\left(\frac{S}{4\pi}\right)^{\frac{3}{2}}}\right)$$

volume réduit

On peut démontrer par expérimentation que la force de lift est proportionnelle au rapport R/h , nous pouvons donc simplifier [6.11] par :

$$F_l = \frac{\eta R^3}{h} f(v) \quad [6.12]$$

La dépendance en fonction du volume réduit peut aussi se calculer expérimentalement ou être trouvée dans des tables en effet le rapport $F_l h / \eta R^3$ en fonction de $1-v$ varie de façon constante.

Cas des monocytes :

Nous nous plaçons dans le cas de notre dispositif microfluidique avec les paramètres du tableau 49.

Paramètres	Valeurs
h (μm)	60
w (μm)	300
R (μm)	7.5
η (Pa.s)	10 ⁻³
q (μl/min)	0.5

Tableau 49. Paramètres physiques choisis pour un monocyte.

Dans ce cas $f(v) = 1,25$.

En nous plaçant à une distance de 5μm de la paroi, nous obtenons une force de lift de 5.7 pN. Ce qui n'est pas négligeable. En effet, nous avons vu dans le chapitre 5 que nos dispositifs génèrent des forces de l'ordre de 25 pN, la force de lift représente ainsi approximativement 1:5^{ième} de la force magnétique. Ce n'est pas critique pour réussir à piéger ou séparer les monocytes mais peut faire diminuer l'efficacité des dispositifs.

6.4.1.3 Bilan des forces

Dans le bilan des forces, il reste à comparer la force magnétique et la force de Stokes. La force magnétique qui s'applique au complexe monocyte bille est la même que pour la bille magnétique seule car la quantité de matériaux magnétiques est la même. Cependant la taille est elle différente, en effet nous passons d'une bille de 5μm de diamètre à un élément de 20μm de diamètre (augmentation d'un facteur 4). La force de Stokes qui dépend du rayon de l'objet présent dans l'écoulement va donc être fortement modifiée. La force de stokes étant proportionnelle au rayon elle connaît le même rapport d'augmentation que le diamètre soit une augmentation d'un facteur 4.

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta r_{\text{complexe}} (\vec{v}_{\text{bille}} - \vec{v}_{\text{fluide}}) \quad [6.13]$$

La force magnétique doit ainsi être 4 fois plus grande pour avoir la même efficacité de piégeage que dans le cas d'une bille seule. Dit d'une autre façon, pour la même force magnétique exercée sur la bille, il faut réduire la vitesse de l'écoulement par 4 et donc le débit par 4 pour trouver la même efficacité de piégeage.

Concernant la séparation dans un dispositif en 3D, l'analogie avec le fonctionnement pour une bille seule est d'autant plus vraie car la force de lift, lorsque la cellule circule loin des parois, est faible et

est donc négligeable. Ainsi, les différents temps de vol calculés pour une bille seule doivent eux aussi être multipliés par 4 dans le cas du complexe monocyte plus bille.

Nous sommes partis du principe qu'une seule bille était fixée sur le monocyte, ce qui d'après les expériences est généralement le cas. C'est, de toutes manières, le cas le plus défavorable et dans l'éventualité où nous réussirions à fixer plusieurs billes sur le monocyte le bilan des forces serait bien plus favorable au piégeage et à la séparation.

6.4.2 Piégeage des billes et monocytes

Dans un premier temps nous avons souhaité voir s'il était possible de piéger nos monocytes marqués sur les bobines dans un écoulement. Pour cela nous avons pris le design de première génération avec les 3 bobines à la suite avec un seul niveau de canalisation de 25 μm de haut. Ainsi les monocytes marqués seront obligatoirement dans le champ d'action des bobines. Nous avons marqué les monocytes avec les billes de 5 μm déjà fonctionnalisées de chez Invitrogen suivant le protocole expliqué partie 6.3.1.1.

Nous effectuons un contrôle en pression avec l'appareil Fluigent dans la gamme la plus petite (0-25mbar). C'est nécessaire pour avoir des écoulements relativement faibles. La pression minimale pour obtenir un écoulement est de 6mbar en effet en dessous la pression n'est pas assez forte pour vaincre les résistances fluidiques des connectiques. Nous donnerons dans la suite les pressions corrigées c'est-à-dire en soustrayant les 6mbar.

Les expériences ont montré de bons résultats mais sont à nuancer, en effet nous avons réussi à piéger 100% des monocytes marqués pour un delta de pression de minimale de 1mbar ce qui correspond à une vitesse moyenne de l'écoulement à 200 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et un débit de 0,1 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ mais lorsque nous augmentons la vitesse de l'écoulement le taux de piégeage diminue fortement. Ainsi pour un delta de pression de 5mbar le taux de piégeage tombe en dessous des 50% ce qui correspond à une vitesse moyenne de 900 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et un débit de 0,4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

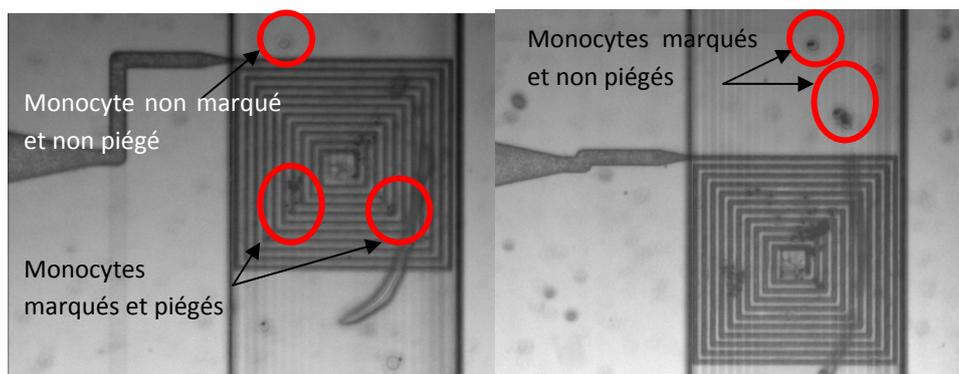


Figure 159. Photo durant les expériences de piégeage. (A) pour un débit de 0,1 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, (B) pour un débit de 0,4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Nous avons pu noter qu'il suffisait que le monocyte soit marqué avec une seule bille magnétique de 5 μm pour être piégé. Ce résultat, tout à fait prometteur, est en accord avec nos expériences réalisées sur les billes seules et avec le bilan des forces précédemment introduit. En effet, lors du piégeage magnétique nous avons obtenu un piégeage de 100% jusqu'à un débit proche de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ainsi

d'après la théorie nous devrions avoir un débit maximal de piégeage pour le complexe monocyte plus bille quatre fois plus faible soit un débit autour de 0,125 $\mu\text{l}/\text{min}$, ce que nous trouvons effectivement.

Les débits mis en jeu sont faibles et il est très difficile de maintenir des écoulements stables avec ces faibles pressions car le moindre à-coup sur le tube d'alimentation déstabilise l'écoulement. Cependant les vitesses de piégeage correspondantes sont tout à fait comparables à la littérature.

Nous avons pu réaliser du piégeage en grande quantité de monocytes marqués. Il en devient même difficile de les compter car ils forment plusieurs couches par endroit, sur la figure 161, il y en a plus de 275. Au vu de la taille de la canalisation 25 μm , de celle d'un monocyte 15 μm et de la présence de multicouche nous avons quasiment rempli la canalisation.

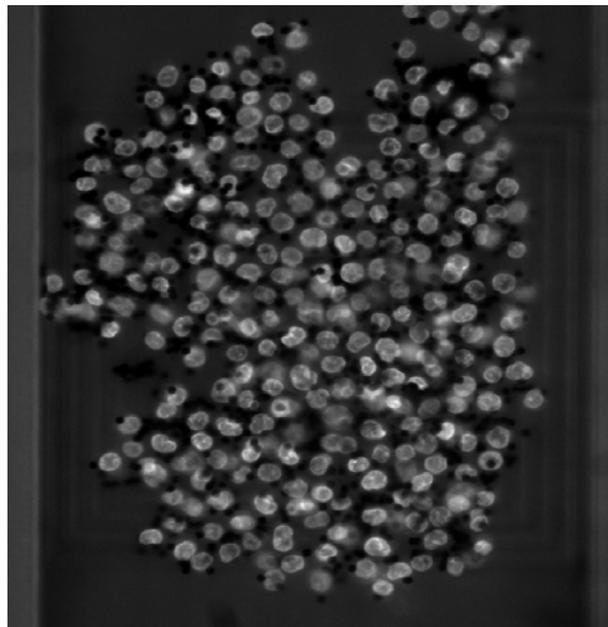


Figure 160. Piégeage de monocytes colorés à l'Hoechst et marqués avec les billes magnétiques.

En conclusion, nos dispositifs permettent de réaliser du piégeage de monocytes avec de très bons taux d'efficacité mais pour des débits malheureusement faibles. L'objectif d'augmenter la force magnétique créée par une bobine que nous avons exprimé dans le chapitre 2 prend tout son sens ici. En effet, si nous voulons piéger plus rapidement il faudra augmenter l'action de la bobine sur les monocytes soit en augmentant la force magnétique soit en s'assurant d'avoir plusieurs billes à la surface du monocyte.

6.4.3 Séparation en dispositif 3D

Nous avons prouvé qu'il est possible de piéger totalement les monocytes marqués si l'écoulement est faible. Notre objectif est quand même de réaliser la séparation magnétique des monocytes marqués nous allons donc voir ici ce qu'il est possible de faire.

Nous avons commencé par tester le design de première génération, pour réaliser une séparation magnétique verticale entre l'écoulement de la canalisation supérieure et celui de la canalisation inférieure.

Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, nous avons eu ici plusieurs problèmes récurrents comme la difficulté de créer un écoulement stable et lent, des problèmes de sédimentation. Mais les résultats obtenus n'en sont pas moins très positifs. Nous avons fixé une différence de pression de 15mbar afin de pouvoir s'affranchir des effets de sédimentations. En effet, lorsque les bobines ne sont pas alimentées, 100% des monocytes restent dans la canalisation supérieure.

De ce fait la vitesse de l'écoulement est assez rapide avec une vitesse moyenne de $1200\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Pour viser un taux de séparation maximal nous décidons d'alimenter les 3 bobines avec un maximum de courant, à savoir 100 mA. Nous avons obtenu en moyenne une séparation de 82% des monocytes marqués dont un taux de piégeage très faible.

Ces premiers résultats sont particulièrement prometteurs. Il aurait été intéressant de tester le dispositif de seconde génération, qui avait montré une bien meilleure efficacité sur le piégeage des billes. Malheureusement, une défaillance de la carte électronique ne nous a pas permis d'aller jusqu'au bout de la démarche.

Conclusion

Ce dernier et sixième chapitre regroupe toutes les informations concernant la manipulation des monocytes.

Nous avons montré et validé le procédé de fonctionnalisation par des anticorps CD14 de nos billes magnétiques pré-fonctionnalisées NH₂ de 1µm de diamètre. Ces billes fonctionnalisées ont pu être utilisées pour marquer, en tube Ependorf, les monocytes avec un bon taux de marquage de 78%. Ce marquage a pu être comparé avec des billes fonctionnalisées commercialement avec les anticorps CD14 et montrant un taux de marquage de 67%.

Ces taux valident le procédé de marquage cependant nous espérons accroître son efficacité en réalisant un marquage en microfluidique. Plusieurs solutions sont d'ailleurs proposées certaines sont abordées dans le corps de la thèse, d'autres en annexe.

Avec ce chapitre nous voyons enfin le fonctionnement de nos dispositifs de séparation verticale magnétique avec des cellules. Nous avons d'abord démontré le piégeage avec de très bons résultats car 100% des cellules ont pu être piégées mais pour un débit faible de 0,03µl.min⁻¹. Puis nous avons réussi à obtenir un taux de séparation de 82% pour un débit de 0,5µl.min⁻¹ avec le dispositif de première génération, laissant présager de bien meilleurs taux de séparation pour les dispositifs de deuxième génération.

Conclusion général et perspectives

Une séparation magnétique verticale performante et prometteuse

Le monde de la microfluidique et des LOC est très vaste, nous avons pu en voir une petite partie en introduction dans le chapitre 1. Ces domaines ont l'avantage de pouvoir toucher toutes les sciences, toutes les applications car outre le déplacement des fluides, il est possible d'ajouter de nombreuses fonctions électriques, acoustiques, magnétiques, optiques... Nous nous sommes intéressés au tri cellulaire, une fonction que nous retrouvons dans de nombreuses applications et qui fait l'objet de beaucoup de recherches.

L'objectif de ces travaux de thèse était de pouvoir séparer les monocytes du reste des composés sanguins. Nous nous sommes concentrés sur une séparation magnétique verticale avec une structure fluidique en 3D et un actionnement magnétique réalisé à partir de microbobines de cuivre intégrées au plus près de la canalisation fluidique. Nous avons pu découper ce travail en deux parties distinctes avec une étude de l'actionnement magnétique en premier lieu et une purement fluidique avant de réunir les deux pour démontrer l'efficacité de notre séparation. C'est ce schéma que nous retrouvons dans l'ordre de rédaction de cette thèse.

Nous avons pu ainsi à partir de modifications simples mais efficaces comme la réduction de la taille du contact central, l'ajout d'une plaque ferromagnétique en dessous de la bobine, imaginer de nouveaux designs comme le positionnement de bobine en vis-à-vis permettant la création d'une force magnétique selon x constante sur la profondeur de la canalisation.

La technologie de laminage de film sec en SU8 nous permet de construire des dispositifs tout SU8 avec des géométries originales et en 3D. Nous avons pu démontrer la réalisation d'écoulements fluidiques laminaires 3D de co-écoulements superposés sur une distance contrôlée. Ces géométries nous ont conduites à étendre le concept du T-sensor et à une application d'étude d'agrégation d'une protéine l'Amyloïde Béta.

A chacune des étapes de ce travail, nous nous sommes appuyés sur des simulations numériques basées sur une méthode de résolution par éléments finis grâce au logiciel COMSOL Multyphysics. Nous avons ainsi pu simuler les champs et les forces magnétiques créées par les différents designs de bobines, permettant de faire ressortir le design optimal. Nous avons aussi simulé les comportements des fluides selon les géométries 3D des dispositifs fluidiques prouvant la nécessité d'une couche intermédiaire entre les niveaux de canalisations pour réaliser une mise en commun des fluides dans une section rectiligne de canalisation, seule option permettant d'obtenir des co-écoulements laminaires superposés stables.

Une fois que les deux briques de base, que sont l'étude du magnétisme et l'étude de la fluidique, ont été appréhendées, nous avons pu réaliser les dispositifs imaginés. Pour cela nous avons dû améliorer

différentes étapes de fabrication permettant une bonne reproductibilité technologique tels que le choix des designs, le procédé de développement, la diminution des contraintes. Nous avons montré la possibilité d'intégrer des bobines en vis-à-vis, de part et d'autre de la canalisation fluide, pour cela il a fallu dépasser certaines difficultés techniques présentées dans ce rapport.

Nos dispositifs réalisés, nous avons pu les tester d'abord avec des billes magnétiques, puis avec des monocytes THP1 de culture, que nous avons marqués avec des billes magnétiques. Nous avons pu démontrer un piégeage et une séparation maximale dans les deux cas pour des conditions d'écoulements particulières. Nous avons ainsi fait la preuve de concept de notre démarche.

Nous avons pu mettre en relief certains paramètres comme la nature des billes, la sédimentation, qui jouent un rôle prépondérant dans l'efficacité de piégeage et de séparation. Nous avons pu ainsi montrer un piégeage des billes de $5\mu\text{m}$ jusqu'à une vitesse d'écoulement de $1,1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, une séparation effective sans piégeage à une vitesse d'écoulement de $3,3\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. De même pour les monocytes marqués nous avons pu montrer un piégeage effectif jusqu'à une vitesse d'écoulement de $0,3\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et une séparation de 82% pour une vitesse de $1,2\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Nous pouvons essayer de comparer ces résultats avec les études, de dispositifs similaires, proposés dans la littérature. Il n'est pas facile de faire des comparaisons directes car de nombreux paramètres diffèrent. Nous voyons qu'avec une séparation de 100% pour des billes de 500nm et un écoulement de $6,5\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, les dispositifs avec des aimants permanents sont clairement plus puissants. En revanche notre dispositif montre une efficacité plus grande comparée aux électroaimants de Rong Rong qui n'obtiennent qu'une séparation à 75% pour une alimentation de 500mA, une vitesse d'écoulement de $2,4\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et des billes de $8\mu\text{m}$... Notons aussi que nous avons des comportements similaires aux microbobines de Choi, mais avec un piégeage effectif de 100% pour un écoulement de $1,2\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, des billes de $1\mu\text{m}$ de diamètre et une alimentation de 30mA, il reste plus performant montrant aussi l'intérêt du permaloy (alliage ferromagnétique) situé en dessous de la bobine, ce que nous n'avons pas eu la possibilité de tester encore.

Cependant qu'importe une comparaison poussée entre les recherches tant que le dispositif répond parfaitement à l'application souhaitée. Ce qui dans notre cas est démontré pour un point de fonctionnement à un débit de $1,5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ avec le dispositif de deuxième génération, une alimentation de 100mA et des billes Invitrogen de $5\mu\text{m}$ permettant une séparation de 100% en continue avec très peu de piégeage.

Nous verrons dans la suite de cette conclusion que de nombreuses recherches peuvent être encore faites avec les dispositifs existant et puis d'autres imaginés, réalisés mais pas encore testés.

Le design de deuxième génération n'a pas livré tous ses secrets

Le design de deuxième génération nous a donné de bons résultats de séparation verticale magnétique pour les billes Invitrogen de $5\mu\text{m}$ seules comme nous avons pu en reparler dans la conclusion de ces travaux. Il est alors maintenant envisageable de refaire des expériences avec le

complexe bille + monocyte. Nous nous attendons à un point de fonctionnement autour de $0,5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pour un taux de séparation proche des 100% sans piégeage sur les bobines, encore faut il le vérifier.

Plus intéressant encore, nous pouvons tester ce dispositif pour une solution plus réaliste, plus proche de notre solution d'intérêt. Nous pouvons commencer par un mélange avec des monocytes marqués et non marqués, puis en introduisant d'autres éléments au mélange pour valider la séparation sélective du dispositif.

Enfin, comme nous avons pu le voir dans d'autres études décrites au chapitre 1 partie 1.5.3, l'influence de la viscosité du fluide porteur peut jouer un rôle important sur l'efficacité de piégeage. Ce paramètre n'a pas été étudié dans cette thèse, c'est dans la continuité des travaux que d'intégrer cette étude. Notons que la viscosité va principalement dépendre de la température (due à l'échauffement de la bobine) et des adjuvants à la solution comme du PVP, de la BSA, ou tout autre tensioactif.

Des designs imaginés et réalisés mais non encore exploités

Une séparation horizontale avec un design en 2D

Nous avons centré l'étude dans cette thèse sur une séparation verticale profitant des connaissances que nous avons dans le domaine des écoulements laminaires 3D superposés. Mais cette option n'a pas été la première évoquée. En effet, dans les travaux précédents de Rémy Fulcrand, une séparation horizontale en 2D avait été imaginée. Cependant certains défauts ont conduit à la conception d'une nouvelle géométrie.

Les principaux défauts d'une telle structure étaient de devoir travailler en batch et non en continu comme actuellement et de présenter un fort taux de perte d'éléments cibles. En effet, les billes magnétiques étaient piégées sur une bobine active, puis une autre, proche était activée et la première désactivée. Par ce jeu d'activation et de désactivation il était possible de faire déplacer des billes magnétiques de droite à gauche ou de gauche à droite dans la canalisation.

Au cours de cette thèse, nous avons voulu retourner à cette séparation imaginant quelques modifications nous référencerons ce nouveau design comme celui de deuxième génération. Les deux designs des dispositifs première et deuxième génération sont comparables figure 161 et 162.

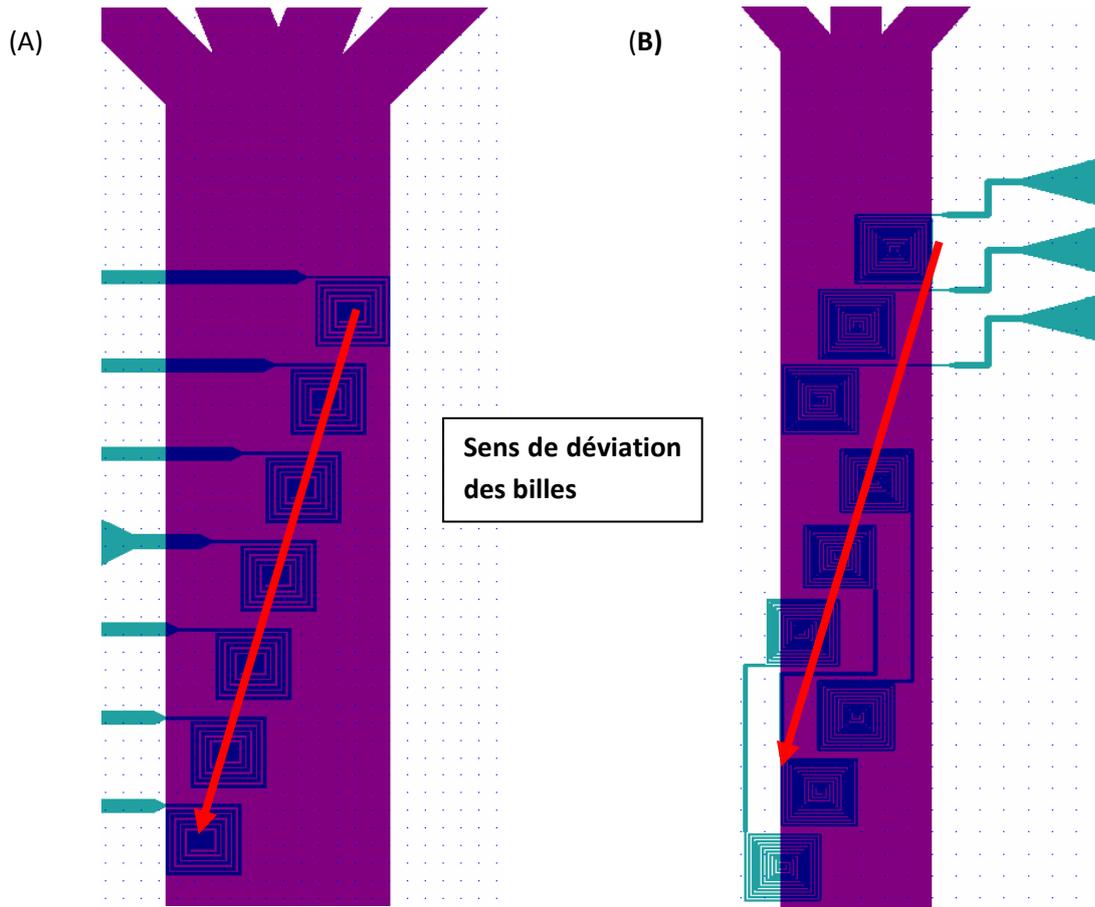


Figure 161. Design 2D première génération de Rémy Flucrand

Figure 162. Design 2D deuxième génération.

Dans le cas du nouveau modèle, figure 162, nous plaçons trois séries de trois bobines légèrement décalées les unes par rapport aux autres afin de minimiser les pertes de billes.

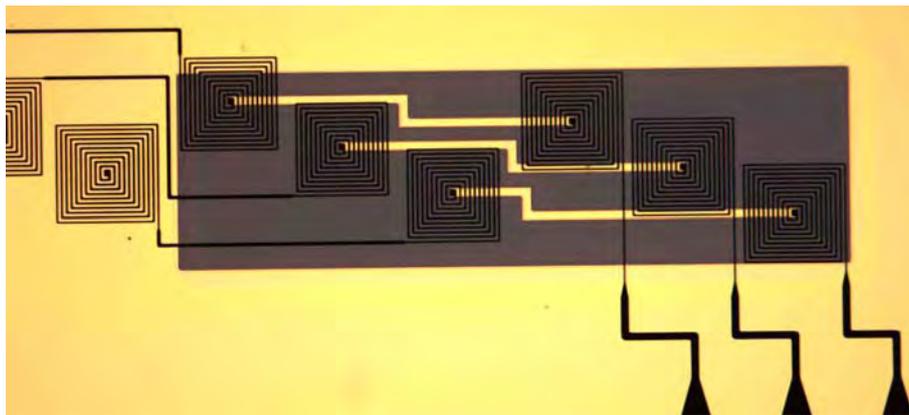


Figure 163. Photo des bobines en décalées pour le design de deuxième génération

Ce nouveau dispositif a pu être fabriqué mais les résultats étant justes préliminaires, ils n'ont pas fait l'objet d'une partie dans le corps du texte. En outre, ce concept peut être étendu pour effectuer de la focalisation dans la canalisation sur une ligne centrale ou latérale.

De nouvelles options avec des bobines en vis-à-vis

Nous avons pu démontrer dans cette thèse la réalisation de bobines en vis-à-vis. Cette option permet d'imaginer d'autres fonctionnements que nous n'avons malheureusement pas pu exploiter dans ces travaux mais qui seront fort intéressants à regarder par la suite.

Les approches hybrides : voir l'aimant permanent comme un atout

L'objectif de cette thèse était de pousser au maximum l'intégration de l'actionneur magnétique dans le LOC en utilisant des microbobines fabriquées et placées au plus près de la canalisation, le tout restant commandable afin d'avoir un outil précis efficace et versatile.

Nous avons vu les limitations d'une telle approche. Nous avons bien démontré la possibilité de séparer des cellules marquées, mais pour des débits toutefois limités. Pour augmenter la force nous ne pouvons plus jouer sur le gradient car les bobines sont aux résolutions maximales, nous ne pouvons pas jouer sur le courant sans chauffer excessivement le milieu. Nous arrivons donc là à une limitation forte. Mais il est possible de positionner des aimants permanents à proximité de la puce et de telle manière que le champ qu'ils génèrent soit uniforme.

Ce fonctionnement est très bien expliqué dans l'article de Chiou (C-H. Chiou, 2013), nous nous appuyerons d'ailleurs sur ce travail pour expliquer les perspectives qui s'offrent dans notre cas.

Les avantages de la combinaison aimants permanents et microbobines

Le but d'ajouter des aimants permanents est de pouvoir créer une zone où le champ magnétique est constant. En effet si le champ est constant, le gradient est nul et donc la force magnétique aussi. Dans une telle situation les billes magnétiques ne sont soumises à aucune force et leur trajectoire n'est pas modifiée.

Pour créer une zone de champ constant, il suffit par exemple de placer deux longs aimants (pour considérer qu'ils sont infinis par rapport à la zone de travail) en vis-à-vis, il y aura une zone où les deux champs magnétiques se rejoignent et se stabilisent. La figure 164 montre le fonctionnement de ce principe, il est possible de simuler facilement sur COMSOL les aimants afin de savoir à quelle distance les placer et quelle sera la valeur du champ constant au centre.

Lorsque la bobine est alimentée, le champ généré par celle-ci s'ajoute au champ des aimants (il est cependant faible par rapport à celui-ci). Toutefois le gradient qui apparaît permet de générer une force qui est proportionnelle à la somme des champs aimants plus bobine fois le gradient du champ de la bobine.

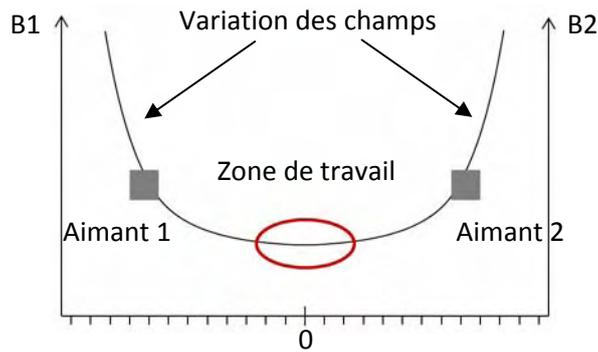


Figure 164. Schéma de principe de la création d'une zone à champ constant avec deux aimants.

Nous voyons que le gradient résultant est le même que pour une bobine seule en revanche la valeur du champ est bien plus grande, et la force magnétique est plus importante. Il est ainsi facile de multiplier par un facteur 50 la force magnétique qui va s'appliquer sur les billes magnétiques.

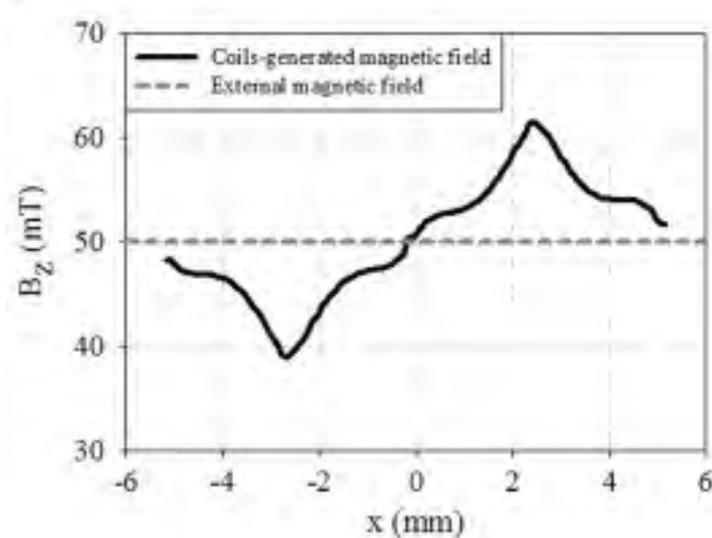


Figure 165. Variation de champ B_z au dessus de la bobine translatée de +50mT grâce aux aimants permanents

Outre l'augmentation importante du champ, l'utilisation d'aimants permanents permet, un peu plus subtilement, une nouvelle fonction qui est la répulsion.

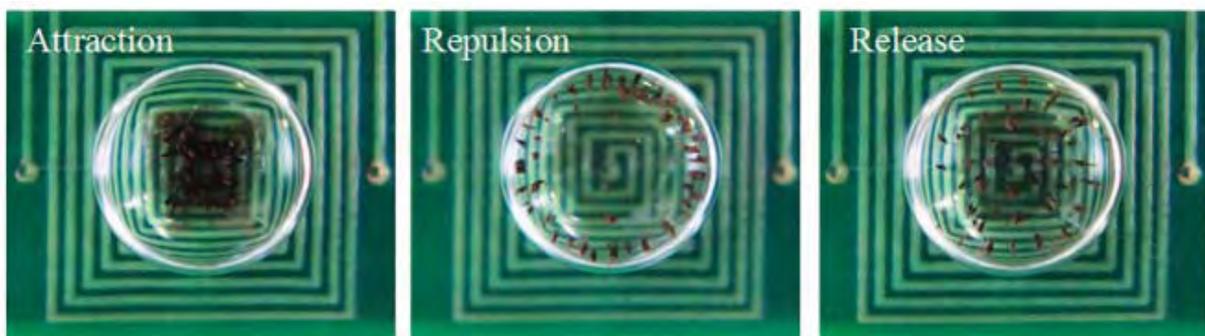


Figure 166. Preuve du concept d'attraction et de répulsion grâce à l'ajout d'aimants permanents en plus des microbobines.

Nous voyons qu'un tel dispositif propose des avantages certains, cependant chaque chose a ses inconvénients pour ce système c'est la restriction spatiale. En effet, non seulement les aimants prennent de la place et ne doivent pas interférer avec les entrées et sorties fluidiques, de plus la zone de travail est plutôt petite ce qui impose un positionnement précis de la puce entre les aimants.

Les avantages d'ajout d'aimants permanents pour notre étude

Nous avons vu dans le chapitre 2 des simulations COMSOL dans le but de trouver la géométrie de bobine qui nous donne le plus grand champ et le plus grand gradient de champ pour avoir la plus grande force magnétique sur nos billes a une géométrie de type carré. Cependant au vu des ces raisonnements, il n'est plus obligatoire d'avoir la géométrie avec le plus fort champ puisque la valeur du champ sera principalement donnée par le champ externe créé par les aimants. Nous pourrions donc passer d'une géométrie de type carré à une géométrie de type serpentín par exemple. Un schéma des deux types de géométrie est rappelé figure 167.

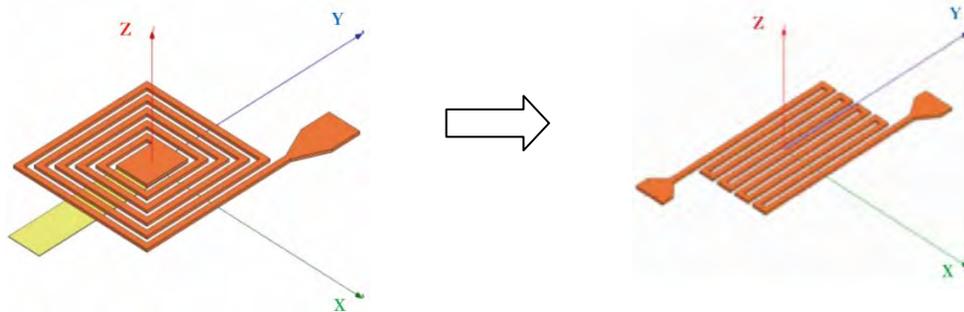


Figure 167. (A) Design de microbobine de type carré, donc deux niveaux de métallisation pour sa réalisation, (B) Design de microbobine de type serpentín, donc un niveau de métallisation nécessaire pour sa réalisation.

Il est vrai qu'en changeant de géométrie, la force que nous pourrions créer sera certes bien plus forte que dans les designs actuels mais plus faible que pour une géométrie carré et des aimants. Cependant là où nous perdons un peu de « puissance » magnétique nous gagnons énormément en réalisation technique. En effet, la différence majeure entre les deux géométries (carré et serpentín) est que dans le cas de la géométrie carré il faut une métallisation sur deux niveaux pour récupérer la masse au centre de la bobine. Alors que la géométrie en serpentín se fait plus simplement en une seule étape de métallisation et croissance. Ceci est un gain considérable et ouvre de nombreuses autres possibilités : matrices de micro-actionneurs magnétiques pour le piégeage de cellules uniques, manipulation de cellules uniques, ...

Bibliographie

- (s.d.). Consulté le Janvier 2012, sur Life Technologies: <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-purification-protocol/immunoprecipitation-with-dynabeads-protein-g.html>
- A. Chen, T. B.-J. (2013). On-chip magnetic separation and encapsulation of cells in droplets. *Lab on a Chip* , Vol. 13, Issue 6, pg. 1172-1181.
- A. D. Stroock, S. K. (2002). Chaotic mixer for microchannels. *Science* , Vol. 295, Issue 5555, pg. 647-651.
- A. E. Kamholz, B. H. (1999). Quantitative Analysis of Molecular Interaction in a Microfluidic Channel: The T-Sensor. *Analytical Chemistry* , Vol. 71, pg. 5340-5347.
- A. Hatch, A. E. (2001). A ferrofluidic magnetic micropump. *Journal of microelectromechanical systems* , Vol. 10, Issue 2, pg. 215-221.
- A. L. Bogdanov, S. S. (2000). Use of SU8 photoresist for very high aspect ratio x-ray lithography. *Microelectronic Engineering* , Vol. 53, pg. 493-496.
- A. Manz, N. G. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators* , Issues 1-6, pg. 244-248.
- A. Rida, M. A. (2004). Dynamics of magnetically retained supraparticle structures in a liquid flow. *Applied Physics Letters* , Vol. 85, Issue 21, pg. 4986-4988.
- B. Passlick, D. F.-H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* , Vol. 74, Issue 7, pg. 2527-2561.
- B. Selva, P. M. (2010). Integration of a uniform and rapid heating source into microfluidic systems. *Microfluidics and Nanofluidics* , Vol. 8, Issue 6, pg. 755-765.
- Becker, H. (2010). Collective wisdom. *Lab on Chip* , vol. 10, Issue 11, pg. 1351-1354.
- Belge, K.-U. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes are a major source of TNF. *The Journal of Immunology* , vol. 168, pg 3536-3542.
- Bozorth, R. M. (1993). *Ferromagnetism*. IEEE Press.
- Brody, J. (2011). *Faculté de Washigton*. Récupéré sur <http://faculty.washington.edu/yagerp/microfluidicstutorial/hfilter/hfilterhome.html>
- C. Cupelli, T. B. (2013). Leukocyte enrichment based on a modified piched flow fractionation approach. *Microfluidics and Nanofluidics* , Vol. 14, Issue 3-4, pg. 551-563.
- C. Greiner, M. H. (2011). Confocal backscattering-based detection of leukemic cells in flowing blood samples. *Cytometry* , Vol. 79, pg. 866-873.

- C. L. Yang, H. Z. (2005). Preparation of magnetic poly(methylmethacrylate-divinylbenzene-glycidylmethacrylate) microspheres by spraying suspension polymerization and their use for protein adsorption. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , Vol. 293, Issue 1, pg. 187-192.
- C. Lobos, A. R. (2013). Etude expérimentale de la focalisation de microorganisme dans un microcanal. *Colloque Francophone Séparation de Particules Biologiques 2013*. Toulouse.
- C. Nwankire, E. V. (2012). Multi-force, Multi-phase, Multi-material, Multi-component, Multi-dimensional, Multi-scale, Multi-fonctional, Multi-purpose microfluidic lab-on-a-disc platforms. *the 3rd European Conference in Microfluidics*. Heidelberg, Allemagne.
- C. S. Lee, H. L. (2001). Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied Physics Letters* , Vol. 79, Issue 20, pg. 3308-3310.
- C-H. Chiou, D. J.-H. (2013). Topography-assisted electromagnetic platform for blood-to-PCR. *Biosensors and Bioelectronics* , Vol. 50, pg. 91-99.
- Curtis D. Chin, V. L. (2012). Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip* , pg. 2118-2134.
- D. Robert, N. P. (2011). Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device. *Lab on a Chip* , Vol. 11, Issue 11, pg. 1902-1910.
- D. Sugiyama, Y. T.-N. (2012). Density-based particle separation using a microfluidic device. *the 3rd European Conference on Microfluidics*. Heidleberg, Allemagne.
- Dutkowski, K. (2008). Experimental investigation of Poiseuille number laminar flow of water and air in minichannels. *International Journal of Heat and Mass Transfert* , Vol. 51, Issue 25-26, pg. 5983-5990.
- E. Ermantraut, R. B. (18 juin 2013). *Brevet n° US 8467039 B2*. US.
- E. H. Conradie, D. F. (2002). SU-8 thick photoresist processing as a functional material for MEMS applications. *Journal of Micromechanical and Microengineering* , Vol. 12, Issue 4, pg. 368-374.
- E. Sollier, H. R.-L. (2009). Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood. *Sensors and Actuators B: Chemical* , Vol. 141, Issue 2, pg. 617-624.
- E. Sollier, M. C. (2008). A passive microfluidic device for plasma extraction from whole human blood. *1st European conference on microfluidics*, (pp. pg. 7030-7033).
- Elmen, G. W. (1928). Magnetic Properties of Perminvar. *The Journal of the Franklin Institute* , Vol. 206, Issue 3, pp. 21-40.
- Erickson KA, W. P. (1993). Evaluation of a novel point-of-care system, the i-stat portable clinical analyser. *Clinical chemistry* , vol. 39, issue 2, pg. 283-287.
- F. Lacharme, C. V. (2008). Full on-chip nanoliter immunoassay by geometrical magnetic trapping of nanoparticle chains. *Analytical Chemistry* , Vol. 80, Issue 8, pg. 2905-2910.
- F. Sarrazin, L. E. (2006). Mise en oeuvre de micro-réacteurs à l'échelle de micro-gouttes : caractérisation du mélange. *La houille blanche* , Vol. 3, pg. 50-55.
- F. Vullier, C. L. (1986). Flow-cytometry analysis of CD4 subpopulations (4B4 and 2H4) in HIV seropositive patients. *Biology of the cell* , vol. 58, Issue 3, pg. A18.

- F. Zaugg, R. T.-M.-T. (2012). *Brevet n° EP 2229591 B1*. Europe.
- Fulcrand, R. (2009). *Etude et développement d'une plateforme microfluidique dédiée à des applications biologiques Intégration d'un actionneur magnétique sur substrat souple*. Université de Toulouse.
- Fulcrand, R. (2009). *Etude et développement d'une plateforme microfluidique dédiée à des applications biologiques Intégration d'un actionneur magnétique sur substrat souple*. Université Paul-Sabatier Toulouse III, Toulouse.
- G. Voskerician, M. S. (2003). Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials* , Vol. 24, pg. 1959-1967.
- Goodfellow. (2013, Juin). Récupéré sur <http://www.goodfellow.com/F/Polyethylene-terephthalate.html>
- Gronewold, T. M. (2007). Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: Recent trends and challenges. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 603, Issue 2, pg. 119-128.
- H. A. Nieuwstadt, R. S. (2011). Microfluidic particle sorting utilizing inertial lift force. *Biomed Microdevices* , Vol. 13, pg. 97-105.
- H. Becker, C. G. (2008). Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , Vol. 390, Issue 1, pg. 89-111.
- H. Hartshorne, C. J. (2004). Ferrofluid-based microchip pump and valve. *Sensors and Actuators B : Chemical* , Vol. 99, Issues 2-3, pg.592-600 .
- H. Lee, E. S. (2008). Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. *Nature Medicine* , Vol.14, Issue 8, pg. 869-874.
- H. Lorenz, M. D. (1997). SU-8: a low-cost negative resist for MEMS. *Journal of Micromechanics and microengineering* , Vol. 7, Issue 3, pg. 121-124.
- H. Rostaing, H. C. (2007). A micromagnetic actuator for biomolecule manipulation. *Sensors and actuators a-Physical* , Vol. 135, Issue 2, pg. 776-781.
- Hardt, S. (2002). Radial and tangential injection of liquid/liquid and gas/liquid streams and focusing thereof in a special cyclone mixer. *Sixth International Conference on Microreaction Technology, IMRET 6*, (pp. Vol. 164, pg. 329-344). New Orleans, USA.
- H-K. Chang, Y.-K. K. (2000). UV-LIGA process for high aspect ratio structure using stress barrier and C-shaped etch hole. *Sensors and Actuators A: Physical* , Vol. 84, Issue 3, pg. 342-350.
- I. K. Dimov, L. B.-D.-C. (2011). Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS). *Lab on a Chip* , Vol. 11, Issue 5, pg. 845-850.
- J. A. Davis, D. W. (2006). Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* , Vol. 104, Issue 40, pg. 14779-14784.
- J. A. Viator, S. G. (2010). Gold Nanoparticle Mediated Detection of Prostate Cancer Cells Using Photoacoustic Flowmetry with Optical Reflectance. *Journal of Biomedical Nanotechnology* , Vol. 6, Issue 2, pg. 187-191.

- J. Atencia, G. A. (2010). Magnetic connectors for microfluidic applications. *Lab on a Chip* , Vol. 10, Issue 2, pg. 246-255.
- J. Jang, S. S. (2000). Theoretical and experimental study of MHD (magnetohydrodynamic) micropump. *Sensors et Actuators A* , Vol.80, Issue 1, pg. 84-89.
- J. Joung, J. S. (2000). Micropumps based on alternating high-gradient magnetic fields. *IEEE Transactions on magnetics* , Vol. 36, Issue 4, pg. 2012-2014.
- J. M. Shaw, J. D. (1997). Negative photoresists for optical lithography. *IBM Journal of Research and Development* , Vol. 41, Issue 1-2, pg. 81.
- J. S. Park, H. I. (2009). Multiorifice flow fractionation: continuous size-based separation of microspheres using a series of contraction/expansion microchannels. *Analytical Chemistry* , Vol. 81, Issue 20, pg. 8280-8288.
- J. Zang, K. L. (2001). Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS). *Polymer Testing* , Vol. 20, pg. 693-701.
- J. Zhou, I. P. (2013). Fundamentals of Inertial Focusing of Microparticles in a Rectangular Microchannel. *Lab on e Chip* , Vol. 13, Issue 6, pg. 1121-1132.
- J-H. Wang, C.-H. W.-C.-Y.-B. (2011). An integrated microfluidic system for counting of CD4+/CD8+ T lymphocytes. *Microfluidics and Nanofluidics* , Vol. 2, Issue 3, pg. 531-541.
- J-S. Park, H.-I. J. (2011). Multiorifice Flow Fractionation: Continuous Size-Based Separation of Microspheres Using a Series of Contraction/Expansion Microchannels. *Lab On a Chip* , Vol. 11, Issue 1, pg. 93-99.
- K. Nandy, S. C. (2008). Analytical model for the magnetophoretic capture of magnetic microspheres in microfluidic devices. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , Vol. 320, pg. 1398-1405.
- K. S. Ryu, K. S. (2004). Micro magnetic stri-bar intergrated with parylene microfluidic channels. *Lab on chip* , Vol. 4, Issue 6, pg. 608-613.
- K. Y. Lee, N. L.-P. (1995). Micromachining applications of a high resolution ultrathick photoresist. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* , Vol. 13, Issue 6, pg. 3012-3016.
- K. Zhang, Q. L. (2009). On-chip manipulation of continuous picoliter-volume superparamagnetic droplets using a magnetic force. *Lab on a Chip* , Vol. 9, Issue 20, pg. 2992-2999.
- Koller, E. (2009). *Aide-mémoire Génie chimique*. Dunod.
- Kost, G. J. (2002). *Principles and prectice of point-of-care testing*. Philadelphia: Lippincott William et Wilkins.
- L. F. Zanini, O. O.-R.-B. (2012). Micromagnet structures for magnetic positioning and alignment. *Journal of Applied Physics* , Vol. 111, Issue 7.
- L. Shui, A. V. (2009). Interfacial tension controlled W/O and O/W 2-phase flows in microchannel. *Lab On a Chip* , Vol. 9, Issue 6, pg. 795-801.
- L. Yu, S. N. (2013). Advances of Lab-on-a-chip in Isolation, Detectopn and Post-processing of Circulating Tumour Cells. *Lab on Chip* , Vol. 13, Issue 16, pg. 3163-3182.

- LeMen, J. F. (s.d.). Consulté le Juillet 2013, sur <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CMELEC/biotsav.htm>
- L-H. Lu, K. S. (2002). A magnetic microstirrer and array for microfluidic mixing. *Journal of Microelectromechanical Systems* , Vol. 11, Issue 5, pg. 462-469.
- M. A. Ali, J. M. (1991). Temperature effects in rhodamine B dyes and improvement in cw dye laser performance. *Laser Chemical* , Vol. 11, pg. 31-38.
- M. Abkarian, A. V. (2005). Dynamics of Vesicles in a Wall-Bounded Shear Flow. *Biophysical Journal* , Vol. 89, pg. 1055-1066.
- M. D. Estes, B. O.-M. (2009). Isolation of prostate cancer cell subpopulation of functional interest by use of an on-chip magnetic bead-based cell separator. *Journal of Micromechanics and Microengineering* , Vol. 19, Issue 9, 095015 (8pg).
- M. Feldmann, A. W. (2004). A novel fabrication for 3D-multilayer micro mixers. *8th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Systems*, (pp. Vol. 2, pg. 16-18). Malmo, Suède.
- M. Glynn, D. K. (2013). CD4 Counting Technologies for HIV Therapy Monitoring in Resource Poor Settings-State-of-the-Art and Emerging Microtechnologies. *Lab on a Chip* , Vol. 13, Issue 14, pg. 2731-2748.
- M. Heller, H. B. (2008). A theoretical analysis of the resolution due to diffusion and size dispersion of particles in deterministic lateral displacement devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* , Vol. 18, Issue 7.
- M. Woytasik, J.-P. G.-G.-P. (2006). Fabrication of planar and three-dimensional microcoils on flexible substrates. *Microsystem Technologies-micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems* , Vol. 12, Issue 10-11, pg. 973-978.
- M. Yamada, K. K. (2007). Microfluidic devices for size-dependent separation of liver cells. *Biomedical Microdevices* , Vol. 9, Issue 5, pg. 637-645.
- M. Yamada, M. S. (2005). Hydrodynamic filtration for on chip particle concentration and classification utilizing microfluidics . *Lab on a Chip* , Vol. 5, Issue 11, pg. 1233-1239.
- MBio. (s.d.). Consulté le Octobre 16, 2013, sur <http://mbiodx.com/products/>
- MicroChem. (s.d.). SU-8 3000 Permanent Epoxy Negative Photoresist.
- N. Chronis, W. L. (2001). Microfabricated Bio-magnetic Separator Based On Continuous Hydrodynamic Parallel Flow. *5th International Conference on Micro Total Analysis Systems (μ TAS)*, (pp. pg. 345-351). Monterey, California.
- N. N. Watkins, S. S. (2011). A microfabricated electrical differential counter for the selective enumeration of CD4+ T lymphocytes. *Lab on a Chip* , Vol. 11, Issue 8, pg. 1437-1447.
- N. T. Nguyen, K. M. (2006). Manipulation of ferrofluid droplets using planar coils. *Applied Physics Letters* , Vol. 89, 052509 (3pg).
- N-T. Nguyen, Z. W. (2005). Micromixers-a review. *Journal Of Micromechanics and Microengineering* , Vol. 15, Issue 2, pg. R1-R16.

- P. Garstecki, A. M.-C. (2010). Formation of bubbles and droplets in microfluidics systems. *Microfluidics Based Microsystems* , Vol. 53, Issue 4, pg. 163-181.
- P. Garstecki, H. A. (2005). Mechanism for Flow-Rate Controlled Breakup in Confined Geometries: A route to Monodisperse Emulsions. *Physical Review Letters* , Vol. 94, Issue 16, pg. 365-368.
- P. Tseng, D. D. (2009). Rapid and Dynamic Intracellular Patterning of Cell-Internalized Magnetic Fluorescent Nanoparticles. *Nano Letters* , Vol. 9, Issue 8, pg. 3053-3059.
- P. Yi, A. A.-z. (2012). Thermal analysis of nanofluids in microfluidics using an infrared camera. *Lab on a Chip* , Vol. 12, Issue 4, pg. 2520-2525.
- Q. Jin, C. V.-G. (2007). Migration and deformation of leukocytes in pressure driven flows. *Mechanics Research Communications* , Vol. 34, Issues 5-6, pg. 411-422.
- Q. Ramadan, V. D. (2006). Fabrication of Three-Dimensional Magnetic Microdevices With Embedded Microcoils for Magnetic Potential Concentration. *Journal of Microelectromechanical Systems* , Vol. 15, Issue 3, pg. 624-638.
- R. C. Meier, V. B. (2010). Twisted microfluidics: a novel photoresist lamination process for 3D multilevel lab-on-a-chip (LOC) applications. *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Groningen, Pays-Bas.
- R. Fulcrand, A. B.-M. (2011). On chip magnetic actuator for batch-mode dynamic manipulation of magnetic particles in compact lab-on-chip. *Sensors and Actuators B: Chemical* , Vol. 160, Issue 1, pp. 1520-1528.
- R. Rong, J.-W. C. (2006). An on-chip magnetic bead separator for biocell sorting. *Journal of Micromechanics and Microengineering* , Vol. 16, pg. 2783-2790.
- S. Dochow, C. K. (2011). Tumour cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments. *Lab on Chip* , Vol. 11, Issue 8, pg. 1484-1490.
- S. Kobayashi, E. M. (2011). Effects of microstructure geometry and plasma modification on wetting properties of SU-8 surfaces. *Microelectronic Engineering* , Vol. 88, Issue 8, pg. 1775-1778.
- S. L. Biswal, A. P. (2004). Micromixing with linked chains of paramagnetic particles. *Analytical Chemistry* , Vol. 76, Issue 21, pg. 6448-6455.
- S. S. Bithi, S. A. (2010). Behavior of a train of droplets in a fluidic network with hydrodynamic traps. *Biomicrofluidics* , Vol. 4, 044110.
- S. Zheng, J.-Q. L.-C. (2008). Streamline-Based Microfluidic Devices for Erythrocytes and Leukocytes Separation. *Journal of Microelectromechanical Systems* , Vol. 17, Issue 4, pg. 1029-1038.
- Shirai, A. (2008). Modeling neutrophil transport in pulmonary capillaries . *Respiratory Physiology & Neurobiology* , Vol. 163, pg. 158-165.
- T. Kohlmeier, H. H. (2002). Challenges in using photosensitive embedding material to planarize multi-layer coils for actuator systems. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , Vol. 242-245, Issue 2, pg. 1149-1152.
- T. Thorsen, R. W. (2001). Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters* , Vol. 86, Issue 18, pg. 4163-4166.

- T. Thorsen, S. J. (2002). Microfluidic Large-Scale Intergration. *Science* , Vol. 298, Issue 5593, pg. 580-584.
- T. Vilkner, D. J. (2004). Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical Chemistry* , vol. 76, Issue 12, pg. 3373-3385.
- V. Hessel, H. L. (2005). Micromixers-a reveiw on passive and active mixing principles. *Chemical Engineering Science* , Vol. 60, Issues 8-9, pg. 2479-2501.
- V. van Steijn, C. R. (2010). Predictive model for the size of bubbles and droplets created in microfluidic T-junctions. *Lab On a Chip* , Vol. 10, Issue 19, pg. 2513-2518.
- Verpoorte, E. (2003). Beads and chips: new recipes for analysis. *Lab on Chip* , Vol. 3, Issue 4, pg. 60N-68N.
- W. C. Jackson, H. D. (2001). Rapid prototyping of active microfluidic components based on magnetically modified elastomeric materials. *Journal of Vacuum science and Technology B* , Vol. 19, Issue 2, pg. 596-599.
- W. Liu, H. W.-M. (2011). Rare cell chemiluminescence detection based on aptamer-specific capture in microfluidic channels. *Biosensors and Bioelectronics* , Vol. 28, Issue 1, pg. 438-442.
- Wa, N. (1998). Expanded CD14+CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infection and Immunity* , vol. 66, pg.2782-2790.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the futur of microfluidics. *Nature* , Vol. 442, pg. 368-373.
- X. Wu, H. W. (2011). Enhancement of separation efficiency on continuous magnetophoresis by utilizing L/T-shaped microchannels. *Microfluidics and Nanofluidics* , Vol. 11, Issue 1, pg. 11-24.
- X.H. Cheng, D. I. (2007). A microfluidic device for practical label-free CD4+T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on Chip* , Vol. 7, Issue 2, pg. 170-178.
- Y. Liao, J. S. (2011). Rapid prototyping of three-dimensional microfluidic mixers in glass by femtosecond laser direct writing. *Lab on a Chip* , Vol. 12, Issue 4, pg. 746-749.
- Y-H. Chang, C.-J. H.-B. (2012). A tunable microfluidic-based filter modulated by pneumatic pressure for separation of blood cells. *Microfluidics and nanofluidics* , Vol. 12, Issue 1-4, pg. 85-94.
- Y-J Chiu, S. H.-F.-H. (2013). Universally applicable three-dimensional hydrodynamic microfluidic flow focusing. *Lab on a Chip* , Vol. 13, Issue 9, pg. 1803-1809.
- Y-Y. Huang, P. C.-H. (2012). Patterned nanomagnets on-chip for sreening circulating tumor cells in blood. *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Okinawa, Japan.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* , Vol. 81 pg 584-592.

Annexe A : Conférence, Poster, Brevet

Publications :

A. Montrose, S. Cargou, F. Nepveu, R. Manczak, A-M. Gué, K. Reybier, « impedimetric immunosensor for the detection of circulating pro-inflammatory monocytes as infection markers. », *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.49, pg. 305-311.

S-D. Zhang, N. Petersen, W-J. Zhang, S. Cargou, J. Ruan, D. Murat, C-L. Santini, T. Song, T. Kato, P. Notareschi, Y. Li, K. Namba, A-M. Gué, L-F. Wu, « Swimming behavior and magnetotaxis function of the marine bacterium strain MO-1 », *environmental microbiology reports*, 2013.

Brevet :

K. Reybier, A-M. Gué, J. Sudor, S. Cargou, A. Montrose, « Système microfluidique et procédé pour isoler et quantifier au moins une sous-population de cellules à partir d'une population de cellules » demande n° 13 57410 déposée le 26/09/2013.

Conférences internationales :

S. Cargou, H. Kabbara, M-A. Mader, P. Joseph, A. Boukabache, A-M. Gué, « Handling fluidic flow in SU8 original 3D geometries », *μflu'12*, Heildenberg Allemagne, Oral long, 2012.

S. Cargou, V. Picot, M.-A. Mader, P. Joseph, A.-M. Gué, « Multilevel (3D) microfluidics as a new way for multi-component reaction analysis », *WCCE 9*, Séoul Corée du sud, Oral long, 2013.

Conférences et workshop nationaux :

S. Cargou, A. Boukabache, A-M. Gué, « Multi-level integration of micro-coil inside a magneto-fluidic sorting device », *GDR Micro fluidique* Lyon, Poster, 2011. (Poster)

S. Cargou, A-M. Gué, « Manipulation de fluide à travers un réseau 3D de SU8 », *JNRDM* Marseille, Poster, 2012. (Poster)

S. Cargou, A-M. Gué, « Handling flow through innovative 3D SU8 structures », *GDR Micro et nano fluidique*, Bordeaux, Poster, 2012. (Poster)

S. Cargou, A-M. Gué, « Manipulation de fluide à travers un réseau 3D de SU8 », *Ecole d'été microfluidique*, Agay, Poster, 2012. **Prix du meilleur poster.** (Poster)

S. Cargou, A-M. Gué, « Système multi-niveaux magnéto-microfluidique intégré pour la détection de monocytes infectés », *JNRDM Grenoble*, Poster, 2013. (Poster)

S. Cargou, « Système multi-niveaux magnéto-microfluidique intégré pour la détection de monocytes activés », Congrès GEET, Toulouse, Oral, 2013. **Prix de la meilleur présentation oral de la session micro et nano système.** (Oral)

Annexe B : Tri hydrodynamique pour la séparation en taille et amélioration

Nous avons été amenés à réfléchir au tri par taille. En effet nous avons vu dans le chapitre 1 que les monocytes, nos éléments cibles, sont les éléments les plus gros du sang, et même si nous envisageons une séparation magnétique, le marquage des monocytes dans le sang complet risque d'être difficile au vu de la rareté des éléments cibles. Il faudra donc, peut-être, faire une première étape, une sorte de préparation de l'échantillon avec une séparation ou un enrichissement (C. Cupelli, 2013).

Il existe un moyen facile de séparer des particules par la taille sans utiliser d'autres forces que celles générées par l'écoulement. Nous pourrions dire que la séparation et la concentration de l'échantillon se fait « naturellement » à condition d'avoir la bonne géométrie de puce. On parle de séparation hydrodynamique. Cette méthode de séparation a été démontré par Yamada en 2005 et son principe sera expliqué par la suite.

En partant de ces travaux, nous proposons un dispositif 3D dont le fonctionnement pourrait faciliter et accélérer le tri.

I Le tri hydrodynamique

I.1 Principe du tri

Le principe du tri hydrodynamique est de disposer de canaux annexes perpendiculairement au canal principal de l'écoulement et de choisir judicieusement la longueur des canaux annexes de manière à ce que les particules circulant dans le canal principal soient aspirées ou non, selon leur taille, dans les canaux annexes.

On définit ainsi un rayon critique R_{crit} qui est le rayon de la particule en dessous duquel elle sera aspirée dans les canalisations annexes et au-dessus duquel elle restera dans la canalisation principale.

Les avantages de ce système sont de trois ordres :

- Un procédé simple,
- Ne dépendant pas du débit,
- N'ayant pas besoin d'autre source de fluide.

Pour comprendre le fonctionnement partons d'une intersection simple d'un canal principal et d'un canal annexe comme décrit figure 168, avec les différents débits circulant à l'intérieur et son analogie électrique.

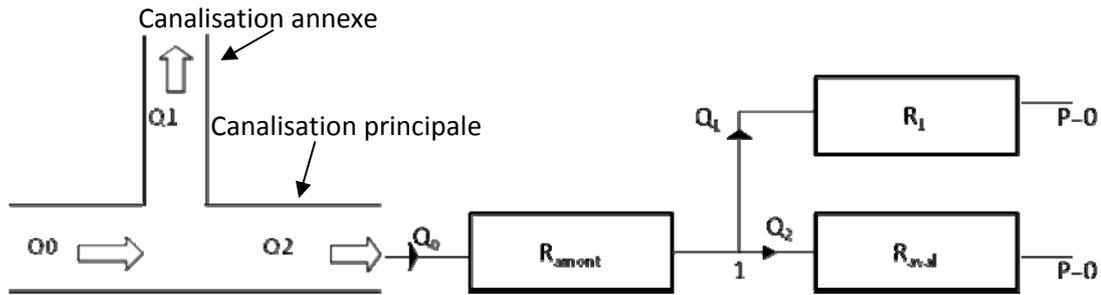


Figure 168. Schéma d'une bifurcation microfluidique et son équivalent en circuit électrique.

Tout d'abord nous allons définir une grandeur, notée a , comme étant le rapport entre le débit sortant dans un micro canal annexe et le débit du canal principal.

Soit :

$$a = \frac{Q_1}{Q_0}$$

La géométrie fluidique peut être comparée à un circuit électrique et nous pouvons exprimer a en fonction des résistances des différentes branches.

$$a = \frac{R_1}{R_1 + R_2}$$

Ce paramètre peut être comparé à une sorte d'efficacité de pompage, c'est une grandeur importante qui nous servira pour discuter de l'efficacité du système.

Nous devons maintenant relier toutes ces grandeurs à la valeur qui nous intéresse c'est-à-dire le rayon de coupure du système. Nous l'appellerons aussi sans distinction R_{crit} , ou rayon critique.

Le calcul du rayon critique dépend, comme nous allons le voir, du profil de l'écoulement. Pour plus de simplicité nous partons d'un profil parabolique mais le raisonnement est le même pour un autre écoulement tant que le profil est connu. En schématisant le profil de l'écoulement, le rapport des débits est aussi égal au rapport des surfaces $S1/S0$ définies comme indiqué sur la figure ... :

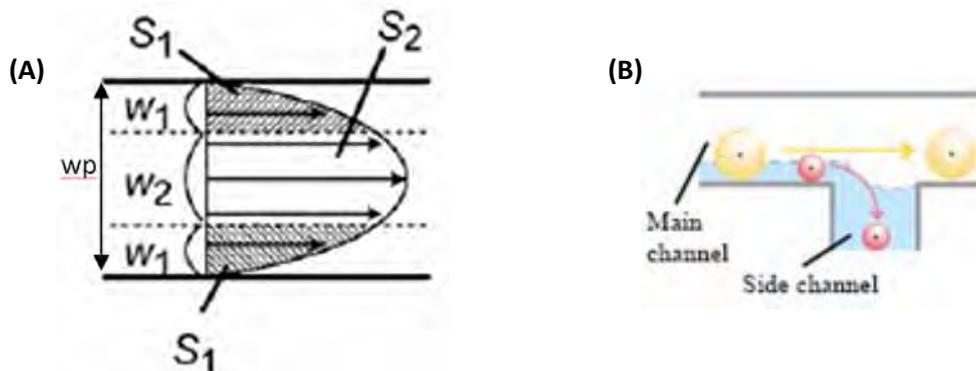


Figure 169: (A) profil de vitesse parabolique dans un micro-canal et (B) schéma de principe de la séparation hydrodynamique.

Avec $w1 = R_{crit}$ et $S0 = 2 * S1 + S2$.

Le principe de fonctionnement de ce mode de séparation peut se résumer sur le schéma En effet, on considère que le fluide compris entre la paroi et $w1$, représenté par la surface $S1$, correspond au fluide qui est aspiré dans la canalisation. Ainsi si une particule possède son centre de gravité à

l'intérieur de cette bande (son rayon < w1) elle sera aspirée, sinon elle continuera sa progression dans le canal principal.

Nous allons tout d'abord mettre en équation la parabole figure ... :



Figure 170: Mise en équation du profil parabolique de la vitesse

$$v(w) = -\frac{4Vmax}{w_p^2}w^2 + \frac{4Vmax}{w_p}w$$

Nous pouvons calculer S1 en intégrant notre équation entre 0 et Rcrit, ce qui nous donne :

$$S1 = 2Vmax \cdot \frac{Rcrit^2}{w_p} \left(1 - \frac{2}{3} \frac{Rcrit}{w_p} \right)$$

Nous avons bien une relation entre S1 et Rcrit, cependant elle n'est pas simple puisque nous avons une équation du troisième degré. Pour s'affranchir de cette difficulté nous allons faire l'hypothèse de négliger $\frac{2}{3} * \frac{Rcrit}{w_p}$, ce qui est le cas majoritairement.

Cela revient à approximer la parabole par une droite entre 0 et Rcrit.

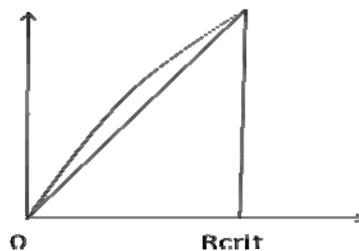


Figure 171: approximation sur le profil de vitesse

Nous obtenons donc :

$$S1 = 2Vmax \cdot \frac{Rcrit^2}{w_p} \text{ d'où } Rcrit = \sqrt{\frac{S1 \cdot w_p}{2Vmax}}$$

Mais puisque S1 = a*S0 et que S0 = 2/3*w_p*Vmax nous pouvons calculer Rcrit en fonction de a :

$$Rcrit = w_p \sqrt{\frac{a}{3}}$$

Nous obtenons une relation simple entre Rcrit et les grandeurs géométriques du dispositif cependant, cette formule n'est valable que dans le cas d'un profil d'écoulement parabolique or le profil dépend du ratio largeur/profondeur. En effet pour un ratio important par exemple 50:1, le profil de vitesse n'est parabolique que dans la profondeur.

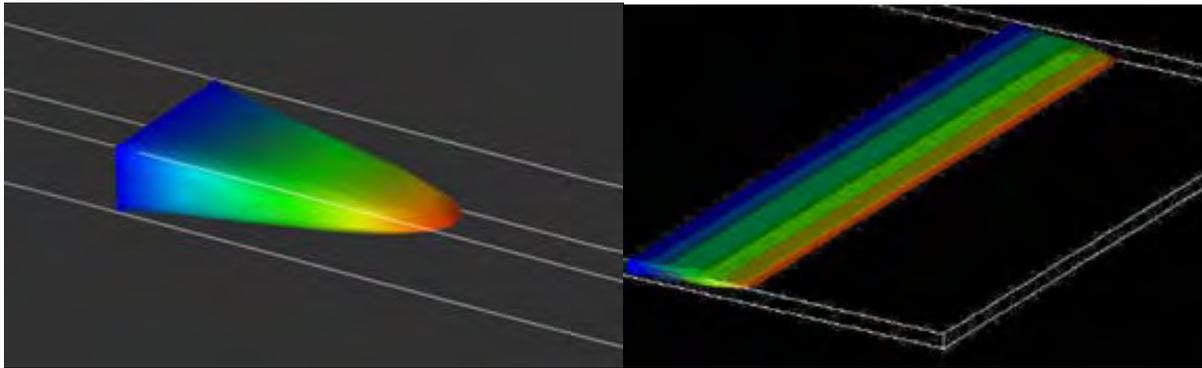


Figure 172: Profil de vitesse selon le rapport largeur/profondeur du canal (Brody, 2011)

Même si la formule pour calculer le R_{crit} est à prendre avec précaution, car n'est pas valable dans tous les cas, le principe de calcul reste le même et se base sur un rapport de résistance.

Nous voyons alors que dans ce type de géométrie en 2D, le calcul du rayon critique utilise la résistance en aval de l'intersection, ce qui veut dire qu'il faut considérer tous ce qui se passe après, jusqu'à la sortie à pression atmosphérique. Cette nécessité de connaître la résistance après l'intersection peut amener de nombreux calculs fastidieux et si une fois le design réalisé, nous voulons faire une modification, il faut tout recalculer.

I.2 Principe du focusing

Cette méthode de tri ne fonctionne que pour les particules qui sont situées contre la paroi de la canalisation principale. Donc il faut dans un premier temps venir plaquer toutes les particules (au moins celles d'intérêts) contre la paroi. Pour cela, nous pouvons utiliser une série de canaux annexes qui permettent d'aspirer du fluide pour plaquer les particules et ensuite les trier. Cette fonction est appelée focusing.

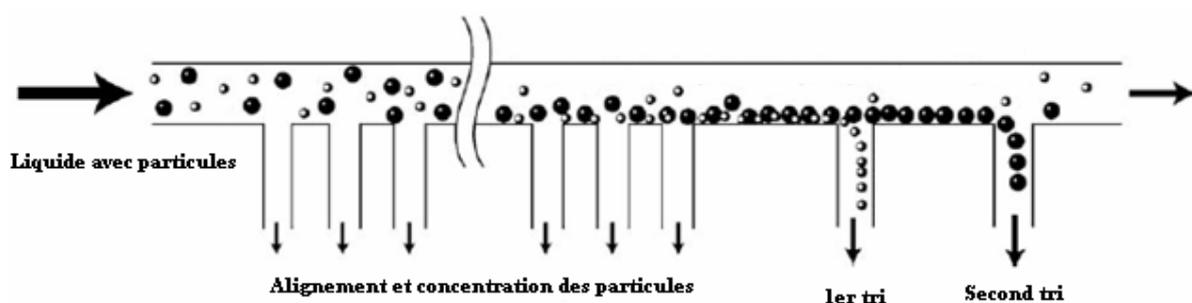


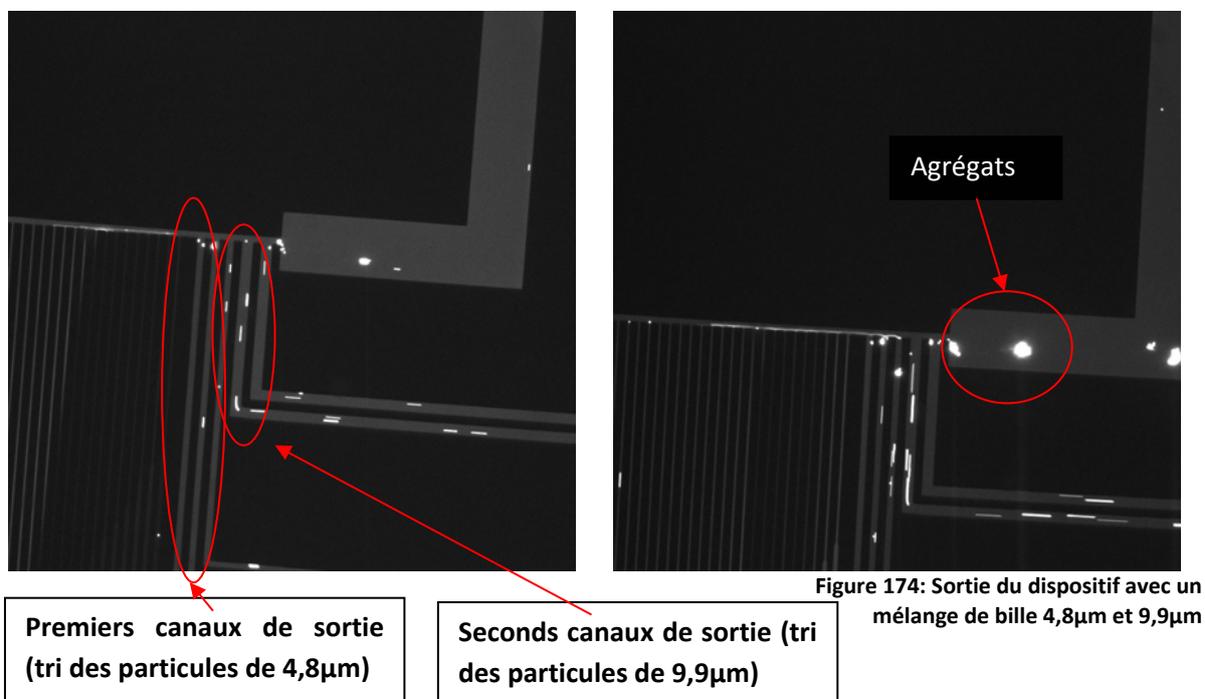
Figure 173. Schéma du principe de l'alignement des particules.

Chaque dimensionnement des canaux annexes demande de connaître la résistance de tous les canaux annexes qui suivent, sachant que les peignes peuvent faire plus de 100 canaux, ça fait beaucoup de calcul. Il faudrait pouvoir s'affranchir ces calculs et c'est ce que nous allons montrer par la suite. Nous voyons ici qu'en plus de réaliser une séparation de tri ce dispositif réalise une étape de concentration ce qui pour des éléments très dilués et rares dans l'échantillon est bénéfique.

Ce dispositif permet de faire une séparation par taille sans employer d'autres forces que celle de l'écoulement, il est donc facile à mettre en place. Ce type de séparation est envisagé comme première étape de préparation de l'échantillon sanguin de notre dispositif afin de séparer les monocytes, qui sont les éléments les plus gros, du reste des éléments sanguins. L'étape de séparation n'a pas à être parfaite, en d'autre terme mieux vaut récupérer plus d'éléments que perdre des monocytes.

Nous avons pu tester ce tri hydrodynamique au laboratoire. Les dispositifs ont été dimensionnés pour réaliser une séparation par taille avec un mélange de bille de 4,8 μm , 9,9 μm et 15 μm souhaitant ainsi mimer les tailles respectives des éléments figurés du sang avec les plaquettes, les globules rouges et les globules blancs.

Une illustration des expériences est montrée figure 174. Cette expérience a pu montrer une bonne séparation pour un mélange de bille de 4,8 μm et de 9,9 μm . Notons que les agrégats, plus gros, sont récupéré en sortit laissant penser un bon fonctionnement pour la récupération des monocytes.



Ces dispositifs sont vraiment prometteurs pour effectuer un premier tri par taille et récupérer les monocytes avant le marquage avec les billes magnétiques. Cependant la réalisation, comme nous l'avons expliqué plus tôt, est délicate à cause du calcul fastidieux des résistances fluidiques, et lors des expériences nous retrouvons les mêmes problèmes. En effet, certains canaux peuvent se boucher, les billes peuvent partiellement obstruer le canal principal changeant de ce faite les résistances fluidiques et donc le comportement global du dispositif.

II Le retour 3D :

Le retour 3D permet d'augmenter l'efficacité du tri hydrodynamique et de faciliter le design des puces comme nous allons le voir ici. Il intervient dans la phase de focalisation des particules.

II.1 Principe de fonctionnement

L'objectif est de prélever une quantité de fluide située sur l'un des bords de la canalisation principale, par l'intermédiaire d'une canalisation annexe, et de réinjecter ce fluide en aval de la canalisation principale de l'autre bord.

Grâce au choix des grandeurs géométriques de la canalisation annexe, la quantité de fluide mais aussi la taille des particules qui seront aspirées peuvent être contrôlés avec précision.

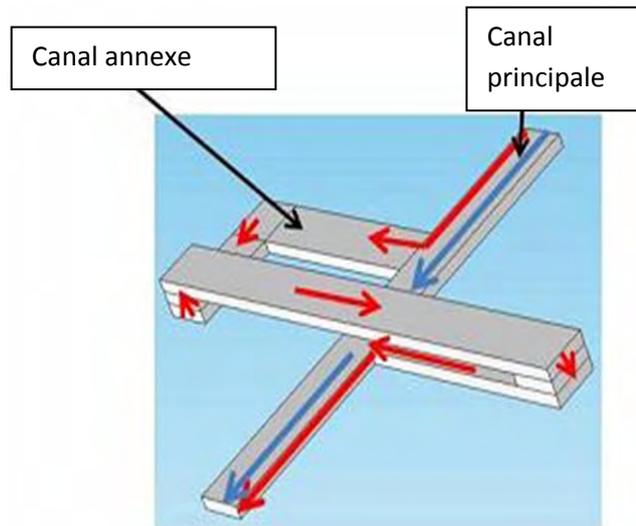


Figure 175. Schéma de principe du Retour 3D.

C'est un fonctionnement proche du tri hydrodynamique 2D sauf que la canalisation annexe est rebouclé sur la canalisation principale. Et comme fait précédemment, nous pouvons faire l'analogie de notre design avec un circuit électrique.

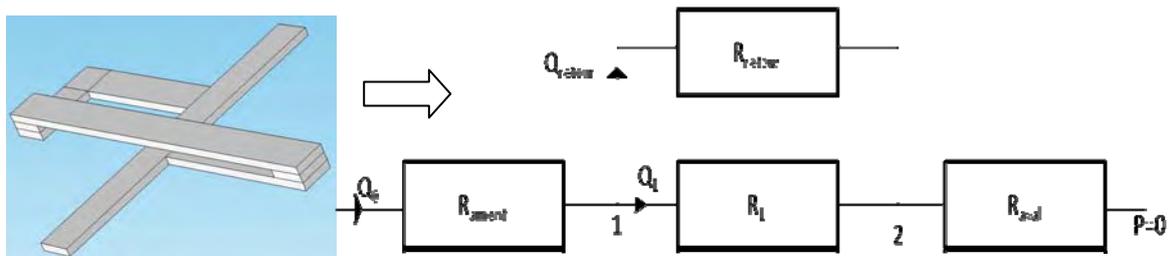


Figure 176. Schéma de principe du retour 3D et son équivalent en circuit électrique.

Par analogie, en utilisant la loi des nœuds et la loi d'ohm :

$$R_2 - R_1 = \Delta P = R_1 \times Q_1 = R_{\text{retour}} \times Q_{\text{retour}} \quad \text{Donc} \quad Q_{\text{retour}} = \frac{R_1}{R_{\text{retour}}} Q_1 \quad \text{Donc} \quad \alpha = \frac{R_{\text{retour}}}{R_1}$$

L'avantage d'une telle géométrie c'est que la résistance en aval n'intervient pas dans le calcul et donc n'influence pas le fonctionnement du système. Seul le rapport des résistances R_1 et R_{retour} compte. L'utilisation en série d'un tel mécanisme est alors possible sans avoir à redimensionner chaque canalisation annexe.

De plus le phénomène de focalisation intervient deux fois de façon complémentaire, une fois quand on aspire le fluide et une autre fois quand on réinjecte le fluide.

II.2 Validation expérimentale

Afin de valider par l'expérience un tel fonctionnement et de prouver la faisabilité du retour 3D nous avons réalisé des dispositifs en SU8 grâce à la technique de laminage expliquée précédemment (voir partie 3.1).

Notre premier but a été de faire la preuve de concept. Dans cette optique et afin de gagner en rapidité et en coût, nous sommes partis avec des masques souples. Ce choix nous contraint dans les dimensions minimales que nous pourrions vouloir (voir partie 3.1.1.3), nous sommes partis sur des canaux de 100 μ m de large. La hauteur des canaux est quand à elle fixée à 25 μ m.

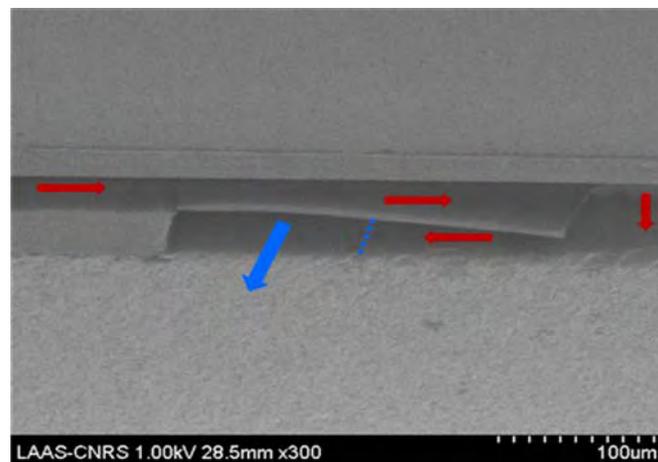


Figure 177. Image MEB du retour 3D.

Nous avons choisi un design simple avec deux entrées et une sortie comme décrit figure Nous injectons de la fluorescéine dans une entrée et de l'eau dans l'autre. En jouant sur le débit d'eau nous pouvons concentrer la fluorescéine sur une épaisseur de fluide bien contrôlée. Nous contrôlons en débit au cours de l'expérience et nous injectons l'eau avec un débit 9 fois supérieur à celui de la fluorescéine.

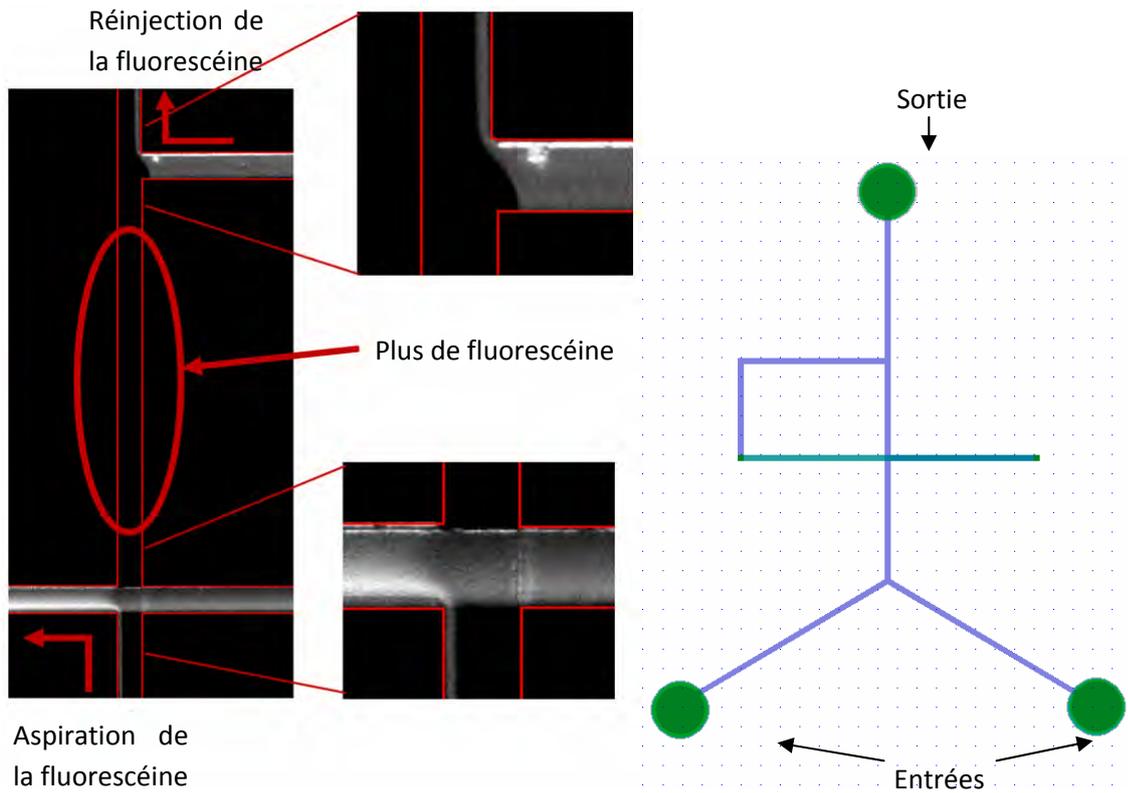


Figure 178. (A) Validation de la fonction du retour 3D par l'aspiration de fluorescéine e d'un côté du canal principale et sa réinjection de l'autre côté, (B) design du dispositif de test du retour 3D.

La fluorescéine est aspirée dans la canalisation annexe à gauche de la canalisation principale et est réinjectée à droite de la canalisation principale. Nous avons donc bien montré le fonctionnement d'aspiration et de réinjection souhaité pour notre dispositif. Qualitativement nous avons donc un outil fonctionnel.

Si nous regardons les taux de pompage théoriques et expérimentaux nous avons aussi une bonne concordance. En effet, le calcul donne un taux de pompages de 14,3%, alors qu'expérimentalement nous trouvons un taux de pompage d'environ 14,5%.

Annexe C : Marquage sur puce

Nous avons vu dans la partie 6.3.1, que le marquage des monocytes avec les billes magnétiques n'était pas une étape anodine, et que le marquage sur puce est une étape préalable à la séparation primordiale. Plusieurs pistes sont envisageables : utilisation d'un mélangeur en flux, marquage en goutte, agitation magnétique...

Dans un simple canal microfluidique, le mélange ne s'effectue que par diffusion comme nous avons pu le voir dans le chapitre 3, pour créer des mouvements d'advection chaotique et donc créer un mélange bien plus efficace, il faut jouer sur la géométrie du dispositif. Des structures en zig zag et créneaux classiques ont été testées comme le montrent les résultats des figures 179 et 181.

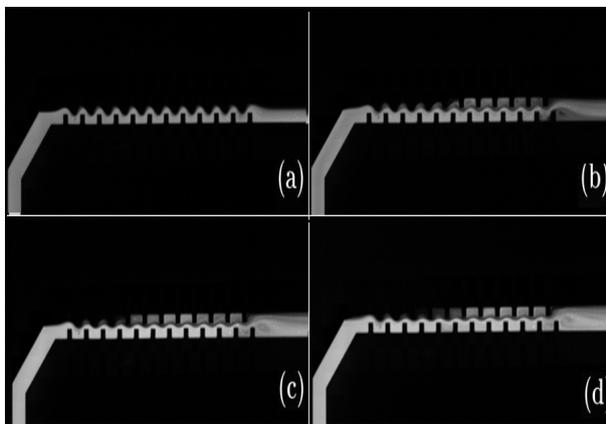


Figure 179. Tests de mélange avec un design en créneau pour des pressions différentes. (a) 30mbar, (b) 150 mbar, (c) 250 mbar, (d) 350 mbar.

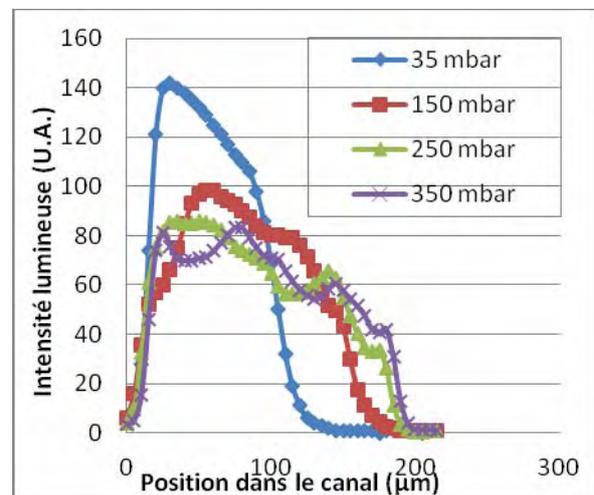


Figure 180. Intensité lumineuse en sortie de dispositif de type créneau.

Le design en créneau crée effectivement du mélange mais est très dépendant du débit. En effet, pour une différence de pression de 35mbar, il n'y a quasiment pas plus de mélange que par diffusion. Le meilleur résultat est obtenu pour une différence de pression maximale de 350 mbar, et là encore le mélange n'est pas parfait.

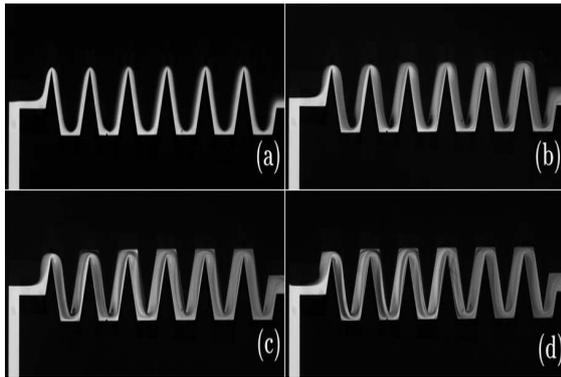


Figure 181. Tests de mélange avec un design en créneau pour des pressions différentes. (a) 10mbar, (b) 50 mbar, (c) 100 mbar, (d) 200 mbar.

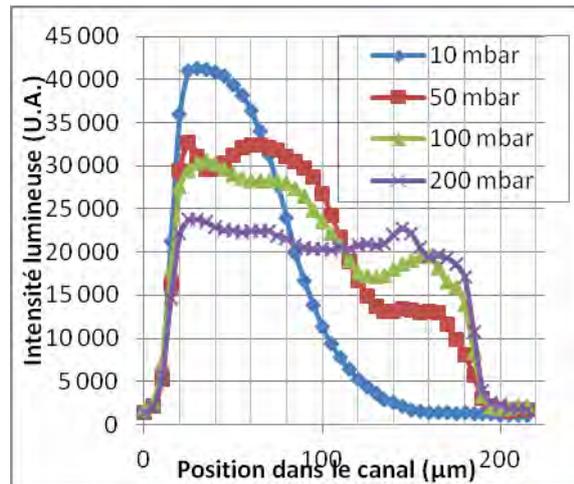


Figure 182. Intensité lumineuse en sortie de dispositif de type zig zag.

Le design en zig zag donne de bien meilleurs résultats que le design en créneau et pour des pressions plus faibles. En effet, pour une différence de pression de 200 mbar nous obtenons un mélange presque parfait.

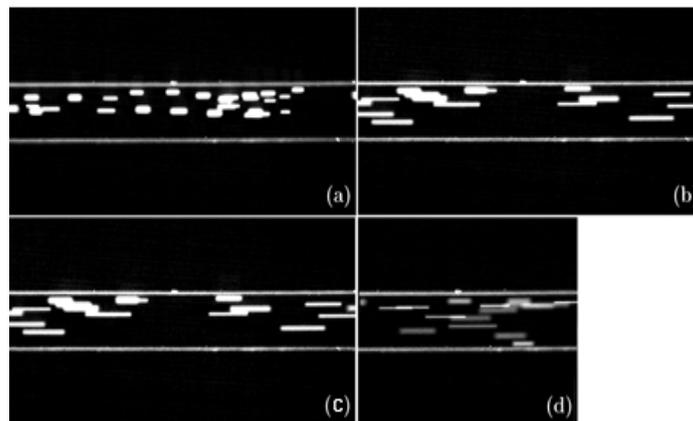


Figure 183. Tests de mélange avec un design en zig zag appliqué à des particules de $15\mu\text{m}$ pour des pressions différentes. (a) 20mbar, (b) 50 mbar, (c) 100 mbar, (d) 200 mbar.

Nous devons maintenant tester ces dispositifs avec des particules car le but est de mélanger des billes magnétiques et des cellules. Nous choisissons des billes fluorescentes de $15\mu\text{m}$. Au vu des résultats, illustrés figure 183, les particules sont effectivement mélangées mais pas de façon équitable. Et même pour une différence de pression de 200 mbar, il y a toujours une surconcentration vers le haut du canal.

En conclusion, les dispositifs zig zag donnent une bonne réponse pour mélanger des fluides, cependant le mélange des particules n'est pas très homogène.

Qui plus est, l'efficacité du mélange dépend du débit employé ce qui n'est pas vraiment pratique car nous restreint dans l'utilisation future des dispositifs. De plus, nous avons montré dans le chapitre 5 que l'efficacité maximale de séparation et de piégeage était obtenue pour des débits faibles correspondant à des différences de pression de quelques mbar. Le mélange par zig-zag reste possible mais il faut alors envisager des rapports de résistances fluidiques importants entre la zone de mélange

et la zone de séparation. Nous voyons ici que la solution de marquer en flux dans un dispositif simple en 2D montre de nombreuses faiblesses.

Annexe D : La visualisation en 3D : Observation sur la tranche

Grâce à la technique de laminage de film sec SU-8, la réalisation de design en 3D est devenue un atout majeur dans la fabrication de nouvelles fonctions mais aussi dans l'amélioration de celles existantes. Cependant l'observation ne se fait que verticalement, par au-dessus ou en-dessous. Il serait pertinent de pouvoir observer en 3D dans la canalisation. L'utilisation d'un microscope confocal est possible mais ne permet pas de donner une image en continue de toute la hauteur de la canalisation : il faut sélectionner, scanner les différentes épaisseurs de fluide une à une. Le mieux serait de pouvoir observer les canalisations sur la tranche en plaçant une caméra latéralement ou en récupérant l'image de la tranche par un miroir.

Utilisation d'un mini miroir

Réalisation d'un micro-miroir :

Une solution est de graver du silicium par attaque KOH selon un plan cristallin, puis de le métalliser pour augmenter la réflexion et ainsi créer un micro-miroir. Cependant cette méthode ne permet pas de faire apparaître des plans à 45° qui serait idéaux pour l'observation.

En effet, nous pouvons obtenir des plans à 35° (plan 110) ou à $54,74^\circ$ (plan 100), qui dans le cas d'un miroir plan va conduire à une déviation des rayons comme schématisé dans la figure ci-dessous.

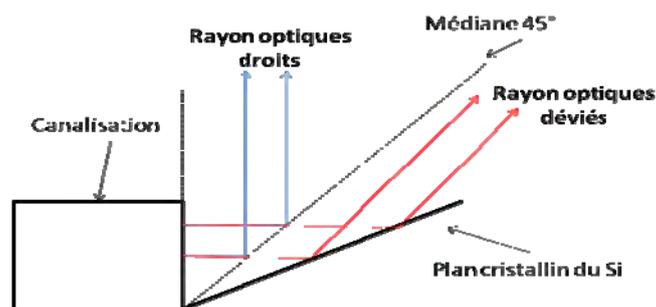


Figure 184. Schéma des attaques possibles du silicium suivant son plan cristallin.

L'angle de déviation n'est pas forcément critique si l'observation se fait à proximité du miroir. Malheureusement, pour observer les dispositifs nous utilisons des zooms de 2,5x ou de 5x soit au moins avec un centimètre d'espace entre la lentille et le substrat. Ainsi la zone observée sort du champ de vision pour des plans du miroir orientés à 35° et $54,74^\circ$.

Utilisation d'un mini-miroir :

Il existe des mini-miroirs commercialisés de taille de l'ordre du mm. Pour notre utilisation, il existe de taille 5*5*5 mm avec un angle de 45° recouvert d'or, chez Thorlabs. Ils peuvent être recouverts de différents métaux pour avoir une meilleure réflexion selon la longueur d'onde.

Cependant, la pointe du miroir n'est pas parfaite, elle est « brisée », ce qui impose que le miroir soit utilisé sur la partie centrale, ou au moins, bien au dessus de la pointe. De plus, il doit être placé au plus près de la canalisation pour limiter les effets de diffusion (100µm). Ainsi des dispositifs spécifiques ont été réalisés pour tester cette possibilité d'observation.

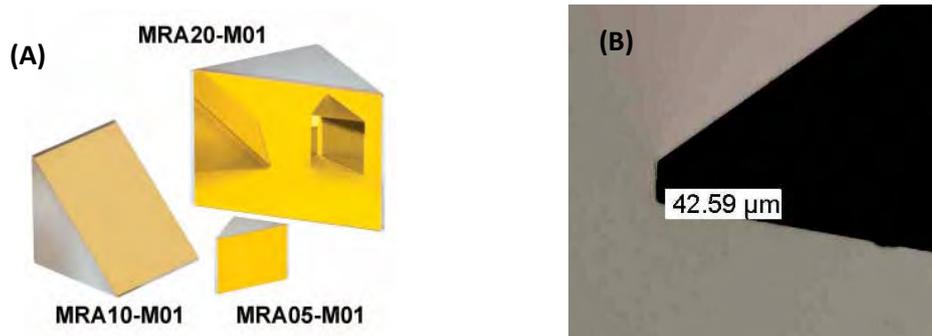


Figure 185. (A) Photo du mini-miroir, (B) photo de la pointe du mini-miroir « brisée » à une hauteur de 43µm. Celle-ci fait 43µm (voir figure185.B), une couche de SU8 de 60µm à alors été rajoutée en dessous du dispositif de façon à le remonter par rapport au substrat et une cavité à été aménagée à proximité de la zone d'intérêt.

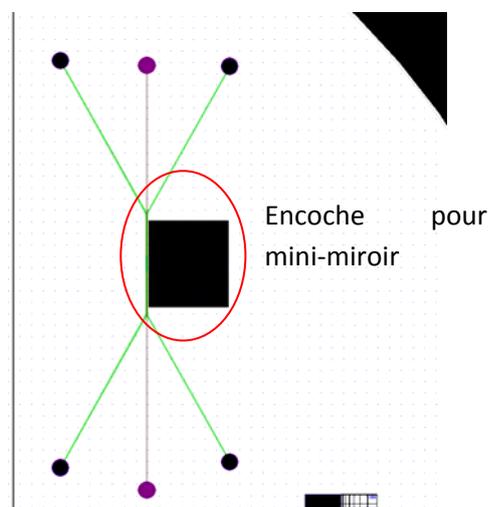


Figure 186. Schéma de la réalisation des dispositifs pour la visualisation de la tranche avec l'utilisation d'un mini-miroir.

Cependant avoir un grand trou juste à côté de la canalisation rend le laminage délicat et de nombreux défauts apparaissent. La plupart des dispositifs sont ainsi percés au niveau de l'encoche pour le mini-miroir car la bande des 100µm séparant la canalisation du trou n'est pas suffisante pour avoir une bonne adhésion du film sec de SU-8.

Nous avons quand même réussi à visualiser l'écoulement de fluorescéine à travers la canalisation. Cependant les observations effectuées ne sont pas concluantes.

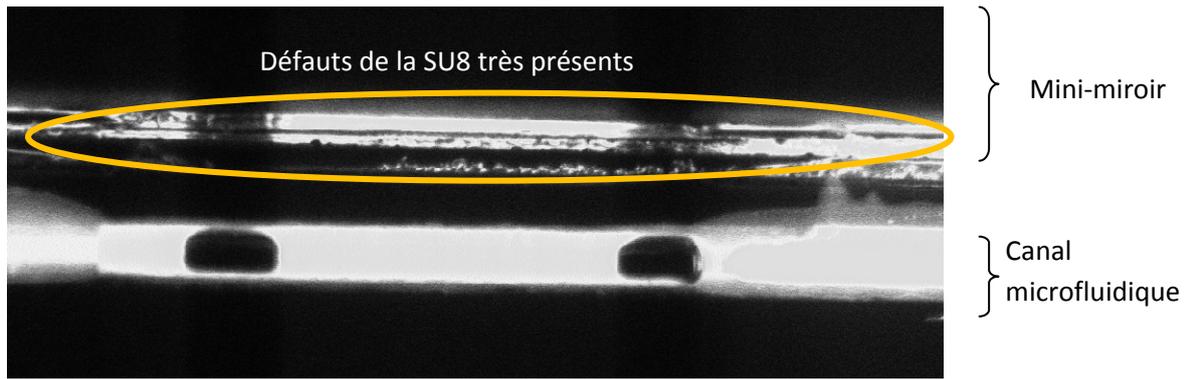


Figure 187. Observation de l'écoulement de fluorescéine dans la canalisation par l'intermédiaire d'un mini-miroir placé au plus près de la canalisation.

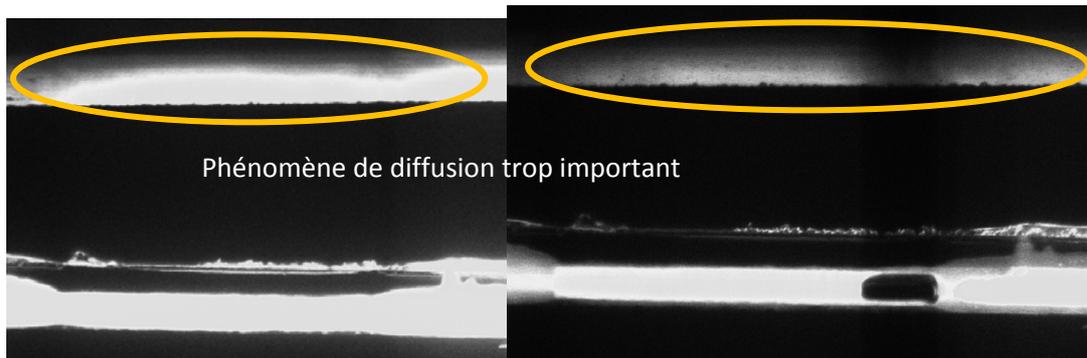


Figure 188. Observation de l'écoulement de fluorescéine dans la canalisation par l'intermédiaire d'un mini-miroir éloigné de 500µm environ de la canalisation.

Finalement trop proche du bord de la canalisation, les défauts de la SU-8 sont très visibles et masquent l'observation. Mais loin n'est pas forcément mieux la diffusion jouant un rôle important.

Les expériences sont donc loin d'être concluantes et bien que nous puissions voir la présence des bulles dans la canalisation, ou bien les limites de la partie commune, nous devinons plus que nous ne voyons. Il est alors impensable de pouvoir visualiser des billes qui s'écoulent d'une canalisation à l'autre. Cette option est donc abandonnée.

Montage spécifique

Nous avons vu que l'implantation d'un mini-miroir est techniquement délicate et que, de plus, la qualité de l'image n'est pas suffisante pour nos applications. Nous nous tournons donc vers une deuxième possibilité, à savoir, l'observation sur la tranche avec un objectif et une caméra déportés.

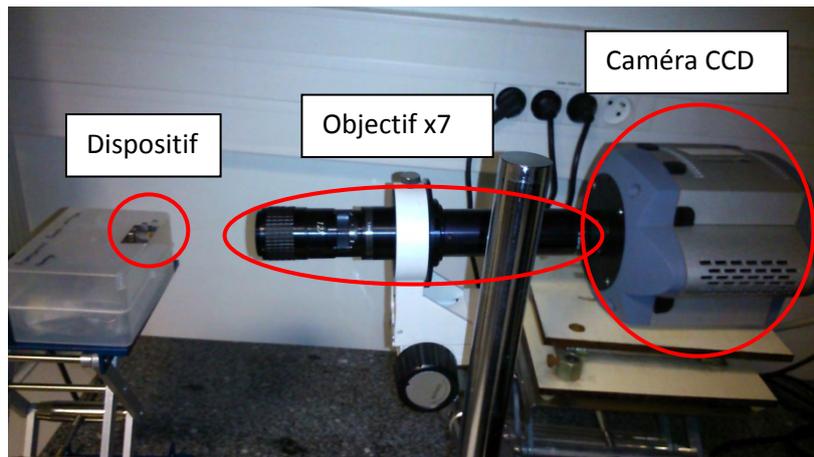


Figure 189. Montage de la manip pour la visualisation sur la tranche

Nous choisissons un objectif de grande focale (~20 cm) car en raison de l'encombrement des expériences il ne serait pas possible de placer un objectif en quasi contact avec la puce.

Pour faire un premier test nous choisissons de travailler avec un zoom x7, sur une canalisation préalablement coupée dans la longueur. Différentes photos très convaincantes ont pu être prises comme illustrées figure 190 et 191. Nous n'avons pas pu confirmer ce résultat avec des canalisations fermées.

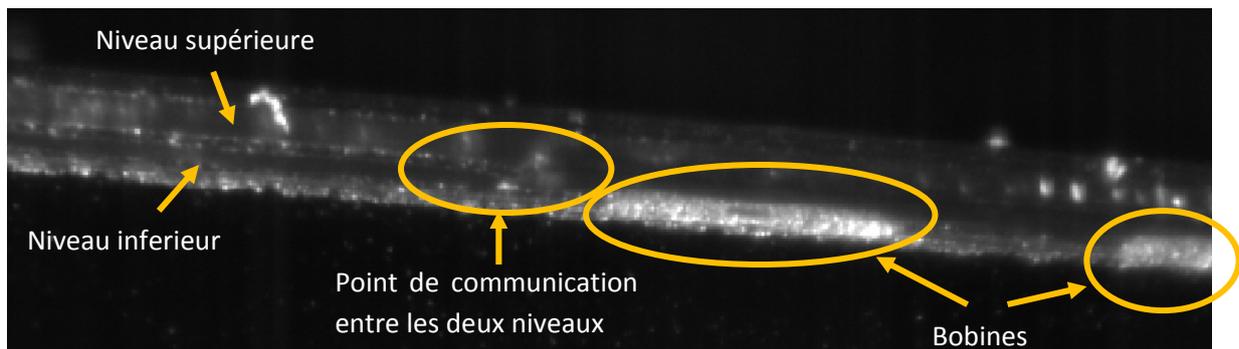


Figure 190. Visualisation d'un dispositif de tri 1-3D3 sur la tranche, incliné.

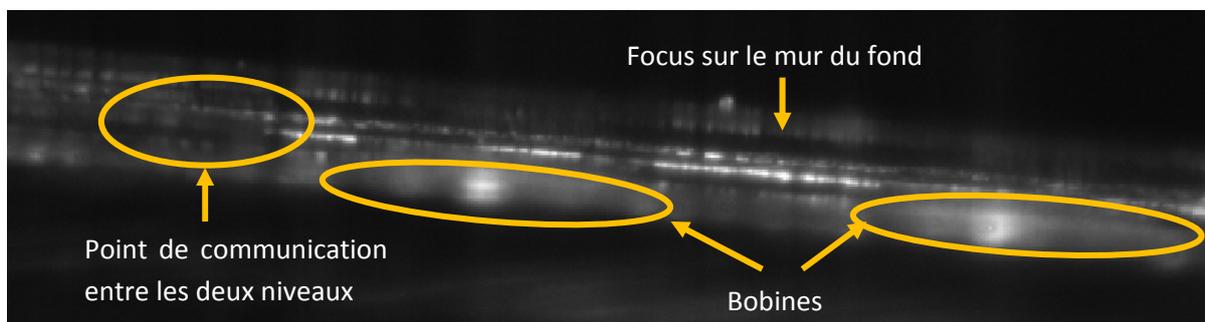


Figure 191. Visualisation d'un dispositif de tri 1-3D3 sur la tranche, aligné horizontalement.

En conclusion, nous voyons que quelle que soit la technique, la mise en place d'un système d'observation par la tranche, reste compliquée et donc dans un premier temps nous avons choisis de séparer les fluides dans différents canaux de sorties et regarder dans chaque canal ce qu'il y a.