



**HAL**  
open science

# MICROFLUIDIQUE DE GOUTTES POUR LES ANALYSES BIOLOGIQUES

Max Chabert

► **To cite this version:**

Max Chabert. MICROFLUIDIQUE DE GOUTTES POUR LES ANALYSES BIOLOGIQUES. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00180994

**HAL Id: tel-00180994**

**<https://theses.hal.science/tel-00180994>**

Submitted on 22 Oct 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Institut Curie

## LABORATOIRE PHYSICO-CHEMIE CURIE

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité : Physique des liquides

*présentée par :*

**Max CHABERT**

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

*Sujet de la thèse :*

## Microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques

*soutenue le 21 Septembre 2007 devant le jury composé de :*

M. Jean-Francois JOANNY	Président du jury
M. Mathieu JOANICOT	Rapporteur
Mme. Marie-Claude POTIER	Rapporteur
M. Yves FOUILLET	
Mme. Patricia DE CREMOUX	
M. Johann ROERAADE	
M. Kevin DORFMAN	Membre invité
M. Jean-Louis VIOVY	Directeur de thèse



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction : microfluidiques</b>	<b>3</b>
1.1	Microfluidique : mise en œuvre, avantages et inconvénients . . . . .	4
1.1.1	Propriétés des systèmes miniaturisés . . . . .	5
1.1.2	Fabrication de microsystèmes . . . . .	12
1.2	Microfluidique de gouttes . . . . .	16
1.2.1	Manipulation directe de gouttes . . . . .	17
1.2.2	Génération et manipulation de gouttes en flux . . . . .	21
1.2.3	Applications générales de la microfluidique de gouttes . . . . .	28
<b>2</b>	<b>PCR microfluidique</b>	<b>37</b>
2.1	La PCR : principe, applications et matériel . . . . .	37
2.1.1	Principe général . . . . .	37
2.1.2	Méthodes et applications . . . . .	41
2.1.3	Matériels commerciaux existants . . . . .	46
2.2	Systèmes de PCR microfluidiques . . . . .	47
2.2.1	PCR microfluidique en chambre . . . . .	48
2.2.2	PCR microfluidique en flux continu . . . . .	51
2.3	Système de PCR développé lors de cette thèse . . . . .	55
2.3.1	Conception des systèmes thermiques et fluidiques . . . . .	56
2.3.2	Automatisation du système . . . . .	71
2.4	Résultats obtenus . . . . .	80
2.4.1	Tests de contamination et de reproductibilité . . . . .	80
2.4.2	Tests sur échantillons cliniques . . . . .	90
2.5	Conclusions et perspectives . . . . .	92
<b>3</b>	<b>Encapsulation de cellules uniques</b>	<b>97</b>
3.1	Biologie cellulaire et microfluidique . . . . .	98
3.1.1	Manipulation microfluidique de cellules . . . . .	99
3.1.2	Confinement de cellules en microfluidique diphasique . . . . .	103
3.2	Description du système utilisé . . . . .	106
3.2.1	Dispositif fluide . . . . .	106
3.2.2	Principe de fonctionnement . . . . .	108
3.3	Caractérisation expérimentale . . . . .	112

## 2 Table des matières

---

3.3.1	Diagramme de phase . . . . .	113
3.3.2	Statistiques d'encapsulation et de tri des cellules . . . . .	120
3.4	Conclusion . . . . .	126
<b>4</b>	<b>Électrocoalescence de microgouttes</b>	<b>129</b>
4.1	Coalescence de gouttes : introduction . . . . .	129
4.1.1	État de l'art « microfluidique » . . . . .	129
4.1.2	Électrocoalescence : principes . . . . .	135
4.2	Caractérisation du système d'électrocoalescence . . . . .	139
4.2.1	Caractéristiques du système . . . . .	139
4.2.2	Résultats expérimentaux . . . . .	143
4.3	Conclusion . . . . .	153
<b>5</b>	<b>Conclusions</b>	<b>155</b>
	<b>Annexes</b>	<b>158</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>164</b>

# Chapitre 1

## Introduction : microfluidiques

Que dire d'un domaine à la fois ancien dans les principes qui le fondent et pourtant complètement d'actualité dans la recherche actuelle, fourmillant d'idées nouvelles et d'applications originales? La microfluidique a connu un véritable essor depuis le début des années 1990, s'est divisée en plusieurs branches allant de la mécanique des fluides jusqu'à la biologie en passant par la chimie, pour arriver aujourd'hui à un point de maturation tel que les promesses faites par cette jeune discipline en termes d'application à ces divers domaines commencent à être tenues. Si l'on peut désigner la microfluidique comme une « vieille » discipline, c'est que celle-ci est basée sur des écoulements fluides à petite échelle (de 10 à 100  $\mu\text{m}$  typiquement), dont l'étude expérimentale remonte maintenant à plus de 150 ans grâce au médecin français Jean-Louis-Marie Poiseuille, qui s'intéressait à la circulation du sang dans des capillaires [Poiseuille, 1846]. Il s'agit toutefois d'une approche extrêmement réductrice, on pourrait de même déclarer que la mécanique des fluides a cessé d'être un axe de recherche entre 1820 et 1850 lorsque Navier puis Stokes ont posé les équations fondatrices de ce domaine. Nous fixerons donc les débuts de notre récit à la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle.

La microfluidique appartient au champ plus large des microsystèmes électromécaniques ou MEMS (micro-electromechanical systems en anglais). Suite au discours visionnaire de Feynman en 1959 suggérant que la miniaturisation pourrait permettre l'étude de phénomènes complexes et alors peu accessibles, desquels devrait découler nombre d'applications potentielles, les premiers MEMS, surfant sur le développement spectaculaire de l'industrie de la microélectronique et de la technologie du silicium, apparaissent dans les années 1980. Des exemples de MEMS « grand public » sont ainsi les actionneurs d'airbag ou les têtes d'imprimantes à jet d'encre, faisant intervenir phénomènes électriques, fluidiques et mécaniques au sein d'un système de quelques centaines de microns fabriqué en silicium. Parallèlement, la microfluidique, s'intéressant plus particulièrement au mouvement des fluides au sein de canaux microfabriqués va trouver naturellement ses premières applications dans l'analyse biologique ou chimique. Au delà de quelques tentatives isolées d'intégration de canaux micrométriques, de pompes et de vannes sur support silicium, que l'on

voit apparaître dès 1975, c'est en 1990 que se profile le concept de « laboratoire sur puce », avec la promesse d'améliorer rendement et vitesse des analyses chimiques ou biologiques par intégration de multiples étapes au sein de microcanaux permettant de travailler sur des volumes inférieurs au microlitre [Manz *et al.*, 1990b]. Les « puces » microfluidiques sont le support des microcanaux, par analogie avec les puces électroniques supportant les circuits intégrés, et c'est sur ce principe que va se développer une multitude d'applications. Il est important de mentionner ici que si, comme le suggérait déjà Feynman, la microfluidique n'a pas donné naissance à des phénomènes physiques nouveaux, elle a permis et motivé de nombreuses études théoriques fondamentales, évidemment sur différents types d'écoulements à petite échelle, mais aussi dans des domaines plus éloignés comme la cinétique chimique ou l'électrophorèse d'ADN.

Après ce chapitre d'introduction, ce manuscrit se composera de trois parties principales. Les deux premières aborderont successivement l'utilisation de la microfluidique pour effectuer la polymérase chain reaction (PCR) au sein d'un système diphasique original mis au point dans notre laboratoire, et la compartimentation de cellules uniques au sein de microgouttes. Enfin, un dernier chapitre démontrera le fonctionnement d'une brique technologique permettant de fusionner deux microgouttes au sein d'un laboratoire sur puce.

L'introduction de cette thèse, quant à elle, est divisée en deux parties principales. La première traite des techniques générales utilisées en microfluidique et des avantages inhérents à la réduction des dimensions des écoulements, illustrés à travers quelques exemples concrets de réalisations. La seconde partie introduit le concept et les champs d'application de la microfluidique de gouttes (ou diphasique, ou bien encore digitale), objet principal de ce manuscrit. Dans le cadre de l'utilisation de ces méthodes pour l'analyse biologique, certains exemples seront traités de façon plus détaillée dans les chapitres suivant cette introduction. Le lecteur pourra pour la signification de certains nombres ou symboles rencontrés au cours de la lecture se reporter en annexe à la fin de cette thèse.

## 1.1 Microfluidique : mise en œuvre, avantages et inconvénients

Les premières applications microfluidiques voient donc le jour dans les années 1990 et consistent principalement en la miniaturisation de techniques classiques d'analyse telles que la chromatographie en phase liquide [Manz *et al.*, 1990a] ou l'électrophorèse [Harrison *et al.*, 1992]. Ces méthodes progressent jusqu'aux années 1995 avec l'intégration de détections optiques ou électrochimiques et l'amélioration des performances de séparation, ainsi que l'utilisation sur puce de techniques de séparation plus élaborées.

C'est à partir de 1995 que la microfluidique dépasse le stade de nouvelle méthode

d'analyse pour permettre le déroulement de réactions chimiques au sein des puces, avec par exemple la miniaturisation de la réaction de PCR, qui sera décrite plus en détail dans le chapitre 2. Des revues très complètes permettent de retracer tant l'histoire, les techniques et les applications en analyse de la microfluidique [Auroux *et al.*, 2002; Dittrich *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2002; Vilkner *et al.*, 2004] que la physique [Squires & Quake, 2005; Stone *et al.*, 2004] sous-tendant cette jeune discipline. Pour l'aspect tout aussi important concernant la synthèse chimique en microréacteurs, on pourra se reporter à Jensen [2001] et Brivio *et al.* [2006]. Citons aussi l'édition spéciale 2006 du journal Nature (volume 442, p.351-418, 27 juillet 2006) où plusieurs figures reconnues du domaine illustrent les applications nombreuses de celui-ci. Dans cette première partie, nous introduirons les nombres caractéristiques de la microfluidique ainsi que les méthodes principales de fabrication des puces et de contrôle des fluides utilisés en leur sein.

### 1.1.1 Propriétés des systèmes miniaturisés

A partir de quelques ordres de grandeur, nous définissons ici les particularités physiques des écoulements à petite échelle. C'est des propriétés de ceux-ci que découlent les avantages des systèmes microfluidiques ainsi que les difficultés inhérentes à leur conception.

#### 1.1.1.a Nombres caractéristiques

La microfluidique utilise des écoulements à une échelle variant de quelques dizaines à quelques centaines de microns (à titre de comparaison, un cheveu fait environ cent microns de diamètre). Pour la majorité des liquides usuels, depuis l'eau jusqu'à une huile relativement visqueuse (quelques centaines de mPa.s pour la paraffine), à des vitesses raisonnables compte tenu des dimensions du système ( $< 0,1$  m/s), le nombre de Reynolds  $R_e$  dans les microsystèmes est faible, typiquement inférieur à 0,1. Rappelons que ce nombre compare les effets inertiels et les effets visqueux, et que les écoulements se situent donc ici dans le régime visqueux. L'équation de Stokes, simplification de l'équation de Navier-Stokes présentée en annexe, est donc applicable aux écoulements des liquides incompressibles en présence et s'écrit en régime stationnaire :

$$\eta \vec{\Delta} \vec{v} = -\vec{\nabla} P + \vec{f}_v \quad (1.1)$$

où  $\vec{f}_v$  représente d'éventuelles forces volumiques,  $P$  la pression et  $\vec{v}$  la vitesse en un point de l'écoulement.

Lorsque le flux est contrôlé en pression, les écoulements auront donc une allure parabolique de Poiseuille. D'autre part, le nombre de Reynolds permet de discriminer les écoulements laminaires des écoulements turbulents. La transition laminaire/turbulent est généralement fixée à  $R_e \sim 2000$ , l'écoulement devenant transitoire à  $R_e \sim 50$  : même dans le cas extrême d'un liquide usuel peu visqueux s'écoulant dans

un canal de taille millimétrique à grande vitesse, on restera donc dans le cas d'un écoulement laminaire. Globalement, les écoulements liquides monophasiques dans les systèmes microfluidiques restent relativement simples, ce qui offre un contrôle poussé des conditions expérimentales en leur sein. Enfin, du fait de la linéarité de l'équation de Stokes, l'écoulement est réversible, ce qui peut-être utilisé à des fins de tri.

Un autre aspect important en microfluidique, particulièrement dans le cas des écoulements diphasiques qui nous intéressent dans la suite de cette thèse, est la valeur du nombre capillaire, qui compare les effets visqueux aux effets capillaires. La situation est moins tranchée que dans le cas du nombre de Reynolds. Pour des liquides dont la tension interfaciale varie de quelques mN/m à quelques dizaines de mN/m, et des vitesses toujours « raisonnables », ce nombre peut atteindre l'unité. Ce qui signifie que les forces liées à la viscosité ont la même importance que celles liées au effets capillaires. Il s'agit cependant de situations relativement « rares », et on restera souvent dans une configuration où le nombre capillaire est inférieur à 1, avec des effets capillaires dominant les effets visqueux. Concrètement, une goutte placée dans un flux de fluide immiscible dans une situation de bas nombre capillaire sera peu déformée par le flux de liquide continu, tandis que les lignes de champ de vitesse de ce dernier seront perturbées autour de la goutte. A l'inverse, à nombre capillaire relativement élevé, la goutte sera déformée par l'écoulement et le perturbera peu. Nous aurons l'occasion de revenir à ces différences de comportement dans les chapitres 2 et 3. Plus généralement, cette prééminence des forces capillaires fait ressortir l'importance que revêtent les effets de surface par rapport aux effets en volume à cette échelle. Pour fixer les idées, considérons un cube d'un mètre de côté : pour un volume d' $1\text{ m}^3$ , sa surface est de  $6\text{ m}^2$ , soit un rapport surface/volume de  $6\text{ m}^{-1}$ . Pour un cube de  $100\text{ }\mu\text{m}$  de côté, on obtient un volume de  $10^{-12}\text{ m}^3$  pour une surface de  $6 \cdot 10^{-8}\text{ m}^2$ , soit un rapport volume/surface de  $6000\text{ m}^{-1}$ . En conséquence, les forces dites « en volume » (liées à la gravité par exemple) sont vite dominées par les forces dites « de surface » (capillaires ou visqueuses par exemple) lorsque l'on réduit les dimensions d'un système.

### 1.1.1.b Conséquences

Comme toujours, pourrait-on dire, il y a du bon et du mauvais dans les caractéristiques décrites ci-dessus. De par leur faible encombrement, une des plus grandes promesses des systèmes microfluidiques est certainement, par analogie avec la révolution survenue au cours des 50 dernières années dans le monde de l'électronique, la possibilité entrevue d'une intégration poussée de multiples composants au sein d'une même puce. Dans le cadre de systèmes d'analyse, cette intégration permet de regrouper diverses étapes de façon automatisée, amenant ainsi un gain de temps et de sensibilité. Dans le cadre de microsystèmes pour la synthèse chimique, cette intégration permet un gain important en débit par des échanges thermiques facili-

tés et le multiplexage des opérations. Dans tous les cas, la réduction drastique des volumes utilisés pour l'analyse permet de faire des économies tant de réactifs que d'échantillons. D'un point de vue plus fondamental, la diminution des dimensions et le contrôle accru des conditions qui en découle permet l'étude d'objets microscopiques uniques. Enfin, la prédominance des effets de surface présente plusieurs avantages que ce soit pour le piégeage de molécules d'intérêt ou les transferts thermiques accrus.

Chaque médaille ayant son revers, les effets de surface peuvent au contraire nuire à la qualité des analyses du fait de l'adsorption des produits d'intérêt sur les parois. Nous y reviendrons dans la suite de cette thèse. D'autre part, la réduction des volumes utiles est souvent une chimère du fait des importants volumes morts nécessaires pour introduire un échantillon dans une puce. C'est le célèbre problème du « world to chip » pointé par Ramsey dès 1999 [Ramsey, 1999]. En corollaire de ce problème, se pose celui de l'encombrement des systèmes miniaturisés : si une fois de plus l'idée d'une puce laisse envisager un système portable, celle-ci ne représente souvent que la partie émergée de l'iceberg et nécessite souvent un appareillage complexe et volumineux associé pour permettre une analyse fiable.

Au-delà de ces généralités, certains traits caractéristiques des systèmes microfluidiques ont donné naissance à de vastes domaines d'études qui sont traités plus en détail ci-dessous.

**Mélange.** De la laminarité des écoulements découle directement le problème du mélange dans les systèmes microfluidiques. Les deux formes de transport « naturel » d'espèces dans un écoulement, convectif et diffusif, sont généralement comparées par le nombre de Péclet  $P_e$ , défini en annexe. La simple analyse dimensionnelle pourtant traditionnelle du domaine peut ici s'avérer trompeuse : du fait de la faible valeur du coefficient de diffusion, aux échelles que nous considérons, le nombre de Péclet s'avère généralement élevé. En d'autres termes, le mélange de deux flux devrait principalement s'effectuer par convection. Pourtant, du fait de la laminarité des écoulements, le mélange de deux solutés perpendiculairement au flux les transportant a lieu lentement par diffusion. Pour qu'un composé diffuse perpendiculairement au flux sur une distance  $d$ , la longueur nécessaire de canal dans le sens de l'écoulement est donné par  $P_e \cdot d$ .

Le flux laminaire et le mélange lent au sein des microsystèmes peuvent être exploités pour accéder aux propriétés d'un liquide (concentration en soluté, pH, viscosité), par exemple au sein du désormais classique capteur en T ([Kamholz *et al.*, 1999] et figure 1.1). De la même façon, cette possibilité de contrôle précis de flux variés au sein d'un microsystème permet de soumettre un objet d'intérêt (une cellule par exemple) à des variations localisées de concentration ou de soluté et d'étudier sa réponse [Takayama *et al.*, 2003].

A l'inverse, l'absence de mélange efficace peut s'avérer un problème dans le cas d'applications impliquant une réaction rapide entre deux solutés transportés par

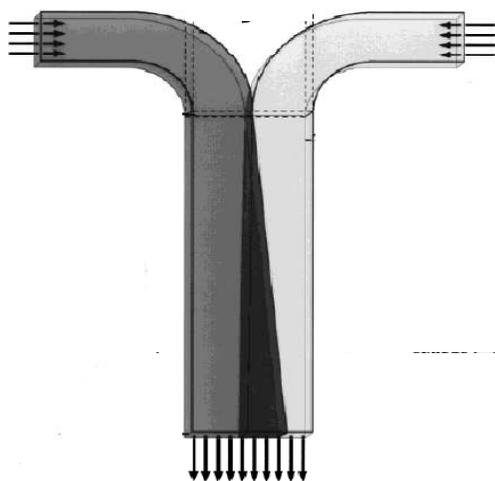


FIG. 1.1 – Exemple de capteur en T pour la mesure des propriétés physiques ou chimiques d'une solution. Les phénomènes prenant place dans la zone d'interdiffusion (tels que la répartition d'un traceur fluorescent) sont suivis optiquement afin d'accéder à ces propriétés. D'après Kamholz *et al.* [1999].

deux flux laminaires ou certaines études de cinétique à temps courts. Le mélange a ainsi fait l'objet de nombreuses études en microfluidique (voir par exemple l'édition spéciale du journal *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 2004, 362). Les 2 communications de Wiggins et Ottino dans cette édition spéciale définissent bien les bases mathématiques de ce qu'on entend par mélange et chaos. Nous en retiendrons qu'un mélange efficace entre deux flux laminaires découle d'une suite d'étirements et repliements de leur interface. Cette notion peut s'apparenter au chaos, d'où le terme souvent utilisé de mélangeur chaotique, bien qu'il s'agisse ici d'une description qualitative plutôt que d'une définition rigoureuse, sur laquelle les spécialistes des systèmes dynamiques n'arrivent eux-mêmes pas à se mettre d'accord. L'exemple le plus parlant d'étirement et de repliement d'interface est la transformation du boulanger : le boulanger pétrit sa pâte en l'étirant et en la repliant de nombreuses fois, et crée ainsi de « l'interface » (figure 1.2).

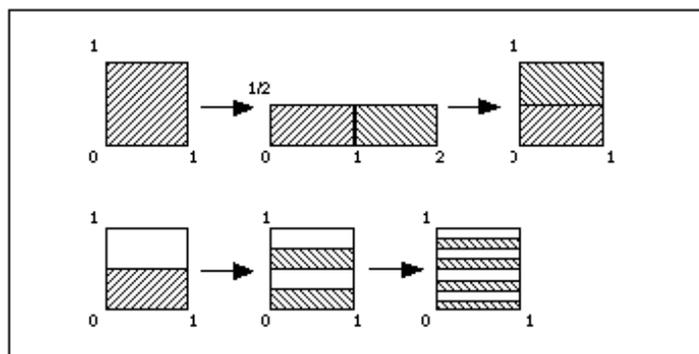


FIG. 1.2 – Principe de la transformation du boulanger.

Dans ce cadre, on trouve des stratégies de mélange dites *passives*, quand c'est la géométrie du canal qui provoque le mélange de deux flux laminaires parallèles

circulant en son sein [Stroock *et al.*, 2002], et *actives*, quand c'est une perturbation extérieure, mécanique [Tabeling *et al.*, 2004] ou électrique par exemple [Fu *et al.*, 2005] qui permet le mélange des deux flux (figure 1.3 A et B). Citons aussi l'utilisation de géométries de « flow-focusing » monophasique [Knight *et al.*, 1998]. Nous reviendrons sur ce type de géométrie dans la partie suivante ainsi qu'au chapitre 3. En résumé, un flux laminaire d'échantillon est focalisé par deux flux l'entourant et s'affine : cet affinement, et la réduction concomitante des distances séparant les solutés permet à la diffusion de jouer un rôle efficace, ce qui permet d'accéder à des mélanges rapides et des cinétiques de l'ordre de la milliseconde [Hertzog *et al.*, 2004] (cinétique de repliement des protéines par exemple, figure 1.3C). Nous verrons enfin dans la prochaine partie que l'utilisation d'écoulements diphasiques permet du fait de la segmentation du flux un mélange efficace.

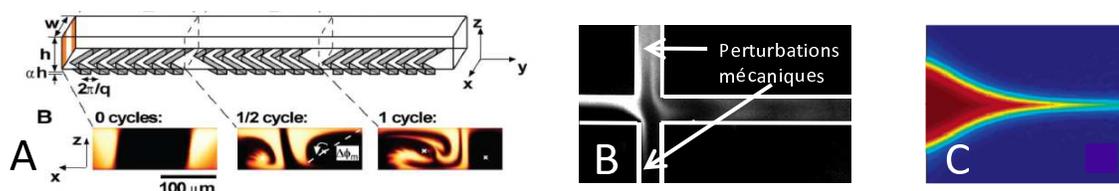


FIG. 1.3 – A : mélangeur passif. Les chevrons sur le fond du canal induisent un cisaillement dans une direction différente de celle de l'écoulement, et donc des écoulements secondaires. L'arrangement périodique de ces chevrons permet un mélange efficace. D'après Stroock *et al.* [2002]. B : mélangeur actif. Des perturbations mécaniques périodiques au niveau de la croix provoquent un mélange chaotique dans le canal d'écoulement. D'après Tabeling *et al.* [2004]. C : flow focusing monophasique. La diminution de l'épaisseur du flux central permet un mélange efficace par diffusion du contenu de celui-ci avec les flux l'entourant. D'après Hertzog *et al.* [2004]

**Contrôle des écoulements.** La manière la plus classique de provoquer un mouvement de fluide consiste évidemment comme dans le monde « macroscopique » à contrôler les écoulements en imposant un débit ou une pression à l'entrée du microcanal. Ces deux méthodes partagent l'inconvénient d'impliquer un profil parabolique de flux. Pour une réaction en flux continu dans un microcanal, les solutés se déplaçant près des parois avanceront moins vite que les composés se trouvant au centre du canal. Cette inhomogénéité en concentration dans le flux implique une diffusion des espèces perpendiculairement à la direction du flux. Celles-ci explorant ainsi toutes les vitesses possibles, on a une diffusion dans le sens de l'écoulement avec un coefficient de diffusion effectif supérieur à celui de la diffusion moléculaire pure. Ces effets combinés impliquent un phénomène d'étalement du soluté connu sous le nom de dispersion de Taylor-Aris [Taylor, 1953], qui conduit à une dilution du soluté et

une possible contamination entre plusieurs produits se suivant dans un canal. Dans le cas par exemple de séparations par chromatographie, les résultats peuvent ainsi être faussés par ce phénomène. Nous verrons dans la prochaine partie que la compartimentation découlant des écoulements diphasiques est une solution à ce problème typique des écoulements de Poiseuille.

D'autre part, du fait des faibles dimensions des microsystèmes, provoquer un écoulement à une vitesse donnée implique souvent une chute de pression (c'est à dire la pression à exercer pour contrer les pertes liées à la viscosité du fluide) importante. Celle-ci varie à débit donné comme l'inverse du rayon à la puissance 4 pour un capillaire circulaire, et prend donc vite une grande importance dans des microcanaux.

Enfin, alors qu'un contrôle du flux en pression permet d'arrêter celui-ci rapidement par équilibrage des pressions, un contrôle en débit (avec une pompe pousseringue par exemple) implique d'attendre un certain temps après l'arrêt de la pompe avant de voir le flux dans le canal devenir nul. Cet effet est lié à la compressibilité des liquides considérés dans le canal [Tabeling, 2003] combinée avec les importantes chutes de pression mentionnées plus haut. Le contrôle en pression, soit par pression hydrostatique, soit grâce à des appareils (commercialisés par exemple par la société Fluigent) peut ainsi pour certaines applications se révéler avantageux.

D'autres types de contrôle d'écoulement, ceux-ci propres à la dimension des canaux utilisés peuvent être mis en œuvre, par exemple des effets électroosmotiques. Une surface chargée attire près d'elle des contre-ions contenus en solution, formant une double couche électronique appelée couche de Debye-Huckel. L'application d'un champ électrique parallèlement aux parois met ces ions en mouvement, ce qui entraîne par effets visqueux (rappelons que nous nous trouvons dans l'approximation de Stokes) l'ensemble du fluide. Si la couche de Debye-Huckel est fine par rapport aux dimensions du canal, on se retrouve cette fois-ci avec un écoulement de type « bouchon », par opposition à un profil parabolique, sans dispersion des solutés. Deux désavantages nuisent cependant à cette méthode : d'abord, l'homogénéité du flux dépend fortement de l'état de surface, parfois difficile à maîtriser ; ensuite, on ne peut déplacer que des solutions portant des charges libres, donc généralement aqueuses. Dans la même veine, l'électrophorèse, déplacement de charges libres sous l'effet d'un champ électrique, est aussi utilisée pour déplacer un soluté au sein d'un microcanal : cette technique est généralement dédiée à la séparation des composants de celui-ci dans un réseau d'obstacles, et peut être « parasitée » ou au contraire optimisée par la superposition d'effets électroosmotiques. Nous verrons aussi dans la suite de cette introduction que des effets électrohydrodynamiques peuvent être utilisés pour déplacer des gouttes dans une huile isolante.

**Séparation d'objets.** Un pan entier de la microfluidique utilise pour la séparation d'objets des obstacles microfabriqués ou microorganisés sous champ. Nous ne détaillerons pas ici leur utilisation, et retiendrons juste que selon la taille et la nature

des obstacles utilisés, on peut trier des objets allant de macromolécules (ADN par exemple, [Doyle *et al.*, 2002]) à des particules de l'ordre du micron [Huang *et al.*, 2004]. Le lecteur intéressé à ce sujet pourra se rapporter à la thèse de N. Minc [Minc, 2005].

Le contrôle laminaire des écoulements à petites échelles a aussi permis la mise au point de méthodes de séparation très élégantes s'appuyant sur les différences de taille entre les particules, qui induisent des comportements en flux distincts. Nous ne décrivons ici que ces méthodes passives. Nous les retrouverons dans le chapitre 3, où nous présenterons aussi des méthodes « actives » de tri utilisant cette fois des champs de force extérieurs au flux lui-même.

Parmi les méthodes passives utilisant uniquement des architectures de canaux particulières, la chromatographie hydrodynamique tire parti du positionnement des particules dans un flux de Poiseuille pour les séparer selon leur taille : les particules de taille comparable à celle du capillaire les contenant avancent plus vite que les petites particules car elles ne visitent pas les zones de vitesse nulle près des parois. Le développement de cette méthode est antérieur à celui de la microfluidique [Small, 1974], mais son application en microcanaux de très faible hauteur ( $1\ \mu\text{m}$ ) a donné lieu à des séparations de nanoparticules et de macromolécules intéressantes [Chmela *et al.*, 2002]. Nous laissons de côté les techniques de field flow fractionation (FFF) qui nécessitent généralement un champ de forces autre que celui créé par le flux pour séparer des particules. De plus, la plupart des méthodes en découlant ne sont pas utilisées en microcanaux. On pourra se reporter à la revue de Giddings, inventeur de la FFF [Giddings, 1993] pour plus d'informations à ce sujet.

Une nouvelle méthode, originale et surtout bien adaptée à l'utilisation des techniques de la microfluidique, a été développée par le groupe de M. Seki à l'université d'Osaka : il s'agit de la « pinched flow fractionation » (PFF, [Yamada *et al.*, 2004]). La PFF consiste à confiner un flux de particules dans une partie de microcanal de section comparable à la taille des plus grosses particules. Comme en chromatographie hydrodynamique, celles-ci resteront relativement centrées dans le canal tandis que les plus petites circuleront près de la paroi. Un élargissement subséquent du canal amplifie la différence de position entre les centres des particules et permet un tri selon leur taille (voir figure 1.4A). On notera ici qu'un flux secondaire est tout de même nécessaire pour orienter les particules vers la paroi. Les mêmes auteurs ont par la suite présenté une méthode utilisant simplement des canaux secondaires perpendiculaires au canal principal et jouant sur la résistance hydrodynamique de chaque canal pour séparer les particules selon leur taille. A chaque bifurcation, les petites particules ont statistiquement plus de chances de partir dans un canal secondaire que les grosses (figure 1.4B). Après plusieurs bifurcations et recombinaisons des flux, on obtient une séparation presque totale des particules selon leur taille ([Yamada & Seki, 2006] et figure 1.4C). Grâce à une architecture précise, les auteurs sont capables de séparer les différentes cellules du sang en les faisant simplement circuler dans leur microcircuit.

Une autre méthode récente consiste à utiliser la gravité pour séparer les micro-particules dans un microcanal placé verticalement et au bas duquel se trouve un virage à  $90^\circ$  : les particules les plus lourdes prendront le virage plus bas que les autres et seront donc placées sur des lignes de champ différentes dans le canal horizontal de sortie [Huh *et al.*, 2007]. Comme on peut s'y attendre lorsqu'une force agissant en volume (ici le poids) est utilisée dans un microsystème, celui-ci n'est pas très efficace, permettant tout juste la séparation correcte de particules de rayons  $1\ \mu\text{m}$  et  $20\ \mu\text{m}$ .

Retenons pour la suite que ces techniques peuvent être adaptées à des gouttes plutôt qu'à des particules et sont donc susceptibles de nous intéresser.

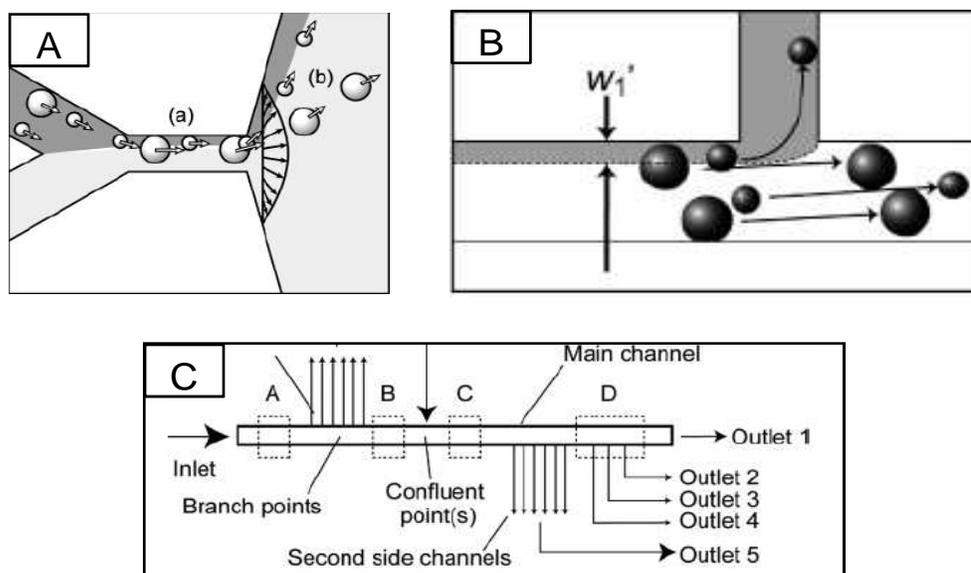


FIG. 1.4 – A : Géométrie typique utilisée pour la pinch flow fractionation. D'après Yamada *et al.* [2004]. B : Principe de la filtration hydrodynamique. C : Dans un système utilisant la filtration hydrodynamique, la succession de filtres et de recombinaison du filtrat avec le flux principal permet une séparation très efficace. D'après Yamada & Seki [2006].

### 1.1.2 Fabrication de microsystèmes

Les premières méthodes utilisées pour construire des microsystèmes découlaient naturellement des technologies silicium de la microélectronique [Manz *et al.*, 1990b]. Si le silicium présente d'un point de vue industriel l'avantage de la facilité de fabrication, il n'est pas idéal du fait de son opacité gênant une éventuelle détection optique, et sa mise en œuvre n'est pas aisée pour des laboratoires non spécialisés. Le verre permet de contourner l'inconvénient de l'opacité, mais la gravure sur verre

reste difficile à réaliser. Les chercheurs se sont donc rapidement tournés vers des méthodes dites « molles » utilisant des élastomères.

### 1.1.2.a Lithographie molle

On peut dire sans peur de se tromper que ce sont les méthodes de « lithographie molle » qui ont permis l'explosion des méthodes microfluidiques au sein de laboratoires aux cultures pourtant très différentes, allant de la physique à la chimie en passant par la biologie. Quel que soit l'élastomère utilisé, ces techniques permettent de produire une multitude de puces identiques par moulage sur un « master » préalablement préparé, généralement par photolithographie. La grande vedette de la lithographie molle est sans conteste le PolydiMethylSiloxane (PDMS). Bien que le déroulement exact de son développement semble plus trouble qu'il n'y paraît, l'histoire a retenu qu'il fut introduit dans le monde de la microfluidique en 1998 par le groupe de G.M. Whitesides à Harvard [Duffy *et al.*, 1998]. L'utilisation du PDMS étant devenue monnaie courante, les méthodes correspondantes sont décrites dans de nombreux articles [Kim *et al.*, 1995; McDonald & Whitesides, 2002], ouvrages [Tabeling, 2003] et thèses [Goulpeau, 2006; Minc, 2005], et notre exposé se limitera ici à la simple présentation du principe plutôt qu'à un guide de mise en œuvre.

Le moule (master) est le plus souvent préparé par photolithographie. En résumé, une résine photosensible est étalée par spincoating (par rotation à quelques milliers de tours par minute) sur un substrat plan et propre (type verre ou silicium). Moyennant quelques étapes de chauffage et une exposition aux UV à travers un masque, on obtient après développement les motifs désirés dans des gammes allant du micron jusqu'à quelques centaines de microns, selon la viscosité de la résine et la vitesse de rotation à laquelle celle-ci est étalée. On peut utiliser des résines négatives (type SU8, Microchem), qui réticulent là où elles sont exposées, ou au contraire des résines positives, ces dernières permettant d'accéder à des canaux arrondis plutôt que carrés.

Le moule étant prêt, le PDMS est mélangé avec un réticulant dans une proportion de l'ordre 10 :1, cette proportion pouvant être variée selon le module élastique final désiré pour le matériau. Le mélange est coulé sur le master placé au fond d'un récipient et le tout est placé au four pour au moins deux heures pour permettre la réticulation. Le PDMS durci ayant épousé les formes du master est démoulé. Afin de finaliser les canaux, le moulage obtenu doit être collé sur un support. Ce dernier consiste généralement en une surface de verre (hydrophile), ou une surface lisse de PDMS (hydrophobe), selon les propriétés désirées. Les deux surfaces à coller sont placées dans un plasma <sup>1</sup> pendant un temps compris entre 30 et 90 secondes. Les deux surfaces alors oxydées se collent facilement de façon irréversible. La liaison obtenue est solide et c'est généralement une autre partie du circuit qui est détériorée avant

---

<sup>1</sup>on utilise idéalement un plasma à oxygène, mais le plasma à air fonctionne bien si le vide n'est pas trop important

que celui-ci ne se décolle. Juste après oxydation et collage, les surfaces obtenues sont hydrophiles et chargées, et selon les applications il faut replacer le circuit à 65°C pour une nuit afin d'avoir récupération hydrophobe du PDMS [Kim *et al.*, 2000].

Le PDMS permet incontestablement une microfabrication simple et rapide des microsystèmes. Il présente cependant des défauts, le principal étant d'être gonflé par de nombreux solvants. Selon le composé organique utilisé, il sera possible de travailler quelques heures avec un circuit en PDMS (avec des huiles de type alcane ou silicone par exemple), mais dans le cas de solvants plus agressifs (acetone, styrène), la puce sera inutilisable en moins d'une minute. Deux autres caractéristiques du PDMS peuvent se révéler importantes dans le cadre de certaines applications : il est perméable à l'air, et du fait de son élasticité se déforme pour des pressions supérieures à quelques centaines de milli-bars [Gervais *et al.*, 2006].

De nouveaux procédés utilisant des substrats plastiques en lieu et place du PDMS ainsi que d'autres méthodes de fabrication des moules ont été développées dans notre équipe [Paul *et al.*, 2007] afin de contourner ces propriétés du PDMS. A partir de masters supportant une température de travail plus élevée que ceux en SU8, des canaux peuvent être formés par lamination à chaud d'un film en COC (cyclic olefin copolymer) sur le moule puis collage du motif obtenu sur un film plat de COC grâce à un mélange de solvants. Cette méthode est éventuellement transposable à d'autres matériaux thermoplastiques, fluorés par exemple, ce qui nous le verrons dans le chapitre 2 pourra s'avérer utile. Dans ce cadre, l'utilisation de films photosensibles (type SY300, Elga Europe) appliqués par laminage avant exposition permet une fabrication facile de moules robustes. D'autres procédés permettent également d'accéder à un prototypage rapide et bon marché à partir de résines thiolènes [Cygan *et al.*, 2005] ou d'un équivalent fluoré du PDMS, photoréticulable [Rolland *et al.*, 2004]. Des méthodes de photoablation laser, moins « haut débit », permettent de créer des microcanaux dans d'autres matériaux, polyimide par exemple [Barret *et al.*, 2006].

### 1.1.2.b Exploitation et modification des propriétés du PDMS

Le PDMS, de par sa mise en œuvre facile et son élasticité, permet d'intégrer des pompes et des valves au sein même d'une puce en utilisant la superposition de plusieurs couches de ce matériau. C'est la méthode de lithographie molle multi-niveaux (MSL, multilayer soft lithography), développée par le groupe de Steve Quake à Caltech [Unger *et al.*, 2000]. Supposons qu'au lieu d'utiliser une épaisse couche de PDMS, on « imprime » les canaux sur une fine membrane de PDMS, déposée par spin-coating par exemple. On peut ensuite sur cette membrane coller une seconde architecture de canaux permettant de contrôler l'ouverture et la fermeture des premiers, constitués dans la membrane collée sur une surface plane (voir figure 1.5). En appliquant une pression dans les canaux du dessus, on défléchit la membrane les séparant du canal fluide. On dispose ainsi de canaux d'actionnement actionnables par les canaux de contrôle situés au-dessus d'eux. Afin d'obtenir une fermeture ef-

ficace des canaux d'actuation par les canaux de contrôle, il est important que les premiers soient semi-circulaires et non carrés, ce qui nécessite l'utilisation de masters fabriqués à partir de résine positive. Cette technique a ainsi été utilisée pour construire des micropompes peristaltiques et des réseaux complexes de chambres séparées par des microvalves (« valves à la Quake ») [Thorsen *et al.*, 2002]. Les microsystèmes hautement intégrés en résultant sont aujourd'hui commercialisés par la société Fluidigm.

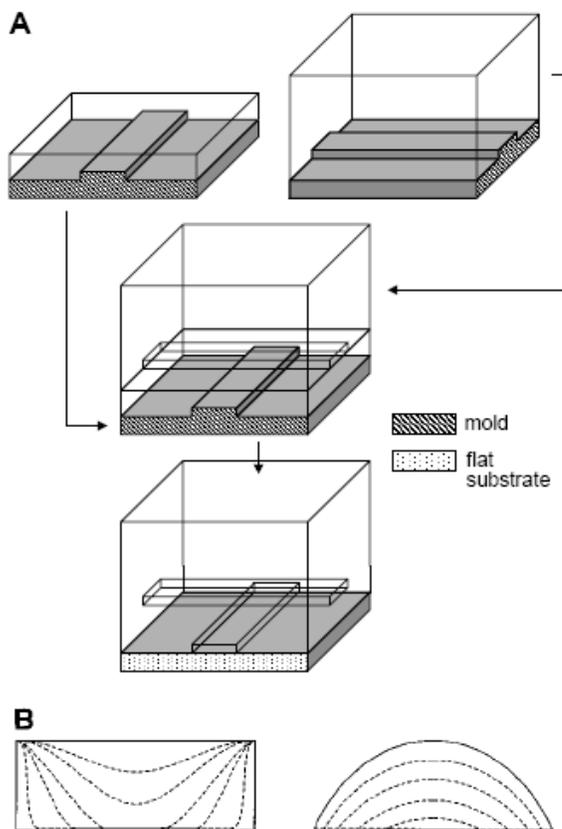


FIG. 1.5 – Principe de la MSL. A : fabrication d'une architecture multini-veaux. B : déflexion de la membrane correspondant à l'application d'une pression dans le canal de contrôle. Dans le cas d'un canal carré (à gauche), la déflexion de la membrane ne permet pas de fermer entièrement le canal. D'après Unger *et al.* [2000].

Le PDMS est naturellement hydrophobe et non chargé. Cet état de surface n'est pas toujours idéal puisqu'il peut conduire à l'adsorption de protéines par interaction hydrophobe et gêner les phénomènes électrohydrodynamiques. Les traitements de surface se sont donc beaucoup développés, utilisant principalement des procédés de silanisation, dont un exemple sera donné au chapitre 2 et en annexe 1. D'autres méthodes consistent à « faire pousser » des chaînes polymères depuis une surface sur laquelle se trouvent des initiateurs de polymérisation (benzophénone par exemple) fixés de façon covalente ou adsorbés. Une revue détaillée des techniques de traitement disponibles ainsi que des méthodes de caractérisation des revêtements obtenus peut être trouvée dans Pallandre *et al.* [2006].

## 1.2 Microfluidique de gouttes

Nous avons abordé dans la partie précédente les phénomènes qui caractérisent la microfluidique en général, ainsi que les avantages et les inconvénients découlant naturellement des phénomènes physiques à l'oeuvre. Nous allons maintenant essayer de démontrer que dans le cadre de certaines applications, l'utilisation d'écoulements diphasiques permet de dépasser les limitations de la microfluidique monophasique (mélange, dispersion des composés) tout en conservant ses atouts. L'utilisation d'écoulements diphasiques trouve un écho dans trois principaux champs d'application : la « fabrication » d'objets microscopiques (émulsions ou microparticules par exemple), la synthèse en chimie et l'analyse biologique ou chimique.

Après avoir abordé les méthodes principales permettant de générer et de contrôler des gouttes en microsystèmes, nous décrirons ces champs d'applications principaux et en quoi ils diffèrent des applications traditionnelles. Des revues sur ce sujet peuvent être trouvées dans [Atencia & Beebe, 2005; Joanicot & Ajdari, 2005]. Remarquons ici que si les écoulements de la microfluidique monophasique peuvent souvent être décrits par des modèles théoriques simples, les phénomènes prenant place au sein de systèmes diphasiques, même simples sur le principe (écoulement d'une goutte transportée par un flux d'huile contrôlé en pression par exemple), deviennent vite très compliqués à décrire. Cet aspect fondamental du domaine est lié à l'apparition de phénomènes de mouillage complexes qui, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, prennent toute leur ampleur à l'échelle micrométrique. A ceux-ci s'ajoutent les complications liées à l'études d'interfaces tridimensionnelles déformables et mobiles. Le but de cette thèse n'est pas de décrire de façon exhaustive chaque phénomène prenant place au sein des systèmes que nous avons développés, mais uniquement d'en tirer une bonne compréhension physique afin de les exploiter au mieux. Les études théoriques appliquées à la microfluidique de gouttes restent pour l'instant relativement rares. Le lecteur intéressé pourra se rapporter à la thèse de L. Ménétrier, associant expériences et interprétation théorique pour plus de détails [Ménétrier-Deremble, 2007]. Quelques références données ci-dessous permettront aussi au lecteur d'y voir plus clair. Enfin, nous le verrons de façon plus particulière dans chaque chapitre, le « microfluidicien diphasique » a la chance de pouvoir s'appuyer sur nombre d'études théoriques remontant jusqu'aux années 1950 et traitant de ces écoulements.

Nous distinguerons dans cette partie les méthodes utilisant un déplacement direct des gouttes sur un substrat (méthodes électrohydrodynamiques, chimiques, optiques...) pour les manipuler et les méthodes utilisant des contrôles en flux ou en pression de l'huile dans laquelle les gouttes sont suspendues. C'est principalement à ces dernières que nous nous intéresserons au cours de cette thèse, même si, nous le verrons dans le chapitre 4, ces méthodes distinctes peuvent parfois être mariées dans le cadre d'applications bien particulières. Nous commencerons donc cette partie par un bref exposé des techniques de manipulation « directe » de gouttes avant de nous

tourner vers celles qui sous-tendent le travail présenté ici. Des aspects plus complexes de manipulation tels la fusion ou le fractionnement de gouttes seront aussi abordés dans le chapitre 4.

### 1.2.1 Manipulation directe de gouttes

Les méthodes les plus populaires pour manipuler des microgouttes reposent généralement sur l'interaction entre le liquide et un champ électrique. D'autres méthodes, moins répandues, utilisent des ondes acoustiques, des phénomènes optiques, ainsi que des traitements chimiques.

#### 1.2.1.a Méthodes électrohydrodynamiques

**Électromouillage et diélectrophorèse.** L'électromouillage utilise un principe connu depuis plus d'un siècle : placer un liquide conducteur dans un champ électrique réduit son angle de contact avec le substrat. Ce phénomène peut-être utilisé pour déplacer une goutte sur un réseau d'électrodes lorsque le réseau d'électrodes est conçu de telle façon qu'une goutte se trouve principalement sur une électrode tout en étant en léger contact avec les électrodes voisines. Lorsque le potentiel de l'électrode sur laquelle se trouve la goutte est nul par rapport à la masse et que l'électrode voisine est portée à un potentiel donné, la goutte se déforme de façon asymétrique vers cette électrode et le gradient de pression résultant induit un déplacement de la goutte vers l'électrode activée (voir figure 1.6A).

Remarquons que le phénomène évoqué peut s'apparenter à de la diélectrophorèse. Celle-ci s'applique à une particule diélectrique de permittivité différente de celle du milieu l'entourant placée dans un champ électrique inhomogène [Pohl, 1958]. Dans le cas où la particule est moins polarisable que le milieu l'entourant, l'inhomogénéité du champ va créer un dipôle dissymétrique autour de la particule, ces charges l'entraînant dans les régions de champ faible (diélectrophorèse négative). Dans le cas de particules plus polarisables que le milieu les entourant, le dipôle inhomogène induit en leur sein va les emmener vers les régions de champ fort (diélectrophorèse positive). Le phénomène fait intervenir la permittivité complexe de la particule dans le cas d'un diélectrique non parfait, et son effet dépend aussi de la fréquence du champ électrique appliqué et de la conductivité des milieux considérés. Électromouillage et diélectrophorèse sont des phénomènes reliés. La diélectrophorèse est aussi utilisée pour déplacer des gouttes sur un substrat plan.

Sans rentrer dans le débat tendant à distinguer ces deux méthodes, nous nous contenterons de remarquer que l'électromouillage est généralement appliqué au déplacement de gouttes conductrices (et joue donc sur la conductivité du milieu considéré, induisant une variation « capillaire ») tandis que la diélectrophorèse peut être utilisée pour déplacer des gouttes diélectriques (d'huile par exemple, en jouant uniquement sur la polarisabilité de la goutte par rapport à celle du milieu l'entourant).

D'autre part, la géométrie utilisée pour des applications d'électromouillage comprend généralement deux électrodes, une électrode de contrôle et une masse entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel en chaque point du système où l'on souhaite déplacer la goutte. La goutte se trouve confinée en hauteur entre ces deux électrodes. La géométrie utilisant la diélectrophorèse consiste généralement en une série d'électrodes placées sous la goutte et entre lesquelles une différence de potentiel est appliquée pour induire un déplacement de la goutte « flottant » librement sur la surface (voir figure 1.6B). La diélectrophorèse correspond aussi à l'utilisation de champ de fréquence élevée ( $>1000$  Hz), alors que l'électromouillage utilise des basses fréquences pour jouer sur le déplacement des charges. Enfin, si comme mentionné plus haut, les gouttes déplacées par électromouillage sont dimensionnées par rapport aux électrodes de façon à « sentir » les électrodes voisines, les gouttes déplacées par diélectrophorèse sont généralement localisées sur une seule électrode à la fois. Une discussion plus détaillée des phénomènes à l'oeuvre et de leur dépendance en fréquence pourra être trouvée dans Jones [2002] et Zeng & Korsmeyer [2004] : ceux-ci peuvent finalement être théoriquement regroupés au sein d'une même expression pour la force électrohydrodynamique s'exerçant sur un fluide.

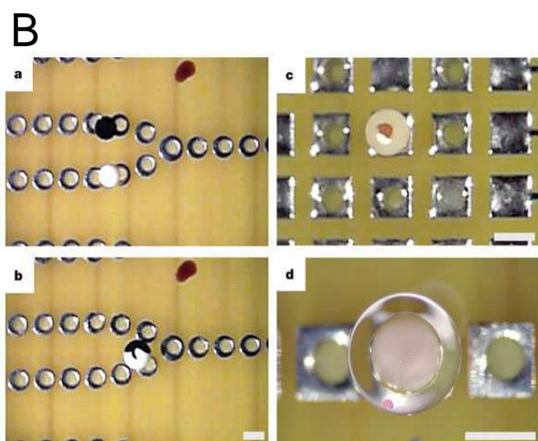
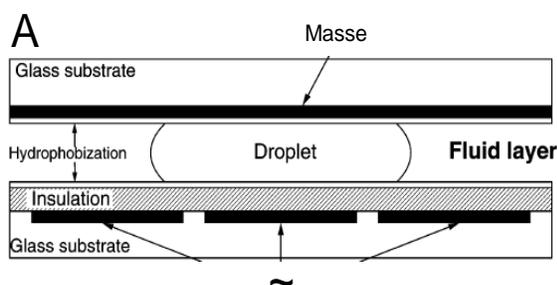


FIG. 1.6 – A : schéma typique d'un circuit permettant de déplacer une goutte dans l'huile par électromouillage. D'après Srinivasan *et al.* [2004]. B : Disposition typique d'une puce utilisant la diélectrophorèse de gouttes flottant librement. D'après Velev *et al.* [2003].

**Limitations de ces méthodes** Dans le cas d'un système diphasique gouttes/air, on imagine sans peine les problèmes d'évaporation (particulièrement exacerbée par

l'effet Joule dans des gouttes conductrices soumises à un champ électrique alternatif haute fréquence), de contamination inter-gouttes et d'adsorption des produits d'intérêt sur la surface qui peuvent se poser. Les systèmes « digitaux » introduits ci-dessus ont donc tout de suite été utilisés dans le cadre de systèmes diphasiques liquide/liquide, ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'évaporation.

De plus, dans le cas typique de systèmes eau non mouillante/huile mouillante, la goutte d'eau n'est pas supposée entrer en contact avec les parois. Cependant, du fait de la tendance des gouttes à s'orienter vers les zones de champ fort, on peut douter que le film d'huile séparant les gouttes des parois suffise à éviter à la longue l'adsorption sur celles-ci des produits contenus dans les gouttes. Si ces systèmes peuvent se révéler efficaces dans le cadre d'applications où la contamination n'est pas un aspect crucial, leurs potentialités pourraient se révéler limitées dans des applications de type Polymerase Chain Reaction (PCR), comme nous le verrons au chapitre 2. De fait, dans un de leurs premiers articles sur le sujet, Pollack *et al.* [2002] mentionnent l'existence d'un seuil préalable au déplacement d'une goutte par électromouillage dans leur système (voir figure 1.6A), typique d'une hystérésis d'angle de contact s'apparentant donc à l'existence d'une ligne triple eau/huile/paroi. Certains auteurs prétendent éviter toute contamination dans le cadre de système diélectrophorétiques où des gouttes libres sont manipulées au sein d'une huile fluorée [Velev *et al.*, 2003], mais aucune confirmation rigoureuse n'a été présentée.

On peut conclure que les systèmes utilisant les méthodes électrohydrodynamiques présentent l'avantage de la flexibilité d'utilisation, le mouvement de chaque goutte pouvant être contrôlé séparément. L'adressage, utilisant les méthodes éprouvées issues de la microélectronique, permet une intégration poussée [Fouillet *et al.*, 2005]. D'autre part, au delà de leur mouvement, la génération des gouttes, leur fusion ou leur séparation deviennent directement accessibles sans ajout d'éléments extérieurs grâce à ce type de contrôle. Le mélange peut aussi être effectué relativement facilement [Paik *et al.*, 2003]. Malgré ces avantages, ils restent limités par leur principe même de fonctionnement : chaque goutte devant être adressée et gérée individuellement dans un réseau d'électrodes, ils ne peuvent prétendre atteindre les débits énormes promis par les méthodes de microfluidique de gouttes décrites dans la prochaine partie. En résumé, ce ne sont pas des systèmes haut-débit, mais ils sont parfaitement adaptés au développement de dispositifs de microfluidique de gouttes portables, puisqu'ils ne nécessitent pas d'éléments de pompage extérieurs. A titre d'exemple d'application, la détection de glucose contenu dans des gouttes transportées sur ce type de puce a pu être réalisée grâce à une réaction d'oxydation enzymatique simple [Srinivasan *et al.*, 2004].

### 1.2.1.b Autres méthodes directes

Des méthodes autres qu'électrohydrodynamiques peuvent être utilisées pour transporter des gouttes au sein d'un milieu. La plupart utilisent, comme l'électromouillage

finale, des gradients de tension de surface. Il s'agit ici de modifier l'énergie de surface du substrat, et le déplacement induit de la goutte peut s'apparenter à une réponse aux effets Marangoni. Parmi elles, citons les méthodes utilisant un *gradient de composition chimique* [Chaudhury & Whitesides, 1992] : sur une surface présentant des zones plus ou moins hydrophobes, les gouttes vont se déplacer vers les zones les plus hydrophiles (donc de haute énergie). Cette méthode a été rendue réversible grâce à des polymères photoresponsifs permettant le déplacement guidé d'une goutte d'huile sur substrat plan [Ichimura *et al.*, 2000].

Dans la même veine, le gradient de tension de surface peut être induit par chauffage local du substrat. Il s'agit du phénomène de *thermocapillarité*, la tension de surface entre la puce et la goutte diminuant lors du chauffage, celui-ci pouvant être induit par des électrodes servant aussi à la détection capacitive de la goutte [Chen *et al.*, 2004] ou par des méthodes de chauffage laser [Kotz *et al.*, 2004]. Dans toutes ces situations, puisque c'est l'énergie de la surface qui est modifiée, on se trouve forcément dans la situation de gouttes touchant celle-ci, donc avec les mêmes problèmes potentiels que ceux mentionnés plus haut. Dernièrement, une méthode basée sur le même principe de chauffage laser mais permettant d'agir sur des gouttes circulant dans un microcanal sans contact avec les surfaces a été démontrée [Baroud *et al.*, 2007] : cependant, il s'agit plus d'une méthode permettant d'agir sur des gouttes transportées en flux dans un microcanal plutôt qu'un moyen « direct » de déplacer les gouttes. Dans la rubrique « laser », citons les méthodes utilisant un piège optique pour déplacer des gouttes dans certaines conditions : elles seront abordées plus en détails dans le chapitre 3.

La manipulation de gouttes par ondes acoustiques de surface est une méthode plus rarement utilisée mais connaissant un succès croissant. Cette méthode consiste à placer les gouttes sur un réseau de transducteurs alimenté électriquement à leur fréquence de résonance et générant par conséquent une onde de Rayleigh [Renaudin *et al.*, 2006]. La pression résultante sur la goutte permet d'induire son déplacement. Une fois de plus, la goutte est en contact avec le substrat. Nous verrons dans le chapitre 2 que cette technique a été appliquée à la PCR en gouttes. Une autre méthode mécanique consiste à soumettre un substrat hydrophobe sur lequel repose une goutte à une vibration asymétrique de fréquence proche d'un mode d'oscillation de la goutte [Daniel *et al.*, 2005].

Pour finir, citons une méthode originale utilisant la lévitation diamagnétique de gouttes pour les manipuler, jusqu'à aujourd'hui seul exemple d'application des techniques de lévitation connues (électrostatique, acoustique, etc...) à la manipulation de gouttes individuelles ayant pour but des applications de type laboratoire sur puce [Lyuksyutov *et al.*, 2004]. A ce propos, le lecteur souhaitant se détendre pourra se reporter à une communication de science amusante sobrement intitulée « Acoustic method for levitation of small living animals » [Xie *et al.*, 2006] (défenseurs des coccinelles s'abstenir). D'autres tentatives de déplacement de microgouttes en 3 dimensions ont été décrites, par exemple en utilisant une goutte circulant entre deux

électrodes auxquelles est appliquée une différence de potentiel (ddp) avec seulement une des électrodes isolée (CEA LETI).

## 1.2.2 Génération et manipulation de gouttes en flux

Les méthodes présentées ci-dessus sont généralement regroupées sous le nom de microfluidique « digitale », principalement du fait de leur ressemblance sur le principe avec les méthodes de la microélectronique, particulièrement en ce qui concerne le support sur lequel elles sont appliquées. Ce terme s'est ensuite étendu à l'ensemble des applications utilisant des écoulements diphasiques en microcanaux, chaque goutte étant considérée comme un « vecteur d'information » indépendant pouvant être transporté sans perte. Nous présentons dans cette partie les deux méthodes les plus classiques pour générer en flux des microgouttes de façon reproductible et contrôlée au sein de microcanaux : la jonction en T et la géométrie de focalisation de flux (flow-focusing). Précisons au préalable que, hors du cadre d'études fondamentales des phénomènes à l'œuvre, la phase continue est en général préférentiellement mouillante par rapport à la phase dispersée dans les canaux considérés. Dans le cas contraire, pour les géométries présentées ci-dessous, on ne forme pas toujours de gouttes, et on obtient souvent un co-flux laminaire de deux fluides immiscibles. La génération de gouttes « à la demande » est également abordée en fin de cette partie.

### 1.2.2.a Génération de gouttes

**Jonction en T.** Il s'agit de la première technique pour générer des gouttes de façon périodique et contrôlée au sein de microcanaux, proposée par Thorsen *et al.* [2001]. La phase continue circule dans un canal principal. La phase dispersée est amenée dans le canal principal par un canal secondaire perpendiculaire à celui-ci. Elle envahit le canal principal et une goutte finit par se détacher (voir figure 1.7A). Dans leur étude fondatrice, Thorsen *et al.* avancent que le détachement de la goutte est lié à une compétition entre tension de surface (tendant à retenir la goutte dans le canal secondaire) et forces visqueuses (tendant à détacher la goutte par cisaillement). Cette théorie est par la suite corroborée par le groupe de R.F. Ismagilov, un des pionniers de la microfluidique de gouttes appliquées à la chimie [Tice *et al.*, 2004], qui décrit une dépendance de la taille du « plot » formé avec le nombre capillaire du système lorsque les liquides utilisés ont une viscosité comparable (par plots – ou plugs en anglais – on entend une goutte confinée par les parois du canal et allongée<sup>2</sup>, voir figure 1.7C).

Cette vision sera par la suite contredite par une étude du groupe de G.M. Whitesides, qui propose à la place une approche (à faible nombre capillaire,  $C_a < 0,01$ )

<sup>2</sup>un raffinement ultérieur, purement anglo-saxon cette fois ci, consiste à désigner par « slug » un plot de phase dispersée mouillant les parois du canal, et par « plug » un plot de phase dispersée ne les mouillant pas. L'académie française ne s'est pas encore penchée sur la traduction de cette finesse.

liée à la chute de pression due à la présence de la phase dispersée dans le canal principal. Celle-ci tend à le « boucher ». Lorsque la chute de pression à travers la phase dispersée devient trop importante, une goutte se détache [Garstecky *et al.*, 2006].

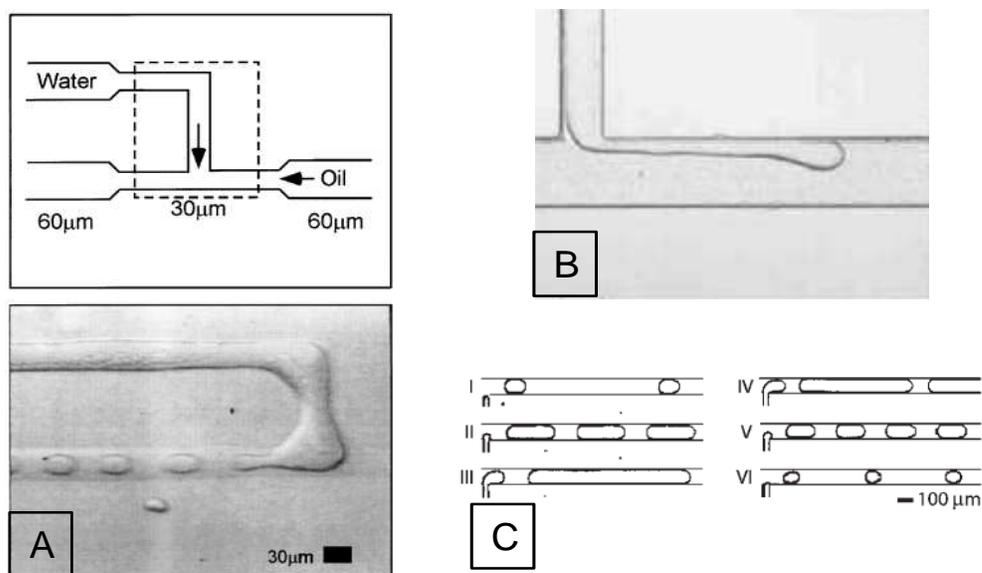


FIG. 1.7 – A : Géométrie typique utilisée pour la formation de gouttes à une jonction en T. Première implémentation, d’après Thorsen *et al.* [2001]. B : Génération de gouttes à une jonction en T lorsque la phase dispersée est partiellement mouillante sur les parois du canal. D’après Nisisako *et al.* [2004]. C : Génération des gouttes lorsque la phase continue est complètement mouillante sur les parois du canal. La plus petite taille de gouttes générée fait au moins la taille du canal principal. D’après Garstecky *et al.* [2006]

Les deux modèles ne sont en fait pas nécessairement contradictoires, le mode de formation des gouttes dépendant fortement du caractère totalement ou partiellement mouillant de l’huile de transport, ainsi que de la largeur du canal principal relativement au canal secondaire. [Dreyfus *et al.*, 2003]. Qualitativement, si la phase dispersée mouille légèrement les parois du circuit, ou si le canal principal est plus large que le canal secondaire, on est plus proche d’un cas où le détachement des gouttes est dû à une compétition entre tension de surface et cisaillement visqueux [Nisisako *et al.*, 2004]. On pourra dans certains cas de cette situation former des gouttes dont le diamètre absolu est inférieur à la largeur du canal principal (figure 1.7B), leur taille étant en dernier lieu limité par la largeur du canal secondaire. A l’inverse, lorsque la phase continue est totalement mouillante sur les parois des microcanaux, et que le canal principal est du même ordre de taille que le canal secondaire ou plus petit, la goutte se détachera à cause de la chute de pression à

travers elle dans le canal principal. On comprend bien dans cette situation qu'il est impossible de former des gouttes de diamètre absolu inférieur à la largeur du canal principal (figure 1.7C). On aura donc formation de « plots » plutôt que de gouttes.

Quel que soit le mode dans lequel on travaille, la taille des gouttes ou « plots » formés est proportionnelle au rapport  $Q_d/Q_c$  avec les symboles définis en annexe. D'une façon générale, il sera préférable de se placer dans une situation où les gouttes sont complètement non-mouillantes sur les parois du capillaire, le contrôle sur la taille des gouttes générées en sera d'autant meilleur.

**Géométrie de flow focusing** Cette géométrie a été suggérée par Ganan-Calvo dès 2001 dans une géométrie cylindrique (en capillaires) pour la formation de bulles d'air dans un liquide [Ganan-Calvo & Gordillo, 2001]. Ce n'est cependant qu'en 2003 qu'elle est appliquée dans une géométrie plane microfabriquée et pour la formation de gouttes d'eau dans l'huile, dans l'article fondateur du groupe d'H. Stone à Harvard ([Anna *et al.*, 2003] et figure 1.8). Cette géométrie fonctionne sur un principe complètement différent de la jonction en T et s'inspire des géométries classiques de « jetting » : la phase dispersée est injectée colinéairement à deux flux d'huile l'entourant. Selon les conditions expérimentales choisies, un jet de phase dispersée peut se former entre les deux flux d'huile. Le co-flux laminaire ainsi créé passe à travers une constriction, ce qui l'affine et induit éventuellement la rupture du jet en gouttelettes. Dans une autre situation, les gouttes peuvent se détacher directement du canal de sortie sans formation de jet : on parle alors de mode de « dripping ». Globalement, la taille des gouttes formées augmente comme dans le cas d'une jonction en T avec le rapport  $Q_d/Q_c$ .

L'intérêt de cette méthode réside principalement dans la largeur de la gamme de taille des gouttes accessibles, celles-ci pouvant indifféremment être plus grandes ou plus petites que la taille de la constriction impliquant la rupture du jet dont elles proviennent. Dans des conditions bien contrôlées de flux ou de pression, la taille des gouttes obtenues est extrêmement reproductible. D'autre part, leur fréquence de génération est généralement relativement haute, de l'ordre du kHz, ce qui pour nombre d'applications, particulièrement de formation d'émulsions ou de microparticules, se révèle très intéressant en terme de débit. En revanche, la rupture du jet en gouttes implique souvent la formation de gouttes secondaires, de taille beaucoup plus faible que les gouttes principales, qui selon les cas peuvent s'avérer gênantes. Nous verrons au chapitre 3 qu'il existe diverses méthodes pour s'en affranchir.

Même si la génération d'émulsions très monodisperses est possible dans ce type de systèmes, leur description analytique est beaucoup plus difficile que celle de la jonction en T. D'une part, elle fait intervenir la notion d'instabilité de jet de Rayleigh-Plateau dans une géométrie non circulaire tendant parfois vers 2 dimensions pour des canaux beaucoup plus larges que hauts. D'autre part, le mouillage des parois par la phase dispersée joue ici un rôle beaucoup plus critique que dans le cas de la jonction en T en influençant fortement la dynamique de formation et de rupture

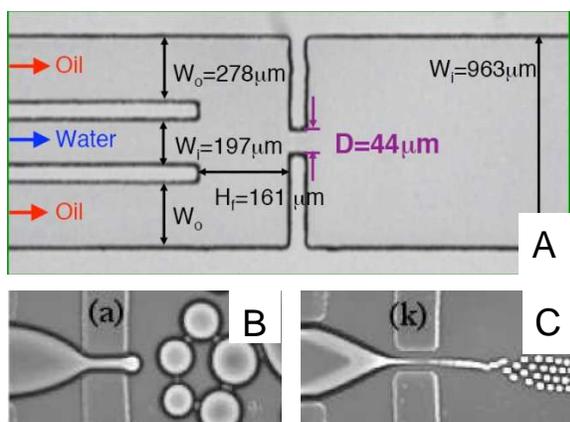


FIG. 1.8 – A : schéma typique d'un circuit permettant de réaliser la focalisation d'un flux central entre deux flux de liquide immiscible. B : fonctionnement du système à un rapport  $Q_d/Q_c$  relativement élevé. C : fonctionnement du système à un rapport  $Q_d/Q_c$  relativement faible. D'après Anna *et al.* [2003].

du jet. Expérimentalement, il est recommandé de se placer dans une situation où la phase dispersée est totalement non mouillante, même si cette situation est souvent difficilement réalisable (voir chapitre 3 par exemple).

Théoriquement, pour des raisons de courbure et d'augmentation d'interface, l'instabilité de Rayleigh-Plateau ne peut se développer dans une géométrie purement à deux dimensions. Ceci peut expliquer que la rupture du jet ait lieu suite au passage dans une constriction ramenant sa largeur à une dimension comparable à sa hauteur. En réalité, une étude théorique et expérimentale portant sur la stabilité de fils polymères subissant une élongation dans un espace confiné entre deux plaques parallèles montre que dans le cas d'un confinement dans une des trois dimensions, il existe un seuil de confinement à partir duquel l'instabilité peut se développer de façon asymétrique, avec une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde trouvée dans le cas axisymétrique [Son *et al.*, 2003].

D'autres études pour le cas précis de la géométrie présentée en figure 1.8, ont été menées avec de l'air contrôlé en pression à la place du liquide central, ce qui simplifie la situation puisque l'air est considéré comme un fluide parfait et le liquide comme complètement mouillant sur les parois du système. Dans cette configuration, les auteurs reprennent la théorie « en pression » développée plus haut pour la jonction en T et expliquent à nouveau le détachement des bulles par la chute de pression liée à sa présence dans la constriction [Garstecki *et al.*, 2005a]. La taille des bulles formées semble indépendante de la tension interfaciale. Cependant, les auteurs n'observent pas de focusing à proprement parler, c'est à dire qu'on ne voit pas d'amincissement du jet d'air et de génération de bulles de taille plus faible que la constriction dans laquelle elles se forment (voir par exemple Garstecki *et al.* [2004], pendant expérimental de la référence précédente, avec contrôle du gaz en pression et du liquide en flux). En revanche, ils rapportent un comportement dynamique intéressant du système, avec doublements de période et génération de plusieurs populations de gouttes lorsque le flux de liquide est augmenté [Garstecki *et al.*, 2005b]. Ce type de comportement semble lié à des phénomènes de couplage par la tension de surface entre la forme des interfaces créées et les contraintes s'exerçant sur les fluides en pré-

sence. Dans une étude expérimentale menée par le groupe de H. Stone [Ward *et al.*, 2005] pour une phase dispersée liquide, ce couplage est avancé pour expliquer la différence de comportement frappante entre un contrôle en flux et un contrôle en pression des deux liquides dans les expériences de flow-focusing. Pour un contrôle « tout en flux », la taille des gouttes change peu lorsque le débit de phase dispersée est augmenté sur une décade (c'est donc la fréquence de génération qui varie). En revanche, pour un contrôle en pression, une multiplication de la pression appliquée à la phase dispersée par seulement deux induit une augmentation conséquente de la taille des gouttes générées. Dans cette étude, le système est dimensionné de telle façon qu'il n'y ait pas de formation de jet ni de gouttes de taille plus faible que celle du capillaire. Mentionnons enfin que malgré la difficulté inhérente à la modélisation du phénomène dans le cas de deux liquides visqueux et mouillant chacun les parois de la puce, une simulation numérique présentée par Dupin *et al.* [2006] permet de retrouver de façon frappante les régimes observés expérimentalement dans Anna *et al.* [2003].

Suite à la première géométrie utilisée pour le flow-focusing en microcanaux, quelques variantes ont été démontrées, dont une première correspondant à une légère modification de l'originale [Xu & Nakajima, 2004]. La seconde est plus intéressante puisqu'il s'agit d'un système 3D microfabriqué, permettant de s'affranchir totalement de l'interaction de la phase dispersée avec la surface et donc d'utiliser indifféremment le système avec des phases dispersées aqueuses ou organiques [Yobas *et al.*, 2006], même si la fabrication du système implique la mise en œuvre de techniques relativement compliquées. Enfin, une dernière méthode, qui sera présentée dans la prochaine partie, utilise l'assemblage de capillaires pour obtenir une géométrie propre à la formation de jets, retrouvant les avantages du circuit précédent avec une technique de fabrication plus accessible.

### 1.2.2.b Utilisation des gouttes

**Mélange au sein des gouttes.** Des recirculations prennent place dans les gouttes. Nous le verrons au chapitre 2, les gouttes « glissent » par rapport au film d'huile les séparant des parois du capillaire avec une vitesse légèrement supérieure, et les conditions de continuité à l'interface induisent ces recirculations. Au sein de la goutte, elles permettent un mélange efficace du contenu, donc à priori une augmentation de l'efficacité de la réaction. La figure 1.9 présente une vue d'ensemble de celles-ci dans le référentiel de la goutte (vitesse  $U$ ). Ces recirculations colinéaires au flux entraînant les gouttes peuvent être exploitées pour réaliser la transformation du boulanger mentionnée précédemment en utilisant des canaux ondulés entraînant des réorientations successives des flux internes à la goutte ([Song *et al.*, 2003a] et figure 1.9).

Dans le cas de plots de solution aqueuse séparés par de l'air (qui mouillent donc les parois), on observe aussi ces recirculations, cette fois liées aux conditions

aux limites à la paroi. Pour un train de gouttes non mouillantes, on observe donc aussi des recirculations dans l'huile les séparant : elles peuvent s'avérer extrêmement nuisibles si du matériel venait à s'échapper des gouttes, puisqu'elles le mettraient alors directement en contact avec une goutte voisine et il y aurait contamination. On observe enfin des recirculations respectivement en aval et en amont de la première et dernière goutte d'un train.

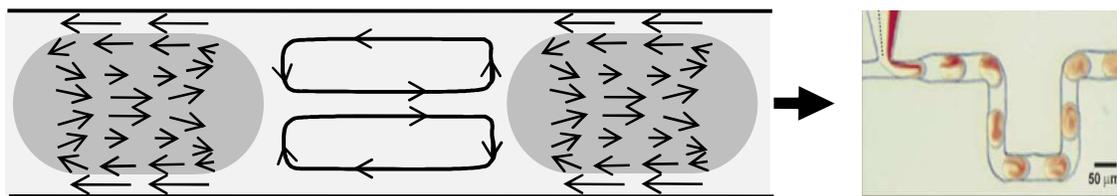


FIG. 1.9 – Recirculations dans et autour de gouttes dans un train de gouttes. Vue dans le référentiel de la goutte, la flèche droite représentant le sens du flux dans le référentiel du laboratoire. L'épaisseur du film séparant les gouttes des parois est exagérée pour une meilleure description. La photo de droite illustre la transformation du boulanger dans une goutte (d'après Song *et al.* [2003a])

Des gouttes plus petites que le canal dans lequel elles sont entraînées sont aussi sujettes à des recirculations, liées au profil de Poiseuille du flux.

**Gouttes à la demande.** Les techniques permettant de générer une goutte à un instant voulu attirent de plus en plus l'intérêt des chercheurs. Dans le cadre de réactions en flux par exemple, il est important de pouvoir générer une goutte ponctuellement pour l'ajouter au mélange réactionnel, sans que cette génération ne soit périodique pour autant. Nous l'avons vu, cette génération est relativement facile dans le cadre de méthodes de manipulation directe des gouttes. Dans le cadre de l'électromouillage par exemple, il suffit d'appliquer une tension à une série d'électrodes se trouvant collée à un réservoir de liquide : un doigt se forme vers la dernière de ces électrodes, et la mise à la masse des électrodes intermédiaires résulte en la rupture du doigt et la formation d'une goutte. Le problème se corse lorsque les gouttes sont générées en flux, et on trouve aujourd'hui peu voire pas de méthodes permettant d'y accéder.

Certains auteurs présentent des méthodes directement inspirées des techniques développées pour les imprimantes à jet d'encre (qui, rappelons-le représentent peut-être le premier grand succès commercial de la microfluidique) : les gouttes sont ainsi générées par cale piezoélectrique, chauffage, champ électrique, mais toutes ces méthodes sont appliquées dans le cas classique de génération de gouttes libres dans l'air, présentant donc peu d'intérêt pour nos applications. Les procédés pertinents dans le cadre de la microfluidique de gouttes se limitent pour l'instant à essayer

de contrôler la fréquence à laquelle sont générées les gouttes par forçage mécanique [Willaime *et al.*, 2006], ou électrique [Link *et al.*, 2006]. Enfin, l'utilisation de l'effet Marangoni décrit dans Baroud *et al.* [2007] permet de retarder la formation des gouttes dans le cas d'un contrôle en flux : on peut penser que cette méthode associée à un contrôle en pression permettrait d'accéder à la goutte à la demande. On trouve enfin dans He *et al.* [2005], article sur lequel nous reviendrons dans le chapitre 3, une méthode de génération de gouttes à la demande dans une jonction en T présentant un fort rétrécissement : la solution aqueuse est amenée en contact avec la phase continue à la limite du T, les pressions sont équilibrées, puis une goutte est détachée par un léger pulse de pression. L'étude de la formation de la goutte n'est cependant pas détaillée, et les premières expériences menées dans notre laboratoire montrent que l'équilibration des interfaces est loin d'être évidente.

Dans la même famille de problèmes, le chercheur est souvent confronté au dilemme suivant dans le cadre d'applications d'analyse : comment former à un débit raisonnable des gouttes aux contenus *tous différents* les uns des autres ? Si la microfluidique de gouttes présente l'avantage de s'affranchir des volumes morts puisqu'ils peuvent être comblés par l'huile de transport et non par la solution d'échantillon, les méthodes de génération présentées plus haut permettent a priori de former nombre de gouttes, mais toutes identiques. Dans le cadre d'applications où chaque goutte doit représenter un réacteur indépendant, celles-ci sont donc plutôt inefficaces ! Nous verrons dans le chapitre 4 que la composition de la goutte peut être variée au moment de sa formation en utilisant par exemple plusieurs flux monophasiques laminaires. Une stratégie alternative consiste à encapsuler des objets différents dans chaque goutte, par exemple cellules ou billes sur lesquelles sont attachées les produits d'intérêts : nous y reviendrons dans le chapitre 3. Enfin, nous avons opté lors de la conception de notre machine de PCR microfluidique (chapitre 2) pour une formation directe des gouttes grâce à un robot et des pompes : les puristes déclareront qu'il s'agit ici de « millifluidique » et non de microfluidique. Il n'en reste pas moins qu'il s'agit pour l'instant de la seule méthode proposée aujourd'hui pour injecter des gouttes variées au sein d'un même microsystème à partir d'un support macroscopique classique.

**Séparation de phases et valves.** Lorsque les gouttes sont utilisées comme microréacteurs, il est intéressant de pouvoir à un certain point les séparer de l'huile les transportant afin de pouvoir conduire une analyse de leur contenu, par exemple dans le cas d'un couplage PCR en gouttes/électrophorèse capillaire. On trouve pour l'instant très peu d'exemples d'achèvement dans ce sens.

S'agissant d'écoulements microfluidiques diphasiques mais pas « à gouttes », on trouve des systèmes exploitant des propriétés de mouillage différentes permettant de maintenir un co-flux stable entre deux phases immiscibles et de récupérer chaque phase séparément en sortie [Tokeshi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2001], mais il ne s'agit pas de la séparation d'une phase dispersée dans une autre.

Dans le cas d'écoulements liquide/air, le groupe de K. Jensen au MIT, spécialisé entre autres dans la synthèse chimique en microfluidique segmentée, a proposé en 2004 un séparateur basé sur des forces capillaires : dans le cas de plots d'éthanol séparés par de l'air, un peigne de canaux initialement mouillé par la phase liquide permet d'évacuer l'éthanol lors de la circulation des gouttes le long de ce peigne sans laisser passer les séparateurs d'air, la tension de surface éthanol/air suffisant à exclure ce dernier du canal d'extraction [Gunther *et al.*, 2004]. Dans un cadre de fonctionnement inversé pour un écoulement solution aqueuse/air, l'utilisation d'un peigne permet de retenir le plot de solution aqueuse tandis que l'air passe à travers [Hosokawa *et al.*, 1999] : le peigne joue ainsi le rôle de valve. On retrouve le même principe dans la thèse de L. Ménétrier-Deremble, cette fois-ci appliqué à des écoulements liquide/liquide et dans le cas de nombres capillaires plus faibles [Ménétrier-Deremble, 2007].

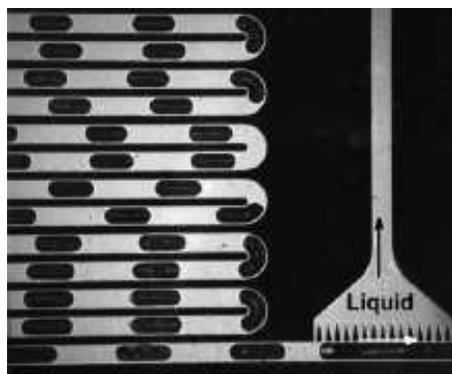


FIG. 1.10 – Séparation de phase air/liquide. L'éthanol correspond aux plots noirs tandis que l'air évacué est en blanc. D'après Gunther *et al.* [2004].

Le groupe de D.T. Chiu démontre un couplage échantillons en gouttes/électrophorèse capillaire grâce à un canal d'amené des gouttes hydrophobe et de section beaucoup plus faible que celle du canal d'électrophorèse, lui-même hydrophile, ce qui évite apparemment la pénétration de l'huile dans le canal de séparation [Edgar *et al.*, 2006]. Enfin, l'application des célèbres « valves à la Quake » à des plots de liquide circulant en microcanaux permet de contrôler l'écoulement des plots, de les fractionner, et éventuellement de les retenir dans une partie du canal tandis que la phase continue circule autour d'eux, ce qui peut en quelque sorte amener à une séparation de phase jouant sur l'empilement de plots successifs [Urbanski *et al.*, 2006].

### 1.2.3 Applications générales de la microfluidique de gouttes

Comme mentionné plus haut, on peut décomposer celles-ci en deux grandes familles. Dans la première, on fait « des gouttes pour les gouttes », c'est à dire que l'intérêt de la microfluidique de gouttes réside principalement dans la formation d'entités identiques pouvant former une émulsion, une mousse ou des microparticules. Dans la deuxième famille, les gouttes sont en quelque sorte des tubes à essais

microscopiques, c'est à dire qu'elles sont abordées en tant que microréacteurs indépendants permettant de réaliser à haut débit et en parallèle diverses opérations de synthèse ou d'analyse. Une fois de plus, le lecteur désirant en savoir plus pourra se reporter à la très complète revue effectuée par Song *et al.* [2006b] du groupe de R. Ismagilov. Une revue traitant plus particulièrement de la synthèse chimique multiphasique peut-être trouvée dans Gunther & Jensen [2006]. Nous mentionnons enfin un champ d'application plus récent et fondamental tendant à utiliser les gouttes comme porteuses d'information logique.

### 1.2.3.a Des gouttes pour les gouttes

**Émulsions.** Il s'agit là de la première application, la plus évidente, de la microfluidique de gouttes : la capacité décrite ci-dessus de générer à haut débit des gouttes de taille extrêmement contrôlée en fait une méthode idéale pour fabriquer des émulsions stables et monodisperses. D'autre part, la parallélisation rendue possible par la petite taille de ces systèmes peut leur permettre d'égaliser les débits offerts par les méthodes en « masse ». C'est donc naturellement que les premières publications des méthodes décrites plus haut s'emploient à démontrer la formation d'émulsions d'eau dans l'huile [Anna *et al.*, 2003; Thorsen *et al.*, 2001], d'huile dans l'eau [Yobas *et al.*, 2006] et d'air dans un liquide quelconque [Ganan-Calvo & Gordillo, 2001; Garstecki *et al.*, 2005a] avec une polydispersité de l'ordre du pourcent seulement.

Ne s'arrêtant pas en si bon chemin, les chercheurs ont ensuite proposé des systèmes permettant de créer des doubles émulsions, particulièrement difficiles à produire en masse. On trouve deux méthodes principales selon qu'une géométrie en T ou de flow-focusing est utilisée.

Les jonctions en double T utilisent de façon astucieuse des propriétés de surface différentes dans chaque T [Barbier *et al.*, 2006; Okushima *et al.*, 2004]. Dans un premier T, la surface du canal est hydrophobe et mouillée par de l'huile, permettant ainsi la formation de gouttes d'eau dans l'huile. La suspension arrive au second T, dont la surface est traitée de façon à être hydrophile et est préférentiellement mouillée par la phase aqueuse, permettant de former des gouttes d'huile dans l'eau, ces gouttes contenant elles-mêmes une goutte d'eau (voir figure 1.11A).

Le cas d'une géométrie de flow-focusing est un peu plus compliqué, et il est recommandé de se reporter à la figure 1.11B pour suivre l'explication. Afin de s'affranchir des effets de surface, une géométrie de jetting fabriquée à partir de capillaires emboîtés est utilisée. Un capillaire de section circulaire à pointe effilée (capillaire 1) est introduit dans un capillaire de section carrée (capillaire 2) dont la hauteur égale le diamètre du premier capillaire, ce qui permet un emboîtement précis des deux parties. Un troisième capillaire (capillaire 3), circulaire de même diamètre que le premier, est lui aussi emboîté dans le capillaire carré de telle façon que la pointe du premier capillaire débouche dans ce dernier. La phase dispersée de l'émulsion primaire circule

dans le capillaire 1. La phase continue de l'émulsion primaire est introduite dans le capillaire 2 par la droite, tandis que la phase continue de la deuxième émulsion (double) est introduite par la gauche. La double émulsion formée partira vers la gauche dans le capillaire 3. Par exemple dans le cas d'une double émulsion « eau bleue » dans « huile » dans « eau verte », l'eau bleue arrivera dans le capillaire 1, l'huile par la droite du capillaire 2 et l'eau verte par sa gauche.

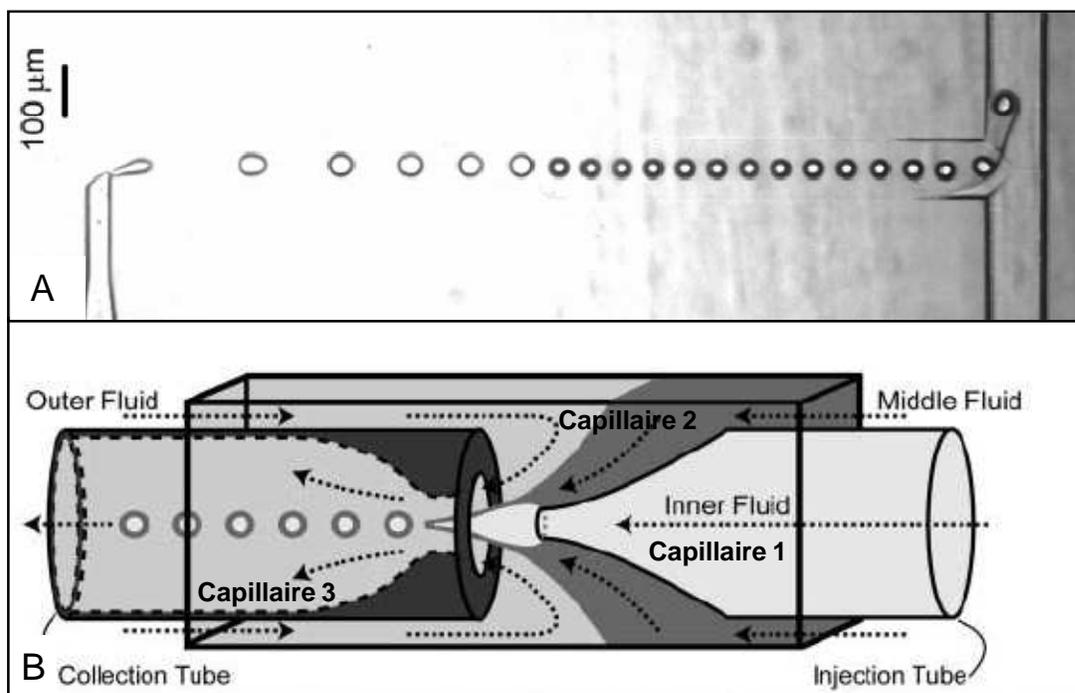


FIG. 1.11 – A : formation de doubles émulsions grâce à 2 T successifs aux propriétés différentes. D'après Okushima *et al.* [2004]. B : Formation d'une double émulsion dans une géométrie de flow-focusing. D'après Utada *et al.* [2005].

Dans les 2 cas, lorsqu'elles sont couplées avec les méthodes de synthèse de particules que nous décrivons ci-dessous, ces méthodes peuvent être utilisées pour enfermer un objet biologique (cellule par exemple) dans son milieu, protégé par une capsule solide formée à partir de la 2ème phase de l'émulsion.

**Microparticules.** La synthèse de microparticules en microcanaux est la suite logique de la formation d'émulsions extrêmement monodisperses. Nous décrivons ici les méthodes utilisant une polymérisation in situ et non hors-puce après une éventuelle émulsification microfluidique. La première démonstration d'utilisation de la microfluidique pour la formation de capsules est à mes yeux la création de liposomes dans une géométrie de flow focusing par le groupe de L. Locascio au NIST

[Jahn *et al.*, 2004]. Ces capsules sont cependant formées dans un système monophasique par auto-assemblage des lipides du fait de la diminution de leur solubilité dans le jet d'isopropanol les contenant lorsque celui-ci est focalisé par un tampon aqueux.

On trouve la première démonstration de polymérisation en ligne grâce à une initiation UV dans Jeong *et al.* [2004], qui utilisent une géométrie de jetting en capillaire pour produire un jet stable formant des spaghettis de polyacrylate après exposition UV (voir figure 1.12A). On voit ensuite apparaître la synthèse de particules de polymère aux compositions variées en 2005 avec utilisation du confinement créé par les microcanaux pour donner aux particules des formes diverses [Dendukuri *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005]. La formation de microcapsules à la paroi dure et au cœur liquide est effectuée peu après [Nie *et al.*, 2005]. Un bon résumé de toutes ces méthodes peut être trouvé dans un article présentant le travail du groupe de E. Kumacheva à l'université de Toronto [Seo *et al.*, 2005]. Plus récemment, la mode est à la formation de capsules d'hydrogel, par photopolymérisation encore et avec des compositions et formes variées [Shepherd *et al.*, 2006], ou par diffusion d'un réticulant depuis une phase continue d'undecanol vers la phase aqueuse dispersée contenant l'alginate [Zhang *et al.*, 2006b] (voir figure 1.12B). Ces capsules sont entre autres intéressantes dans le cadre d'encapsulation de molécules médicinales.

Notons tout de même les limitations de telles méthodes : nous avons vu plus haut que les propriétés de mouillage des différentes surfaces influaient fortement sur la formation d'émulsions. La possibilité de synthèse de microparticules en sera donc aussi fortement dépendante, sauf peut-être dans le cas d'utilisation de géométries concentriques où les fluides n'interagissent pas avec les parois. Même dans cette situation, la tension interfaciale entre les phases reste un paramètre critique et pas nécessairement contrôlable dans tous les cas de figure. Enfin, notons ici que nous avons décrit la synthèse de microparticules *à partir* de gouttes, et que les exemples de synthèse *dans* des gouttes seront abordés dans la partie traitant des gouttes comme microréacteurs. Nous excluons de cette discussion les microréacteurs diphasiques solution/air qui utilisent pour la réaction l'interface formée soit autour des « plots » de liquides, soit dans une géométrie où un premier liquide est répandu sur les parois du tube tandis qu'un second fluide circule en son centre (pipeline) [Kobayashi *et al.*, 2004] : ceux-ci commencent à être un peu éloignés de la microfluidique de gouttes en tant que telle. De même nous excluons les co-flux de deux phases immiscibles utilisés à des fins d'extraction [Tokeshi *et al.*, 2002] ou de réaction. Remarquons que dans les références citées ci-dessus, la microfluidique se révèle très intéressante pour certaines réactions dangereuses et exothermiques (fluorination, hydrogénation) du fait des transferts thermiques accrus et du contrôle précis sur les conditions de réaction au sein d'un microsystème. Notons aussi que ces écoulements en co-flux laminaires immiscibles peuvent être utilisés pour effectuer des mesures rhéologiques [Guillot *et al.*, 2006].

### 1.2.3.b Des gouttes comme microréacteurs

Nous nous intéressons ici au cas où les gouttes remplacent les classiques microtubes, tubes à essais et autres verreries dans le but de réaliser synthèse chimique (la revue de Gunther & Jensen [2006] est aussi pertinente pour ce cas), études de cinétique ou de cristallisation, ainsi qu'analyse de produits biologiques. Nous aborderons aussi rapidement un effet plus fondamental utilisant les gouttes comme informations logiques.

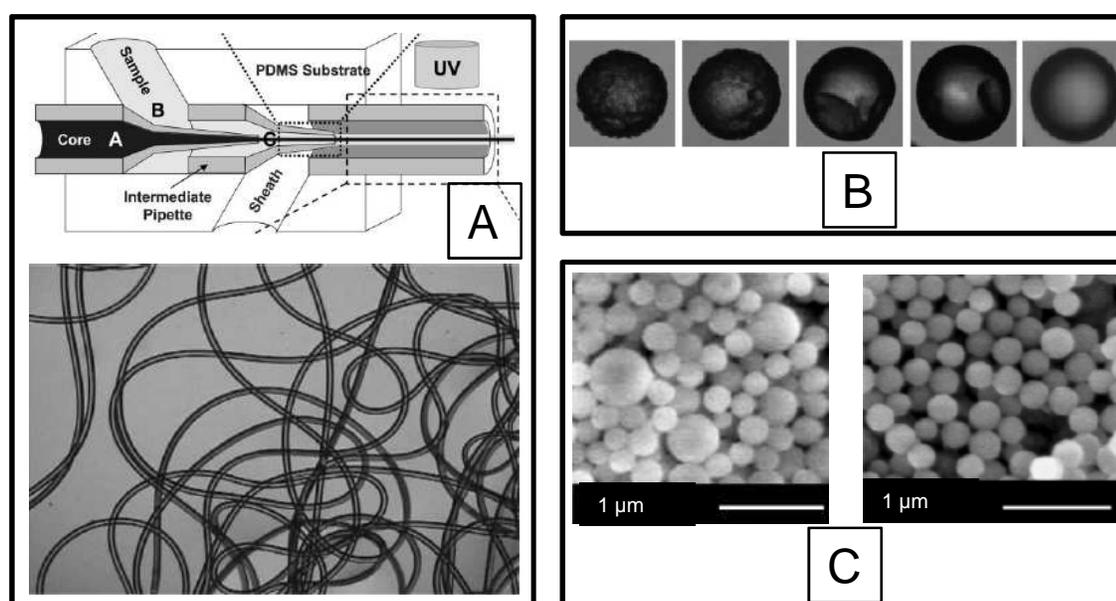


FIG. 1.12 – A : synthèse de fibres de PolyVinylAcrylate, d'un diamètre de quelques dizaines de microns, dans une géométrie de jetting avec irradiation UV en ligne. D'après Jeong *et al.* [2004]. B : Capsules d'alginate formées par diffusion d'ions calcium depuis une phase undecanol vers la phase aqueuse. D'après Zhang *et al.* [2006b]. C : Nanoparticules de silice synthétisées en microsysteme par hydrolyse et condensation de silanes. A gauche : en microsysteme monophasique. A droite : en microsysteme diphasique avec une polydispersité beaucoup plus faible. D'après Gunther *et al.* [2004]

**Synthèse chimique.** Si dans le paragraphe précédent, les gouttes formées constituaient directement le support de la réaction chimique, c'est aussi à l'intérieur de ces gouttes que peut s'effectuer la réaction. On y retrouve les avantages principaux de la microfluidique de gouttes énoncés plus haut : un mélange efficace et une absence de dispersion des réactifs, auxquels s'ajoutent les propriétés générales de la

microfluidique classique en termes de transfert thermique et de contrôle des conditions expérimentales. Dans l'article utilisant la séparation ethanol/air « en peigne », Gunther *et al.* [2004] présentent ainsi la synthèse de nanoparticules de silice par hydrolyse de silanes suivie d'une condensation dans un flux segmenté eau/air avec une polydispersité inférieure à 10 %, bien meilleure que dans le cas d'un microréacteur monophasique (voir figure 1.12C).

L'intérêt s'oriente ensuite vers la synthèse de nanocristaux semi-conducteurs CdSe. Cette synthèse est réalisée à température ambiante [Hung *et al.*, 2006; Shestopalov *et al.*, 2004] ou à haute température dans une phase continue fluorée [Chan *et al.*, 2005] afin d'améliorer les propriétés des cristaux produits. La finesse du pic de fluorescence obtenu permet d'estimer la monodispersité des particules. D'une façon générale, les huiles fluorées se prêtent très bien à la synthèse en microgouttes du fait de leur grande inertie chimique et de leur non-miscibilité à des phases carbonées.

Au delà des nanoparticules et de précipitations, des réactions simples ont été réalisées en microgouttes, parmi lesquelles des réactions acide/base [Burns & Ramshaw, 2001] ou des synthèses organiques monoétapes [Hatakeyama *et al.*, 2006]. On ne trouve pas pour l'instant de réactions complexes dans un format diphasique, principalement à cause de méthodes d'additions successives de réactifs dans les gouttes encore mal maîtrisées (voir chapitre 4) ainsi que de la complexité à gérer une phase dispersée dont les propriétés évoluent fortement dans le temps (viscosité, tension de surface), bien qu'un écoulement diphasique présente déjà de ce point de vue un avantage certain sur un écoulement monophasique. L'utilisation d'émulsions doubles peut s'avérer une solution efficace au second problème, mais elle rend l'addition de produits au cours de la réaction d'autant plus difficile. D'autre part, le gonflement du PDMS dans la plupart des solvants organiques limite l'application de la microfluidique à la chimie. Les solutions alternatives consistant à utiliser des puces en verre sont chères, et les nouveaux matériaux mentionnés plus haut trouvent ici tout leur intérêt.

**Cristallisation de protéines.** La synthèse de nanocristaux décrite ci-dessus est intimement liée aux phénomènes de cristallisation, qui avec la cinétique chimique représentent les deux principaux domaines d'application de la microfluidique de gouttes à la caractérisation chimique.

Un préalable à ces études, tout comme aux analyses biologiques, est la mise au point de méthodes de détection efficaces. La méthode la plus utilisée est bien entendu, du fait de sa simplicité de mise en œuvre, la détection par fluorescence. On voit cependant désormais apparaître des méthodes originales, permettant des études par microspectroscopie Raman dans des gouttes [Cristobal *et al.*, 2006b], ou une détection électrochimique du contenu en ions de celles-ci [Luo *et al.*, 2006]. Cette dernière méthode n'est cependant pas sans défauts puisqu'elle utilise la conductivité de la goutte pour la détecter lorsqu'elle passe entre deux électrodes et est donc invasive. Plus particulières aux études de cristallisation, des études ont démontré, au-delà de

l'utilisation d'un microscope polarisé, la possibilité de détermination structurale par diffraction des rayons X sur puce de polyimide [Barret *et al.*, 2006], mais en système monophasique.

La cristallisation de protéines trouve un écho naturel dans les systèmes microfluidiques diphasiques. Déterminer les conditions de leur cristallisation est une tâche délicate, les protéines sont rares et chères, et les méthodes en microgouttes permettent de tester rapidement de multiples conditions de cristallisation avec une consommation extrêmement faible en protéines. Le premier système utilisant la microfluidique diphasique est démontré en 2003 : les plugs contenant la protéine d'intérêt et différentes compositions de tampon sont formés et le flux dans le système est arrêté. Le circuit est ensuite incubé (sous l'eau pour éviter l'évaporation des gouttes à travers le PDMS) [Zheng *et al.*, 2003] afin de permettre la nucléation des cristaux, la cristallisation étant observée sous microscope en lumière polarisée (voir figure 1.13). La méthode a été ultérieurement raffinée en plaçant les gouttes dans un capillaire en verre, afin d'utiliser la diffusion de vapeur inter-gouttes pour induire la cristallisation des protéines et d'analyser celles-ci par diffraction des rayons X [Zheng *et al.*, 2004]. On peut aussi envisager de tirer parti de la perméabilité du PDMS à l'air à des fins de cristallisation [Leng *et al.*, 2006]. Moyennant l'utilisation d'une troisième phase appropriée permettant de séparer de façon stable les plots d'intérêt, les « cartouches » de protéines peuvent être stockées de façon stable pendant des mois [Chen *et al.*, 2007]. Les études des différents paramètres influençant la cristallisation sont bien résumées dans une revue du groupe leader du domaine [Zheng *et al.*, 2005], dont les publications superposées sont trop nombreuses pour être toutes citées ici.

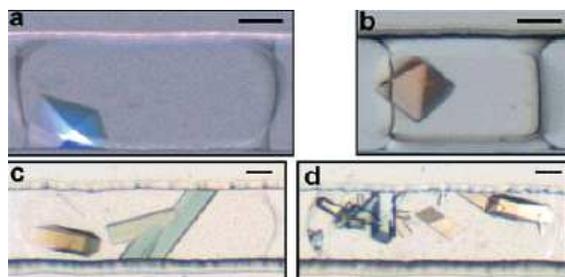


FIG. 1.13 – Exemple de cristallisation de protéines dans des gouttes aqueuses séparées par une huile fluorée. D'après Zheng *et al.* [2003].

**Études cinétiques.** Si la microfluidique de gouttes est une méthode efficace pour cristalliser des protéines, elle se révèle aussi un outil extrêmement performant pour étudier les cinétiques de cristallisation de produits variés et de réactions chimiques. Les premières applications, utilisant principalement la possibilité de détermination précise de l'instant de début de réaction grâce au mélange au sein des gouttes, ont été dédiées à l'étude de la cinétique de réactions chimiques [Song & Ismagilov, 2003]. La possibilité de contrôle rapide et précis des températures à l'intérieur des gouttes a été utilisée pour étudier la cinétique de nucléation de cristaux de  $KNO_3$  dans l'eau [Laval *et al.*, 2007a], ainsi que des diagrammes de solubilité [Laval *et al.*, 2007b].

Les systèmes utilisant la perméabilité du PDMS ont été appliqués à la construction du diagramme de phase d'un système eau/surfactant [Leng *et al.*, 2007]. Enfin, la possibilité de compartimenter des réactions dans des gouttes et de varier les concentrations en leur sein par ajout de tampon et de réactifs permet d'étudier des réactions autocatalytiques hors d'équilibre mimant les cascades biologiques [Gerdtts *et al.*, 2004].

La microfluidique de gouttes trouve ainsi des applications prometteuses dans la biologie, dont nous décrivons quelques applications ci-dessous. D'autres aspects seront bien entendu traités plus en détails dans le reste de cette thèse.

**Applications aux analyses biologiques.** De la même façon que l'on peut étudier des cinétiques purement chimiques en microgouttes, on peut aussi étudier des cinétiques enzymatiques selon les mêmes principes. Pour l'instant, l'avantage de ces études réside plutôt dans la diminution de volumes de réactifs, et servent souvent de preuve de concept pour un système, sans apporter de réelle nouveauté sur le plan purement biologique [Ahn *et al.*, 2006; Song & Ismagilov, 2003; Tan & Takeuchi, 2006]. Cependant, les méthodes microfluidiques diphasiques présentent aussi l'avantage d'un mélange rapide : pour pouvoir étudier correctement des cinétiques de réactions, le mélange des réactifs doit évidemment se faire sur une échelle de temps inférieure à celle de la réaction. Ceci est par exemple rendu possible par l'utilisation de gouttes circulant dans un canal crénelé [Liau *et al.*, 2005].

La microfluidique de gouttes a récemment été appliquée à l'analyse médicale, par exemple à la mesure de temps de coagulation du sang [Song *et al.*, 2006a], l'écoulement diphasique permettant ici d'éviter le bouchage du canal. Dans un format diphasique eau/air, des plots de solutions d'acides nucléiques ont été transportés au sein d'un canal tapissé de spots d'hybridation, et une hybridation efficace détectée en moins de 500 s [Wei *et al.*, 2005]. Une approche du même type est également développée par la société AbaG en partenariat avec le laboratoire Biopuces du CEA afin de déposer des anticorps de façon localisée sur les parois d'un capillaire. Enfin, des réactions classiques de biologie moléculaire telles la PCR, peuvent être menées en microgouttes : nous y reviendrons dans le chapitre 2. De plus, nous le verrons au chapitre 3, l'encapsulation d'objets biologiques ou de molécules uniques au sein de microgouttes est une tendance croissante en biologie, permettant d'accéder à des paramètres jusque là non mesurables dans les études statistiques : ces processus d'encapsulation sont pour l'instant principalement menés par des émulsifications en masse.

### 1.2.3.c Gouttes logiques

La circulation d'une goutte et plus particulièrement d'un plot à faible nombre capillaire dans un microcanal implique une modification du flux au sein de celui-ci, et résulte en particulier en une augmentation de la pression en amont de la goutte

lorsque le contrôle des écoulements est effectué en débit. Concrètement, si une goutte a le choix entre deux chemins, et qu'une première goutte choisit le chemin n°1, la goutte la suivant choisira le chemin n°2, de résistance hydrodynamique plus faible (et correspondant donc, pour un contrôle en débit, à un flux plus grand). Cette particularité est de plus en plus étudiée expérimentalement et théoriquement [Engl *et al.*, 2005]. On rencontre selon la concentration en gouttes dans la suspension des cas complexes où des séries entières de gouttes choisissent un chemin avant que d'autres changent de direction. En arrivant à une jonction, les gouttes sont en effet influencées par deux phénomènes : le flux instantané dans chacune des jonctions, lié à la résistance hydrodynamique du canal et donc au nombre de gouttes qui y sont déjà présentes, mais aussi pour deux gouttes se suivant de façon rapprochée, la perturbation des lignes de vitesse par la première goutte. Si l'on néglige ce dernier effet, pouvant être considéré comme de second ordre, on trouve des méthodes élégantes permettant de répartir parfaitement un train de gouttes entre deux canaux grâce à l'équilibration des pressions réalisée par un « by pass » (court-circuit en quelque sorte) microfluidique [Cristobal *et al.*, 2006a].

On peut également trouver des applications originales, avec la création des équivalents fluidiques d'éléments logiques (porte OR, AND, etc...) [Prakash & Gershenfeld, 2007], ou bien encore des systèmes de codage et décodage de trains de gouttes [Fuerstman *et al.*, 2007]. Bien que les temps de réponse, de l'ordre de la milliseconde, empêchent ce type de système de prétendre rivaliser avec les processeurs microélectroniques, on peut espérer qu'ils donnent naissance à des circuits microfluidiques auto-régulés sans recours à des éléments extérieurs.

# Chapitre 2

## PCR microfluidique

Dans ce chapitre, après une introduction au principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR), ainsi qu'à ses applications, nous présenterons les avantages inhérents à la miniaturisation des systèmes de PCR et les diverses stratégies employées afin de réaliser celle-ci. Nous en viendrons ensuite à la description de la mise au point du système miniaturisé original développé au cours de cette thèse, ainsi qu'aux résultats obtenus avec celui-ci.

### 2.1 La PCR : principe, applications et matériel

#### 2.1.1 Principe général

L'ADN (acide désoxyribonucléique), porteur de l'information génétique, est constitué de deux brins complémentaires assemblés en double hélice par liaisons hydrogène entre les bases constituant chaque brin. Rappelons que ces bases sont au nombre de 4, deux purines (adénine A et guanine G) et deux pyrimidines (cytosine C et thymine T), et qu'elles s'associent spécifiquement en A-T (2 liaisons hydrogène) et G-C (3 liaisons hydrogène) dans la double hélice [Watson & Crick, 1953]. Notons enfin que les brins d'ADN sont « polaires », possédant une extrémité alcool dite 3' et une extrémité phosphate dite 5', deux simples brins d'ADN s'associant « tête-bêche » dans la double hélice (figure 2.1).

La PCR est une réaction permettant d'amplifier un fragment d'ADN par cyclages thermiques répétitifs grâce à une enzyme polymérase thermostable. Elle nécessite pour son déroulement la présence de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et de deux courts brins d'ADN complémentaires d'une partie de chaque simple brin du fragment considéré appelés amorces [Saiki *et al.*, 1985, 1988]. Afin de bien comprendre le déroulement de la réaction, il est important de préciser à ce stade que 1) les enzymes ADN-polymérases incorporent les nucléotides complémentaires d'un ADN simple brin en « travaillant » sur le brin qu'elles synthétisent dans le sens 5'-3' seulement et 2) les ADN-polymérases ne commencent leur synthèse sur un simple

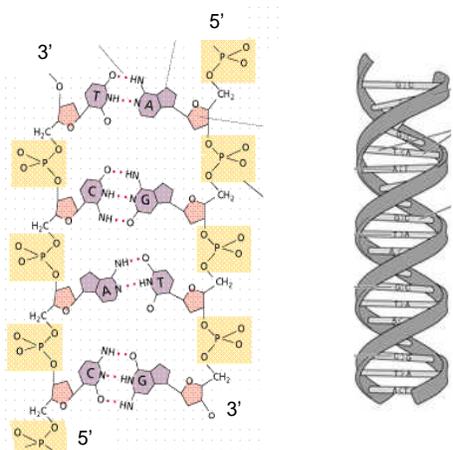


FIG. 2.1 – Structure d'une double hélice d'ADN. Vue de gauche 2D : association de bases complémentaires par liaisons hydrogène, et position "tête-bêche" des deux simples brins associés. Vue de droite : double hélice résultante.

brin d'ADN qu'à partir des amorces, appariées à un endroit précis de chaque simple brin.

C'est donc par le placement des amorces que l'on détermine le fragment d'ADN que l'on va amplifier. Un cycle de réaction comprend trois étapes de thermalisation (figure 2). Partant d'un double brin d'ADN, un chauffage à une température d'environ 95°C permet d'abord de dénaturer celui-ci en deux simples brins complémentaires par déstabilisation des liaisons hydrogène responsables de la formation de la double hélice (phase de dénaturation). En abaissant la température aux environs de 55°C, on induit la fixation des amorces aux emplacements désirés sur chaque simple brin (phase d'appariement). Les amorces sont courtes et présentes en solution en large excès par rapport à l'ADN cible, ce qui permet leur fixation rapide sur chaque simple brin d'ADN alors que les brins complémentaires ne se réappariement pas. Enfin, à une température de 72°C environ, l'enzyme ADN-polymérase est à sa température de fonctionnement optimale et incorpore les dNTP complémentaires à chaque base des simple brins en démarrant des amorces (phase d'extension).

Après un cycle de PCR, on a ainsi obtenu 2 doubles brins d'ADN à partir d'un seul. Au terme de cette première étape, ces deux molécules ne sont pas exactement le fragment que l'on cherche à synthétiser, puisque si l'on sait où la polymérase commence à travailler (amorces), on ne sait pas encore où elle s'arrête, c'est à dire qu'elle synthétise à priori tout le brin complémentaire d'un simple brin à partir de l'amorce. Le brin synthétisé va cependant être à son tour répliqué lors du deuxième cycle, et l'amorce se fixant à lui pour marquer le début de la réplication permettra de déterminer l'autre extrémité du fragment à répliquer (figure 2.2). Après  $n$  cycles de PCR, on a ainsi théoriquement multiplié la quantité initiale d'ADN par  $2^n$ , chaque brin nouvellement créé servant de support de synthèse d'un nouveau brin au cycle suivant.

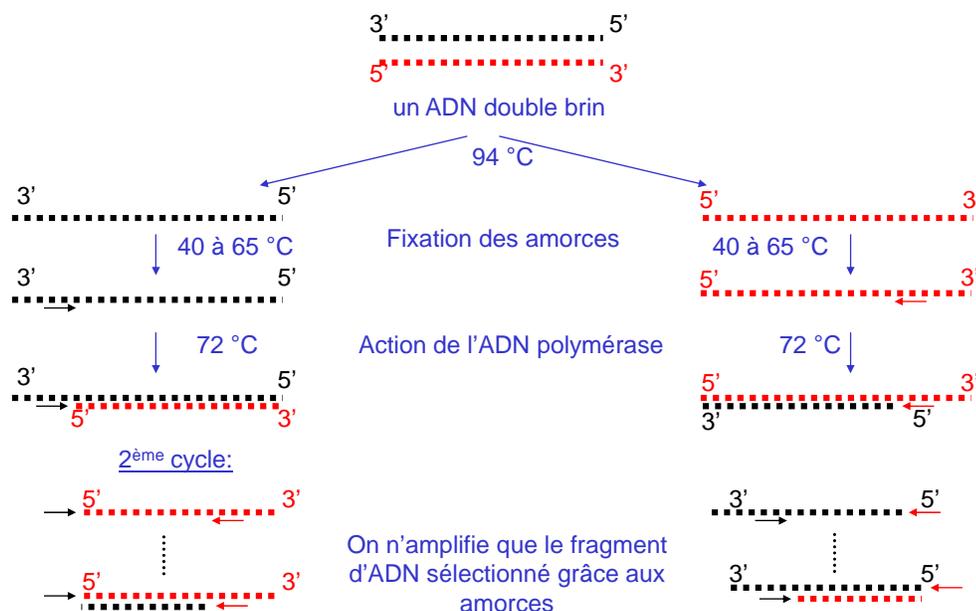


FIG. 2.2 – Principe de la PCR. A l'issue des deux premiers cycles, le fragment d'ADN cible est entièrement déterminé par placement des amorces. L'amplification exponentielle qui s'ensuit rend la quantité de fragments inexacts négligeable par rapport à la quantité totale d'ADN cible synthétisée.

### Quelques caractéristiques pratiques.

**Enzymes.** Notons d'abord que si les enzymes polymérase étaient connues depuis les années 1960, la première amplification *in vitro* d'ADN [Saiki *et al.*, 1985] fut réalisée avec une ADN-polymérase non thermostable, ce qui impliquait de changer l'enzyme après chaque cycle de dénaturation, d'où une perte de temps et une augmentation des risques de contamination considérable. Le développement impressionnant de cette méthode n'a été rendu possible que par l'existence d'une enzyme polymérase thermostable, découverte pour la première fois chez une bactérie vivant dans des sources chaudes et des cheminées hydrothermales, *Thermus (ou thermophilus) Aquaticus*. Cette enzyme utilisée communément en PCR porte ainsi le nom de Taq Polymerase [Saiki *et al.*, 1988].

Si la Taq permet une synthèse rapide des brins complémentaires (on cite souvent des valeurs d'incorporation comprises entre 50 et 100 bases par seconde, l'ordre de grandeur classique est de l'ordre de 30 s. pour un brin d'1 kilopaire de bases–1 kpb), elle ne vérifie pas l'incorporation correcte de ceux-ci et ne peut pas corriger les éventuelles erreurs, ce qui la rend relativement peu fiable (taux d'erreur de 0,01%). D'autres enzymes thermostables à activité exonucléase, capables de relire et le cas échéant modifier la séquence qu'elles créent ont depuis été découvertes [Lundberg *et al.*, 1991], toujours dans des organismes procaryotes extrémophiles, et

présentent des taux d'erreur inférieurs à 1 sur un million (avec par contre des temps de réplication plus long de l'ordre de quelques minutes pour 1 kpb). La Taq reste cependant l'enzyme de référence pour la Polymerase Chain Reaction, parfois associée à une enzyme à activité exonucléase, ce qui permet de tirer simultanément avantage des propriétés de chacune.

Les enzymes « hotstart », dont l'activité est inhibée par attachement à un anticorps à température ambiante sont de plus en plus souvent utilisées afin de limiter les amplifications non-spécifiques dans les phases pré-PCR. Ces enzymes sont activées par détachement de l'anticorps lors de la phase de dénaturation de l'ADN.

**Amorces et contamination.** Si l'enzyme est un élément primordial permettant le bon déroulement de la réaction, le choix des amorces l'est tout autant en ce qu'il détermine la spécificité de la réaction. La taille des amorces varie généralement entre 10 et 30 bases. Les amorces doivent être sélectionnées selon deux critères : la minimisation du risque d'appariement des amorces entre elles sous forme de dimères et l'unicité des sites possibles de fixation des amorces sur les brins d'ADN cibles. Des logiciels permettent aujourd'hui de calculer les meilleures amorces possibles pour l'amplification d'une séquence d'ADN donnée.

**Efficacité.** La limite théorique de multiplication du nombre de molécules par  $2^n$  n'est en pratique jamais atteinte. Plusieurs raisons sont invoquées pour cette saturation de la réaction à un plateau se situant en général aux alentours de  $10^6$  fois le nombre initial de molécules, parmi lesquelles la dégradation de la polymérase au fur et à mesure des cycles de température et l'appauvrissement du milieu réactionnel en dNTP.

Par ailleurs, et c'est nous le verrons un des principaux obstacles à dépasser lors de la mise au point d'un système microfluidique de PCR, cette réaction est de par son efficacité exponentielle, très prompte à la contamination. Des précautions particulières sont à prendre afin d'éviter la contamination des échantillons par un ADN étranger susceptible d'être amplifié. De même, les échantillons amplifiés étant très concentrés et à cause de la volatilité des courts fragments d'ADN, ils doivent si possible être tenus éloignés de la zone de préparation des nouveaux échantillons.

Les tailles caractéristiques des fragments amplifiés en PCR vont classiquement d'une centaine à quelques milliers de pb selon les applications. A partir de 2000 à 3000 pb, les polymérases ont tendance à se détacher des brins d'ADN et à perdre leur efficacité. Le taux d'erreur de réplication augmente et les temps de cycles utilisés classiquement en PCR ne laissent pas le temps à l'enzyme de répliquer le fragment en son entier. Des fragments de dizaine de milliers de paires de base peuvent être amplifiés mais requièrent des cycles de température plus longs et des enzymes spécialement modifiées pour une meilleure processivité (qui « collent » mieux à l'ADN).

Enfin, les températures données ci-dessus le sont à titre indicatif et ne constituent en aucun cas des standards fixes. On pourra ainsi, selon les applications (cf. partie

2.1.2), trouver des cycles à deux températures seulement, la fixation des amorces et l'action de la polymérase se faisant à la même température. Un temps de cycle typique correspond à 30 secondes de dénaturation, 30 secondes de fixation des amorces et 1 minute d'élongation. Le nombre de cycles utilisés en PCR varie entre 20 et 40, encore une fois selon l'application. Une longue phase de dénaturation, variant généralement de une à dix minutes est généralement observée préalablement au cyclage thermique, afin d'assurer une séparation complète des doubles brins d'ADN et le cas échéant l'activation des enzymes « hotstart ». De même, une phase d'extension est souvent ajoutée en fin de réaction afin d'assurer la synthèse de tous les brins complémentaires de chaque simple brin.

### 2.1.2 Méthodes et applications

Nous listons ici de manière non exhaustive diverses applications de la réaction de PCR et les méthodes associées, avec une emphase particulière sur ce qui a motivé la mise en place du projet de PCR microfluidique. Notons pour la petite histoire, et donner du poids à ce chapitre, qu'après sa découverte par Mullis (ce qui lui valut le prix Nobel de chimie 1993), la PCR fut brevetée par la compagnie l'employant, Cetus Corporation, et que Hoffman-La Roche racheta en 1992 les droits du brevet pour pas moins de 300 millions de dollars, ce qui laissait présager de l'immensité des champs d'application de cette méthode. Alors que les brevets originaux couvrant la méthode de PCR et la Taq Polymerase sont tombés en 2005, une véritable « guerre des brevets » fait toujours rage entre Hoffman-La Roche et des grands fournisseurs de réactifs comme Promega.

Pour revenir à la science, on peut décomposer l'utilisation de la PCR en deux grandes branches, l'une indirecte, où la PCR sert uniquement d'étape d'amplification au sein d'un protocole complet, l'autre directe où la PCR est utilisée de façon autonome à des fins d'analyse, tirant parti de sa spécificité d'amplification mentionnée plus haut. Il existe ensuite au sein de ces grands champs d'application et de techniques associées toute une zoologie de méthodes particulières dont l'exposé n'est ici pas le sujet.

#### 2.1.2.a La PCR comme étape d'amplification

Le principe de la PCR est en grande partie utilisé dans les applications de séquençage. Dans sa version la plus simple, la réaction est utilisée « telle quelle » pour amplification avant analyse, ou le protocole peut-être modifié afin d'obtenir une gamme de fragments d'ADN permettant de reconstituer la séquence complète du brin original. Pour plus de précisions sur ce vaste sujet, qui trouve ses applications dans la détection de mutations comme en médecine légale, en passant par les tests de paternité, le lecteur pourra se reporter à la thèse de J. Weber [2005].

De façon évidente, on peut aussi utiliser la PCR pour cloner un gène. La séquence cible est reproduite en large nombre, puis peut être insérée dans des vecteurs

(par exemple des plasmides). Ce vecteur est ensuite placé dans un organisme qui, devenant de fait un organisme génétiquement modifié, va exprimer le gène cible. Cette expression permet d'une part de mieux étudier le gène et les protéines qui lui sont associées. D'autre part, les organismes génétiquement modifiés sont très utilisés pour produire en masse des produits biologiques tels que médicaments ou enzymes.

La PCR peut être utilisée à des fins de mutagenèse afin d'étudier plus finement la fonction d'un gène ou de faire de l'évolution de protéines *in vitro*. Les mutations sont introduites dans le gène d'intérêt grâce à des amorces mutées, ou par l'utilisation de polymérases sujettes à beaucoup d'erreurs d'incorporation.

### 2.1.2.b La PCR comme outil de détection

Afin de comprendre l'intérêt de la PCR comme technique autonome d'analyse, il est important de comprendre qu'au delà de la simple amplification d'ADN, cette méthode peut intégrer des étapes amont et aval la rendant particulièrement attractive.

**PCR avec transcription inverse.** La PCR avec transcription inverse (RT-PCR pour Reverse Transcription PCR) consiste à synthétiser le fragment d'ADN cible de la réaction à partir de l'ARN messenger contenu dans les cellules, puis à amplifier cet ADN complémentaire (dit ADNc) par PCR. L'amplification de l'ADN obtenu permet ainsi après analyse de remonter à l'*expression* du gène cible dans les cellules d'intérêt et non simplement à sa présence. D'autre part, les ARNm sont présents en nombre plus grand dans une cellule que l'ADN génomique (présent à hauteur d'une seule copie), ce qui permet une plus grande sensibilité de la méthode pour détecter des gènes exprimés. Par transcription inverse de tous les ARN messenger présents dans la cellule et amplification des ADN complémentaires correspondants, on peut théoriquement avoir accès à l'ensemble du transcriptome de cellules données. On ne peut par contre pas avoir accès au génome de cette cellule puisque seules les séquences d'ADN exprimées (exons, par opposition aux introns) seront détectées. Pratiquement, la transcription inverse est toujours effectuée à concentration fixe d'ARNm car son efficacité en dépend. L'ADNc résultant est ensuite dilué, et on exprime sa concentration initiale dans la réaction de PCR en « équivalents ARN », c'est à dire par rapport à la concentration théorique équivalente d'ARNm initialement transcrite.

**PCR quantitative.** L'application la plus simple de la PCR consiste à évaluer *après* la réaction les produits de l'amplification. On peut parler de mesure en point final ou « endpoint detection ». Quelle que soit l'application recherchée, cette vérification est bien entendue systématiquement effectuée suite à la réaction de PCR. Celle-ci est généralement effectuée par intercalation de produits qui fluorescent spécifiquement lorsqu'ils sont fixés sur de l'ADN double brin (bromure d'ethydidium–BET–

par exemple). On peut faire migrer les produits sur gel d'agarose avant révélation (ce qui permet une vérification de la taille du fragment amplifié), ou faire une mesure directe in situ par exemple par fluorescence induite par laser [Higuchi *et al.*, 1992]. Notons que la détection de séquences d'ADN statistiquement issues de cellules uniques (donc d'une molécule d'ADN) a très vite été rendue possible par cette méthode simple [Li *et al.*, 1988].

La PCR quantitative (Q-PCR) permet de suivre en temps réel et à chaque cycle de l'amplification l'évolution de la quantité d'ADN synthétisé, ce qui en fait d'une part une méthode plus précise de détection des séquences d'intérêt, d'autre part un outil idéal à coupler avec la transcription inverse d'ARN pour mesurer les niveaux d'expression d'un gène. Ce suivi en temps réel est effectué par mesure de fluorescence. La PCR quantitative est généralement effectuée sur des fragments d'ADN courts, de l'ordre d'une centaine de paires de bases, et les fluorophores utilisés peuvent être spécifiques ou non de la séquence d'ADN d'intérêt. On obtient finalement une courbe présentant une phase exponentielle correspondant à la multiplication par deux du matériel génétique présent à chaque cycle, et deux plateaux, le plateau bas correspondant à un signal en dessous de la limite de détection (trop faible nombre de cycles), le plateau haut correspondant à la saturation de la réaction. La quantité de matériel initialement présente en solution est caractérisée par le Ct (pour crossing threshold) de la courbe, correspondant généralement au premier point de celle-ci se situant au dessus du bruit de fond et dans la phase exponentielle (voir figure 2.3). Les Ct sont donc exprimés par des nombres décimaux, et non en nombre entier de cycles réels.

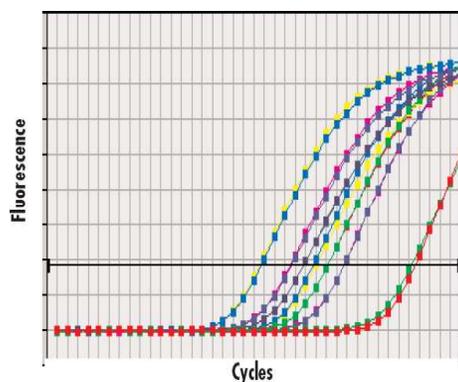


FIG. 2.3 – Courbes typiques obtenues en PCR quantitative. La bande noire horizontale représente le Ct. Des courbes correspondant à l'amplification de plusieurs séquences cibles, initialement présentes en nombre plus ou moins grand sont présentées ici.

Dans le cas d'interactions non spécifiques, le marqueur le plus répandu est le *SybrGreen I* (breveté par Molecular Probes), de la famille des colorants cyanine asymétriques [Rye *et al.*, 1992], qui a la propriété de fluorescer fortement lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin (excitation 490 nm, émission 520 nm), son niveau de fluorescence étant beaucoup plus faible lorsqu'il est seul en solution ou interagit avec de l'ADN simple brin. L'utilisation de ce type de marqueur est compatible avec l'utilisation de la PCR pour détecter une séquence cible puisque la spécificité de la réaction et donc de la détection est assurée par les choix des amorces. Elle peut

cependant augmenter le risque d'erreur en cas d'intercalation du SybrGreen dans des dimères d'amorces ou de formation d'un produit secondaire due à l'attachement des amorces sur un site non désiré de l'ADN cible. Le choix des amorces est donc d'autant plus crucial lorsque cette méthode est utilisée. D'autres intercalants existent, tels que le BET déjà cité, et toute la famille des xOxO (x représentant presque une consonne quelconque), mais le SybrGreen présente par exemple une sensibilité 10 fois supérieure à celle du BET. Des études semblent montrer que celle-ci est en partie due à un « double effet », le SybrGreen s'intercalant d'abord dans la double hélice d'ADN avant de couvrir la surface de celle-ci [Zipper *et al.*, 2004].

D'autres méthodes, présentant cette fois un double niveau de spécificité, consistent d'une façon générale à utiliser des sondes fluorescentes spécifiques du fragment d'ADN que l'on cherche à amplifier. Parmi les méthodes les plus classiques, on retiendra les sondes d'hybridation (double dye oligonucléotides probes) et, dans une moindre mesure, les « molecular beacons ».

1. Les « double dye oligonucléotides probes » sont composées d'un oligonucléotide complémentaire de la séquence que l'on cherche à amplifier aux extrémités duquel se trouve un fluorophore d'un côté et l'inhibiteur (quencher) correspondant de l'autre [Holland *et al.*, 1992]. L'idée originale consistait à utiliser des sondes radioactives plutôt que des fluorophores [Holland *et al.*, 1991]. Le fluorophore et son inhibiteur se trouvant proches l'un de l'autre, la fluorescence est inhibée. Lors de la phase de fixation des amorces, la sonde se lie à la séquence libre d'ADN simple brin. Lors de la réplication de ce simple brin par la polymérase, celle-ci décroche la sonde du brin et la dégrade par son activité exonucléase, laissant ainsi le fluorophore et son inhibiteur libres en solution. L'éloignement résultant entre eux induit une augmentation du niveau de fluorescence (voir figure 2.4B). L'exemple le plus classique de cette famille de sondes est sans doute le Taqman [Heid *et al.*, 1996], développé par Genentech et commercialisé par Roche, qui s'utilise avec des cycles à deux températures et non trois. Son nom, issu de l'humour bien connu des scientifiques, est la compression de Taq et Pacman.

2. Les « molecular beacons » [Tyagi & Kramer, 1996] consistent en une boucle d'ADN dont la partie simple brin (bouclée) est complémentaire de la séquence cible, et dont la fermeture en double brin comprend un fluorophore et son inhibiteur au bout de chaque simple brin (voir figure 2.4A). Après la dénaturation de l'ADN pendant la réaction de PCR, la partie simple brin du beacon peut se lier au simple brin d'ADN, ouvrant ainsi sa boucle et éloignant le fluorophore de son inhibiteur, d'où une augmentation du signal de fluorescence. La différence notable avec les sondes de type Taqman est l'aspect réversible de cette augmentation de fluorescence, la boucle pouvant se dissocier du simple brin et se refermer lorsque la température s'élève. Cette méthode est à priori encore plus spécifique que les sondes fluorescentes puisque la sonde doit pour s'apparier au simple brin cible défaire la boucle la maintenant fermée.

D'autres méthodes spécifiques de détection existent encore (sondes Scorpion...)

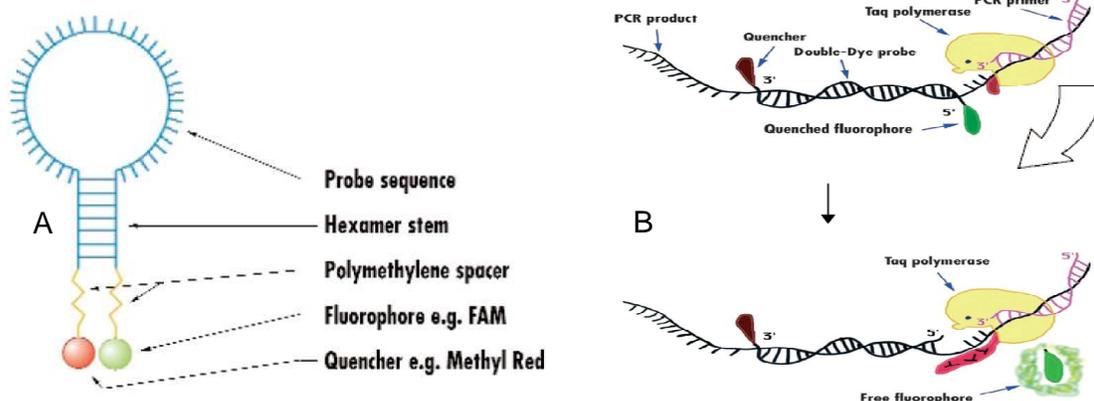


FIG. 2.4 – A : Schéma de principe des "molecular beacons". B : Fonctionnement des double dye oligonucleotides probes : le fluorophore est séparé de son inhibiteur par action de la Taq.

mais le détail de leur fonctionnement, souvent dérivé des deux techniques présentées ici, dépassent le champ de ce manuscrit.

Notons qu'au delà de la double spécificité qu'elles apportent à la réaction de PCR, les sondes fluorescentes permettent aussi un multiplexage de la réaction de PCR par utilisation de fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes. On peut ainsi dans un même tube amplifier des fragments d'ADN différents et repérer indépendamment le résultat de chaque amplification en utilisant des sondes spécifiques de chaque fragment émettant à des longueurs d'ondes différentes.

**Applications directes** Comme mentionné plus haut, la transcription inverse couplée à la PCR quantitative permet de mesurer précisément l'expression d'un gène dans un échantillon donné. En utilisant les propriétés de multiplexage de la PCR quantitative, on amplifie souvent le gène d'intérêt avec un gène de référence dont le niveau d'expression dans l'échantillon est connu, et on mesure l'expression du gène cible par différence de Ct avec la référence connue (quantification relative). Cette technique permet par exemple de déterminer si une personne est ou non porteuse d'un gène de prédisposition à une maladie, comme par exemple des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 pour le cancer du sein héréditaire chez la femme (voir par exemple Scully & Puget [2002] pour une revue détaillée). Un autre exemple souvent cité dans le domaine médical est la détection précoce de l'infection de cellules par un virus connu comme celui du SIDA.

En outre, la PCR est utilisée dans l'industrie agro-alimentaire afin de valider l'absence ou la présence de bactéries pathogènes dans des échantillons de nourriture. Un projet international (FOOD-PCR) visant à normaliser les détections par PCR

de 5 bactéries pathogènes les plus répandues (*Salmonella enterica*, E-Coli...) dans la nourriture a ainsi été financé en 2000, pour 3 ans et à hauteur de plus de 2 M€ par la commission européenne [Hoorfar & Cook, 2003]. L'utilisation de la PCR pour attester de la qualité des aliments est aujourd'hui reconnue par la grande majorité des agences sanitaires nationales. Cette méthode présente principalement les avantages de la rapidité et d'un faible coût lorsqu'on la compare aux méthodes traditionnelles basées sur la culture de bactéries.

Bien que les applications présentées ci-dessus semblent simples sur le principe (détecter directement un pathogène ou une mutation par amplification directe d'une séquence particulière d'ADN les caractérisant), il est important d'avoir conscience de la difficulté inhérente à la mise en oeuvre de cette pratique de façon reproductible et dans un format commun à tous les acteurs du domaine. Le choix des références et des différents matériels tant biologiques que physiques utilisés dans les expériences peuvent fortement influencer sur la nature des résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre, et de nombreuses équipes de recherche travaillent encore aujourd'hui à la mise au point de protocoles fiables et transposables, tant dans le domaine agro-alimentaire que médical [de Cremoux *et al.*, 2004].

### 2.1.3 Matériels commerciaux existants

Les premières réactions de PCR étaient réalisées « au bain-marie » en transférant les tubes de réactions entre trois bains thermostatés, ce qui, on s'en doute, représentait une tâche à la fois prenante et plutôt dénuée d'intérêt. La première révolution dans le domaine de l'instrumentation fut donc l'apparition du premier « thermocycleur », commercialisé par PECEI (joint venture de Cetus et Perkin Elmer) en 1987 et fonctionnant grâce à un module à effet Peltier permettant de chauffer et refroidir les tubes selon des temps de cycle précis. La plupart des instruments de paillasse actuels, bien que plus performants en termes de rampe de chauffage/refroidissement et présentant plus de fonctionnalités de programmation des cycles fonctionnent encore souvent sur ce principe.

Il faudra attendre 1996 pour qu'apparaisse le premier appareil de PCR quantitative en temps réel, le ABI 7700 commercialisé par Applied Biosystems (devenu une division de Perkin Elmer) en même temps que son système TaqMan de sondes fluorescentes. Il apparaît rapidement un grand nombre de systèmes commerciaux, dont la majorité est dédiée à l'analyse haut débit d'ADN et fonctionne avec des microplaques 96 puits voire 384 puits. Les cycles de température sont toujours effectués grâce à un module à effet Peltier, les échantillons sont excités par laser ou par une combinaison de lampes à large spectre et de filtres, et la détection se fait généralement sur des barrettes CCD. Pendant l'intervalle de quasiment 10 ans séparant l'apparition du premier thermocycleur de celle des appareils quantitatifs, de nombreux chercheurs ont travaillé sur l'aspect tant physique que biologique de la quantification de la réaction en temps réel, construisant des systèmes quantitatifs

« faits maison » [Higuchi *et al.*, 1993].

On voit apparaître à la même époque une autre génération d'instruments de PCR quantitative, plus flexibles mais moins haut-débit, utilisant des techniques originales de chauffage, de manipulation des liquides ou de détection. Parmi eux, on peut citer le Corbett Rotor Gene, combinant centrifugation des tubes d'échantillons et chauffage par flux d'air, assurant ainsi une parfaite uniformité thermique des échantillons. Le Light Cycler, développé par Idaho Technologies [Wittwer *et al.*, 1997] et commercialisé par Roche, utilise des capillaires d'un volume de 20  $\mu\text{L}$  à 100  $\mu\text{L}$  placés dans un support tournant et eux aussi chauffés par circulation d'air chaud, permettant d'atteindre des rampes de refroidissement et de chauffage de l'ordre de 20°C par seconde et de réduire les temps d'analyse à une trentaine de minutes contre plus de deux heures pour les machines classiques. L'utilisation de capillaires commence à nous rapprocher de la microfluidique, qui est rappelons le au centre de ce chapitre, et dans laquelle nous entrons définitivement avec le Smart Cycler, commercialisé par Cepheid, ainsi que les systèmes développés par Affymetrix et Motorola, que nous mentionnerons dans la partie suivante.

## 2.2 Systèmes de PCR microfluidiques

Le lecteur l'aura sans doute ressenti, il est extrêmement tentant de miniaturiser les volumes dans lesquels est pratiquée la réaction de PCR, puisqu'au delà des atouts inhérents à tous les systèmes microfluidiques décrits au chapitre 1 (tels l'économie de réactifs par réduction des volumes), ces méthodes appliquées à la PCR permettront d'accélérer les temps de thermalisation de l'échantillon tout en diminuant la consommation d'énergie nécessaire à celle-ci (permettant ainsi la création de systèmes portables). Il a de plus été suggéré très tôt qu'une variation rapide et contrôlée de la température améliorerait à la fois la spécificité et l'efficacité de la réaction [Wittwer & Garling, 1991], et les microsystèmes, par leur faible inertie thermique, ont le potentiel d'intégrer facilement cette propriété. Les appareils miniaturisés appartiennent à deux grandes familles : les systèmes en chambre, où l'échantillon est immobile, et ceux dans lesquels l'échantillon circule, dits en flux continu.

En excluant les systèmes basés sur des capillaires, dont les premières traces remontent à 1989 [Wittwer *et al.*, 1989], on peut ainsi dater l'apparition du premier système de PCR microfluidique aux années 1993-1994, qui consistait alors en une simple microchambre en silicium placée sur un module à effet Peltier [Northrup *et al.*, 1993; Wilding *et al.*, 1994], et exploitait la bonne conductivité thermique du silicium couplée au faible volume de la chambre (donc sa faible inertie thermique) pour accélérer les variations de température. L'apparition du premier système de réaction en flux continu remonte à la même époque [Nakano *et al.*, 1994] : l'échantillon subit des cycles de température par circulation dans un capillaire traversant différentes zones de température. L'intégration de cette méthode sur puce microfluidique fera cependant plus de bruit [Kopp *et al.*, 1998], avec une rapidité de réaction alors inégalée.

Les deux voies progressent ensuite parallèlement vers toujours plus d'intégration et de haut-débit, comme nous allons le décrire dans cette partie.

Un autre aspect évidemment important dans le cadre de la PCR se rapporte aux méthodes de régulation de température utilisées dans les microsystèmes. Celles-ci le sont particulièrement dans le cas des chambres microfluidiques et seront donc rapidement présentées dans cette partie. Enfin, du fait du grand rapport surface/volume inhérent aux systèmes microfluidiques, des traitements de surface sont souvent indispensables au bon déroulement de la PCR : cet aspect sera brièvement abordé en fin de partie. Nous ne pouvons pas dans ce manuscrit couvrir en détails le champ immense que représente la PCR en microfluidique, et le lecteur intéressé pourra se reporter à deux revues très complètes [Zhang & Xing, 2007; Zhang *et al.*, 2006a] pour plus de détails. D'autres revues plus courtes [Auroux *et al.*, 2004; Roper *et al.*, 2005], plus ciblées sur les matériaux utilisés [Sun & Kwok, 2006], ou traitant plus généralement des microsystèmes de diagnostic [Landers, 2003] sont également disponibles dans la littérature.

### 2.2.1 PCR microfluidique en chambre

Relativement simples sur le principe, les microsystèmes de PCR en chambre trouvent leur sens dans la possibilité de multiplier les chambres sur une même puce et dans l'intégration de plusieurs étapes amont et aval de la réaction de PCR sur un même support. Ils font appel à des systèmes de régulation de température de plus en plus sophistiqués permettant de tirer pleinement parti de la faible inertie thermique de l'échantillon. Notons que c'est pour l'instant cette technique qui a été la plus souvent retenue pour le développement industriel de machines de PCR miniaturisées.

#### 2.2.1.a Fonctionnement séquentiel

C'est principalement par leur possibilité de fonctionner en mode séquentiel, par déplacements successifs de l'échantillon dans différentes parties du système correspondant à différentes applications, que les systèmes de PCR en microchambre permettent l'intégration de multiples processus analytiques au sein d'une même puce. Les premières tentatives d'intégration de multiples étapes sur le même support voient le jour en 1996 avec l'intégration dans un même système d'une microchambre de PCR avec une électrophorèse capillaire sur puce [Woolley *et al.*, 1996]. Des systèmes couplant PCR en microchambre, mélange des produits avec un intercalant fluorescent, électrophorèse sur gel et détection de ce dernier au sein d'un système unique sont présentés en 1998 [Burns *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 1998]. On voit à la même époque l'apparition des premiers microsystèmes « statiques » de PCR quantitative, que la miniaturisation a permis de rendre portables [Belgrader *et al.*, 1998, 1999; Northrup *et al.*, 1998]. En particulier, les travaux de Northrup *et al.* [1998] ont ouvert la voie aux machines commerciales développées par la compagnie

Cepheid mentionnée plus haut, au sujet desquelles plus de détails sont disponibles dans [Belgrader *et al.*, 2000, 2001]. En 2001, Motorola fait part de l'intégration d'une étape de PCR en chambre avec électrophorèse intégrée [Liu *et al.*, 2001], à laquelle fera suite une intégration complète des étapes de capture cellulaire, lyse et purification du contenu des cellules, PCR, et hybridation des produits sur puce à ADN [Liu *et al.*, 2004].

La détection quantitative a été intégrée à la PCR en microchambre, grâce à la fabrication de thermocycleurs intégrant une détection optique et adaptés au format en micropuces [Morrison *et al.*, 2006], cette réalisation matérielle lourde étant généralement réalisée par des entreprises privées. Alternativement, une détection quantitative a été réalisée en plaçant sur un microscope une puce comprenant des éléments de chauffage intégrés et sur laquelle des gouttes de réaction recouvertes par une goutte d'huile sont déposées [Neuzil *et al.*, 2006]. Enfin, certains systèmes quantitatifs ont été rendus portables par l'intégration d'une excitation par diode laser et détection par photomultiplicateur [Cady *et al.*, 2005].

Transcription inverse et PCR ont été couplées en microchambre dans le groupe de S. Quake en utilisant des réactifs commerciaux permettant de faire la transcription inverse et la PCR en une seule étape [Marcus *et al.*, 2006b]. Cette RT-PCR « monoétape » a été effectuée sur des virus capturés sur des billes magnétiques puis purifiés en microchambre [Lien *et al.*, 2007], ou suivie d'une électrophorèse intégrée à la puce [Toriello *et al.*, 2006]. Il reste cependant préférable tant en termes de flexibilité que pour l'optimisation des rendements de rester en deux étapes séparées pour la transcription inverse et la PCR, ce qui a aussi été réalisé en utilisant une combinaison astucieuse de micropompes et microvalves [Liao *et al.*, 2005]. Ces deux étapes ont finalement été intégrées par les auteurs à la désormais classique électrophorèse post-PCR [Huang *et al.*, 2006]. Le groupe de Steve Quake propose peu après sa première tentative un système où des cellules uniques sont lysées, leur ARNm capturé sur des billes et reverse transcrit grâce à des amorces fixées sur ces billes. L'ADNc résultant est purifié, mais sans amplification par PCR subséquente [Marcus *et al.*, 2006a]. A l'heure actuelle, l'intégration de la transcription inverse à la PCR sur puce semble être un sujet « chaud » et de nombreuses communications devraient encore prochainement sortir sur le sujet. Le lecteur pourra se reporter à la thèse de N. Bontoux, décrivant la conception d'un système microfluidique de RT-PCR sur cellule unique pour plus d'informations à ce sujet [Bontoux, 2006]. Citons enfin l'intégration récente d'une phase de purification de l'ADN par chromatographie sur phase solide avant PCR [Legendre *et al.*, 2006], permettant de débarrasser un lysat cellulaire de tous les inhibiteurs potentiels de la réaction. Relevons aussi l'avance considérable qu'avait pris la société Affymetrix qui rapportait déjà en 2000 la création d'un système microfluidique intégrant les phases de purification de lysat cellulaire, de transcription inverse, de PCR et d'hybridation de l'ADN amplifié sur puce [Anderson *et al.*, 2000].

Le développement de procédés multi-étapes au sein d'une même puce a été rendu

possible par la maîtrise des technologies des microvalves et micropompes, liée d'une part aux technologies du silicium issues de la microélectronique, et d'autre part à celles issues du développement spectaculaire de la lithographie molle. On trouve ainsi principalement des micro-chambres en silicium, en polycarbonate ou en PDMS. Ces développements ont aussi permis l'intégration de multiples chambres de réactions jumelles au sein du même système, tirant parti de la possibilité de haute parallélisation offerte par la miniaturisation (voir par exemple [Lagally *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Marcus *et al.*, 2006b; Warren *et al.*, 2006] et figure 2.5A). C'est par ailleurs dans Lagally *et al.* [2001] que l'on voit la première détection d'une molécule unique d'ADN en systèmes microfluidiques : si ceux-ci s'avéraient plus performants en terme de rapidité d'analyse, ils n'égalaient jusque là pas les systèmes classiques en sensibilité.

### 2.2.1.b Systèmes de chauffage

Parmi les nombreux systèmes intégrés développés en microchambre, on trouve une grande variété de méthodes de chauffage, qui peuvent être décomposées en deux grandes familles : par contact et sans contact.

Parmi les méthodes de chauffage par contact, on retiendra le chauffage par film fin intégré à la puce (en polysilicium, platine ou ITO-indium tin oxyde [Belgrader *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2005]), ou le chauffage direct par contact avec un module Peltier [Hong *et al.*, 2001; Khandurina *et al.*, 2000]. Cette dernière méthode est peu avantageuse pour le chauffage d'un échantillon immobile, puisque le gain d'inertie thermique et donc de dépense énergétique dûs à la diminution des volumes sont souvent perdus par l'inertie du bloc lui-même.

Le chauffage sans contact présente l'avantage par rapport à l'intégration de composants à la puce d'éviter toute contamination ou inhibition due au contact de la solution avec ces composants. D'autre part, cette méthode évite des étapes de fabrication compliquées, et débouche sur d'excellentes performances en terme de vitesse de thermalisation. Parmi les chauffages sans contact, mis à part l'utilisation d'un flux d'air, déjà mentionnée pour les dispositifs commerciaux, la méthode la plus populaire, développée par le groupe de J. Landers, consiste à utiliser un rayonnement infra-rouge couplé à une source froide pour chauffer et refroidir la solution [Easley *et al.*, 2005; Giordano *et al.*, 2001; Oda *et al.*, 1998; Roper *et al.*, 2007]. Citons aussi quelques méthodes plus originales utilisant les micro-ondes, les phénomènes inductifs [Pal & Venkataraman, 2002], ou bien encore l'effet Joule. La détection se fait le plus souvent par des capteurs microfabriqués dans la puce, ou des thermocouples extérieurs liés à la surface de celle-ci. Des méthodes de mesure sans contact originales, basées sur des variations d'indice optique [Easley *et al.*, 2005] ou une mesure du rayonnement infra-rouge [Roper *et al.*, 2007] ont aussi été en toute logique développées parallèlement au chauffage sans contact.

## 2.2.2 PCR microfluidique en flux continu

La PCR en microchambre, malgré sa grande flexibilité d'intégration, et son utilisation dans quelques dispositifs commerciaux, reste cependant limitée par la nécessaire thermalisation de l'échantillon et de la chambre le contenant, gourmande en temps et en énergie, et surtout l'impossibilité de mener simultanément plusieurs réactions sans recourir à des dispositifs de fabrication compliquée. On peut ainsi dire que cette méthode ne tire pas pleinement partie des opportunités offertes par les microsystèmes modernes.

La PCR en flux continu apporte un début de réponse à ces problèmes : c'est par sa circulation au sein du système que l'échantillon subit les cycles de température en traversant des parties thermalisées différemment. Cette conversion « temps / espace » permet de faire varier les temps de cycle à volonté en faisant varier la vitesse de circulation de l'échantillon au sein du système, celui-ci se thermalisant quasi-instantanément du fait de son faible volume et du grand rapport surface/volume dans les microsystèmes. On s'affranchit ainsi des limites imposées par la performance des systèmes de thermalisation. D'autre part, il est plus économique énergétiquement de maintenir trois zones de température constante que de faire varier la température d'une même zone entre trois niveaux. Mentionnons tout de même un inconvénient : du fait du contrôle en flux et des temps d'équilibration de pression longs au sein des microcanaux [Tabeling, 2003], les ratios de temps utilisés pendant la réaction sont généralement fixés par l'architecture du système. On peut cependant imaginer un contrôle en pression qui permettrait de fixer presque instantanément la vitesse du fluide dans les canaux, et donc les temps de thermalisation. Quoiqu'il en soit, du fait de son apparition plus tardive, et de sa mise en oeuvre plus difficile, on trouve moins de publications sur la PCR en flux continu, ainsi que moins de systèmes hautement intégrés.

Dans leurs premiers travaux, Kopp *et al.* [1998] réalisent la réaction de PCR sur un fragment de 176 pb en des temps allant de 4 minutes jusqu'à 90 secondes dans une puce où les zones de température sont créées par positionnement sur trois blocs chauffant en cuivre séparés par de l'air (figure 2.5B). On voit ensuite apparaître en 2001 et 2002 des systèmes dont la principale caractéristique est une intégration plus poussée des contrôles de température [Schneegass *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002], avec éventuellement quelques modifications dans le design de la puce. La circulation des fluides est assurée par pompage hydrostatique, ou en flux avec un pousse-seringue. A titre indicatif, la limite des 4 minutes ne sera atteinte en microchambre qu'en 2001 [Giordano *et al.*, 2001], grâce à une méthode perfectionnée de chauffage par laser.

### 2.2.2.a Intégration de différentes étapes

L'intégration de la transcription inverse est effectuée en 2003 par Obeid *et al.* [2003], dans une puce comportant plusieurs sorties à différentes étapes de la réaction de PCR, permettant de suivre séquentiellement l'avancement de celle-ci. La

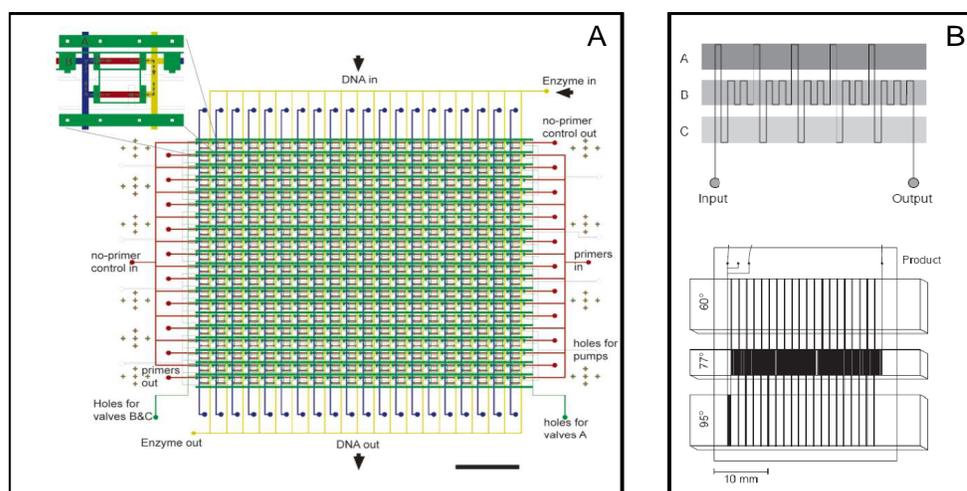


FIG. 2.5 – A : Exemple de système hautement parallèle de PCR en microchambre (400 réactions simultanées, d'après Liu *et al.* [2003]). B : Première puce microfluidique de PCR en flux continu (d'après Kopp *et al.* [1998])

transcription inverse est effectuée dans un premier canal dont la sortie est connectée à l'entrée du canal dédié à la PCR. Deux modes de fonctionnement sont utilisés. Dans la première configuration, la transcription inverse est effectuée sans circulation dans le canal dédié (introduction et contrôle du mouvement de l'échantillon par pression hydrostatique), ce qui revient à un fonctionnement « en chambre », puis les produits résultants sont mélangés en flux aux réactifs de PCR et amplifiés en flux continu. Dans une deuxième configuration, la transcription inverse est effectuée en flux et les produits résultants mélangés en flux aux réactifs de PCR : les deux réactions sont donc cette fois-ci effectuées en flux, mais à des vitesses différentes.

Hashimoto *et al.* [2006] présentent en 2006 une puce en flux continu intégrant les étapes de PCR, de ligation et de détection sur puce à ADN. Ce même groupe avait déjà en 2005 égalé record de vitesse de Kopp *et al.* [1998] sur un fragment d'ADN plus long (500 pb) avec un temps total de réaction de 100 s dans une puce en polycarbonate [Hashimoto *et al.*, 2004].

### 2.2.2.b Dispositifs hybrides

Mentionnons parallèlement l'existence de dispositifs hybrides dans lesquels l'échantillon est effectivement en mouvement mais tourne en boucle dans une chambre fermée : ces dispositifs tirent parti des réactions en flux continu, puisque c'est l'échantillon qui se déplace entre des zones de température et non la température de la chambre qui varie. Ils ne peuvent cependant pas être considérés comme complètement en flux continu puisque l'échantillon ne se déplace pas au sein d'un canal mais est contenu dans un compartiment, et ils conservent ainsi l'aspect séquentiel propre

aux chambres. Le mélange réactif peut ainsi être déplacé au sein d'une chambre verticale (et donc cyclé thermiquement) en exploitant l'instabilité de Rayleigh-Bénard dans un cylindre placé entre une plaque à 95°C au bas de la chambre et une plaque à 60°C en haut de celle-ci [Krishnan *et al.*, 2002], ou plus simplement la convection naturelle [Wheeler *et al.*, 2004]. On peut aussi faire circuler l'échantillon dans un micro-anneau comprenant trois zones de température grâce à des micro-pompes peristaltiques intégrées réalisées par MSL [Liu *et al.*, 2002]. L'échantillon peut aussi être déplacé électrocinétiquement au sein de la puce [Chen *et al.*, 2005].

### 2.2.2.c Contamination croisée

Comme mentionné en introduction de cette thèse, les dispositifs microfluidiques monophasiques de réaction en flux ont l'inconvénient d'être sujets aux phénomènes de dispersion lorsque le mouvement des fluides est contrôlé en pression, ce qui entraîne une dilution des réactifs et une perte de précision. Ce désavantage peut être circonvenu par l'utilisation de phénomènes électrohydrodynamiques pour déplacer les fluides, mais ceux-ci font intervenir une compétition complexe entre électroosmose et électrophorèse, et dépendent fortement de quel produit est manipulé dans quel matériau, ce qui rend leur généralisation difficile.

Il est par ailleurs frappant de voir l'importance accordée à l'état de surface dans les dispositifs dédiés à la PCR, et plus particulièrement dans ceux fonctionnant en flux : il a en effet été très tôt compris [Wilding *et al.*, 1994] que l'état de la surface et sa biocompatibilité influent fortement sur l'efficacité de la réaction, par le biais de phénomènes d'adsorption des produits ou réactifs et de dénaturation de protéines. On rencontre ainsi de nombreux traitements de surface, la plupart faisant appel à la silanisation de surface en verre ou silicium par une molécule hydrophobe [Obeid *et al.*, 2003; Schneegass *et al.*, 2001]. On trouve aussi des méthodes de revêtement dynamique, où une molécule biocompatible (BSA par exemple) est ajoutée au mélange réactionnel afin d'éviter adsorption ou dénaturation des produits d'intérêt. C'est ainsi pour cette raison que Roche commercialise parallèlement à son Light Cycler utilisant des capillaires en verre des « mix » de PCR spécialement formulés.

Si ces revêtements permettent de maintenir une bonne efficacité de la réaction de PCR malgré le fort effet des surfaces, ils ne permettent que partiellement de résoudre les problèmes de contamination inter-échantillons. La plus grande promesse des réacteurs en flux est en effet la possibilité de pouvoir effectuer une analyse en continu, différents échantillons se suivant au sein du même réacteur. Dans des réactions aussi sensibles à la contamination que la PCR, l'adsorption même minime des produits sur les parois du réacteur suffit à fausser les résultats. C'est pourquoi, parmi tous les systèmes de PCR présentés ci-dessus, on rencontre toujours des systèmes « à usage unique », ou nécessitant un lavage entre chaque échantillon. Au delà de l'évidente perte de débit (et de compétitivité économique dans le cas des systèmes jetables), l'utilisateur y perd aussi en reproductibilité, puisqu'il est difficile d'assurer que deux

réactions effectuées dans deux systèmes différents ou à deux moments distincts auront exactement la même histoire. Cela est d'autant plus évident lorsque l'on observe les difficultés rencontrées par des centres spécialisés en PCR, utilisant des matériels commerciaux éprouvés, à uniformiser leurs protocoles et leurs résultats.

#### 2.2.2.d PCR en gouttes

L'utilisation de gouttes en tant que microréacteurs s'impose ainsi comme la meilleure méthode afin de tirer parti des avantages des réactions en flux continu, sans pour autant souffrir des phénomènes de dispersion, d'inactivation, de contamination et de perte de reproductibilité mentionnés plus haut. Les prémices de la réaction de PCR en flux segmenté eau/huile apparaissent dans Schneegass *et al.* [2001] et Chiou *et al.* [2001], ce dernier système utilisant un procédé hybride de goutte déplacée d'avant en arrière dans un tube fermé. Obeid *et al.* [2003] utilisent une bulle d'air pour séparer les phases réactives des phases de lavage. Dans le même esprit, Nakayama *et al.* [2006] utilisent en flux continu un plot d'huile fluorée visqueuse précédant leur plot aqueux de PCR afin de « nettoyer » leur canal des bulles d'air avant réaction. Cet article est aussi une des rares démonstrations de PCR quantitative dans un système microfluidique en flux. Il n'est cependant appliqué qu'à un seul échantillon. En effet, si l'intégration d'une détection en temps réel est relativement aisée dans une microchambre, puisque l'échantillon est immobile, il devient plus ardu lorsque l'échantillon doit être « suivi » au cours de la réaction. Le système devient d'autant plus compliquée dans le cas de plusieurs gouttes circulant à la suite dans un capillaire.

Ce n'est qu'en 2003 que la microfluidique de gouttes proprement dite est appliquée à la réaction de PCR dans le groupe de J. Roeraade [Curcio & Roeraade, 2003]. Des gouttes sont formées et transportées dans un capillaire en Teflon à travers trois bains thermostatés par une huile immiscible. L'utilisation d'une huile fluorée à la place d'une huile carbonée permet de diminuer efficacement la contamination entre gouttes mais l'intercalation de gouttes de lavage entre les microréacteurs reste nécessaire pour s'en affranchir. Cette contamination est principalement attribuée par les auteurs au détachement de petites gouttes satellites des microréacteurs ensuite prélevées par la goutte suivante. Park *et al.* présentent aussi en 2003 un système de PCR en flux segmenté utilisant un capillaire en silice silanisé enroulé autour d'un cylindre chauffant pour le cyclage thermique [Park *et al.*, 2003]. Dans ce système, les segments aqueux sont séparés par de l'air, et un segment de lavage est toujours incorporé entre chaque segment réactionnel. On peut douter de la précision des temps de cyclage thermique dans cette situation, l'air présentant une forte dilatation aux températures utilisées pour la PCR.

Avant d'entrer dans le vif de sujet, il me semble enfin utile de mentionner quelques méthodes originales de PCR en gouttes utilisant le déplacement d'une goutte sur un substrat plan intégré avec différentes zones de température par électromouillage

[Chang *et al.*, 2006] ou ondes acoustiques de surface [Guttenberg *et al.*, 2005] déjà présenté en introduction. Guttenberg *et al.* [2005] intègrent aussi une détection en ligne permettant la PCR quantitative à leur méthode. Bien qu'il s'agisse d'un problème crucial dans les applications de PCR, le problème de la contamination n'est pas abordé par les auteurs. On peut s'attendre à ce que les méthodes utilisant l'électromouillage, du fait de la nécessaire application d'un champ électrique dans le système, soient plus délicates à mettre en œuvre du point de vue de la contamination et nécessitent une parfaite homogénéité de surface du substrat pour fonctionner.

Signalons aussi le développement spectaculaire de la PCR en émulsions, consistant dans les grandes lignes à mener la PCR dans des microgouttes préparées comme des émulsions classiques, sans l'aide de la microfluidique. Lorsque l'on souhaite amplifier une famille de fragments d'ADN, il s'avère que les brins les plus courts sont préférentiellement amplifiés, et que des artefacts liés à l'amplification de fragments recombinés gênent l'analyse. L'utilisation de microgouttes, du fait du faible nombre de molécules qu'elles contiennent, permet de s'affranchir de ces problèmes et d'utiliser de faibles concentrations des séquences de départ, chaque goutte contenant statistiquement un seul type de séquence, généralement sous la forme d'une molécule unique. Ce processus peut-être couplé avec un attachement des fragments amplifiés sur des particules greffées qui permettent alors de réaliser des essais d'hybridation avec un très bon rapport signal/bruit. Avec des protocoles utilisant cette méthode, deux groupes ont démontré le séquençage du génome complet de bactéries plus rapidement (facteur 100 en temps) et à plus faible coût (coûts divisés par 9) qu'avec les méthodes classiques utilisant l'électrophorèse [Margulies & *al.*, 2005; Shendure *et al.*, 2005].

## 2.3 Système de PCR développé lors de cette thèse

Notre système fonctionne sur le principe de la microfluidique de gouttes, et s'appuie plus particulièrement sur le travail présenté dans Curcio & Roeraade [2003]. Concrètement, les échantillons aqueux sont transportés sous forme de gouttes par une huile immiscible dans un capillaire. Ce capillaire traverse diverses zones de température, permettant le déroulement de la réaction de PCR. La première étape a consisté en la mise au point du cœur du système, c'est à dire de la thermalisation et du système fluide utilisé pendant toute la suite des travaux. Je tiens pour cette partie à préciser que les études théoriques puis les premières expériences ont principalement été effectuées par Kevin D. Dorfman, alors post-doctorant au laboratoire. Après validation de cette étape avec les premières réactions de PCR en gouttes, un système complet d'automatisation des prélèvements et de la détection a été mis au point. Nos travaux ont ainsi débouché sur un système microfluidique haut-débit et sans contamination pour la PCR. Cette partie présentera successivement les fondements théoriques de notre système et les choix pratiques en découlant pour sa réalisation, puis la méthode originale d'injection mise au point pour faire de celui-ci

un *réel* instrument haut-débit avec détection en ligne.

### 2.3.1 Conception des systèmes thermiques et fluidiques

Le préalable à la conception d'un instrument performant était la compréhension des phénomènes prenant place au sein d'une microgoutte poussée dans un capillaire par de l'huile. De là, un choix minutieux de l'huile de transport et des capillaires utilisés a été effectué et un cylindre chauffant a été construit afin d'assurer la thermalisation de la réaction. La définition des architectures ainsi que les premiers résultats obtenus ont fait l'objet d'un article en 2005 [Dorfman *et al.*, 2005].

#### 2.3.1.a Gouttes en capillaires : fondements théoriques

On trouve à ce sujet une littérature très fournie, remontant aux années 1960, et dont les motivations premières sont la modélisation de l'extraction du pétrole et l'étude de la circulation des cellules sanguines. Nous nous contenterons d'en tirer les informations essentielles à la conception de notre système. Un traitement plus détaillé peut être trouvé dans une revue d'Olbricht [1996].

**Effets généraux.** Précisons tout d'abord, qu'en fait de gouttes aqueuses, notre système est conçu pour fonctionner avec des *plots*, c'est à dire, rappelons le, des gouttes dont le diamètre absolu est supérieur à celui du capillaire les contenant, et sont donc déformées dans celui-ci. C'est à ce prix que l'on peut s'affranchir des effets liés à la gravité et d'une façon plus générale obtenir des trains de gouttes stables. Nous nous plaçons dans un système où l'huile est préférentiellement mouillante sur les parois du capillaire, ceci afin de minimiser les risques d'adsorption des réactifs sur les parois et de contamination inter-gouttes. L'approche théorique est ainsi facilitée puisque l'on ne se préoccupe pas du mouvement d'éventuelles lignes de contact. Nous le verrons plus loin dans cette partie, remplir cette dernière condition a demandé un effort particulier. Enfin, comme souvent en microfluidique, nous travaillons à faible nombre capillaire  $C_a \ll 1$ . Les études résumées brièvement ci-dessous sont valables à faible nombre de Reynolds, globalement  $Re < 1$ . Bien que des nombres de Reynolds supérieurs ne fassent pas sortir les systèmes d'un régime laminaire, il sera préférable pour notre système de se placer dans ces conditions de  $Re < 1$ , terrain connu, ce qui impose donc des conditions sur les vitesses utilisées dans nos écoulements.

Partant de ces pré-requis, il est alors important de comprendre comment les gouttes interagissent avec le flux d'huile les transportant. Les travaux de Bretherton [Bretherton, 1961] sont souvent cités en référence dans ce domaine, et bien que correspondant à la circulation d'une bulle d'air dans un milieu liquide continu, ils donnent un bon aperçu des phénomènes à l'œuvre.

Tout d'abord, à faible nombre capillaire, l'épaisseur du film d'huile séparant les gouttes des parois du tube varie proportionnellement à  $C_a^{\frac{2}{3}}R$ . Cette formule, origi-

nalement établie pour une bulle d'air (viscosité nulle), a été ultérieurement raffinée [Hodges *et al.*, 2004] pour des gouttes liquides, mais sans modifier notablement l'ordre de grandeur des résultats pour des gouttes peu visqueuses. Il semble par ailleurs physiquement naturel que l'épaisseur du film d'huile soit une fonction croissante du nombre capillaire, puisque celui-ci mesure l'effet des forces visqueuses par rapport à la tension de surface, et donc finalement la déformabilité de la goutte et la quantité d'huile qui pourra s'intercaler entre elle et les parois.

La présence de gouttes au sein du liquide continu induit des variations de pression au sein de celui-ci. Pour des gouttes de rayon absolu  $a$  inférieur au rayon du capillaire  $R$  ( $\lambda \ll 1$ ), on montre que la chute de pression  $\Delta P$  entre l'amont et l'aval de la goutte s'écrit, avec les symboles définis en annexe à la fin de cette thèse [Brenner & Bungay, 1971] :

$$\frac{\Delta PR}{\eta_o V} = \frac{16[(9\sigma + 2)^2 - 40]}{27(\sigma + 1)(3\sigma + 2)} \lambda^5 + o(\lambda^{10}) \quad (2.1)$$

Cette chute de pression est associée au remplacement du fluide continu par du fluide dispersé (dépendance en  $\sigma$ ) et à l'altération des lignes de courant par les contraintes à l'interface eau/huile (dépendance en  $\lambda$ ). Elle peut comme on le voit être positive ou négative selon le rapport  $\sigma$  des viscosités entre le fluide continu et le fluide dispersé. Cette formule ne prend cependant pas en compte un troisième effet pour  $\lambda \rightarrow 1$  : la déformation de la goutte. Pour des plots, on montre que la chute de pression est principalement liée au remplacement d'un fluide par l'autre et à la circulation d'huile dans le film annulaire séparant la goutte des parois [Ho & Leal, 1975]. Elle est à nouveau théoriquement proportionnelle à une puissance du nombre capillaire avec [Bretherton, 1961] :

$$\Delta P \propto \frac{C_a^{\frac{2}{3}} \gamma}{R}. \quad (2.2)$$

Notons que cette chute de pression est une fonction *croissante* de la tension de surface, ce qui correspond bien à l'idée qu'avec une tension de surface plus faible, la goutte se déformera plus, donc l'épaisseur du film de lubrification augmentera et la perte de charge liée aux effets visqueux dissipatifs dans ce film s'en trouvera réduite.

La goutte ne se déplace en effet pas exactement à la vitesse du liquide qui la pousse, mais à une vitesse légèrement supérieure, elle aussi proportionnelle à  $C_a^{\frac{2}{3}}$ . Ce résultat peut-être obtenu analytiquement dans le cas de bulles (non visqueuses), mais se transpose aussi au cas des gouttes. On peut encore comprendre cette formule par rapport à l'épaisseur du film d'huile séparant les gouttes des parois : plus celui-ci est épais, plus les gouttes circulent au centre du capillaire et sont donc entraînées par les zones de haute vitesse du profil de Poiseuille. Dans le cas de notre système, nous verrons que ce paramètre a peu d'influence et que la vitesse des gouttes peut être bien approximée par la vitesse moyenne de l'huile la transportant, le film d'huile les séparant des parois étant très fin (théoriquement de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ).

Les résultats expérimentaux ne corroborent malheureusement pas ces valeurs théoriques, particulièrement au faible nombre capillaire de notre système, ceci étant attribué à la quasi-inévitable présence d'agents tensio-actifs en solution. Nous verrons de plus que nous ajoutons volontairement un tensio-actif dans notre système. La présence de celui-ci complique sérieusement l'analyse du problème, car il peut se répartir inhomogènement autour de la goutte, se retrouvant généralement à l'arrière, ces inhomogénéités pouvant induire des effets Marangoni [Ratulowski & Chang, 1990]. Nous retiendrons juste que dans ce cas, l'épaisseur du film de lubrification est supérieure à la valeur calculée, et la dépendance en  $C_a$  est plus faible (proportionnelle à  $C_a^{\frac{1}{2}}$ ). Tenir compte de la viscosité de la goutte implique aussi une augmentation de l'épaisseur du film. De même, la chute de pression réelle liée à la goutte est plus importante que prévue théoriquement.

**Stabilité.** Bien qu'on ne trouve pas d'études systématiques sur la stabilité globale de trains de gouttes identiques, les auteurs considèrent que l'interaction entre elles devient négligeable dès lors que leur espacement est supérieur au diamètre du capillaire [Ho & Leal, 1975; Olbricht & Leal, 1982], ou à trois fois le rayon des gouttes [Coulliette & Pozrikidis, 1998].

Concernant la stabilité d'une goutte seule, le faible nombre capillaire auquel nous travaillons nous protège d'un fractionnement de celle-ci par cisaillement [Olbricht & Kung, 1992]. Le fractionnement peut avoir lieu par l'instabilité de Rayleigh-Plateau : un cylindre liquide d'une longueur supérieure à  $\pi$  fois son diamètre se fractionne en gouttes, et il conviendra d'en tenir compte dans la conception de notre système.

Par contre, comme en témoignent de nombreuses études, le fractionnement de gouttes peut intervenir lors du passage dans une constriction, ce qui est le cas dans notre système automatisé d'injection. Le fractionnement peut ainsi s'effectuer par « sauts de Haines » : la goutte se bloque dans la constriction et n'en sort que lorsque la différence de pression à travers elle est assez grande pour la déplacer. Le déplacement est alors assez rapide pour que les effets inertiels jouent un rôle important. Les constriction rencontrées par les gouttes dans notre système sont de relativement faible amplitude, et ce phénomène n'a donc pas lieu. Une étude a par ailleurs démontré que pour des bulles compressibles, ce phénomène n'apparaissait pas pour un nombre d'Ohnesorge supérieur à  $10^{-1}$  [Gauglitz & Radke, 1989]. L'autre mode de fractionnement susceptible d'avoir lieu se produit pour des gouttes circulant lentement dans une constriction : au niveau de la constriction, la pression dans la phase continue est inférieure à la pression au delà de celle-ci du fait de la plus grande courbure de la goutte, d'où un flux de liquide dans ce col qui finit par fractionner la goutte. Du fait de notre faible nombre capillaire, le temps requis pour que l'huile circule dans le film de lubrification jusqu'à la constriction est long, et nos gouttes ont le temps de la passer avant fractionnement. On trouve dans Gauglitz & Radke [1990] un temps avant fractionnement de la forme suivante pour une constriction de

rayon  $R_c$  :

$$t = C_a^{-2} \cdot \frac{\eta_o R_c}{\gamma} \quad (2.3)$$

Finalement, comme nous le verrons, les problèmes de fractionnement effectivement rencontrés dans notre système sont liés à des problèmes de mouillage de la surface par les gouttes.

**Ordres de grandeur résultant.** Nous pouvons avec ces informations commencer à définir notre système dans son ensemble. Afin de pouvoir utiliser les théories développées ci-dessus, il nous faut utiliser une géométrie *cylindrique*. En effet, dans les canaux carrés, pourtant utilisés classiquement en microfluidique, le confinement des gouttes est totalement différent : du fait de la tension de surface, les gouttes maintiennent une forme cylindrique, et le film d'huile est réparti différemment puisque la forme de la goutte laisse les coins des canaux carrés « vides ». Ce type de géométrie est de fait beaucoup moins simple et moins étudié. Afin de travailler avec des canaux cylindriques sans recourir à des étapes de fabrication compliquée, le plus simple est donc d'utiliser des capillaires disponibles commercialement.

De la même façon, dans une première étape, afin de faciliter les opérations de prélèvement et de récupération des microgouttes il semble raisonnable de travailler avec des volumes de l'ordre du *microlitre* : des volumes supérieurs (10  $\mu\text{L}$ ) commencent à nous rapprocher de dispositifs déjà existants, tandis que des valeurs inférieures (100 nL) rendent la manipulation des gouttes dans le monde macroscopique difficile sans automatisation. Pour que les gouttes maintiennent une forme de type plot dans le capillaire, sans pour autant être trop allongées et sensibles à l'instabilité de Rayleigh Plateau, cela fixe le diamètre du capillaire utilisé à *quelques centaines de microns*.

Afin de minimiser les pertes de charge au sein de notre système et ne pas trop augmenter le nombre capillaire, nous utiliserons une huile dont la viscosité est de l'ordre de celle de l'eau. En tenant compte du fait que nous voulons travailler à un nombre de Reynolds inférieur à 1, on peut ainsi accéder à une première estimation des vitesses qui seront utilisées dans notre système : pour un capillaire de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre, en utilisant une huile de viscosité comparable à celle de l'eau, nous sommes limités à des vitesses de *quelques millimètres par seconde*. Nous nous placerons dans cette limite haute afin d'éviter les phénomènes de fractionnement dans les constriction évoqués en première partie.

Partant de cette valeur, avec des tensions de surface de l'ordre de quelques dizaines de mN/m, le nombre capillaire du système est de l'ordre de  $10^{-3}$ . Nous pouvons en déduire l'épaisseur théorique du film d'huile séparant la goutte des parois :  $h \sim 1\mu\text{m}$ , d'où une différence entre la vitesse moyenne de la goutte et celle de l'huile négligeable (inférieure à 3 %). Le nombre d'Ohnesorge de notre système est bien supérieur à  $10^{-1}$ , ce qui bien que nous ne soyons pas dans la situation de gouttes compressibles laisse présager que nos gouttes ne se fractionneront effectivement pas par sauts de Haines. Appliquée à notre système, l'équation 2.3 nous donne des temps

de l'ordre de l'heure, ce qui confirme la stabilité de nos gouttes circulant dans les constrictions du système.

Enfin, pour pouvoir comparer aisément les performances de notre système avec celles des appareils classiques, nous devons être capables d'atteindre des temps de cycles de l'ordre de 2 minutes. Compte tenu du fonctionnement en flux de notre système, on peut donc s'attendre à une longueur de capillaire de quelques mètres. Ceci conforte le choix d'une huile peu visqueuse afin de minimiser les pertes de charge.

### 2.3.1.b Choix du système fluidique

**Matériaux.** Partant de l'étude de Curcio & Roeraade [2003], il apparaît clairement que l'utilisation d'un composé perfluoré en tant qu'huile de transport est la solution la plus prometteuse pour minimiser les risques de contamination entre gouttes successives. Les huiles fluorées présentent en effet une très faible affinité pour les molécules biologiques ce qui permet d'éviter toute diffusion de l'ADN dans l'espace inter-plots, sont inertes chimiquement et utilisables à haute température. Une huile appelée FC40, commercialisée par 3M, est utilisée dans toutes nos expériences. Il s'agit d'un mélange de plusieurs perfluoroalcanes principalement à 12 carbones, de densité  $d=1,87$ . Des tests effectués en PCR quantitative par l'hôpital de l'Institut Curie ont de plus prouvé que cette huile ne perturbait en rien la réaction de PCR. Ces résultats ont été complétés ultérieurement de façon indépendante par Walsh *et al.* [2005].

#### Capillaires.

Rappelons que la stratégie proposée pour s'affranchir de la contamination est de rendre les gouttes complètement non mouillantes sur la surface du capillaire utilisé, ceci afin de permettre la formation du film d'huile évoqué et d'éviter l'adsorption des produits sur les parois du capillaire. En termes théoriques simples, il faut rendre le paramètre d'étalement  $S$  de l'huile dans le système [capillaire/huile/solution aqueuse] positif, avec

$$S = \gamma_{ds} - (\gamma_{so} + \gamma). \quad (2.4)$$

Pour une goutte d'huile posée sur la surface dans un environnement entouré d'eau (voir figure 2.6), toujours en termes simplifiés,  $S$  représente la différence d'énergie entre le cas où la goutte d'huile ne s'étale pas et où la surface est donc principalement recouverte par de l'eau (1<sup>er</sup> terme), et le cas où l'huile s'étale, ce qui revient à superposer la surface, une couche d'huile, puis une couche d'eau (2<sup>ème</sup> terme). Il semble donc naturel d'utiliser une surface fluorée, puisque celles-ci sont les surfaces connues de plus basse énergie ( $\gamma \sim 20$  mN/m), et qu'elle devrait présenter de plus une affinité particulière pour l'huile fluorée de transport. Deux stratégies s'offrent alors pour obtenir une telle surface : traiter un capillaire par des polymères fluorés, ou utiliser directement un capillaire fluoré en masse de type Teflon, l'inconvénient de ce dernier étant sa rigidité le rendant plus difficile à manipuler et à intégrer dans

un système complexe de valves.

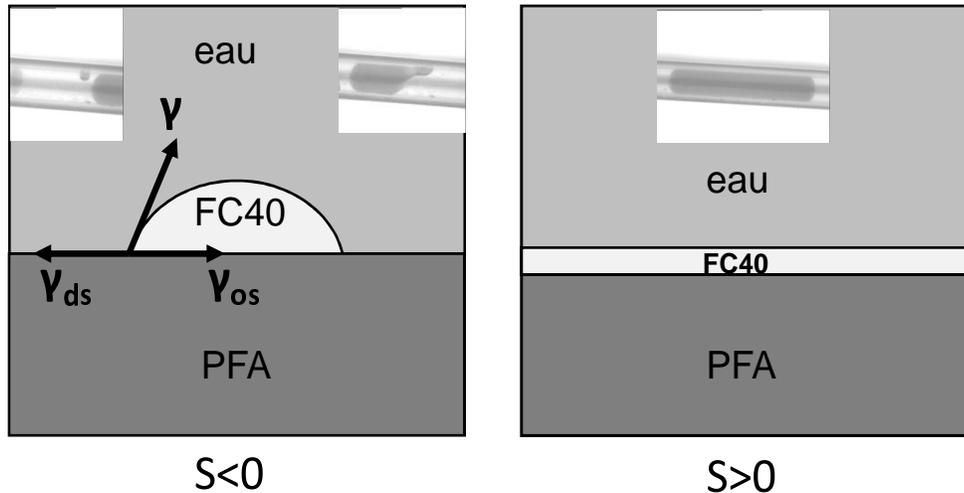


FIG. 2.6 – Influence du paramètre d'étalement sur le mouillage de la surface fluorée par l'huile. Cas  $S < 0$  : les gouttes d'eau peuvent mouiller la surface, d'où collage et fractionnement des gouttes. Cas  $S > 0$  : l'huile mouille entièrement la surface, et on n'observe pas de collage des gouttes. N.B. : les gouttes utilisées dans les expériences de PCR sont moins longues que celles représentées sur les photos ci-dessus.

Pour les capillaires flexibles non fluorés, notre choix s'est naturellement porté vers des tubes en silicone, ce matériau étant commercialement disponible à bas coût, avec des méthodes de traitement de surface bien maîtrisées. Pour sa simplicité de mise en œuvre, nous avons retenu le procédé de silanisation par des fluorosilanes (voir annexe 1). Cependant, alors que le protocole décrit en annexe 1 fonctionne bien sur des petites portions de capillaire (quelques centimètres, voire dizaines de centimètres), il s'est révélé inapplicable avec la longueur de tubes que nous utilisons (plusieurs mètres). En effet, les tubes sont traités par circulation du mélange liquide de silane, et il est impossible d'obtenir un traitement reproductible et fiable sur de telles longueurs : le solvant du silane s'évapore au fur et à mesure du tube, des bulles d'air sont piégées au milieu du flux, ceci nuisant à l'uniformité du revêtement. D'autre part, ces traitements de surface se révèlent fragiles et doivent souvent être renouvelés.

Nous avons donc opté pour un système hybride, où les tubes silicone sont utilisés uniquement dans les parties requérant des tubes flexibles (valves à pincements), et où le reste du système est composé de tubes en Teflon. Parmi les grades de Teflon, notre choix s'est porté vers le PFA (perfluoroalkyl), possédant à la fois une bonne transparence (supérieure à celle du PTFE ou du FEP) et permettant de travailler aux températures relativement élevées utilisées en PCR. Le diamètre interne du tube choisi est de  $760 \mu\text{m}$ , permettant comme mentionné en introduction de travailler avec

des plots d'un volume de l'ordre du  $\mu\text{L}$ , facilitant ainsi l'injection lors des premières expériences. Ces tubes s'avèrent de plus extrêmement résistants à l'usage.

Remarquons ici que les surfaces en Teflon ont la mauvaise réputation d'adsorber fortement les molécules biologiques par interaction hydrophobe, et que c'est ici grâce à notre système diphasique que l'utilisation de ce matériau performant a été rendue possible. Notons enfin que des tentatives ont été effectuées pour utiliser des tubes « Tygon » comme tubes souples, mais que les résultats obtenus ont été décevants. La principale raison réside dans la difficulté à effectuer un traitement de surface sur ce matériau dérivé du PVC (polyvinylchloride). Ces tubes peuvent donner des résultats satisfaisants en terme de stabilité lorsqu'ils sont utilisés avec une huile carbonée de type hexadecane et surfactant lipophile Span 80 (Sorbitan monooléate), mais comme nous l'avons mentionné plus haut, une huile fluorée est plus adaptée à nos besoins. A l'inverse, les tubes en silicone ne peuvent être utilisés avec une huile carbonée car ils gonflent. De même pour les tubes en Teflon : celui-ci étant une surface de très basse énergie, il n'est pas mouillé complètement par les huiles carbonées.

#### Ajout de surfactant.

Malgré l'utilisation de tubes Teflon PFA haute pureté, les premières expériences nous confrontèrent à des problèmes ponctuels de mouillage de la surface par les gouttes. Ceci a un effet en chaîne catastrophique sur l'ensemble du train de gouttes puisqu'une goutte « piégée » par mouillage sur la surface du capillaire se fractionne en laissant derrière elle une goutte secondaire. Cette goutte secondaire est « ramassée » par la goutte suivante, qui se fractionne à son tour en laissant une goutte secondaire au même endroit du capillaire, etc... (voir figure 2.6). Nous attribuons ce phénomène à d'inévitables inhomogénéités de surface présentes dans ce tube fabriqué industriellement par extrusion, qui perturbent le film de lubrification initialement formé par l'huile entre la paroi et les gouttes.

Nous avons donc tenté d'augmenter encore la mouillabilité de la surface par l'huile et l'épaisseur de ce film en agissant sur le nombre capillaire du système. D'après la forme de  $S$ , le paramètre sur lequel il est possible d'agir positivement est la tension de surface entre la solution aqueuse et l'huile. Pour ne pas diminuer en même temps la tension de surface entre la solution aqueuse et la surface du capillaire, l'ajout d'un surfactant dans l'huile de transport s'impose. D'autre part, d'après la loi empirique de Bancroft, l'ajout de surfactant dans l'huile de transport favorise la formation de gouttes d'eau dans l'huile, ce qui nous intéresse. Notre choix s'est porté vers un surfactant de type perfluoroalcool à longue chaîne carbonée, soluble dans l'huile : le 1H-1H-2H-2H-perfluorodecan-1-ol, commercialement disponible chez Fluorochem. Le même type de surfactant s'était déjà révélé relativement efficace pour limiter le mouillage du PDMS par des gouttes d'eau dans l'huile fluorée [Tice *et al.*, 2003]. La figure 2.7 présente l'évolution de la tension de surface eau/huile fluorée en fonction de la concentration en surfactant, mesurée par la méthode de la goutte pendante présentée en annexe (corrigée pour le mouillage de la pointe de mesure par l'huile selon Earnshaw *et al.* [1996], voir annexe 2).

Nous avons expérimentalement constaté qu'une concentration de surfactant à 0,5% en masse permettait d'éviter tout collage des gouttes. Utiliser des concentrations supérieures peut avoir l'effet contraire de celui escompté : au lieu d'avoir contamination inter-gouttes par attachement de celles-ci sur les parois, il peut y avoir contamination inter-gouttes par fractionnement direct de celles-ci, le nombre capillaire devenant trop important. Bien que les mesures aient ici été réalisées avec de l'eau pure tamponnée, les mix de PCR contiennent des tensio-actifs destinés à améliorer les performances de l'enzyme. Ceux-ci diminuent à la fois la tension de surface entre la solution aqueuse et la paroi et celle entre la solution aqueuse et l'huile. On peut penser que les deux effets contradictoires s'annulent en ce qui concerne la mouillabilité du capillaire par le FC40, mais ces tensio-actifs contribuent en plus du fluorosurfactant à augmenter le nombre capillaire de notre système. Par exemple, le mix de PCR vendu par Roche contient du surfactant Nonidet P40 à 0,5 % en masse. Ce surfactant non-ionique à chaîne hydrophile polyéthylène glycol ressemble fortement au Triton X100. Pour de l'eau contenant celui-ci à 0,5% en masse, on trouve dans la littérature [Phongikaroon *et al.*, 2005] une tension de surface à 25°C de l'ordre de 40 mN/m au lieu de 72 mN/m pour l'eau pure. Cette variation est conséquente, et les valeurs présentées ici sont donc à prendre avec précaution dans le cas de notre système.

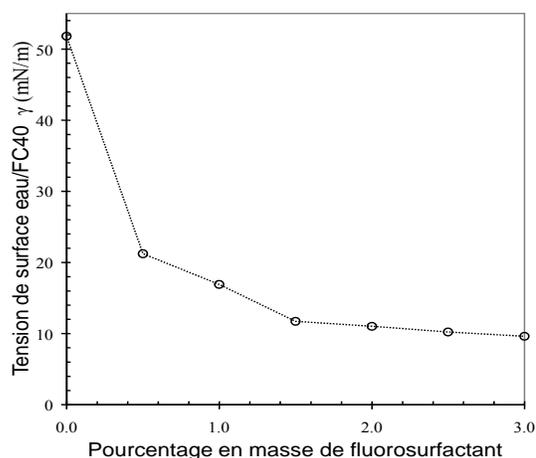


FIG. 2.7 – Tension de surface eau/FC40 en fonction de la concentration massique en surfactant fluoroalcool. D'après Dorfman *et al.* [2005].

De même, les valeurs indiquées ci-dessus sont valables à température ambiante, et la réaction de PCR s'effectue à des températures comprises entre 50°C et 100°C. Aussi bien la viscosité que la tension de surface des liquides diminuent à cette température, il faut donc se méfier des estimations effectuées précédemment. Pour le capillaire comme pour l'huile fluorée, on peut estimer la variation de tension de surface  $\gamma_i$  en fonction de la température  $T$  par l'équation empirique de Guggenheim-Katayama :

$$\gamma_i = \gamma_{io} \left[ 1 - \frac{T}{T_c} \right]^{\frac{11}{9}}. \quad (2.5)$$

avec  $T_c$  température critique et  $\gamma_{io}$  tension de surface à 0 K.

$T_c$  étant élevée pour ces polymères, la variation de tension de surface avec la température est relativement faible. On trouve ainsi dans la littérature [Brandrup & Immergut, 1989], pour des composés se rapprochant de ceux que nous utilisons (PTFE à très longues chaînes, équivalent au tube en PFA, et PTFE à 20 carbones, équivalent à notre huile), des coefficients de variation de l'ordre de 0,06 mN/m.K, soit une diminution d'environ 4 mN/m pour nos composés entre 25°C et 95°C. La tension de surface de l'eau pure, très bien tabulée, varie elle linéairement de 72 mN/m à 60 mN/m entre ces mêmes températures, soit une diminution plus importante. En tenant compte de la présence de tensio-actifs dans le mix de PCR, la tension de surface de la solution aqueuse passe de 40 mN/m à 33 mN/m entre 25°C et 95°C, avec un coefficient de variation de 0,10 mN/m.K déduit de Phongikaroon *et al.* [2005] par fit linéaire. Bien que ces valeurs ne soient pas directement celles qui nous intéressent, on peut donc estimer que l'eau va devenir légèrement plus mouillante dans le système. Cependant, grâce à l'utilisation de tensio-actifs dans l'huile, la rendant très mouillante dans le système à température ambiante, et la diminution globale des tensions de surface avec la température, on peut penser que notre système reste dans la situation où l'huile est complètement mouillante sur les parois du capillaire.

A propos des viscosités, d'après les données fournisseur, la viscosité du FC40 varie linéairement de 3,4 mPa.s à 0,9 mPa.s entre 25 °C et 95°C, soit une diminution de 75% à comparer aux 10 % environ de variation pour les tensions de surface. On devrait donc assister globalement à une diminution du nombre capillaire, d'où un film d'huile mouillante moins épais. En revanche, on augmente par chauffage la stabilité des gouttes vis à vis du fractionnement par cisaillement.

Compte tenu de ces multiples paramètres, dont tous ne sont pas facilement accessibles, la meilleure preuve de l'efficacité de notre système reste la validation expérimentale. Nous avons donc confirmé par observation directe comme par mesure de contamination que les gouttes se comportent toujours comme des cylindres stables et non-mouillants dans le capillaire (voir ci-dessous et partie 2.4).

**Validation par PCR quantitative.** La validité de notre approche a été testée par PCR quantitative dans le cadre d'une collaboration avec l'hôpital de l'Institut Curie (équipe du Dr. Patricia de Crémoux). Les résultats présentés ici ont été obtenus avec de l'ADNc provenant de la transcription inverse de l'ARNm de cellules de la lignée T47D (concentration équivalente en ARNm de 6,25 ng/ $\mu$ L). Le gène cible était RPLPO, gène codant pour la protéine ribosomale P0, souvent utilisé comme gène de référence en PCR quantitative et fortement exprimé. Une première série d'expériences a consisté à tester la contamination entre gouttes circulant dans le capillaire. Cette série a été appliquée au système [capillaire Teflon/huile fluorée+surfactant/solution aqueuse] ainsi qu'aux tubes de silicone silanisés (fluorosilane) ou non. Une autre série a permis de tester la contamination liée à la pointe d'injection en Teflon. En référence à ce qui précède, les tests sont ici effectués à température ambiante, et sans surfactant dans la solution aqueuse. L'expérience

consiste à faire circuler des gouttes contenant de l'ADN et des gouttes n'en contenant pas à la suite dans le capillaire, puis de récupérer ces gouttes pour leur faire subir une PCR quantitative. Si les gouttes initialement sans ADN ont un signal de fluorescence, c'est qu'il y eu contamination.

Dans la première série d'expériences, une goutte contenant le tampon de PCR et l'ADN cible (solution positive) à haute concentration est entourée dans le capillaire de deux gouttes contenant le tampon de PCR seul (solution négative). Cet ensemble de 5 gouttes est déplacé d'avant en arrière à 1 mm/s sur une distance de 5 cm, ceci pendant 50 oscillations représentant une distance totale parcourue par les gouttes de 2,5 m. Chaque goutte a un volume de 2  $\mu\text{L}$  et est séparée de la goutte voisine par 5  $\mu\text{L}$  de l'huile de transport. Le prélèvement est effectué par aspiration depuis le récipient approprié, et la pointe d'aspiration est rincée dans l'eau et essuyée entre chaque aspiration. Les gouttes sont récupérées après circulation, diluées 10 fois afin d'obtenir un volume de solution et une concentration initiale d'ADN utilisables dans les appareils de PCR quantitative, la Taq polymérase est ajoutée, et le mélange résultant est cyclé sur un appareil de PCR quantitative Applied Biosystems 7700 (35 cycles). Les résultats sont exprimés en terme de Ct (cf. partie 2.1.2.b). Comme le montre le tableau 2.1, les tubes en silicone silanisé comme en Teflon PFA utilisés avec notre huile de transport donnent des résultats parfaits en termes de contamination inter-gouttes, puisqu'aucune contamination n'est détectable dans les gouttes ne contenant initialement pas d'ADN, même pour les premières voisines de la goutte positive. Rappelons que la PCR quantitative est une méthode de détection extrêmement sensible et que 35 cycles représentent la limite haute utilisée avec ce type d'appareils, alors que le Ct de 20 en moyenne obtenu pour les gouttes positives correspond à une concentration de départ en ADN plutôt élevée. De plus, l'ADN contenu dans la goutte utilisée pour le test était présent à une concentration 10 fois supérieure au maximum utilisé en PCR quantitative, puisque les gouttes utilisées ont ensuite été rediluées pour permettre une amplification sur système classique. Des expériences similaires menées avec un tube en silicone non silanisé et la même huile de transport démontrent une contamination des gouttes voisines et un faible signal de la goutte positive (Ct=24). Ceci correspond à une adsorption de son ADN sur les parois du capillaire et au prélèvement de celui-ci par les gouttes négatives. Ces premières expériences avaient en plus été effectuées avec des gouttes négatives contenant du bleu de bromophenol, qui semble inhiber la réaction de PCR, ce qui laisse penser que le signal des gouttes négatives aurait de plus dû être plus important que celui relevé dans cette série d'expériences.

Dans la série visant à évaluer la contamination de la pointe d'injection en Teflon, une goutte de solution positive est prélevée, suivie par un espaceur d'huile, puis 5 gouttes de solution négative sont prélevées sans rinçage de la pointe. Les gouttes sont récupérées et cyclées comme décrit dans la première série d'expériences. On pourrait penser que lorsqu'elle est plongée dans la solution d'ADN, la pointe de Teflon est contaminée par adsorption de l'ADN sur ses parois. Les résultats de la



<b>Teflon PFA</b>	35	30	20	35	35
<b>Silicone nu</b>		33	24	32	
<b>Silicone silanisé</b>	35	35	20	35	35

TAB. 2.1 – Valeurs de Ct pour la première série d’expériences, la goutte noire représentant la goutte positive. La valeur obtenue pour le Teflon PFA n’est pas symétrique et correspond donc à un artefact puisque la circulation des gouttes circulent d’avant en arrière dans le capillaire implique qu’elles précèdent ou suivent alternativement la goutte positive et qu’elles sont donc exposées symétriquement à la contamination.

PCR quantitative prouvent le contraire avec un Ct de 20 pour la goutte positive contre un Ct de 35 pour toutes les gouttes négatives. On peut penser que le Teflon de la pointe d’aspiration est protégé par un film d’huile.

**Finalement...** Le système fluïdique retenu pour notre système consiste donc finalement en une huile fluorée  $FC40$  ( $\eta_o = 3,4$  mPa.s ,  $\rho_o = 1850$  kg/m<sup>3</sup> à température ambiante, 3M) contenant 0,5 % en masse de tensio-actif *fluoroalcool* (1H-1H-2H-2H-perfluorodecan-1-ol, tension de surface eau/huile  $\gamma = 20$  mN/m, Fluorochem), circulant dans un capillaire en Teflon *PFA* (Upchurch Scientific, haute pureté, diamètre interne 760  $\mu$ m, diamètre externe 1,6 mm). De la même façon que l’huile fluorée ne semble influencer en rien sur la réaction de PCR, il a été récemment prouvé [Roach *et al.*, 2005] que la présence d’un surfactant fluoroalcool à l’interface solution aqueuse/huile ne provoquait aucune absorption d’enzyme et ne devrait donc pas influencer négativement sur la réaction de PCR. Pour les parties exigeant un tube flexible (vannes), le silicone fluorosilanisé a été retenu (Fisher Bioblock, diamètre interne 760  $\mu$ m, diamètre externe 2,4 mm, silanisé avec du 1H,1H,2H,2Hperfluorodecyltriethoxysilane, Fluorochem). Les parties en silicone représentent seulement 2,5 cm de circuit. Afin de s’affranchir des contraintes liées au traitement de surface du silicone, nous avons aussi tenté d’utiliser des tubes de silicone fluoré en masse disponibles commercialement. Si ces derniers assuraient une stabilité correcte des trains de gouttes, il semble que l’ADN contenu dans celles-ci s’adsorbait complètement sur les parois, et ils ont donc été abandonnés.

### 2.3.1.c Conception du système thermique

Pour sa compacité et son intégration facile avec un capillaire, nous avons opté pour un échangeur de chaleur à géométrie cylindrique, divisé orthoradialement en plusieurs zones de température nécessaires au déroulement de la réaction de PCR. Le capillaire est enroulé autour du cylindre chauffant, et les gouttes subissent les cycles de température en circulant autour de ce cylindre. La question qui se pose est donc la suivante : combien de temps met (et donc sur quelle distance circule) une goutte pour passer d'une température à l'autre, l'écart maximum de température prévu dans notre système correspondant au passage de la zone à 94°C à la zone à 55°C ? Ces calculs sont principalement basés sur des formules pour le moins semi-empiriques tirées du *Perry's chemical engineer handbook* [Perry & Green, 1997], qui sans être élégantes semblent se révéler efficaces.

**Hypothèses de calcul.** On suppose tout d'abord que le film d'huile séparant les gouttes des parois a une épaisseur négligeable et que celles-ci reçoivent donc directement le flux de chaleur des parois. En négligeant aussi les effets de la tension de surface, on approxime alors le problème par celui du transfert de chaleur depuis une paroi à un flux de Poiseuille (problème de Graetz). On considère ensuite que l'air entourant le capillaire est isotherme, et que la paroi extérieure du capillaire est à la même température que l'air ambiant. Enfin, on considère que les recirculations au sein de la goutte créent une équilibration thermique immédiate dans celle-ci, ce que nous vérifierons a posteriori.

**Estimation de la distance nécessaire à la thermalisation.** Ce calcul, qui peut-être trouvé en annexe 3, est effectué pour le cas le plus extrême du passage de 94°C à 54,5°C de la goutte, la température de la zone concernée étant supposée être à 54 °C. On obtient finalement après quelques simplifications pour le temps de thermalisation de la goutte :

$$t = \sqrt{\frac{1}{V} \frac{Q}{2\Pi\Delta T_m} \left[ \frac{x}{k_w R_m} + \frac{1}{1,83k_o} \right]} \quad (2.6)$$

où  $R_m$  est le rayon moyen du capillaire et avec les symboles définis en annexe 3.

En appliquant l'équation 2.6 au cas d'un tube de Teflon de 800  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et une épaisseur des parois de 400  $\mu\text{m}$ , pour une goutte circulant à 0,1 cm/s passant de la zone de dénaturation à la zone de fixation des amorces, on obtient un temps de thermalisation de l'ordre de 6 secondes , ce qui est relativement rapide compte tenu des temps de cycles prévus, bien que légèrement supérieur aux temps obtenus avec les chauffages du mélange réactif par air chaud ou par radiation infrarouge. Le calcul est de plus effectué ici pour une goutte relativement grosse dans un canal large, et la miniaturisation devrait permettre une nette amélioration des

taux de transfert. Cette variation de température tout de même rapide a un effet favorable sur l'efficacité de la réaction.

On peut finalement vérifier l'hypothèse selon laquelle la température dans la goutte est rapidement uniformisée par les recirculations à l'échelle du temps global de thermalisation. Dans le référentiel de la goutte, le champ de vitesse dans la partie cylindrique de la goutte est de la forme [Goldsmith & Mason, 1963] :

$$u(r) = U \left[ 1 - \frac{2r^2 - (R - h)^2}{(R - h)^2(1 + \lambda)} \right]$$

où  $r$  est la coordonnée cylindrique radiale,  $h$  l'épaisseur du film séparant la goutte des parois et

$$\lambda = 2 \frac{\eta_g}{\eta_o} \left[ \frac{R^2}{(R - h)^2} - 1 \right]$$

En tenant compte que l'épaisseur du film séparant la goutte des parois est très faible,  $u$  se simplifie en :

$$u(r) = U \left[ 1 - \frac{2r^2 - R^2}{R^2} \right]$$

En première approximation, on obtient une vitesse nulle sur les bords de la goutte et  $2U$  au centre. En estimant que la goutte est entièrement mélangée pour des temps tels que :

$$t > \frac{L}{2U}$$

on obtient pour la goutte considérée un temps caractéristique inférieur à 2 secondes, et nos hypothèses de départ sont donc bien vérifiées.

**Architecture de système résultante.** Compte tenu des évaluations effectuées précédemment, nous avons opté pour un échangeur thermique cylindrique en cuivre de 4 cm de diamètre pour 7,5 cm de long, une goutte circulant à 0,1 cm/s mettant ainsi environ 2 minutes à en faire le tour. Pour 35 cycles de PCR, une longueur enroulée de capillaire de l'ordre de 4,5 mètres est à prévoir. Compte tenu de son diamètre externe, le capillaire est ainsi enroulé sur une longueur de cylindre de 5,5 cm. Le capillaire entre en traversant axialement la zone à 94°C afin d'obtenir une dénaturation efficace de l'ADN avant le premier cycle, et sort de celui-ci en fin des 35 cycles de réaction par la zone à 72°C afin d'obtenir une phase d'extension plus longue en fin de réaction. Ces parcours initiaux et finaux additionnels représentent ainsi environ 2 minutes.

Bien que le silicone soit plus intéressant que le Teflon du point de vue thermique du fait de sa plus grande conductivité, les difficultés de traitement du silicone évoquées plus haut nous ont poussés à conserver tout de même le Teflon PFA. Chaque zone de température est isolée des autres par des plaques de polycarbonate d'une épaisseur de 5mm (le polycarbonate faisant partie des plastiques au prix abordable

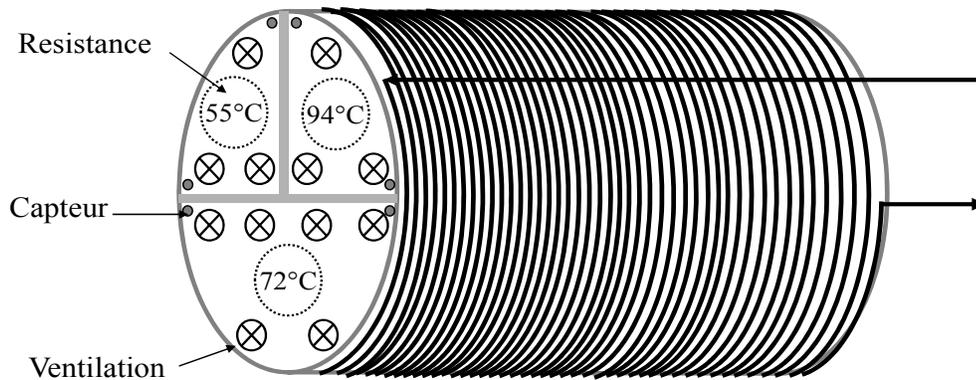


FIG. 2.8 – Cylindre chauffant du système de PCR microfluidique. Les encoches permettant l'entrée et la sortie du capillaire ne sont pas représentés.

les plus isolants). La zone d'élongation occupe une partie du cylindre deux fois supérieure aux autres, soit la moitié de celui-ci, correspondant à un temps d'élongation deux fois supérieur aux temps de dénaturation et d'appariement des amorces pour une goutte. Chaque zone comprend deux capteurs de température Pt100 placés aux extrémités radiales de celle-ci dans des trous prévus à cet effet (mais ne traversant pas le cylindre), une cartouche chauffante, et deux trous destinés au passage de l'air de ventilation traversant complètement le cylindre selon son axe (voir figure 2.8). Elles sont recouvertes par une feuille d'aluminium en contact avec le cuivre de chacune d'elle afin de chauffer le capillaire par le dessus et d'améliorer l'uniformité thermique au sein de celui-ci. Le tout est placé dans une coque de polycarbonate enrobée de coton afin de créer un environnement isotherme en isolant le cylindre de l'extérieur.

La température dans chaque zone est contrôlée par une commande proportionnelle intégrale et dérivée (PID) écrite sous Labview (National Instruments). A titre indicatif, la correction proportionnelle règle le courant de chauffage proportionnellement à la valeur absolue de l'erreur mesurée, la commande intégrale permet de tenir compte du signe de l'erreur et la commande dérivée permet enfin d'éviter les oscillations autour de la valeur demandée en tenant compte de la pente de la mesure de température. Un ventilateur permet d'évacuer la chaleur et de minimiser ainsi la diffusion de température inter-zones, tout en améliorant la rapidité de la commande PID. Sans ventilation, la zone d'appariement, nécessairement voisine de la zone de dénaturation, était du fait de la diffusion thermique à une température supérieure à la température désirée, sans chauffage. Avec ventilation, et grâce au réglage du contrôle PID, on obtient une variation de température orthoradiale dans chaque zone inférieure à  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Il existe nécessairement une zone de transition entre chaque zone de température, mais celle-ci est relativement courte compte tenu du temps de thermalisation de la goutte.

La ventilation pose le problème de l'inhomogénéité thermique le long de l'axe du cylindre : en enlevant de la chaleur à l'entrée du cylindre, l'air s'échauffe et refroidit donc moins bien la suite de celui-ci. Selon les mesures effectuées dans le cœur du cylindre ou à sa surface, nous avons mesuré des différences de températures entre l'entrée et la sortie de la ventilation allant jusqu'à 5°C pour la zone de dénaturation (la plus chaude). Ceci pose d'une part le problème de la reproductibilité des cycles de température au cours de la réaction. D'autre part, des températures trop élevées (supérieures à 95°C) endommagent définitivement l'enzyme de la PCR, malgré sa thermostabilité. Cependant, sur la longueur d'enroulement du capillaire, la variation de température est de tout au plus 2°C dans la zone de dénaturation. D'autre part, les capteurs étant centrés dans le cylindre, on peut penser que les cycles démarrent avec une température de dénaturation légèrement inférieure à la température désirée, et se terminent avec une température légèrement supérieure. Pour finir, nous décrivons ici les valeurs extrêmes obtenues dans la zone de haute température, mais ces différences sont plus faibles dans les autres zones, et particulièrement pour la température d'élongation, cruciale pour le bon déroulement de la réaction.

Nos résultats prouvent que la réaction de PCR avait par ailleurs bien lieu, mais on peut espérer augmenter son efficacité par un meilleur contrôle de la température axiale du cylindre. Une solution consiste à utiliser l'architecture de Park *et al.* [2003], avec une forme (vue axiale) de trèfle à 3 feuilles, chaque feuille correspondant à une zone de température ainsi isolée des autres par une épaisse couche d'air, et ne nécessitant pas de ventilation pour s'équilibrer thermiquement. Le refroidissement est cependant intéressant pour améliorer la vitesse de réaction de la commande PID. Afin de limiter la variation de température axiale du cylindre tout en conservant une source froide correcte, on peut envisager un refroidissement liquide : de par sa plus grande capacité calorifique, le liquide s'échauffera moins au cours de son parcours le long du cylindre et fournira ainsi un refroidissement plus homogène.

#### **2.3.1.d En résumé...**

Nous utilisons une huile fluorée FC40 contenant 0,5 % en masse d'un tensio-actif fluoroalcool pour transporter les gouttes au sein desquelles a lieu la réaction à 0,1 cm/s dans un capillaire en Teflon PFA de diamètre intérieur 760  $\mu\text{m}$ . L'huile de transport est systématiquement dégazée sous vide pendant au moins 20 minutes avant chaque utilisation. En effet, si les huiles fluorées présentent une faible affinité pour les molécules biologiques, elles contiennent une quantité importante de gaz dissous, qui est susceptible de perturber la réaction en formant des bulles du fait des hautes températures utilisées. Afin qu'elles aient la forme de plots, les gouttes ont un volume de l'ordre du microlitre. Des tubes en silicone traité sont utilisés uniquement dans les parties où ils sont nécessaires, c'est à dire dans les valves à pincements. Nous travaillons à faible nombre capillaire et faible nombre de Reynolds, sans contamination entre les gouttes.

Le capillaire est enroulé 35 fois autour d'un cylindre chauffant divisé orthora-dialement en trois zones de température, un tour de cylindre correspondant ainsi à un cycle de PCR pour une goutte avec un temps de l'ordre de deux minutes, ce qui laisse largement le temps à la goutte de se thermaliser dans chaque zone. Pour une goutte seule, le temps de réaction est donc d'environ 70 minutes, ce qui est peu compétitif par rapport aux autres systèmes microfluidiques. C'est par la multiplication des gouttes que notre méthode prend tout son intérêt.

Partant de cet architecture performante pour un système d'analyse à haut débit, il est donc nécessaire d'automatiser les étapes d'injection, de mélange avec les réactifs et de détection des produits afin de tirer pleinement parti des possibilités de notre système. C'est ce que décrit la partie suivante.

### 2.3.2 Automatisation du système

Si la conception de systèmes microfluidiques de PCR a fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières années, le problème de l'injection des échantillons au sein de ces systèmes est resté largement inexploré. Le problème du « world to chip » déjà mentionné en introduction est ici criant, puisque bon nombre de systèmes haut débit performants le sont surtout sur le papier, du fait de l'absence de conception d'une méthode fiable permettant d'interfacer dispositif microfluidique et monde « réel », macroscopique (dans lequel on est qu'on le veuille ou non obligés de passer). On trouve dans le cas des systèmes de PCR en microchambre la possibilité de multiplexage des réactions, permettant par répartition astucieuse des liquides pipetés d'effectuer  $N^2$  réactions avec  $2N + 1$  étapes de pipetage seulement [Liu *et al.*, 2003]. On trouve pour le prélèvement par aspiration quelques idées dans la thèse de M. Curcio [2003], mais aucune n'a été réellement développée.

Nous présentons ci-dessous une méthode d'injection originale, alliée à une détection en ligne des produits de la réaction. A partir d'une microplaque modifiée, notre système permet de prélever automatiquement les échantillons, et de les mélanger aux réactifs. Un flux continu d'échantillons est maintenu autour du cylindre chauffant pendant que l'injection séquentielle est effectuée, permettant un fonctionnement perpétuel du système. Afin de bien faire comprendre l'intérêt de notre système, j'insiste sur le fait que quel que soit le système utilisé, il y a nécessairement une étape du protocole où les échantillons doivent être prélevés « macroscopiquement », c'est à dire que l'on est limité à des volumes supérieurs à  $1 \mu\text{L}$  (bien que certains robots permettent de descendre à quelques centaines de nanolitres), ce qui dans le cadre d'applications microfluidiques utilisant des volumes nettement inférieurs représente souvent une perte. Dans notre cas, des volumes de l'ordre du microlitre ont été utilisés afin de faire la preuve de concept de notre système, mais le principe entier de la manipulation reste valable à plus petite échelle, dans la limite de précision du pompage. Les techniques utilisées et les résultats obtenus sont résumés dans Chabert *et al.* [2006].

### 2.3.2.a Préparation de la microplaque d'injection

Les échantillons et réactifs nécessaires à la réaction sont contenus dans une microplaque 96 puits. Afin de remplir correctement le fond de ces puits, des volumes de 50  $\mu\text{L}$  sont utilisés. Un puits unique contient l'enzyme nécessaire à la réaction de PCR, tandis que les autres puits contiennent les différents échantillons à amplifier. Une goutte d'enzyme sera ajoutée en ligne à chaque goutte d'échantillon. Cette configuration permet de réduire la consommation d'enzyme, puisque pour chaque réacteur formé, on utilise la même portion du volume macroscopique qui a été déposé dans le puits. Ce point est important car le coût des réactions de PCR est essentiellement lié au prix des réactifs, et plus particulièrement à celui de l'enzyme. D'autre part, ceci est associé à un mélange automatique des échantillons et des réactifs, ce qui réduit considérablement les temps de préparation. Ce puits commun se situe à un coin de la plaque, afin de faciliter la programmation des opérations d'injection qui vont suivre. Quant aux amorces, on a le choix de les placer dans le puits commun, ce qui peut correspondre au cas pratique de l'analyse de la même séquence d'ADN de différentes provenances, ou de placer des amorces différentes dans chaque puits, ce qui peut correspondre au cas de l'analyse de différentes parties du même ADN (l'ADN pouvant alors être lui placé dans le puits commun).

La plaque d'injection doit correspondre aux caractéristiques diphasiques de notre système et comporte par conséquent plusieurs niveaux de liquides immiscibles superposés. Chaque puits d'échantillon est ainsi individuellement recouvert d'une couche de l'huile fluorée servant au transport des gouttes. Cette huile étant plus dense que la solution aqueuse, un traitement de surface permettant de maintenir par capillarité la solution aqueuse au fond des puits est utilisé : on cherche à obtenir des puits avec un fond hydrophile et des parois hydrophobes, afin d'empêcher la remontée de la solution aqueuse. Nous utilisons pour ceci une méthode très simple et reproductible bien que peu raffinée. Partant d'une plaque hydrophile (Nunc Multisorp), le fond des puits est recouvert d'une couche d'eau distillée afin de le protéger, puis du spray Teflon (Roth) est vaporisé sur toute la plaque. Après deux heures de séchage à température ambiante, l'eau contenue au fond des puits est enlevée et la plaque rincée à grande eau, avant d'être laissée à sécher toute une nuit à température ambiante. Par cette méthode, on obtient des plaques ayant les caractéristiques désirées et extrêmement robustes.

On peut donc dans ces plaques recouvrir nos échantillons d'une épaisse couche d'huile de transport (200  $\mu\text{L}$ ) tout en gardant une architecture stable à deux niveaux de liquides. La situation du puits d'enzyme est légèrement différente : comme nous l'avons déjà mentionné (partie 2.3.1.b), les mix d'enzymes de PCR contiennent des tensio-actifs. Ceux-ci ont tendance à diminuer la tension de surface entre l'huile et la solution aqueuse et à diminuer l'angle de contact entre celle-ci et la surface fluorée hydrophobe. Par conséquent, les effets capillaires se trouvent amoindris, d'autant plus que l'huile de transport contient déjà un tensio-actif, et la solution d'enzyme a tendance à remonter dans le puits. Par conséquent, le puits d'enzyme est recouvert

par du perfluorohexane pur et moins dense que le FC40 (densité 1,7) de façon à assurer la stabilité du puits contenant l'enzyme. Recouvrir le puits d'enzyme avec une huile fluorée différente de l'huile de transport ne pose, nous le verrons, pas de problèmes du point de vue de l'injection.

La possibilité de recouvrir chaque puits de sa couche d'huile plus dense que la solution aqueuse présente l'intérêt de pouvoir ajouter par dessus la plaque entière une troisième couche de liquide, à nouveau aqueux, sans que celle-ci entre en contact avec les réactifs. Cette troisième couche de solution aqueuse sert d'une part à rincer la pointe d'injection entre chaque étape d'aspiration, d'autre part à éviter que la pointe d'aspiration ne se trouve en contact avec l'air. Des microbulles d'air pourraient en effet se piéger à la surface de celle-ci et se trouver injectées entre les gouttes. Elles servent alors de point de nucléation pour tout le gaz dissout dans l'huile, ce qui, du fait des températures élevées utilisées, conduit à l'apparition de grosses bulles d'air. Celles-ci, de par leur forte dilatation, dérèglent les temps de cycle et déstabilisent le train de gouttes au cours de la réaction. La microplaque préparée est donc placée et calée au fond d'un récipient adapté qui est rempli d'une solution aqueuse de Tween 20 (polyoxyéthylène (20) sorbitan monolaurate, Sigma) à 0,1% en masse. On peut imaginer tirer parti du large excès de ce troisième liquide pour thermaliser la plaque d'échantillons. Cette méthode pose cependant problème, puisque lors de l'injection, en abaissant la température, on augmente le nombre capillaire du système (voir partie 2.3.1.b), et que selon la vitesse de prélèvement utilisée, on peut avoir fractionnement de gouttes par cisaillement.

L'arrangement de fluides résultant est représenté en figure 2.9.

### 2.3.2.b Séquence d'injection

**Architecture générale.** Pour suivre l'explication, se reporter à la figure 2.10. Les fluides sont manipulés dans le système en utilisant deux pousse-seringues (Harvard Apparatus) équipés de seringues de 250  $\mu\text{L}$  (Hamilton), et contrôlés par un programme Labview développé au laboratoire. Ces deux pousse-seringues (désignés par « pompe » en figure 2.10) fonctionnent antisymétriquement. Chaque pousse-seringue est relié à une jonction en Y (représentée par un cercle noir en figure 2.10) en Teflon PTFE (Omnifit) de diamètre interne 800  $\mu\text{m}$ , donc approximativement du même diamètre que le capillaire, et de volume mort quasi-nul. Les deux branches du Y débouchent dans une valve solénoïdale à pincement, cette valve ouvrant soit sur le côté injection (pointe d'injection et microplaque 96 puits) soit sur le côté réaction (cylindre chauffant).

Les valves à pincements présentent, outre les avantages d'un volume mort quasi-nul, celui du contrôle de deux voies antisymétriques avec une seule valve ([voie 1 ouverte ET voie 2 fermée] OU [voie 1 fermée ET voie 2 ouverte]). Elles nécessitent par contre l'utilisation de tubes flexibles pouvant être écrasés et revenir à leur forme initiale lorsqu'il sont libérés, ce qui n'est pas le cas du Teflon. C'est donc ici que

l'on utilise les tubes en silicone traités mentionnés en partie 2.3.1.b. Le risque de fractionnement des gouttes par passage dans une constriction se situe au niveau de ces valves. Même ouvertes, elles appuient légèrement sur le tube et le déforment, ce qui est le prix à payer pour avoir une fermeture efficace résistant à des pressions relativement élevées. Cependant, nous n'avons jamais observé de fractionnement lié aux motifs mentionnés en partie 2.3.1.a dans nos expériences. Il s'agit pourtant d'un point assez critique du système, les gouttes pouvant se fractionner lorsqu'elles mouillent la surface à cause d'un traitement de surface défaillant. Pour cette raison, le traitement de surface doit être renouvelé tous les mois en moyenne. L'autre point critique du système réside dans les jonctions en Y. Celles-ci permettent une connexion directe aux tubes en Teflon par serrage mais nécessitent un alignement parfait de ceux-ci dans la jonction.

Avant le démarrage de l'injection, le système est complètement rempli avec de l'huile de transport de façon à ce qu'il ne subsiste aucune trace d'air dans celui-ci. En effet, en plus de perturber la synchronisation de la réaction en flux, l'air empêcherait une injection précise à cause de sa dilatation. Notons ici l'avantage de la microfluidique de gouttes : les volumes morts sont comblés avec de l'huile de transport, peu coûteuse et n'impliquant pas de dispersion de l'échantillon, au lieu de l'être avec l'échantillon ou un tampon susceptible de le diluer.

**Système d'injection.** La tête d'injection comporte deux diamètres distincts : une pointe de PTFE (diamètre intérieur  $360\ \mu\text{m}$ , diamètre extérieur  $760\ \mu\text{m}$ ,  $8\ \text{mm}$  de long) est enfilée dans le capillaire utilisé dans le reste du système (diamètre intérieur  $760\ \mu\text{m}$ ). Il s'agit donc schématiquement d'une pointe évasée. La pointe de faible diamètre était initialement utilisée pour prélever les échantillons avec plus de précision qu'avec le simple tube de transport tout en perturbant moins l'interface solution aqueuse/huile dans la microplaque. Il s'est finalement avéré qu'elle était aussi un outil très efficace pour coalescer les gouttes d'échantillons avec les gouttes de réactifs.

La platine XYZ servant à déplacer la pointe d'injection au dessus de la microplaque est dérivée d'une mini tourneuse-fraiseuse numérique Kosy fabriquée par la société allemande Max-Computer. Cet appareil présente des performances tout à fait honorables (précision de  $10\ \mu\text{m}$ ) pour un prix défiant toute concurrence ( $1500\text{€}$ , contre plusieurs milliers d'Euros pour les robots destinés à la biologie). Elle est commandée et synchronisée avec les pompes sous Labview grâce à un programme développé par nos soins (il est recommandé de se munir d'un dictionnaire français-allemand sérieux avant de se lancer dans ces programmes à partir des codes machines fournis par le fabricant...).

**Prélèvement.** Le processus d'injection se déroule en un cycle cinq étapes (voir figure 2.9) :

1. La pointe d'aspiration, initialement située dans la solution de lavage, est déplacée

au dessus du puits commun d'enzyme et plongée au fond de ce puits. 500 nL de mix sont prélevés.

2. La pointe est déplacée verticalement à travers le film d'huile recouvrant le puits d'enzyme jusque dans la solution de lavage, puis est déplacée horizontalement au-dessus d'un puits d'échantillon  $n$ .

3. La pointe est plongée au fond du puits  $n$  et 500 nL d'échantillon sont prélevés. A ce stade, les gouttes d'enzyme et d'échantillon sont séparées par une couche d'huile située dans la première partie de la pointe. L'huile étant totalement mouillante dans notre système, cette couche résulte d'une faible quantité de perfluorohexane prélevée par capillarité lorsque la pointe passe à travers la couche d'huile du puits commun.

4. La pointe est déplacée dans l'huile de transport recouvrant l'échantillon du puits  $n$ , et 5  $\mu\text{L}$  de celle-ci sont prélevés au titre d'espaceur entre les microgouttes. C'est là qu'intervient la pointe à deux diamètres. En arrivant dans la partie large de la pointe, le film de perfluorohexane séparant les deux gouttes primaires s'amincit jusqu'à devenir instable et se rompt, induisant ainsi la coalescence des deux gouttes. La faible quantité de perfluorohexane se mélange facilement au reste de l'huile de transport, et représente un volume négligeable par rapport à celle-ci, ne changeant donc pas ses propriétés. L'échantillon et les réactifs sont ensuite rapidement mélangés par les recirculations induites par le transport de la goutte dans le capillaire.

5. La pointe est relevée dans la solution de lavage, et le protocole peut recommencer à l'étape 1 avec le puits d'échantillon  $n + 1$ .

Les gouttes formées (réacteurs de 1  $\mu\text{L}$ ) sont stockées dans une portion de capillaire « tampon » du système d'injection. Après qu'un certain nombre de gouttes aient été formées, la seringue de prélèvement est pleine, et toutes les gouttes formées se trouvent dans le « capillaire tampon » directement relié à la seringue. Notons que ceci est nécessaire à la réinjection correcte des gouttes dans la partie réaction du système (autour du cylindre). Pour une seringue de 250  $\mu\text{L}$ , on peut comme on le verra au paragraphe suivant former jusqu'à 19 gouttes (soit 114  $\mu\text{L}$  incluant les espaceurs d'huile) qui sont stockées dans le canal tampon, tandis que les 136  $\mu\text{L}$  restant sont uniquement de l'huile permettant d'amener les gouttes de la pointe d'injection au canal tampon à travers les valves et les jonctions en Y. Cette huile pourrait être prélevée au dessus de puits contenant des échantillons déjà prélevés, mais dans un premier temps et par souci de simplicité, nous avons dédié une rangée de puits à contenir l'huile utilisée pour déplacer les trains de gouttes formés.

C'est à ce stade qu'intervient le fonctionnement antisymétrique des deux pousse-seringues, permettant de combiner l'injection séquentielle des échantillons décrite et la circulation continue de ceux-ci dans la zone de réaction.

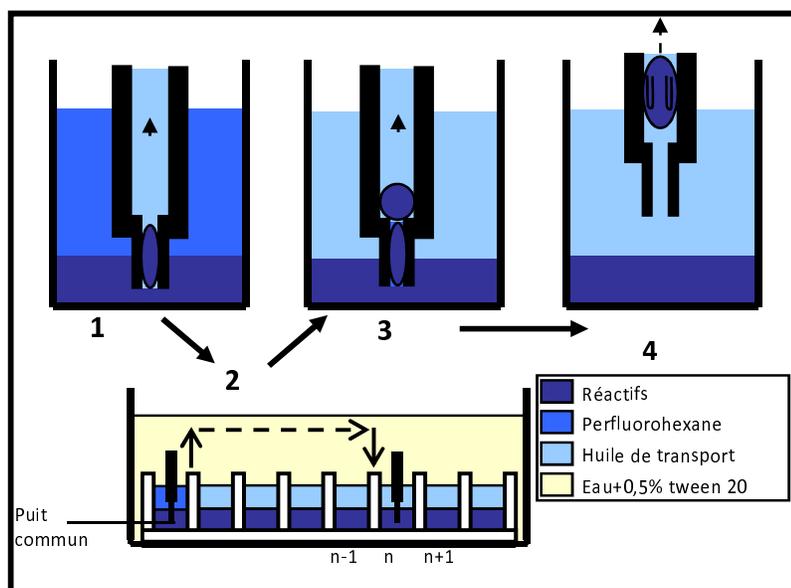


FIG. 2.9 – Microplaquette 96 puits utilisée pour l’injection automatisée des microgouttes, et séquence d’injection telle que décrite dans le texte, avec une pointe d’injection évasée.

### 2.3.2.c Injection séquentielle et flux continu

**Boucle d’injection.** Cette combinaison fait intervenir un cycle d’alternance à deux étapes (figure 2.10). La seringue (n°1) utilisée pour prélever les échantillons est initialement vide, sa vanne ouverte côté injection, et se remplit d’huile au fur et à mesure qu’elle forme les gouttes. A l’inverse, l’autre seringue (n°2) est pleine d’huile lorsque le prélèvement des échantillons commence, avec sa vanne ouverte côté réaction, et assure une circulation continue à 0,1 cm/s autour du cylindre chauffant. Lors de la première série de prélèvements, elle pousse uniquement de l’huile. A la fin de la formation de la première série de gouttes, la valve de la seringue n°1 ouvre le côté réaction, ferme par la même le côté injection, et le pousse-seringue n°1 se met à pousser de façon continue les gouttes formées à l’étape précédente autour du cylindre chauffant, assurant ainsi le flux continu dans la partie réaction tout en permettant le déroulement de la réaction pour ces gouttes. Pendant ce temps, la seringue n°2, désormais vide, est utilisée pour former séquentiellement de nouvelles gouttes destinées à la réaction de la même façon que la seringue n°1 à l’étape précédente. Par une synchronisation précise des deux pousse-seringues sous Labview, notre système est donc capable de fonctionner continuellement (tant qu’il est alimenté en échantillons) avec une pompe qui prélève des échantillons pendant que l’autre pousse en continu ceux qu’elle a déjà formés (voir figure 2.10). Concernant l’alimentation en microplaques d’échantillons du système, on peut tout à fait imaginer le coupler avec

des robots existants permettant de manipuler et de charger des microplaques.

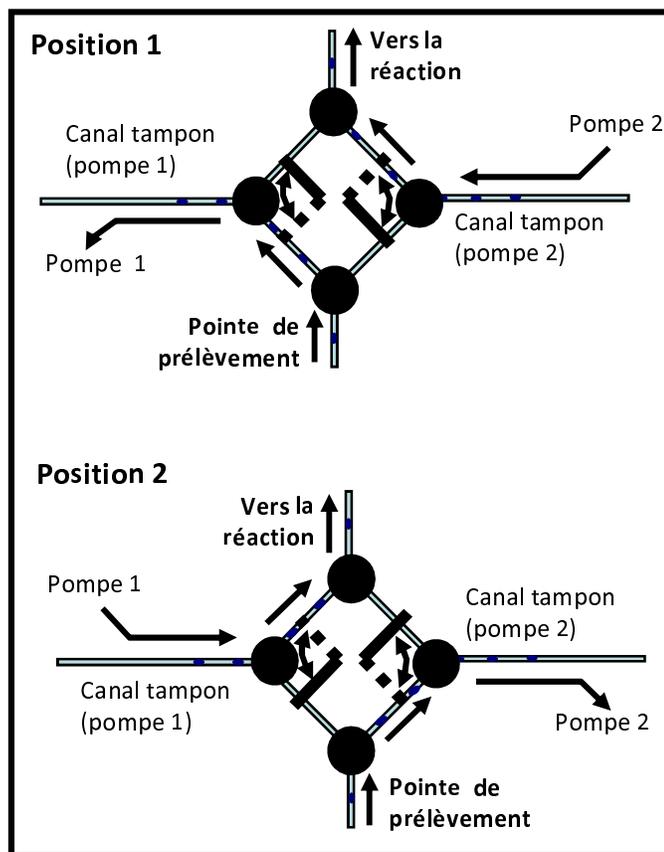


FIG. 2.10 – Cycle à 2 états permettant de combiner injection séquentielle et circulation continue autour du cylindre. Chaque pompe est reliée à une jonction en Y dont les deux branches débouchent sur une valve à pincements. État 1 : la pompe 1 forme séquentiellement des nouveaux réacteurs et les stocke dans son canal tampon pendant que la pompe 2 pousse continûment les réacteurs déjà formés autour du cylindre chauffant. État 2 : la pompe 1 pousse continûment les échantillons qu'elle vient de former dans la zone réaction pendant que la pompe 2 forme séquentiellement de nouveaux échantillons qu'elle stocke dans son canal tampon.

**Remarques.** Quelques remarques sont importantes à ce stade. Le temps d'injection pour une goutte est principalement limité par la vitesse des pompes, plus que par la vitesse de déplacement de la pointe entre des puits plus ou moins distants. Il y a en effet un compromis à trouver entre vitesse d'injection d'une goutte et précision du volume prélevé. Les gouttes sont prélevées à  $0,5 \mu\text{L/s}$ . L'injection des espaceurs d'huile peut se faire à plus haute vitesse puisque la précision en volume est

moins importante dans leur cas. De même pour l'injection du spacer final permettant d'amener le train de gouttes dans le capillaire tampon dans lequel il attendra d'être envoyé vers la partie réactive. Lors du prélèvement d'huile, on utilise ainsi des flux de  $2,5 \mu\text{L/s}$  résultant en des vitesses de l'ordre de  $0,5 \text{ cm/s}$ , d'où une nette augmentation du nombre capillaire. Ceci ne résulte cependant pas en des fractionnements de gouttes dans les constriction ou par cisaillement. Par contre, ces vitesses nous empêchent d'utiliser le refroidissement de plaque mentionné plus haut, puisque les deux effets combinés d'augmentation du nombre capillaire induisent eux le fractionnement des gouttes. Celles ci sont donc prélevées à température ambiante dans la plaque.

On comprend bien que la synchronisation des pompes est un problème complexe fonction à la fois du volume des gouttes et des espaceurs formés, de la vitesse de circulation des gouttes choisie dans la partie réaction, et dans une moindre mesure de la localisation des puits d'échantillons sur la plaque par rapport au puits d'enzyme. Cette nécessaire synchronisation limite ainsi le nombre de gouttes injectables par train. On prélève le nombre maximal de gouttes possibles pendant que l'autre seringue se vide et on finit de remplir la seringue d'aspiration par prélèvement à haute vitesse d'huile pure afin d'être « dans les temps » lorsque la seringue poussante est vide. Dans l'hypothèse où l'on serait capable de prélever les gouttes plus rapidement, et donc d'en prélever plus dans l'intervalle de temps où la seringue de réaction se vide continûment, il reste recommandé de placer le train dans son entier dans un canal tampon. On pourrait imaginer au lieu de ça prélever perpétuellement les gouttes sans se soucier de la seringue effectuant les prélèvements et en laissant les gouttes à l'endroit où elles se trouvent lorsqu'une seringue est pleine, mais ceci rendrait le repérage des gouttes beaucoup plus ardu, puisqu'une goutte prélevée lors d'un cycle d'alternance précédent  $n - 1$  pourrait finalement entrer dans le cylindre après une goutte prélevée au cycle présent  $n$ .

Chaque série de gouttes est séparée de la suivante par un spacer d'huile correspondant au volume nécessaire pour faire transiter le train depuis le canal tampon à travers la jonction en Y et les valves jusqu'à la partie réaction. Lors de cette opération, les trains font demi-tour, c'est à dire que la première goutte prélevée de la plaque se retrouve la dernière injectée dans la partie réaction.

Le lecteur peut se demander où est l'avantage de la microfluidique, puisque les échantillons sont initialement introduits dans les puits en volume de  $50 \mu\text{L}$ . D'une part, ce volume dépend essentiellement de la géométrie des puits considérés, et c'était ici le volume nécessaire pour recouvrir entièrement le fond d'un puits. On peut très bien imaginer utiliser une plaque 384 puits voire 1536 puits à fond rond, dans lesquelles quelques microlitres suffisent à recouvrir correctement le fond, nous rapprochant ainsi de la limite de ce qui est « macroscopiquement manipulable ». L'utilisation d'un capillaire de plus faible diamètre externe serait nécessaire dans ces puits plus petits afin de ne pas trop perturber l'interface huile / solution aqueuse et de ne pas faire remonter les échantillons dans les puits. Avec des capillaires de plus faible

diamètre, on peut facilement venir prélever dans ces puits des volumes de l'ordre de la centaine de nanolitres, ce qui nous fait gagner un facteur 10. La goutte étant non mouillante sur les parois du capillaire, la diminution de ses dimensions dans une limite raisonnable ne devrait pas poser de problèmes fondamentaux tant que la chute de pression induite par la présence des gouttes n'est pas trop importante. D'autre part, même si dans la majorité des cas le volume utilisé restera inférieur au volume introduit macroscopiquement dans la plaque, le même puits peut-être réutilisé pour former plusieurs gouttes. C'est déjà le cas dans notre système pour l'enzyme : on peut dire que dans notre prototype non optimisé, la consommation *réelle* d'enzyme est bien de  $0,5 \mu\text{L}$  par échantillon, tout compris. Quant aux échantillons, on peut imaginer prélever plusieurs fois le même échantillon afin d'effectuer des contrôles : c'est le cas de toutes les analyses en PCR quantitative classique utilisées en médecine et biologie, qui sont souvent effectuées en « duplicate » voire en « triplicate ». Enfin, dans le cadre d'applications de génotypage, on cherche souvent à cribler différents échantillons avec différents réactifs de PCR (amorces), et notre système se révèle parfaitement adapté à ce type de multiplexage.

### 2.3.2.d Montage de détection

Étant désormais capables d'injecter et de faire réagir un grand nombre de gouttes successives, nous devons être capables de détecter celles-ci automatiquement en ligne afin de ne pas perdre en sortie le temps que nous gagnons en entrée. Pour ce faire, un montage classique de détection de fluorescence induite par laser (LIF) a été intégré en sortie du système. Nous avons pour l'instant opté pour une détection en fin de réaction, premier pas vers la PCR quantitative, pour une question de simplicité du montage. Cette détection est effectuée directement dans le capillaire après réaction. Notre montage est destiné à une détection de type FITC (fluorescéine isothiocyanate, excitation 490 nm, émission 520 nm), la plus classique pour le marquage d'ADN avec par exemple du SybrGreen. Si cette méthode de détection n'est pas spécifique du double brin d'ADN considéré, rappelons que la spécificité est obtenue par un choix judicieux des amorces.

Le capillaire est passé au centre d'une boîte noire. Un faisceau laser (laser solide pompé par diode, AOTK, 40 mW, 472 nm) est focalisé par un miroir dichroïque et à travers un objectif x10 sur le centre du capillaire. Le signal de fluorescence éventuel est récupéré à travers ce même dichroïque, filtré par un filtre passe-bande (520-550 nm) et focalisé par une lentille convergente sur un tube photomultiplicateur muni d'un diaphragme. Notre montage se situant dans une pièce ne pouvant pas être laissée dans le noir, et l'isolation de la partie détection de la lumière n'étant pour l'instant pas parfaite, la combinaison d'un diaphragme sur le photomultiplicateur avec une lentille convergente permet de s'affranchir du bruit de fond dû à la lumière extérieure. Le montage est représenté en figure 2.11. Le signal est acquis sous Labview.

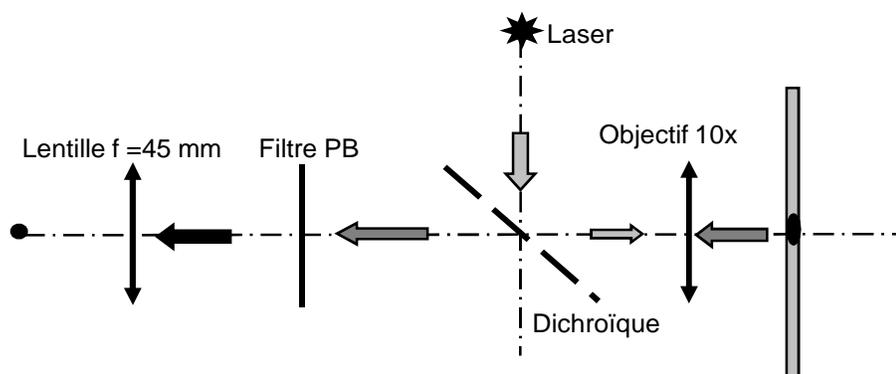


FIG. 2.11 – Schéma du montage de détection des produits par LIF (laser induced fluorescence) dans le capillaire après réaction.

L'utilisation d'un photomultiplicateur permet une détection très sensible de la fluorescence. La limite de détection de notre système n'est cependant pas fixée par le rapport signal sur bruit du détecteur lui-même, mais plutôt comme nous le verrons par celui du bruit de fond lié aux marqueurs fluorescents utilisés.

## 2.4 Résultats obtenus

Les expériences menées sur le système avaient pour but de démontrer la stabilité des trains de gouttes et l'absence de contamination effective (en situation réelle de haute température) entre les gouttes, ainsi que la reproductibilité et l'efficacité du système pour les réactions de PCR. Des essais ont enfin été effectués sur du matériel génétique issu de cellules humaines fourni par l'hôpital de l'Institut Curie afin de détecter des gènes d'intérêt dans le diagnostic du cancer du sein. Ces derniers tests, bien qu'encore anecdotiques lorsqu'on les compare aux performances atteintes avec les appareils de PCR quantitative utilisés en routine, ont permis de prouver la flexibilité de notre système et son application à des cas pratiques.

### 2.4.1 Tests de contamination et de reproductibilité

#### 2.4.1.a Protocoles expérimentaux.

Tous les tests présentés dans cette partie sont effectués sur un plasmide bactérien issu de e-coli, Litmus 28i (New England Biolabs). Ce fragment est originellement un ADN circulaire double brin de 2823 pb que nous amplifions sur 572 pb entre la base 2008 et la base 2580 (amorce sens 5'-AGC-TTG-GAG-CGA-ACG-ACC-3', amorce antisens 5'-CGC-ATT-GCG-GTA-TCT-AGA-ACC-GGT-GAC-GTC-3').

Les tests de reproductibilité sont menés en formant des gouttes contenant tous les réactifs nécessaires à la PCR et de l'ADN avec une concentration identique, et

en comparant les signaux obtenus en fin de réaction. La limite de détection est obtenue en faisant varier la concentration initiale d'ADN contenue dans les gouttes. Enfin, la contamination inter-gouttes est testée en alternant gouttes contenant initialement tous les réactifs nécessaires à la PCR et ADN (gouttes positives) avec des gouttes contenant initialement tous les réactifs nécessaires à la PCR mais pas d'ADN (gouttes négatives). Ainsi, si il y a contamination, celle-ci sera amplifiée exponentiellement par la réaction et donc détectable même à un faible niveau initial.

Les temps de cycle utilisés ici consistent en 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. Lorsque des contrôles sont effectués sur une machine de PCR classique, les mêmes temps de cycle sont utilisés.

#### 2.4.1.b Un peu d'histoire...

Les premiers tests de reproductibilité et de contamination décrits ci-dessous ont été effectués avant l'automatisation du système, et sont présentés en figure 2.12. Ils correspondent à des gouttes de 2  $\mu\text{L}$ , formées à partir d'un mélange réactionnel préparé dans des conditions classiques, avec un mix commercial prémélangé (Ready Mix Taq reaction mixture, Sigma) et une concentration d'amorces de 1  $\mu\text{M}$  (une micromole par litre). La concentration initiale d'ADN dans le mix était de 0,2 ng/ $\mu\text{L}$  environ. Après injection manuelle des gouttes et circulation à 0,1 cm/s autour du cylindre chauffant, chaque goutte était récupérée, dissoute dans 10  $\mu\text{L}$  de tampon et passée sur gel d'électrophorèse. Ce protocole permettait de confirmer que le fragment de la bonne longueur avait bien été amplifié, mais était laborieux et ne permettait pas de tester notre principe sur de nombreuses gouttes successives. D'autre part, l'injection manuelle induisait une variation de la taille des gouttes. Celle-ci, combinée à la difficulté de récupérer des gouttes d'aussi faible volume, conduisait à une reproductibilité assez moyenne due à des masses d'ADN injectées dans le gel différentes selon les gouttes. Ces expériences ont cependant permis de prouver avec succès l'amplification d'ADN avec une efficacité apparente sur gel égale à celle des machines de paillasse et l'absence de contamination entre gouttes successives (figure 2.12).

Comme on peut le voir sur le gel A, la première goutte passant dans le système présente une amplification différente des gouttes la suivant. C'est un phénomène que nous avons constaté de nombreuses fois, et que nous avons d'abord relié à une perturbation thermique liée à l'entrée de la première goutte dans le système. Cette hypothèse semble cependant peu fondée, puisqu'on imagine mal qu'une goutte perturbe beaucoup plus le système de chauffage que l'huile qui circule autour de lui compte tenu des capacités thermiques de chaque élément (capacité thermique de l'huile  $\sim$  capacité thermique de l'eau  $\ll$  capacité thermique du cylindre). Nous penchons désormais pour un effet d'impuretés prélevées par cette goutte lors de sa traversée du capillaire que nous détaillerons plus tard.

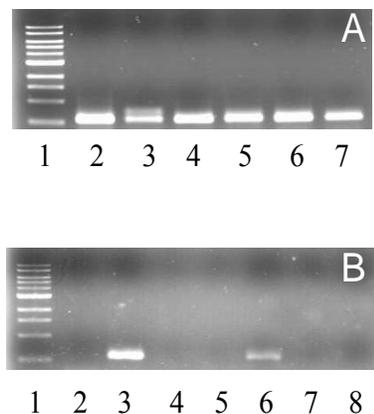


FIG. 2.12 – Premiers résultats obtenus sur gel d'électrophorèse après amplification dans notre système. Gel A : reproductibilité. Ligne 1 : échelle 1 kpb ; Ligne 2 : témoin amplifié dans une machine classique ( $2\mu\text{L}$  sont prélevés dans les  $50\mu\text{L}$  du mélange réactionnel et dilués dans  $10\mu\text{L}$ ) ; Lignes 3 à 7 : 5 gouttes amplifiées dans notre système. Gel B : test de non contamination. Ligne 1 : échelle 1 kpb ; Ligne 2 : témoin négatif ; Ligne 3 : témoin positif ; Ligne 4, 5, 7 et 8 : gouttes négatives ; ligne 6 : goutte positive.

#### 2.4.1.c Tests automatisés.

Ces expériences reposent sur le même principe que les tests préliminaires réalisés sur gel, avec les mêmes cycles de réactions, mais ont pu être conduites à beaucoup plus grande échelle grâce à l'automatisation du système. Afin de pouvoir réaliser la détection en ligne, nous utilisons un mix de PCR contenant initialement du SybrGreen I (SybrGreen Jump Start Taq Ready Mix for quantitative PCR, Sigma). Ce mix contient de plus une enzyme hotstart, ce qui permet d'éviter toute amplification non spécifique dans les gouttes pendant qu'elles sont prélevées et stockées dans le canal tampon. Notre détection étant effectuée en fin de réaction avec du SybrGreenI, nous travaillons à de faibles concentrations d'amorces. Comme nous le verrons, la détection devenait vite impossible à de trop grandes concentrations de celles-ci, le bruit de fond étant trop important. Enfin, nous avons profité du signal extrait de la détection pour faire une étude statistique sur la taille des gouttes formées.

**Signal brut.** La figure 2.13 montre le signal brut (un point d'acquisition toutes les 150 ms environ) obtenu en sortie de photomultiplicateur pour un train de gouttes (donc 19 gouttes) dans lequel une goutte sur 4 contient initialement de l'ADN. Les gouttes négatives sortent avec un faible signal positif, correspondant à la fluorescence de base du SybrGreen interagissant avec les amorces. Ceci permet un comptage correct des gouttes. Les gouttes positives sortent avec un fort signal. Les oscillations liées au bruit de fond du détecteur sont clairement visibles, et à celles-ci s'ajoutent des « pics dans les pics », liés à la fluorescence parasite d'impuretés microscopiques (type poussières) dans les gouttes négatives. Ces artefacts ne sont pas corrélés à la proximité entre une goutte positive et une goutte négative, et ne sont donc en aucun cas une marque de contamination. Comme le démontre sur 19 gouttes la figure 2.13, l'amplification d'une quantité initiale semblable d'ADN est reproductible d'une goutte à l'autre, et il n'y a aucune contamination croisée inter-gouttes.

A partir de ce signal brut, des opérations de traitement permettent d'accéder à une mesure plus quantitative de la quantité d'ADN initialement présente, de s'affran-

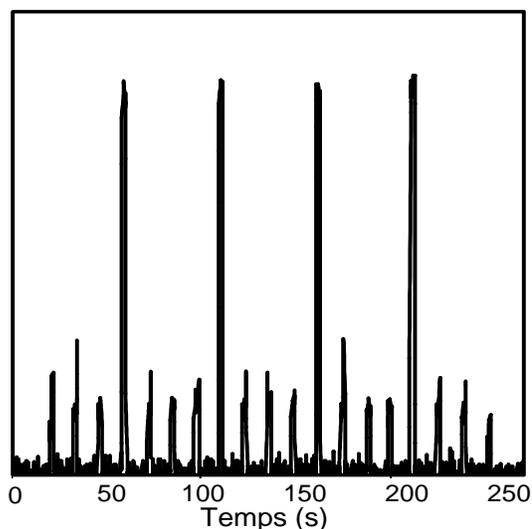


FIG. 2.13 – Signal brut obtenu après PCR pour une série de 19 gouttes. Concentration initiale en ADN des gouttes positives  $0,25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , concentration en amorces  $12,5 \text{ nM}$ .

chir des pics parasites liés à la présence d'impuretés, et d'accéder à une statistique sur la reproductibilité des volumes injectés.

**Traitement du signal brut.** La figure 2.14 présente les résultats obtenus pour deux trains de gouttes successifs alternant gouttes négatives et positives, la concentration initiale d'ADN dans chaque goutte positive de la deuxième série étant doublée à chaque goutte. La concentration initiale dans les réacteurs positifs pour la première série est de  $0,12 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , tandis que pour la deuxième série, la concentration dans les gouttes positives commence à  $7,5 \text{ pg}/\mu\text{L}$  et est doublée dans chaque goutte positive suivante pour finir à  $240 \text{ pg}/\mu\text{L}$  dans la dernière goutte positive. Pour des raisons d'espace, l'intervalle d'huile séparant deux séries (ligne droite de bruit de fond, valeur moyenne nulle pour une durée de 280 secondes environ) n'est pas représenté. Reproductibilité des volumes injectés.

Le lissage (figure 2.14A), effectué par moyenne glissante sur 5 points, permet d'atténuer l'effet des artefacts et du bruit de fond du détecteur. L'encart de la figure 2.14A représente la taille moyenne des gouttes, extraite du signal brut en seuillant le signal juste au-dessus du bruit pour chaque goutte et en déduisant de la largeur du pic situé au-dessus du seuil le temps de passage d'une goutte dans le détecteur. On peut, connaissant la vitesse de celle-ci, remonter à sa taille. On mesure une largeur de pics très reproductible indépendante du contenu de la goutte, avec un écart type de 6% seulement. La valeur moyenne déduite de cette mesure pour le volume de la goutte est de  $0,89 \mu\text{L}$ , au lieu des  $1 \mu\text{L}$  théoriquement prélevés. Cette valeur légèrement inférieure s'explique facilement par une prise en compte seulement partielle des deux demi-sphères dont consistent les extrémités de la goutte, liée à des phénomènes de diffraction aux différentes interfaces et à un éventuel centrage imparfait du faisceau laser sur le capillaire.

Reproductibilité de l'amplification.

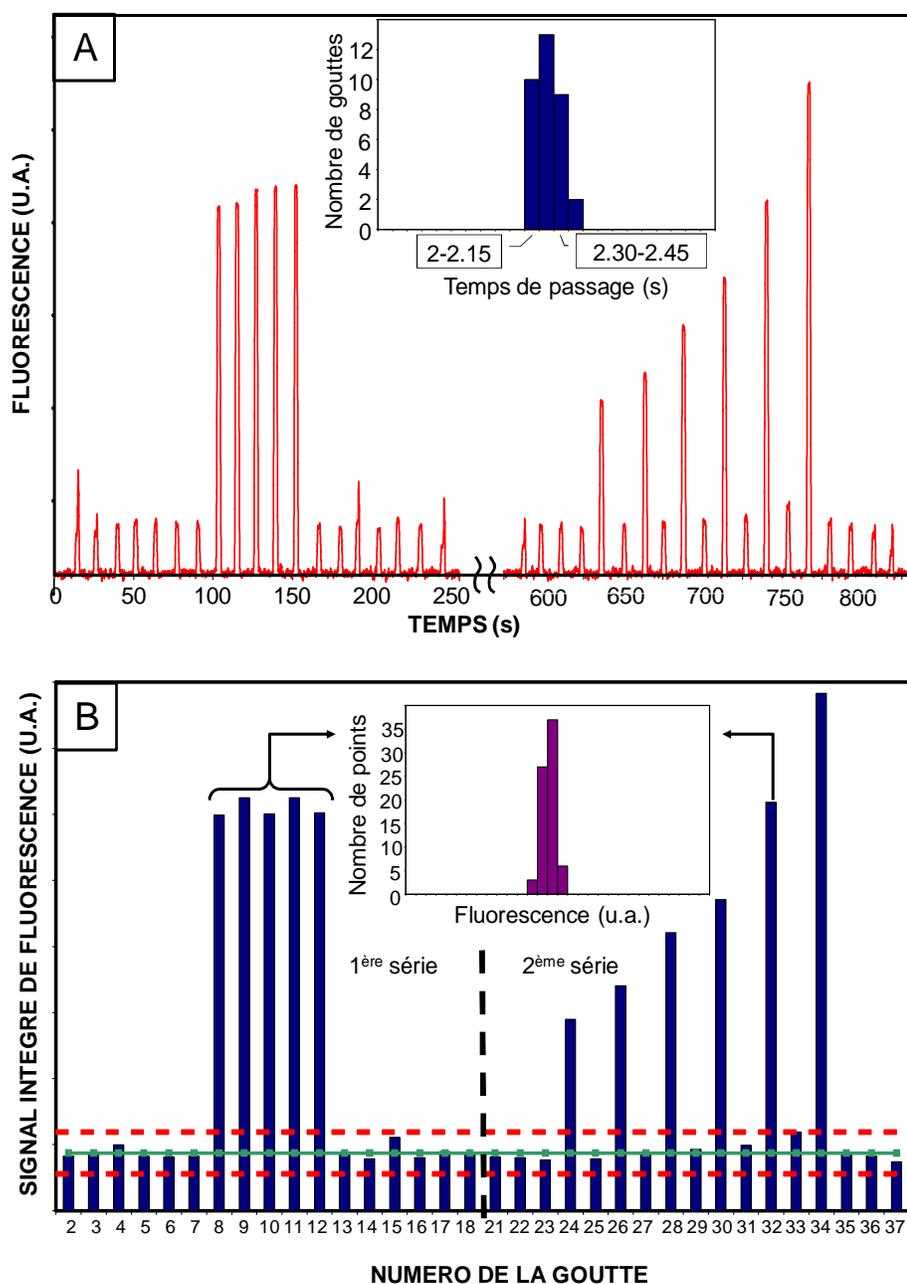


FIG. 2.14 – Deux séries successives (38 gouttes), le puits commun contenant des amorces à 25 nM. Partie A : données brutes lissées par moyenne glissante, encart représentant le temps de passage moyen des gouttes. Partie B : histogramme après intégration. La ligne continue représente la moyenne du signal des gouttes négatives et les pointillés l'intervalle de confiance à 99%. Encart représentant la distribution des valeurs brutes de fluorescence pour les gouttes contenant initialement la même quantité d'ADN.

La reproductibilité de l'amplification pour des gouttes contenant initialement la même quantité d'ADN (gouttes 7 à 11 et goutte 33) a aussi été estimée sur le signal brut, et l'histogramme de la valeur des points de mesure pour ces gouttes est représenté en encart de la figure 2.14B. On observe une parfaite reproductibilité de l'amplification d'ADN avec un écart type de seulement 2%, ce qui est de l'ordre des standards acceptés en PCR quantitative.

#### Gouttes négatives.

Enfin, la figure 2.14B représente le signal moyenné en temps sur un intervalle de 25 points centré au milieu de chaque goutte (intégration par la méthode de Gauss). Comme on peut le voir sur cette analyse digitale, le signal des gouttes négatives varie peu et ne présente pas de corrélation avec la proximité ou non d'une goutte positive, ce qui confirme la non-contamination. La ligne horizontale en trait plein représente la moyenne des pics négatifs tandis que la ligne pointillée représente l'intervalle de confiance à 99 % (calculé en considérant une distribution gaussienne du bruit).

Les première et dernière gouttes de chaque série sont exclues de la figure 2.14B et des calculs correspondant. Comme mentionné lors des premiers tests, chaque goutte traversant pour la première fois une partie du système jusqu'alors inutilisée depuis le début de l'expérience présente un signal de fluorescence distordu, pouvant être inférieur ou supérieur au niveau habituel des gouttes, et sortant de l'intervalle de confiance à 99% calculé sur les autres gouttes. Par observation visuelle de ces gouttes lorsqu'elles passent dans le capillaire de sortie et dans le faisceau laser, on voit clairement des poussières microscopiques à l'intérieur. Le montage expérimental se trouvant dans une salle non dédiée, il est raisonnable de penser que ces poussières sont prélevées par l'huile de transport et se déposent sur les parois du capillaire lorsqu'il n'y a pas circulation de fluides. La première goutte traversant le système, de par l'effet de bouchon qu'elle a en circulant dans le capillaire (seul un fin film d'huile la sépare des parois) emporte ces poussières et finit par les intégrer, ce qui peut avoir pour effet une fluorescence accrue des gouttes négatives (cas de la première goutte, figure 2.14A), ou une inhibition de la réaction de PCR (cas de la ligne 3, figure 2.12A et de la dernière goutte, figure 2.13).

Nous entourons donc toujours les deux premières séries prélevées (traversant chacune une nouvelle partie différente du système lors de l'injection) par des gouttes de lavage non comptabilisées. Du fait du demi-tour effectué par les gouttes dans le canal tampon, il faut considérer la première et dernière goutte de chacune des deux premières séries comme des gouttes de lavage. Les séries suivantes peuvent être injectées sans précautions particulières. Dans un environnement plus propre, les gouttes de lavage ne seraient certainement pas absolument nécessaires, mais il reste prudent de « relaver » le capillaire avant chaque utilisation avec deux gouttes négatives, ce qui ne coûte pas grand chose en terme de débit.

**Influence des amorces.** Le signal de fluorescence des gouttes négatives peut être à tort interprété comme une contamination des gouttes positives, mais deux éléments

prouvent qu'il est en fait lié au bruit de fond du SybrGreen se fixant sur les amorces (figure 2.15).

#### Expériences.

La figure 2.15A, première série, présente le résultat d'une amplification réalisée sur 19 gouttes avec le puits commun contenant uniquement l'enzyme, et les puits d'échantillons contenant soit de l'ADN et des amorces, soit de l'eau pure. Comme le montre le graphe de détection, les gouttes d'eau pure (avec enzyme de PCR) sont indétectables lorsqu'elles passent dans le détecteur après cyclage thermique, et seuls 4 pics correspondant à l'ADN amplifié sont visibles. Les gouttes de la deuxième série de la figure 2.15A contiennent toutes initialement de l'ADN, mais seules les gouttes correspondant aux pics positifs contiennent aussi des amorces. Les pics négatifs sont liés à l'ADN initialement présent en solution mais non amplifié. L'absence de signal des gouttes négatives de la première série figure 2.15A pourrait néanmoins être attribuée à la non-amplification de la contamination du fait de l'absence d'amorces dans la goutte contenant le mélange d'eau pure et de mix de PCR.

La figure 2.15B prouve le contraire. La figure 2.15B1 présente l'amplification dans notre système de concentrations croissantes d'ADN, multipliées par 2 dans chaque goutte positive successive. L'expérience équivalente a été réalisée en machine classique et analysée sur gel par concentrations décroissantes, et correspond aux lignes d à j du gel de la figure 2.15B2. Un mélange d'eau, d'amorces et d'enzyme sans ADN (tube n) a aussi été soumis à amplification dans un appareil classique (et donc non sujet à la contamination) en même temps que les mélanges complets de PCR (avec ADN, tubes p). Des gouttes individuelles extraites du tube n et d'un tube p correspondant à la ligne e sur gel (équivalent au 6ème pic positif dans notre système) sont passées successivement dans le détecteur de notre système. On obtient deux signaux de fluorescence dont les amplitudes relatives sont les mêmes que lorsque l'amplification a lieu dans notre machine (Figure 2.15B3). Parallèlement, aucun produit d'amplification n'est détectable dans le tube n par électrophorèse sur gel, alors que des volumes importants (10  $\mu\text{L}$ ) sont injectés (Figure 2.15B2, lignes b et c).

#### Interprétation.

Le signal des gouttes négatives provient donc bien d'une fluorescence liée à la fixation du SybrGreen sur les amorces. Au delà du signal de fluorescence de fond du SybrGreen se fixant sur les amorces simples brins [Zipper *et al.*, 2004], le comportement de notre mélange réactionnel laisse soupçonner la formation de dimères d'amorces. Le SybrGreen s'intercale alors dans ces dimères et fluoresce bien que l'ADN cible soit absent. A haute concentration d'amorces, typiquement supérieure à 50 nM, on obtient des résultats tout à fait fantaisistes lors de la détection par LIF, rendant impossible la distinction entre gouttes négatives et positives, ceci même lorsque l'amplification est effectuée classiquement et que les produits résultants sont passés individuellement sous forme de gouttes dans le système de détection. Il ne s'agit donc pas d'un problème de contamination sous-jacent à notre système.

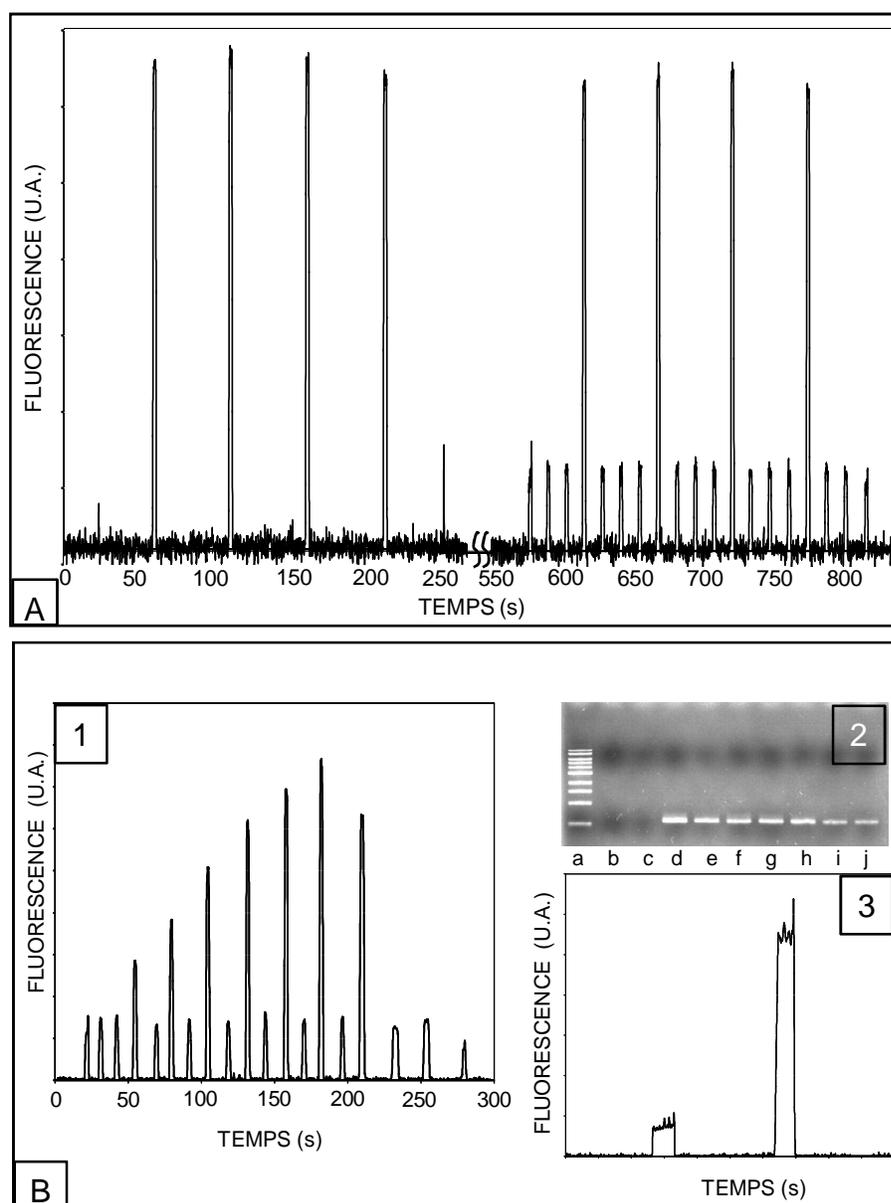


FIG. 2.15 – Influence des amorces sur le signal final de fluorescence. A : signal brut, concentration initiale en ADN des gouttes positives  $0,25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . B1 : amplification d'ADN dans notre système à des concentrations croissantes, signal lissé par moyenne sur 5 points. B2 : Gel de l'expérience équivalente en thermocycleur classique. Ligne a : échelle 1 kpb ; lignes b et c : témoin négatif, contenant initialement de l'enzyme et des amorces sans ADN ; lignes d à j : produits de l'amplification des solutions correspondant aux pics positifs de B1, par concentration décroissante. B3, de gauche à droite : signaux obtenus avec un témoin négatif (gel ligne b) et un positif (gel ligne e) amplifiés sur une machine classique et passés manuellement dans notre détecteur comme gouttes individuelles.

Ce phénomène est d'autant plus pervers qu'il est démontré que la fluorescence du SybrGreen augmente fortement lorsqu'au delà de s'intercaler dans de l'ADN double brin, il se trouve en large excès par rapport à lui (10 molécules de SybrGreen par pb) et se fixe à sa surface [Zipper *et al.*, 2004]. Ainsi, dans une goutte négative ne contenant pas d'ADN en fin de réaction, mais où les amorces sont donc toujours présentes à leur large concentration initiale, une fluorescence forte peut se développer du fait de la formation de dimères sur la surface desquels se fixe le SybrGreen. A l'inverse, dans une goutte positive, les amorces seront peu à peu intégrées à l'ADN double brin synthétisé, et leur signal de fluorescence ne s'ajoutera donc pas à celui de l'ADN double brin.

En conclusion, notre système de fragment et d'amorces n'était initialement pas destiné à faire de la PCR quantitative, et son design n'avait donc pas été optimisé pour ceci. Les résultats de Zipper *et al.* [2004] peuvent sembler surprenants, puisque même dans le cas d'un design extrêmement contrôlé des amorces afin d'éviter la formation de dimères, l'idée d'une fixation en surface du SybrGreen lorsqu'il est en large excès par rapport à l'ADN est contraire à l'idée d'augmentation exponentielle de fluorescence pourtant observée dans les PCR quantitatives de routine utilisant le SybrGreen. Alors que la quantité d'ADN augmente au cours du temps, le SybrGreen serait en moins large excès, et on pourrait avoir compensation des deux effets. Contacté à ce sujet, le Dr. Vitzthum, auteur correspondant de Zipper *et al.* [2004] répond que le SybrGreen est présent à très haute concentration dans les kits pour PCR quantitative tels que ceux que nous utilisons. Ceci est étonnant puisque nous avons constaté au laboratoire qu'au delà d'une concentration en SybrGreen de 1x dans le tampon de réaction (la concentration commerciale 10000x correspondant toujours selon Zipper *et al.* [2004] à une concentration massique de 10 mg/mL), la réaction de PCR est inhibée. D'autre part, pour des fragments d'ADN amplifiés sans SybrGreen, auxquels le SybrGreen est intégré a posteriori, la fluorescence maximale du mélange est atteinte pour une concentration en SybrGreen de 10x, dépassant alors d'un ordre de grandeur la fluorescence obtenue pour le même produit amplifié et détecté grâce au mix commercial contenant initialement du SybrGreen.

A moins de supposer que les mélanges de formulation propriétaire des fabricants contiennent une enzyme et un SybrGreen particuliers permettant de contourner ce problème, le mystère reste entier. Notons au passage sur la figure 2.15B1 que la goutte initialement la plus concentrée en ADN présente un niveau de fluorescence plus faible que la goutte la précédant, initialement deux fois moins concentrée. On peut y voir l'effet de l'intercalation particulière du SybrGreen ou un simple effet de saturation du détecteur ou de la réaction.

Une alternative consisterait à utiliser des sondes fluorescentes, la fluorescence de fond étant alors liée à celle des sondes et devenant indépendante de la concentration en amorces.

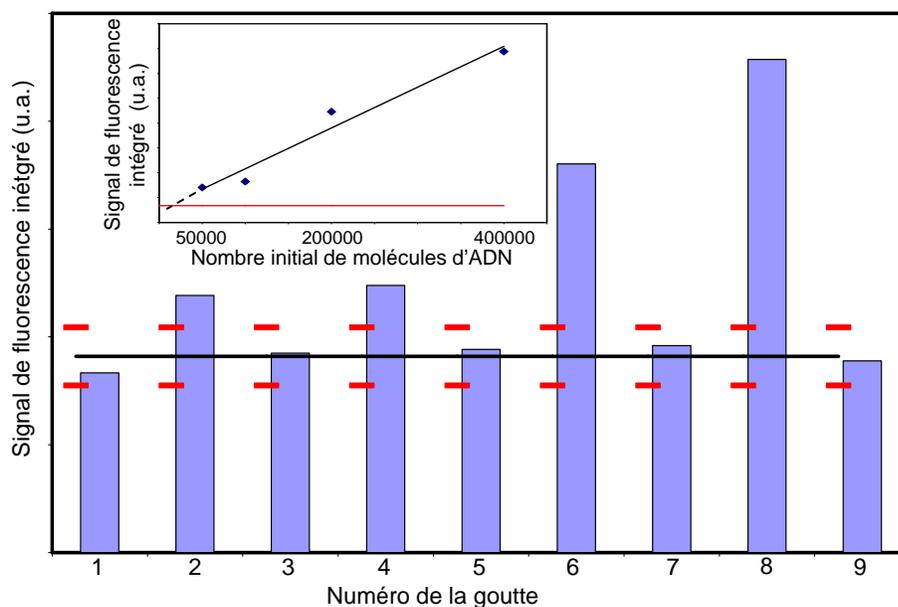


FIG. 2.16 – Limite de détection reproductible du système.

**Limite de détection.** La figure 2.16 présente la limite de détection (LOD) de notre système. Une série de 11 gouttes a été utilisée, les première et dernière gouttes de lavage n'étant pas montrées sur la courbe. Parmi les 9 gouttes restantes, une goutte positive alterne avec une goutte négative : malgré l'absence claire de contamination croisée dans notre système, les gouttes négatives représentent une sécurité supplémentaire assurant une mesure fiable et permettent de déterminer la ligne de base.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme selon le même principe qu'en figure 2.14B. La ligne continue représente le signal moyen des gouttes négatives, et les pointillés l'intervalle de confiance à 99%, en supposant une distribution gaussienne du signal, ce qui correspond à un écart type de 5% du signal négatif intégré. Ce niveau de fluctuations bas permet d'utiliser seulement quelques gouttes pour fixer une ligne de base précise. La concentration initiale d'ADN dans les gouttes est doublée dans chaque goutte positive successive. L'encart de la figure correspond au signal de fluorescence de sortie en fonction du nombre initial de molécules d'ADN dans la goutte. On obtient un coefficient de détermination linéaire de 0,96, ce qui compte tenu des problèmes d'interaction des amorces évoqués plus haut est correct et traduit une proportionnalité entre la quantité initiale d'ADN dans les gouttes et leur signal final de fluorescence. La première goutte détectée correspond à 50000 molécules cibles initiales. Bien que ce résultat soit tout à fait honorable lorsqu'on le compare aux résultats obtenus dans d'autres systèmes miniaturisés [Roper *et al.*, 2005], on aurait espéré mieux. Plusieurs raisons à cette limite de détection encore quelque peu éloignée de la molécule unique peuvent être avancées.

Nous avons tout d'abord constaté une variabilité de cette LOD en fonction de l'« âge » du mix d'enzyme utilisé et du temps écoulé entre la préparation de la plaque et l'injection effective des échantillons autour du cylindre. La figure 2.16 présente une limite extrêmement reproductible, quelle que soient les conditions de travail. Nous avons ainsi déjà obtenu une limite de détection inférieure d'un ordre de grandeur en utilisant un mix d'enzyme complètement nouveau, comme présentée en figure 2.15B1, avec une limite de détection de seulement 6000 molécules d'ADN initiales. L'équivalent amplifié en machine classique est détectable sur gel d'électrophorèse (figure 2.15B2) mais en utilisant des volumes d'injection considérables (10  $\mu\text{L}$  du produit de la PCR). Malgré ce meilleur résultat, notre limite de détection reste de l'ordre de quelques milliers de molécules. Sachant qu'il est possible statistiquement d'amplifier et détecter une molécule d'ADN unique dans des volumes « microfluidiques » dans des machines classiques, on peut se demander pourquoi notre système n'y parvient pas. Plusieurs explications sont plausibles.

Ensuite, comme je le faisais remarquer en introduction, nous travaillons à très faible concentration d'amorces, en fait au minimum de l'intervalle de concentration recommandé par le fabricant du mix de PCR. Comme nous l'avons vu plus haut, les amorces sont responsables du signal de fluorescence émis par les gouttes négatives, et le design non optimisé de notre système de fragment et d'amorces nous empêche de les utiliser à trop forte concentration. Du point de vue cinétique, la fixation des amorces sur l'ADN simple brin peut être vue comme une réaction du second ordre, dont le rendement après un temps  $t$  dépend donc du produit des concentrations des produits de départ. D'autre part, utilisées à si faible concentration, on peut penser que les amorces viennent à manquer en fin de réaction. Il s'avère d'ailleurs que contrairement aux cas où elles sont initialement présentes à haute concentration, elles n'apparaissent pas après réaction dans un thermocycleur sur gel d'électrophorèse. Une concentration plus faible en amorces implique donc une moindre amplification d'ADN lors de la PCR.

Enfin, l'inhomogénéité de température le long de l'axe du cylindre évoquée dans la partie précédente, sans être catastrophique, nuit nécessairement à l'efficacité de la réaction. On peut imaginer que l'enzyme s'abîme plus rapidement, et que les derniers cycles de réactions sont donc assez peu efficaces. Au delà des solutions déjà proposées pour ce problème, nous verrons en conclusion de ce chapitre qu'un changement radical d'architecture ne peut être que bénéfique à cette efficacité.

### 2.4.2 Tests sur échantillons cliniques

Notre système de PCR a été utilisé pour évaluer l'expression de gènes d'intérêt médical dans une lignée cellulaire d'origine humaine.

L'ARN total de cellules de la lignée T47D est extrait et reverse transcrit (1  $\mu\text{g}$  d'ARN total dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon) par la méthode des random hexamers. Les détails de la transcription inverse peuvent être trouvés dans de Cremoux *et al.* [2004],

en même temps que les amorces utilisées pour l'amplification par PCR. Deux gènes cibles ont été étudiés avec notre système, le gène universel RPLPO codant pour la protéine ribosomale P0, utilisé comme référence, et le gène PR du récepteur à la progestérone. Des concentrations initiales en ADNc correspondant à des dilutions respectives par 25 et 50 du produit de la transcription inverse ont été utilisées.

Le gène codant RPLPO a été amplifié en utilisant le qPCR core reagent kit (Eurogentech) et détecté grâce à une sonde fluorescente spécifique (séquence ATCTGCTG-CATCTGCTTGGAGCCCA, fluorophore FAN et extincteur TAMRA), dans les mêmes conditions qu'en analyse de routine. Avec ce système Taqman de PCR quantitative, les cycles de température sont à deux niveaux seulement, 95°C pour la dénaturation et 65°C pour la fixation des amorces et l'amplification, avec des temps correspondants de 15 et 30 secondes respectivement dans un système classique. Le mix utilisé requiert un temps d'activation long pour libérer l'enzyme de l'anticorps l'inhibant (10 minutes à 95°C), et il est donc difficilement utilisable dans notre système qui permet un temps d'activation de 1 minute seulement. Nous avons cependant été capables de détecter RPLPO avec des temps de cycles de 1 minute à 65°C et 1 minute à 95°C. La même expérience réalisée avec 30 secondes à 95°C et 90 secondes à 65°C ne donnait aucune amplification, ce qui confirme le problème d'activation de la Taq dans notre système. Les signaux de fluorescence en sortie sont en moyenne un ordre de grandeur inférieurs à ceux obtenus avec du SybrGreen, mais avec un rapport signal sur bruit comparable, alors que nous utilisons cette fois des concentrations en amorces relativement hautes (>100 nM). La courbe présentant le résultat de l'amplification de RPLPO (figure 2.17, 6<sup>ème</sup> pic) montre aussi la présence d'ADN dans la première goutte détectée, supposée être une goutte de lavage. L'amplification comme la détection par sondes fluorescentes étant spécifiques, il ne peut s'agir que du gène cible RPLPO. La seule explication plausible à ce phénomène correspond à l'amplification d'ADN génomique humain entraîné par la première goutte lors de son passage à travers une partie jusqu'alors inutilisée du système. Cette hypothèse est supportée par les observations mentionnées dans la partie précédente faisant état de micro-débris visibles dans la première goutte à traverser une partie du système.

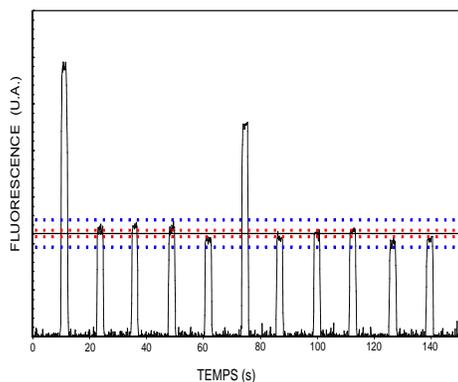


FIG. 2.17 – Détection du gène codant RPLPO en utilisant des sondes fluorescentes et le mix qPCR core reagent mix (Roche). Signal brut.

Le gène PR, plus faiblement exprimé que RPLPO, a été détecté en utilisant le

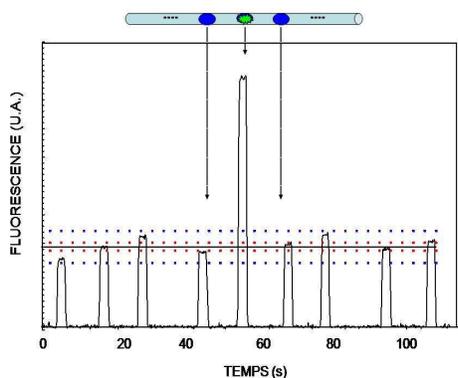


FIG. 2.18 – Détection du gène codant le récepteur à la progestérone, en utilisant un pré-mix de SybrGreen. Signal brut.

même pré-mix d'enzyme et SybrGreen que dans les expériences de caractérisation du système. La difficulté d'activation du mix utilisé pour RPLPO a en effet mené à l'absence d'amplification détectable pour PR avec le système précédent. En utilisant notre pré-mix habituel et des concentrations en amorces de 25 nM, nous avons été capables de détecter le gène PR à l'issue de 35 cycles avec 1 minute à 95°C et une minute à 60 °C. Les résultats correspondants sont présentés en figure 2.18.

## 2.5 Conclusions et perspectives

Nous avons présenté dans cette partie un système original permettant d'effectuer la réaction de PCR dans des microgouttes indépendantes transportées par une huile immiscible. Cette application fait clairement ressortir l'avantage de la microfluidique diphasique pour des applications à haut débit. La compartimentation des réactifs, en plus d'éviter la dispersion, permet grâce à une formulation appropriée des matériaux utilisés de s'affranchir de toute contamination dans le système et donc d'obtenir une architecture haut débit et réutilisable sans étapes de lavage. L'automatisation de l'injection et l'intégration d'un détecteur de fluorescence en fin de réaction a permis de dépasser le stade de la preuve de concept et de prouver la robustesse de notre approche par des résultats sans équivoque tant en termes de reproductibilité que de non-contamination ou de limite de détection sur de nombreuses gouttes consécutives. L'application du système au cas pratique de la quantification de l'expression de gènes d'intérêt dans le diagnostic du cancer du sein, sans apporter pour l'instant autant d'informations que les machines classiques de PCR quantitative, a démontré la flexibilité de notre machine pour la programmation des temps de cycles comme pour les méthodes de détection utilisées. L'automatisation de l'injection, indispensable à la validation de notre approche, est aussi et surtout une proposition de réponse au problème du « world to chip » récurrent dans nombre de microsystèmes : notre méthode d'injection originale permet de prélever et de mélanger automatiquement sous forme de microgouttes échantillons et réactifs à partir d'un support macroscopique standard (la microplaque), tout en maintenant simultanément un flux continu des

microréacteurs dans la partie aval du système. La validation de cette méthode générale couplée à notre système fluide sur la réaction de PCR, très sensible tant sur le plan de la contamination que sur celui de la reproductibilité, prouve d'emblée que notre système est applicable à d'autres réactions chimiques simples. La plateforme développée lors de cette thèse dépasse donc le champ d'application pour lequel elle a été mise au point et devrait plus généralement trouver son utilité dans le domaine florissant de la microfluidique de gouttes.

Nous l'avons vu, certains points du système pêchent encore malgré tout, parmi lesquels l'inhomogénéité du chauffage et l'absence d'une réelle détection quantitative à chaque cycle de la réaction. Le passage à un format planaire pour la partie réaction du système devrait apporter une réponse aux deux problèmes. Comme nous l'avons présenté brièvement en introduction, des systèmes de chauffage performants destinés aux puces microfluidiques existent déjà et pourraient être assez facilement intégrés dans une future puce de PCR avec des techniques de fabrication appropriées. De même, des techniques de détection pour puces microfluidiques se sont fortement développées, poussées principalement par le développement des outils d'électrophorèse miniaturisés. On peut ainsi imaginer placer le microcircuit sur un capteur CCD, et après excitation faire une imagerie globale des gouttes circulant dans le système (voir par exemple [Adams *et al.*, 2003]).

Cependant, le passage en format planaire ne va bien entendu pas sans obstacles. Nous l'avons vu, la contamination est un problème fondamental en microfluidique de gouttes, que nous avons su résoudre grâce à une formulation précise du système capillaire-huile. Comment reproduire la surface du Teflon PFA dans des canaux microfabriqués? On peut imaginer trouver un équivalent fluoré du PDMS, permettant une fabrication aisée d'une puce fluorée en masse. Nous avons vu que de tels matériaux ont été mis au point [Rolland *et al.*, 2004], mais restent chers et non disponibles commercialement pour nos applications. Nous inspirant des techniques de mise en œuvre du COC développées au laboratoire, nous avons pour notre part tenté d'utiliser des matériaux fluorés commerciaux (3M Dyneon, Dow Corning Silastic) et de former des microcircuits par pressage sous haute température, mais sans réel succès pour l'instant. Un autre problème est à prendre en compte à ce niveau : les résultats obtenus en termes de contamination et de stabilité des trains de gouttes tiennent pour des canaux circulaires. Or la plupart des microcircuits classiques fabriqués par moulage ont des canaux de forme rectangulaire, au mieux demi-circulaires, ce qui peut reposer le problème de la contamination, du fait de la modification du confinement du film d'huile séparant les gouttes des parois. Celle-ci peut impliquer une contamination par adsorption des produits contenus dans les gouttes sur les parois, mais aussi à cause d'une déstabilisation des gouttes (cassage) ou des trains de gouttes. Compte tenu de ces observations, on peut penser que la solution idéale consisterait en des canaux en verre traités par un polymère fluoré. La gravure du verre par acide fluorhydrique est une méthode dangereuse mais bien maîtrisée, et peut donner des canaux quasi-circulaires (gravure isotrope). D'autre part, du fait de

ses champs d'application immenses, le traitement de surface du verre par différentes méthodes est extrêmement bien connu et documenté. Notons que la solution la plus simple, consistant à utiliser un Teflon liquide (AF1600, DuPont) physisorbé sur la surface n'est ici pas valable car ce Teflon liquide est soluble dans l'huile fluorée. Une autre solution, moins glamour, consisterait simplement à utiliser des capillaires de Teflon PFA, éventuellement de plus faible diamètre pour permettre de travailler à plus faibles volumes, collés à la surface d'un système de chauffage et de détection plan. Dans l'idée plus générale d'une diminution des volumes utilisés dans le système, un travail de fond est nécessaire afin de mettre au point des jonctions et des valves permettant de travailler avec des gouttes et des circuits de plus faible diamètre sans introduire de volumes morts ni de contamination, en conservant la forme de plots des gouttes. La solution la plus évidente semble être celle des valves « à la Quake » utilisant une architecture multiniveaux dans un élastomère souple type PDMS, qu'il conviendrait de traiter.

La microfluidique a le potentiel de révolutionner les habitudes de l'analyse en biologie comme en chimie d'ici dix ans. Parmi les méthodes existantes, l'utilisation d'écoulements diphasiques, bien que plus compliquée à mettre en oeuvre, représente la voie la plus prometteuse pour parvenir à créer des systèmes haut débit capables de proposer une alternative aux systèmes classiques actuels. Nous espérons, malgré les obstacles qu'il reste à dépasser, avoir à travers ce chapitre démontré au lecteur la possibilité d'une telle réalisation.

## Entracte

Dans la partie précédente, nous avons présenté un système de PCR autonome quasiment « fini », c'est à dire déjà capable de fonctionner et d'apporter des résultats en mode automatisé, de façon avantageuse en terme de consommation et de débit par rapport aux systèmes actuels. Mettre au point cette machine a requis une étude détaillée des mécanismes de transport de gouttes dans les capillaires, et de nombreuses astuces de conception du système d'injection, pour en faire aujourd'hui un système utilisable par des non-spécialistes à partir de supports classiques (microplaques). Ce système ne tire cependant pas avantage de toutes les possibilités offertes par la microfluidique, particulièrement en ce qui concerne la diminution des volumes. Si les 100 nanolitres avec lesquels il devrait être possible de travailler à l'avenir conviennent tout à fait en termes d'économie par rapport aux machines actuelles, l'utilisation de volumes de l'ordre du femtolitre offre des possibilités jusque là inaccessibles par des méthodes classiques.

En ordre de grandeur, une goutte de 1 femtolitre a un diamètre de 10  $\mu\text{m}$  environ. Ces volumes ne sont pas manipulables avec les méthodes d'injection décrites au chapitre précédent, de part le manque de précision des pompes, la nécessaire élasticité des circuits conduisant à une absorption des variations de pression, et les effets de tension de surface prenant trop d'ampleur pour des « plots » à cette échelle. Il faut donc recourir à des méthodes alternatives, briques technologiques beaucoup plus « amont » par rapport au prototype présenté dans la partie précédente, mais offrant à priori des performances jusqu'alors inégalées si leur intégration est réussie. La conception d'un système fonctionnant à cette échelle implique, de la même façon que dans la machine présentée plus haut, la capacité à former de façon reproductible des gouttes de taille contrôlée, ainsi qu'à synchroniser et à mélanger ces gouttes au sein d'un circuit fluide. Les méthodes utilisées diffèrent nécessairement et impliquent la mise en oeuvre de phénomènes plus complexes tirant parti de la miniaturisation des écoulements pour mieux les contrôler.

Nous présentons ainsi dans les deux parties qui vont suivre deux briques technologiques indispensables à l'évolution vers des systèmes ultraminiaturisés. La première est une méthode permettant, à partir d'une population de cellules dans son milieu de culture, d'encapsuler chaque cellule seule dans une microgoutte d'une taille comparable à la sienne, et de séparer cette goutte des gouttes vides en utilisant de simples effets hydrodynamiques. En relation avec le chapitre précédent, il s'agit en quelque

sorte d'aller prélever l'échantillon à analyser « à la source », ce qui permet de tirer pleinement parti de la précision et de la sensibilité offerte par la concentration et le confinement du contenu d'une cellule dans une goutte. Afin que cette méthode ait une réelle utilité, il convient ensuite de pouvoir ajouter à la cellule encapsulée dans sa goutte des produits permettant son analyse. La deuxième brique technologique mise au point dans cette thèse consiste ainsi en une méthode permettant grâce à un champ électrique de coalescer deux microgouttes initialement séparées par plus d'une fois leur rayon. La seconde méthode, représentant pourtant une étape ultérieure dans le processus devant à terme permettre d'analyser le contenu d'une cellule unique, a en fait été mise au point bien avant la technique d'encapsulation de cellule. Par souci de clarté et de cohérence, nous présenterons néanmoins ces deux méthodes dans l'ordre où elles devraient à terme être utilisées.

## Chapitre 3

# Encapsulation de cellules uniques

Les premières études s'intéressant au comportement des cellules utilisaient une approche « en masse », extrayant des valeurs moyennes de données obtenues sur des populations entières de cellules. Il a cependant vite été compris que ces populations de cellules pourtant identiques présentaient à un instant donné une variété de comportements différents. Cette stochasticité dans le comportement cellulaire est liée à de possibles différences de composition subtiles du milieu cellulaire, des mutations génétiques, et d'une façon générale la différence de niveau d'expression des gènes au sein d'une population de cellules. Cette dernière variabilité peut-être divisée en deux familles : les bruits intrinsèques (inhérents à la stochasticité des processus biochimiques internes à la cellule), et les bruits extrinsèques (liés au microenvironnement interne de chaque cellule à un instant donné) [Raser & O'Shea, 2005]. L'intérêt des biologistes s'est donc rapidement porté vers l'étude du comportement individuel de cellules dans un environnement donné. Ceci d'abord parce que les résultats obtenus en moyenne peuvent facilement conduire à une interprétation erronée. Par exemple, au sein d'une population de cellules identiques, celles-ci vont réagir à un stimulus chimique à partir d'un seuil de concentration différent pour chaque cellule : cette réponse peut être analysée comme une réponse linéaire au stimulus lorsque l'étude porte sur la population entière de cellules, alors qu'il s'agit en fait d'une accumulation des réponses à un seuil donné pour chaque cellule. Mais l'étude de cellules individuelles permet aussi l'étude des causes et des conséquences du bruit cellulaire, sous-tendu par des chemins de signalisation complexes, et dont l'importance est fondamentale dans la survie et l'évolution des espèces.

Pour une étude complète à l'échelle de la cellule unique, il faut non seulement être capable d'isoler chaque cellule, mais aussi d'étudier un nombre important de cellules individuelles simultanément, pendant qu'elles sont actives [Lidstrom & Meldrum, 2003]. Au delà de méthodes dites « classiques », le lecteur aura sans doute deviné que la microfluidique et les techniques associées trouvent ici leur application naturelle, ne serait-ce que pour des motifs de dimensionnement. Par le nombre de publications, d'exposés en conférences et de revues paraissant aujourd'hui sur le sujet, il est clair que la biologie cellulaire apparaît de plus en plus comme le débouché

principal de la microfluidique pour des applications plus ou moins fondamentales. Cette dernière permet en particulier de contrôler précisément les conditions dans lesquelles les cellules sont placées, et donc de s'affranchir de causes de variabilité dans le comportement d'une population de cellules liées par exemple à la variation de composition du milieu les contenant. De plus, les effets de concentration créés par le confinement d'une cellule dans une chambre ayant le même ordre de taille qu'elle permet de réaliser des mesures jusqu'ici inaccessibles.

Nous décrirons dans une première partie les applications démontrées de la microfluidique à la biologie à l'échelle cellulaire, avant de présenter dans une seconde partie la méthode d'isolation de cellules uniques au sein de gouttes mise au point au laboratoire. Le lecteur intéressé pourra se reporter à des revues traitant généralement de l'application de la microfluidique à l'étude de cellules [El-Ali *et al.*, 2006; Sims & Allbritton, 2007], ou à la découverte de médicaments [Dittrich & Manz, 2006].

### 3.1 Biologie cellulaire et microfluidique

Les premières études à l'échelle de la cellule unique ont été effectuées à l'aide d'instruments de biologie cellulaire classiques, parmi lesquels les systèmes de cytométrie en flux tiennent la place la plus importante. Ces systèmes analysent à haut-débit le niveau de fluorescence de cellules circulant dans un canal et permettent une étude précise du niveau d'expression des protéines dans une cellule donnée. Ils nécessitent bien entendu un marquage de la cellule d'intérêt pour fonctionner. Parmi les cytomètres en flux, le FACS (fluorescence activated cell sorting) permet de trier des populations de cellules avec un débit supérieur à 10000 cellules par seconde. Le triage est en quelque sorte basé sur un écoulement diphasique, puisque les cellules circulent dans leur milieu, leur niveau de fluorescence est détecté, et elles sont encapsulées dans une goutte chargée grâce à une formation de jet sous champ électrique, celle-ci étant ultérieurement orientée selon le niveau de fluorescence de la cellule qu'elle contient. La faiblesse de ces systèmes est généralement liée à cette méthode de tri, puisque l'utilisation d'un champ est susceptible d'influencer l'état de la cellule, et que la formation des gouttes peut provoquer la formation d'un aérosol potentiellement dangereux dans le cas de cellules pathogènes. Les cytomètres classiques ont aussi le défaut de ne pas pouvoir assurer une homogénéité parfaite du milieu de culture d'une cellule à l'autre, et ne permettent pas une étude temporelle de l'évolution au sein d'une cellule. Ce type d'applications est assuré par des méthodes de microscopie automatisée permettant de scanner au cours du temps un nombre conséquent de cellules et leur réaction à différentes drogues par exemple. Notons enfin en relation avec le chapitre 2 que la RT-PCR peut aussi être utilisée pour mesurer l'expression de gènes dans une cellule unique. Les techniques microfluidiques semblent ici aussi prometteuses puisque les effets de concentration permettent d'améliorer l'efficacité de la réaction de transcription inverse et donc les capacités de détection de la réaction

[Bontoux, 2006].

Bien qu'ils n'égalent pas encore le débit offert par les méthodes classiques, les microsystèmes fluidiques offrent des possibilités inégalées en termes de contrôle de l'environnement cellulaire et de manipulation des cellules. Nous présenterons successivement dans cette partie les applications principales de la microfluidique à l'étude de cellules individuelles, avant de nous intéresser plus particulièrement à la compartimentation des cellules au sein de microgouttes.

### 3.1.1 Manipulation microfluidique de cellules

Au delà de la microfluidique pure et dure, les biologistes ont vite trouvé un intérêt dans les techniques de microfabrication et de modification locale des propriétés de surface pour exposer des cellules adhérentes à un microenvironnement mécanique contrôlé et étudier leur développement en fonction de celui-ci. Le développement des cellules *in vivo* dépend en effet aussi des contraintes mécaniques auxquelles elles sont soumises. On trouve par exemple dans la littérature des exemples de contrôle de l'axe de division des cellules par patterning de molécules en surface [Thery *et al.*, 2005]. Les applications utilisant complètement les techniques de la microfluidique ont quant à elles d'abord consisté en la miniaturisation des cytomètres en flux, puis continué avec l'intégration en microsystèmes des différentes étapes nécessaires à l'analyse cellulaire que sont la culture, l'isolation, et la lyse ou l'électroporation de cellules.

#### 3.1.1.a Micro-cytomètres en flux

Nous laissons ici de côté les méthodes utilisant le piégeage de cellules par capture directe sur des anticorps déposés en surface ou sur des microcolonnes. Le premier cytomètre en flux miniaturisé est présenté par le groupe de S.Quake en 1999 [Fu *et al.*, 1999], et utilise un flux électroosmotique pour déplacer et diriger les cellules après détection optique dans un canal très étroit (quelques microns), avec deux modes de fonctionnement selon que l'on cherche à concentrer une population ou à trier des cellules rares. Ce FACS a un débit faible (de l'ordre de la dizaine de cellules par seconde) en comparaison avec les appareils classiques, mais évite toute contamination entre les cellules et est beaucoup moins cher. Il sera plus tard modifié avec un pompage « à la Quake » au lieu d'un flux électroosmotique [Fu *et al.*, 2002].

D'autres modèles, utilisant un focusing monophasique du flux contenant les cellules et s'affranchissant d'un canal étroit risquant de se boucher font ensuite leur apparition [Simonnet & Groisman, 2006], et un contrôle en pression extérieur au système permet d'atteindre des vitesses de tri de l'ordre de celles des cytomètres classiques. Notons cependant que ces vitesses ne sont obtenues qu'avec des billes fluorescentes et non avec des cellules vivantes : on peut penser que les taux de cisaillement impliqués dans ces systèmes miniaturisés lyseraient des cellules vivantes.

La diélectrophorèse peut être utilisée pour séparer des cellules aux propriétés diélectriques très différentes, comme on peut le faire avec des particules. Mais des systèmes se rapprochant plus des cytomètres en flux classiques l'utilisent aussi. Dans une première version [Voldman *et al.*, 2002], toutes les cellules sont piégées par diélectrophorèse dans des pièges individuels, leur luminescence est mesurée, et les cellules non désirées sont relâchées en flux. Dans une autre version [Hu *et al.*, 2005], les cellules sont marquées avec différentes particules polarisables au lieu des fluorophores utilisés en FACS classique, et triées directement en flux par diélectrophorèse à des taux supérieurs à 10000 cellules par seconde : ce système peut être vu comme l'analogie du « magnetic activated cell sorting » (MACS) par rapport au FACS dans le monde macroscopique.

Même si ces systèmes sont encore relativement lents, on peut envisager tirer parti de la parallélisation rendue possible par la miniaturisation pour augmenter le débit des micro-FACS, et découpler ainsi le compromis classique à faire entre résolution, pureté et débit des FACS classiques.

### 3.1.1.b Culture et lyse des cellules.

Il s'agit ici de deux éléments fondamentaux à intégrer au sein des systèmes microfluidiques, débouchant sur deux types d'études distinctes : la culture cellulaire en micropuces permet d'observer l'évolution d'un petit nombre d'éléments dans des conditions très contrôlées et éventuellement variables, tandis que la lyse cellulaire ouvre la porte à des études de biologie moléculaire sur le contenu de cellules uniques.

Dans les expériences en masse, la lyse des cellules s'effectue généralement de façon chimique, avec utilisation de détergents comme le SDS (sodium dodecyl sulfate). Bien que cette approche reste valable en microsystèmes, la présence de produits chimiques autres que le tampon de réaction peut gêner l'analyse subséquente des produits contenus dans la système. Les chercheurs ont donc tiré parti des possibilités offertes par la microfabrication pour créer des systèmes de lyse mécanique constitués de « microcouteaux » [Di Carlo *et al.*, 2003]. Exploitant la possibilité d'appliquer des champs électriques intenses et contrôlés, des techniques consistent à lyser les cellules par application d'un champ électrique alternatif avant de réaliser la séparation électrophorétique de leurs contenus [McClain *et al.*, 2003]. Le but de la lyse est en effet souvent la conduite d'une analyse subséquente du contenu des cellules, par capture sur anticorps, électrophorèse ou chromatographie. J'en profite pour mentionner une technique assez puissante et originale consistant à utiliser la variation de fréquence de résonance d'un micro-cantilever, pour détecter par exemple des molécules s'adsorbant à sa surface [Burg *et al.*, 2007]. En relation avec le chapitre 2, la détection par PCR puis électrophorèse sur puce de seulement quelques bactéries a par exemple été démontrée dans Lagally *et al.* [2004]. En utilisant les systèmes à chambre multiples, le groupe de S. Quake a démontré l'isolation de cellules uniques et la récupération de leur ARNm [Hong *et al.*, 2004].

L'étape la plus amont de toute étude de biologie cellulaire est bien entendu la culture cellulaire, qui a aussi été intégrée sur puce, offrant un contrôle spatial et temporel accru des conditions de développement des cellules. Cette opportunité a vite été saisie pour la culture de cellules « difficiles » comme les cellules osseuses ou celles du foie, et l'étude de cellules particulières comme les neurones. D'autre part, l'utilisation de microchambres permet la culture de cellules sous perfusion dans des conditions plus proches des conditions physiologiques que dans les cultures classiques, ainsi que l'étude de la réaction des cellules à des variations de population ou de flux. Ces microchambres sont fermées par des « valves à la Quake » [Balagadde *et al.*, 2005] ou avec des écrans Braille servant à ouvrir et fermer les membranes de PDMS [Gu *et al.*, 2004], permettant de s'affranchir intelligemment des brevets détenus par la société Fluidigm.

### 3.1.1.c Isolation de cellules uniques.

C'est certainement dans cette application que la microfluidique a le plus à offrir aux études de biologie cellulaire. Au-delà de l'étude des cellules adhérentes, évoquée en introduction, des microsystèmes permettent l'étude de cellules uniques en suspension grâce à une architecture astucieuse.

La principale méthode « classique » s'intéressant à l'étude de cellules uniques est le patch-clamp, permettant par mesure des courants transmembranaires la caractérisation des canaux ioniques de la membrane cellulaire. Cette méthode a été miniaturisée pour permettre un piégeage par aspiration puis une mesure parallélisée des courants électriques sur des cellules de mammifère ([Ionescu-Zanetti *et al.*, 2005] et figure 3.1B). Sur le même principe, l'électroporation sur cellules uniques a été réalisée en microcanaux, permettant d'inoculer ADN, protéines, etc...dans la cellule en rendant sa membrane momentanément perméable [Khine *et al.*, 2005]. L'avantage principal par rapport aux méthodes en masse est un meilleur contrôle sur la tension appliquée et donc sur le phénomène d'électroporation lui-même.

Une autre méthode élégante permettant de manipuler des cellules individuelles en suspension sans nécessaire recours à la microfluidique est l'utilisation de pinces optiques. Pour une particule diélectrique d'indice optique supérieur à celui du milieu l'entourant, placée dans un faisceau laser focalisé, une force va prendre naissance et avoir tendance à l'attirer dans les zones de champ fort, permettant son piégeage. La position de la particule est ainsi contrôlée dans le plan perpendiculaire au faisceau laser, et si le gradient de champ est assez important pour s'opposer à la pression de radiation sur la particule tendant à l'expulser du point de focalisation du faisceau, la position de la particule peut-être contrôlée dans les trois dimensions. Cette technique a été mise au point dans les laboratoires Bell au début des années 1970 et appliquée aux cellules par son inventeur en 1987 [Ashkin *et al.*, 1987]. Son principe et ses applications sont bien résumées dans une revue [Grier, 2003]. Cette méthode présente l'inconvénient de possibles dommages causés aux cellules par le chauffage lié au

rayonnement laser, ainsi que la difficulté de mise en œuvre dans un laboratoire non spécialisé.

Dépassant la simple miniaturisation de méthodes classiques, le premier exemple de plateforme permettant d'isoler une cellule unique en solution et de lui appliquer divers traitements grâce à un équivalent de micropipette microfabriqué est présenté dans Wheeler *et al.* [2003] (voir figure 3.1A), suivi de peu de Peng & Li [2004]. Les expériences menées permettent de prouver l'efficacité de la plateforme sans apporter de nouvelles informations d'ordre biologique, et cette plateforme ne permet l'étude que d'une seule cellule à la fois, d'où un débit assez limité. Une autre version, plus simple et utilisant uniquement le flux des cellules à travers le circuit pour remplir un réseau de pièges hydrodynamiques à cellules uniques est présentée en 2006 [DiCarlo *et al.*, 2006] (voir figure 3.1C), et utilisée pour obtenir des données nouvelles sur les concentrations en carboxylestérases au sein de cellules uniques. Dans le même esprit, on peut utiliser la sédimentation de cellules dans des puits microfabriqués de façon à ne contenir qu'une seule cellule afin de permettre une observation individuelle de chacune d'elle, mais l'application uniforme d'un réactif liquide à l'ensemble des cellules peut s'avérer difficile [Rettig & Folch, 2005]. Les deux dernières méthodes impliquent nécessairement un contact, même minime, des cellules avec les parois. D'autres méthodes, utilisant des dispositifs plus compliqués ont été mise au point afin de capturer des cellules sans contact dans des « eddies » (mini-tourbillons) fluides [Lutz *et al.*, 2006] ou grâce à des forces acoustiques [Evander *et al.*, 2007], cette dernière méthode utilisant le même principe que celui présenté en introduction pour déplacer des gouttes, et impliquant un échauffement du substrat. De plus, de même que pour ses sœurs utilisant la diélectrophorèse comme décrit plus haut, cette méthode soumet la cellule à des forces supérieures à celles auxquelles elle est soumise *in vivo*.

Les méthodes présentées ci-dessus permettent de soumettre individuellement un nombre conséquent de cellules à un environnement bien contrôlé. D'autres méthodes consistent à « enfermer » la cellule avec une quantité donnée de son milieu, sans communication avec ses voisines, dans le but de concentrer et analyser les protéines contenues dans une cellule. Des microchambres intégrées et fermées par des valves à la Quake ont ainsi été intégrées au sein d'un microsystème, permettant la capture d'une cellule unique, l'ajout de réactifs, la lyse de la cellule, et l'analyse de son contenu par électrophorèse [Wu *et al.*, 2004]. Selon le même principe de confinement, l'expression stochastique des protéines mentionnée en introduction a pu être observée grâce à l'effet de concentration créé par l'isolation en microchambres [Cai *et al.*, 2006] des produits liés à l'action de la  $\beta$ -galactosidase dans la cellule et relargués par celle-ci. Enfin, une méthode originale de valves utilisant des plots d'air pour confiner le contenu des cellules a été démontrée [Irimia *et al.*, 2004]. Ceci nous amène naturellement à évoquer les méthodes de confinement au sein de microgouttes, objet de ce chapitre.

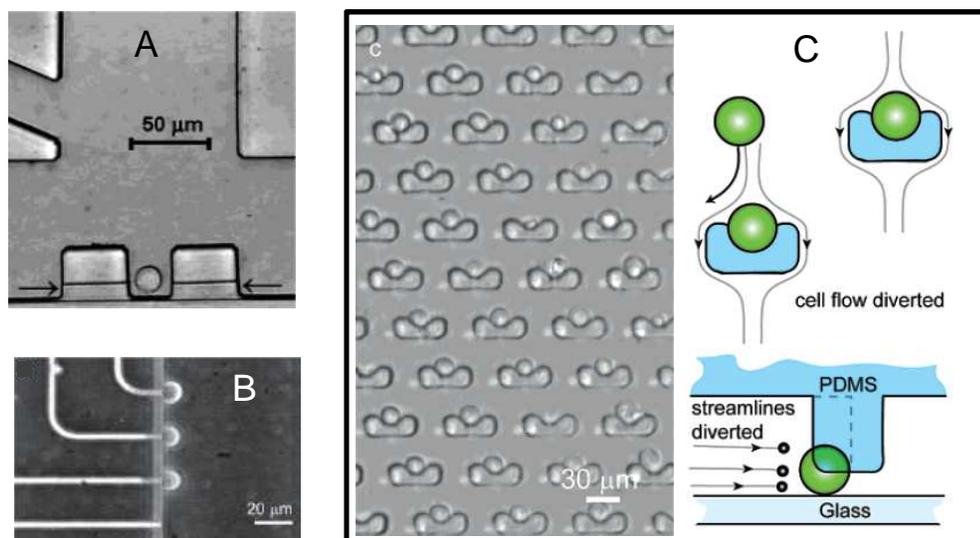


FIG. 3.1 – A : premier piège à cellules en microcanaux. Le canal supérieur gauche permet de délivrer des réactifs à la cellule. D'après Wheeler *et al.* [2003]. B : système microfluidique d'électroporation et d'étude de cellules par patch clamp. D'après Ionescu-Zanetti *et al.* [2005]. C : Piège à cellules hautement intégré permettant la capture et le traitement simultané de nombreuses cellules. La partie droite précise le principe de fonctionnement de celui-ci. D'après DiCarlo *et al.* [2006]

### 3.1.2 Confinement de cellules en microfluidique diphasique

Ces méthodes permettent de s'affranchir des valves, quel que soit leur type, en confinant les cellules au sein de gouttes ou plots séparés par un fluide immiscible. Une première application consiste à utiliser les recirculations induites dans des plots de liquide séparés par de l'air pour améliorer les conditions d'étude après lyse d'un groupe de cellules [El-Ali *et al.*, 2005]. Cette étude a aussi permis de démontrer que les recirculations au sein des gouttes n'ont pas d'effet observable sur les cellules. Les flux segmentés ont aussi été utilisés pour cultiver des cellules en petit nombre dans les microcompartiments formés par les plots [Grodrian *et al.*, 2004]. Le but principal de la microfluidique de gouttes est cependant l'encapsulation d'une cellule unique au sein d'une microgoutte et le contrôle de cette goutte. La cellule peut ensuite être lysée, à des fins d'analyse moléculaire, ou conservée intacte au sein de la goutte, à laquelle on rajoute éventuellement des réactifs pour étudier le comportement cellulaire.

#### 3.1.2.a Origines

Dans la même lignée que la PCR en émulsion mentionnée dans l'introduction du chapitre 2, l'idée d'isoler des cellules uniques au sein de gouttes afin de concentrer

leur contenu et de permettre leur analyse individuelle découle finalement du concept de compartimentation *in vitro* proposée dès 1998 par Tawfik & Griffiths [1998]. Le principe de cette compartimentation consiste dans les grandes lignes à mimer les cellules par des micro-émulsions d'eau dans l'huile (formées à l'époque sans l'aide de la microfluidique), par exemple à des fins d'évolution dirigée *in vitro*. Compte tenu des concentrations utilisées et de leur taille, les gouttes formées contiennent statistiquement une seule copie de gène, dont l'activité est évaluée par son action sur un substrat donné après qu'il ait été transcrit et exprimé dans la goutte. L'utilisation de doubles émulsions permet ensuite la sélection des gènes d'intérêt grâce à un triage par FACS. L'idée naturelle découlant de ceci est bien sûr de mettre une cellule dans la cellule artificielle [Aharoni *et al.*, 2005], ce qui permet par exemple l'évolution dirigée de bactéries *in vitro*. Une bonne revue de ces techniques peut-être trouvée dans Griffiths & Tawfik [2006].

Il est clair d'après ce que nous avons vu dans les parties précédentes que la microfluidique de gouttes a tous les atouts en termes de contrôle sur la taille et la composition des gouttes formées pour jouer un rôle central dans ce type de technique, et que l'encapsulation de cellules uniques au sein de gouttes du même ordre de taille est un défi à relever pour les chercheurs du domaine.

### 3.1.2.b Dispositifs microfluidiques pour l'encapsulation de cellules

La première démonstration d'encapsulation contrôlée de cellules au sein d'une microgoutte est présentée par He *et al.* [2005]. Dans une géométrie de jonction en T, une pince optique (laser infra-rouge) est utilisée pour déplacer une cellule dans la solution aqueuse près de l'interface eau/huile, puis une goutte de solution aqueuse contenant la cellule est détachée par application d'un pulse de pression dans la branche secondaire du T, résultant en l'encapsulation de la cellule dans une goutte unique du même ordre de taille (voir figure 3.2A). Avec un autre laser, la cellule peut être rapidement lysée dans la goutte et son contenu analysé. Cette méthode permet d'encapsuler de façon certaine une cellule dans une goutte mais présente les désavantages déjà décrits plus haut des pinces optiques, et offre un débit faible compte tenu des possibilités de la microfluidique de gouttes.

Des démonstrations d'encapsulation de cellules dans un mode continu de génération de gouttes et sans utilisation de champs de force extérieurs apparaissent ensuite. Le groupe d'A.P. Lee présente une méthode utilisant une géométrie de flow-focusing en microcanaux pour émulsifier une phase aqueuse contenant les cellules dans une phase d'acide oléique contenant des lipides [Tan *et al.*, 2006]. Cette émulsion primaire est ensuite injectée hors-puce dans un mélange eau-éthanol, provoquant la formation de vésicules lipidiques autour des gouttes d'eau contenant les cellules. La cellule est ainsi encapsulée dans son milieu, protégé par une vésicule lipidique, restant viable pour plusieurs heures (voir figure 3.2B), et peut être replacée dans une phase aqueuse avec laquelle la vésicule est susceptible de permettre un échange

d'ions. Cette méthode n'offre malheureusement aucun contrôle sur le nombre de cellules dans chaque goutte, ni sur le nombre de gouttes vides parmi les gouttes contenant une ou plusieurs cellules. D'autre part, la formation des vésicules est fortement dépendante de la taille des gouttes d'eau de l'émulsion, d'où un contrôle réduit sur les conditions expérimentales. L'encapsulation de cellules uniques dans les gouttes n'est assurée que « statistiquement » en ajustant la concentration de la suspension de cellules par rapport à la taille des gouttes formées, ce qui est aussi le cas dans les deux méthodes décrites ci-dessous.

Plutôt que l'encapsulation dans des vésicules lipidiques, Oh *et al.* [2006] démontrent l'encapsulation de cellules dans leur milieu au sein de microcapsules polymères (voir figure 3.2C). La géométrie concentrique utilisée est directement inspirée de l'assemblage de micropipettes décrit par Utada *et al.* [2005] pour la formation de doubles émulsions dans une géométrie de jetting. La solution aqueuse contenant les cellules circule au centre, est focalisée par une solution de monomères, le tout étant transporté dans une troisième phase aqueuse. Les gouttes sont formées dans un mode de jetting et la réaction de polymérisation des capsules initiée par irradiation UV. Bien que cela semble surprenant suite à l'exposition des cellules aux UV et à des produits chimiques pas nécessairement biocompatibles, les cellules (de levure) semblent selon les auteurs pouvoir rester vivantes plusieurs jours à l'intérieur de leur capsule polymère...

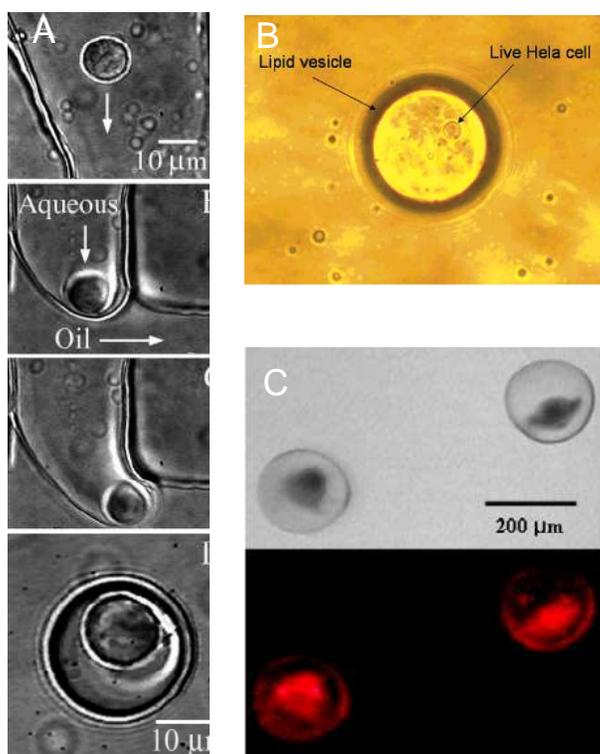


FIG. 3.2 – A : Encapsulation d'un lymphocyte B à l'aide de pincettes optiques et d'une génération de goutte unique en pression. D'après He *et al.* [2005]. B : Cellule HeLa, vivante après deux heures d'encapsulation au sein d'une vésicule lipidique. D'après Tan *et al.* [2006]. C : Cellules de levure encapsulées au sein de capsules polymériques placées dans l'eau depuis deux jours. D'après Oh *et al.* [2006].

Brouzes *et al.* [2006] ont présenté une méthode consistant à encapsuler des cellules dans des gouttes de solution aqueuse transportées par une huile fluorée, à coalescer cette goutte primaire avec une goutte de colorants cellulaires et à détecter les cellules mortes grâce à ce dernier, à des débits supérieurs à 1000 gouttes par seconde. Cette détection par fluorescence peut-être appliquée à trier les gouttes vides des gouttes contenant une cellule. Cependant, une fois de plus, l'encapsulation de cellules uniques se fait de façon statistique sur des suspensions diluées, et la majorité des gouttes sont vides, ce qui compromet l'aspect haut-débit du tri. D'autre part, bien qu'un montage de détection de fluorescence ne soit pas nécessairement compliqué, il correspond à l'ajout d'un élément extérieur à la puce et ne facilite pas l'utilisation du système par des non-spécialistes. Tout dernièrement, Huebner *et al.* [2007] utilisent le même principe, mais avec une formation et un mélange des gouttes « à la Ismagilov » (voir chapitre 4) pour mesurer l'expression d'un fluorophore dans *e-coli*.

Dans la partie suivante, nous allons présenter une méthode permettant de contrôler de façon précise l'encapsulation d'une cellule unique par goutte et la sélection automatique de ces gouttes parmi les gouttes vides sans utilisation d'un autre champ de forces qu'hydrodynamique, avec un haut débit caractéristique de la génération de gouttes en microcanaux.

## 3.2 Description du système utilisé

Notre système permet l'encapsulation de cellules uniques au sein de gouttes individuelles et le triage automatique de ces gouttes parmi les gouttes vides. Pour ce faire, il combine le phénomène de flow-focusing et le triage des gouttes par des effets purement hydrodynamiques. Afin de fixer les idées, nous décrirons d'abord dans cette partie le microcircuit utilisé pour mener à bien les expériences. Nous précisons ensuite les principes à l'œuvre dans l'encapsulation de cellules uniques et le tri des gouttes contenant une cellule (gouttes positives) parmi les gouttes vides (gouttes négatives).

### 3.2.1 Dispositif fluide

#### 3.2.1.a Architecture du système

Le système utilisé est décrit en figure 3.3, avec les dimensions correspondantes. Nous utilisons une géométrie de flow-focusing inspirée de Anna *et al.* [2003]. Le flux de solution aqueuse contenant les cellules est focalisé par deux flux d'huile dans le rétrécissement typique des géométries de flow-focusing. Le système est complètement fabriqué en PDMS selon les méthodes classiques décrites rapidement en introduction, ce qui résulte en des canaux hydrophobes d'une hauteur uniforme de 30  $\mu m$ .

Notons cependant quelques différences importantes. Tout d'abord, la région de focalisation du jet est plus longue que dans le design de Anna *et al.* [2003], indui-

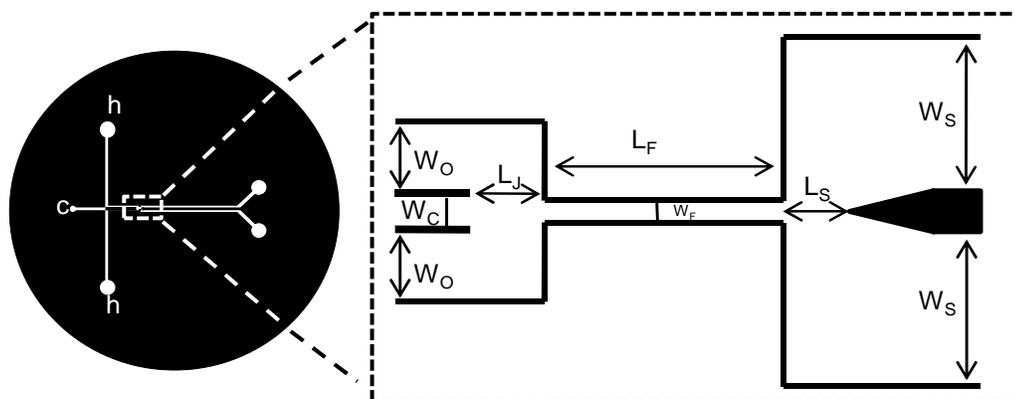


FIG. 3.3 – Architecture du système utilisé pour l’encapsulation de cellules uniques. A gauche : vue d’ensemble, « h » et « c » désignant les entrées d’huile et de cellules respectivement. A droite : région de focalisation et tri. La suspension de cellules est injectée par l’entrée centrale gauche ( $W_C = 70\mu\text{m}$ ) et focalisée par deux flux d’huile de paraffine contrôlés indépendamment ( $W_O = 150\mu\text{m}$ ). La région de focalisation a une longueur  $L_F = 500\mu\text{m}$  pour une largeur  $W_F = 40\mu\text{m}$ . Elle débouche sur une chambre séparée en deux sorties symétriques ( $W_S = 450\mu\text{m}$ ) après  $L_S = 150\mu\text{m}$ . Les canaux de sortie ont une longueur de deux centimètres. Ce système est placé *horizontalement*, mais les sorties du haut et du bas de la figure sont souvent désignées comme telles dans le reste de ce chapitre, ou par régions supérieures et inférieures.

sant la rupture du jet formé dans le rétrécissement plutôt que dans l’élargissement subséquent. Ensuite, chaque flux d’huile servant à focaliser la solution aqueuse est contrôlé indépendamment, permettant ainsi d’accéder à un défléchissement du jet et des gouttes en résultant. Enfin, l’élargissement post-focalisation est plus large que dans le cas standard, et séparé en deux canaux symétriques de sortie, qui permettront le triage des gouttes pleines parmi les gouttes vides.

### 3.2.1.b Liquides utilisés et contrôle des flux

L’huile utilisée est une huile de paraffine, à laquelle est ajoutée du surfactant Span 80 (sorbitan monooléate) à 5% en masse (densité 0,9, viscosité mesurée du mélange 120 mPa.s). Cette huile présente l’avantage d’être visqueuse, ce qui permet d’imposer un cisaillement conséquent même à des vitesses relativement faibles, et est parfaitement newtonienne.

Le pourcentage de surfactant contenu dans l’huile est relativement élevé, et bien supérieur à la concentration micellaire critique du surfactant dans la paraffine. De plus, une concentration inférieure à 1 % en masse suffirait par exemple à obtenir une huile hexadecane complètement mouillante dans le système considéré. Nous avons cependant, de même que d’autres groupes (C.Baroud, communication privée),

ponctuellement constaté des problèmes de mouillage excessif de la solution aqueuse et de recalescence des gouttes lorsque le tensio-actif est utilisé à seulement 1% en masse dans la paraffine, et nous l'associons à la viscosité élevée de cette dernière limitant la diffusion du surfactant aux interfaces. La formation de gouttes dans une géométrie de flow-focusing implique en effet une augmentation rapide d'interface avec des fréquences de génération de gouttes supérieures au kHz.

D'autre part, le fait que la solution aqueuse contienne des cellules modifie ses propriétés interfaciales. On peut supposer que les protéines nécessairement présentes dans une suspension de cellules agissent comme des tensio-actifs. Que l'on utilise directement le milieu dans lequel se trouvent les cellules, ou bien qu'on les resuspende dans une solution tamponnée après centrifugation, l'effet reste présent même après plusieurs changements successifs de tampon : on peut l'interpréter comme un relargage des protéines liées aux cellules dans la solution. Toutes les mesures sont donc effectuées avec du milieu de culture cellulaire en guise de solution aqueuse (RPMI 1640, 100 U/mL pénicilline, 100  $\mu$ g/mL streptomycine, 10 % FBS—fetal bovine serum). Ce dernier peut ou non contenir des cellules selon les expériences. Ceci a pour principal effet de favoriser le mouillage du PDMS par la solution aqueuse malgré la présence d'huile avec du surfactant comme phase continue, et de rendre les microgouttes formées relativement instables à long terme vis à vis de la coalescence.

Le mouvement des fluides est contrôlé en flux par des pousse-seringues : un pousse-seringue simple contrôle le flux de la suspension de cellules, tandis qu'un double pousse-seringue est utilisé pour contrôler les deux flux d'huile, ceux-ci pouvant être variés d'un côté et de l'autre en utilisant des seringues de diamètres différents. Les débits d'huile utilisés dans notre système sont de l'ordre de 100  $\mu$ L/h pour l'huile et 10  $\mu$ L/h pour la solution aqueuse.

Compte tenu des débits relativement élevés utilisés dans notre système combinés à la viscosité importante de la paraffine, les pressions au sein de celui-ci peuvent être relativement importantes, et il conviendra de tenir compte de la déformabilité du PDMS mentionnée en introduction de cette thèse dans toute tentative d'évaluation des pressions et des vitesses au sein du système. Ainsi, pour un contrôle en flux, le système se déformant, les vitesses réelles des fluides peuvent être moindres que celles estimées à partir du débit en considérant un système rigide. Nous pouvons cependant estimer le nombre capillaire dans nos canaux avec pour vitesse caractéristique celle de l'huile dans la région de focalisation (quelques cm/s) et une tension de surface de quelques mN/m :  $Ca \sim 0,5$ . Bien que la tension de surface domine encore les effets visqueux, ce nombre capillaire relativement élevé correspondra à une déformation des gouttes lors de leur circulation dans le rétrécissement.

### 3.2.2 Principe de fonctionnement

Les cellules que nous utilisons sont des lymphocytes T Jurkat. Avant injection dans le système, les cellules sont centrifugées et resuspendues à environ  $10^7$  cel-

lules/mL dans leur milieu, soit une concentration élevée supérieure de 10 fois à la concentration normale en milieu de culture. Le diamètre de ces cellules est compris entre 10 et 15  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2.a Encapsulation des cellules

La première étape consiste à encapsuler de façon fiable une cellule individuelle dans une goutte malgré la concentration élevée de la suspension. La géométrie de flow-focusing utilisée se révèle parfaitement adaptée à ce problème. Nous l'avons déjà vu, elle permet en effet de former des gouttes plus petites que les plus faibles dimensions du système. Nous allons donc ici pouvoir l'utiliser pour former des gouttes de l'ordre de taille des cellules sans pour autant courir le risque de boucher un canal de trop faibles dimensions ou encore d'endommager les cellules du fait de leur circulation dans un canal trop petit. Nous nous plaçons dans un régime où le diamètre des gouttes formées est inférieur au diamètre cellulaire moyen.

Le jet se casse pendant son passage dans la région de focusing. Lorsqu'une cellule passe dans le jet, elle perturbe celui-ci, induit sa rupture en un endroit différent du point habituel d'équilibre et se retrouve encapsulée seule dans une goutte (voir figure 3.4). On retrouve ce principe d'encapsulation de particule (macroscopique) par perturbation d'un jet cette fois continu (sans casse en l'absence de particules) dans Cohen *et al.* [2001], avec dans ce cas une formation de jet par aspiration à l'interface entre deux fluides. Dans notre cas, l'utilisation d'un jet continu et sa rupture uniquement par passage d'une cellule impliquent une foule de gouttes secondaires mal contrôlées et difficiles à trier, donc pénalisantes.

Il arrive souvent que les cellules arrivent dans le jet « en paquets » plutôt que de façon régulière. Cependant, les cisaillements à l'interface solution aqueuse/huile dans le jet induisent leur séparation et leur alignement au sein de celui-ci, et la taille des gouttes formées ne permet statistiquement l'encapsulation que d'une cellule par goutte. Chaque cellule est encapsulée dans une goutte dont le diamètre est au maximum deux fois le sien, soit un rapport 1/8 en volume, ce qui représente un état très confiné. Nous reviendrons sur le diagramme de fonctionnement précis du système dans la prochaine partie.

### 3.2.2.b Séparation des gouttes

La deuxième étape consiste à séparer les gouttes positives (contenant une cellule) des gouttes négatives (n'en contenant pas). Nous avons abordé les techniques de séparation de particules en microfluidique dans l'introduction de cette thèse, et montré qu'elles pouvaient aussi sous certaines conditions s'appliquer aux gouttes. Nous avons vu que les techniques basées sur la gravité fonctionnaient mal, ne permettant de séparer que des particules à grandes différences de masse, et, une cellule étant principalement composée d'eau, il y a peu d'espoir de pouvoir distinguer une goutte contenant une cellule d'une goutte n'en contenant pas par des arguments sur la

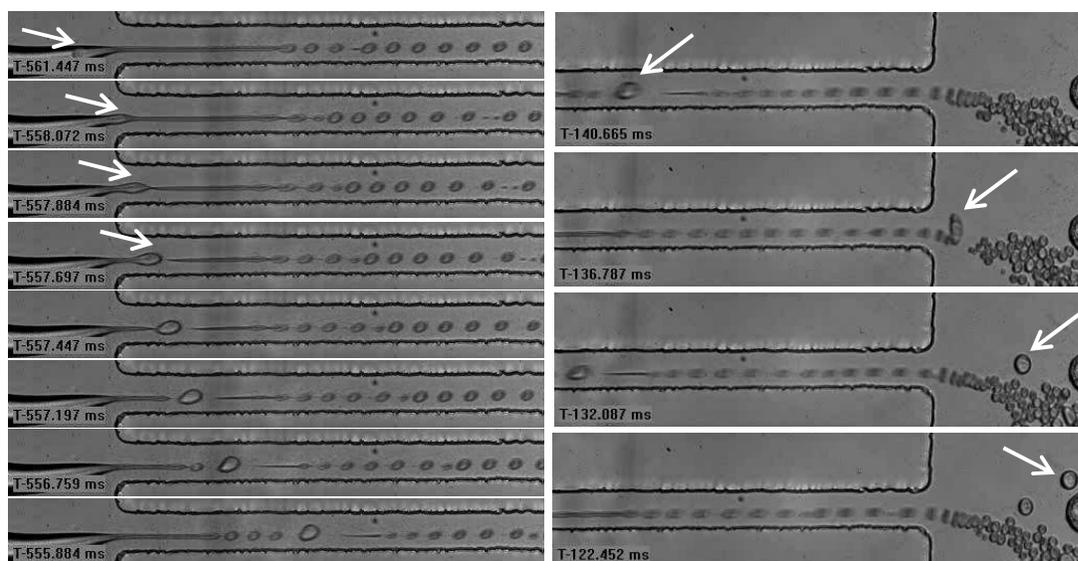


FIG. 3.4 – A gauche : mécanisme d'encapsulation d'une cellule unique dans une géométrie de flow-focusing. La cellule, plus grosse que les gouttes formées « naturellement », perturbe le jet et est encapsulée dans une grosse goutte. On peut voir que cette grosse goutte positive est plus centrée dans la région de focalisation que les petites gouttes négatives. A droite : résultat de la différence de taille entre les gouttes en sortie de la région de focalisation. La grosse goutte ressort centrée dans celle-ci tandis que les petites gouttes passent dans la sortie du « bas ». Elles interagissent avec la goutte positive et la poussent vers la sortie du « haut ».

masse. La séparation par diélectrophorèse aurait pu être envisageable, mais, comme nous le verrons au chapitre suivant, les gouttes étant beaucoup plus conductrices que l'huile les entourant, le champ électrique doit être considéré comme quasi-nul à l'intérieur de celles-ci, et la présence d'une cellule dans la goutte n'aurait que peu influencé son mouvement. Le seul argument de discrimination entre gouttes positives et négatives est donc la taille : il est en effet possible de régler les flux de façon à former des gouttes dont la taille « naturelle » est plus faible que celle des gouttes positives, et par conséquent d'avoir deux populations de gouttes de taille différente selon qu'elles contiennent une cellule ou pas.

La plupart des techniques utilisées pour la séparation de gouttes selon leur taille ont été développées dans le groupe d'A.P. Lee et utilisent des différences dans les résistances des canaux fluidiques de sortie. Ces différences de résistance influencent le champ de vitesse dans le canal, et selon leur taille, les gouttes « sentent » plus ou moins certaines lignes du champ de vitesse [Tan *et al.*, 2004].

**Migration transversale des gouttes** Nous avons pour notre part mis au point une technique originalement inspirée de la « pinch flow fractionation » (PFF) per-

mettant de séparer les gouttes selon leur taille. Les différents effets à l'œuvre dans notre méthode sont bien décrits dans un article d'Hudson [2003]. Notre méthode diffère de la PFF en elle-même puisqu'au lieu de former dans un premier temps les gouttes puis d'utiliser un flux secondaire pour les aligner le long d'une paroi, cette asymétrie est directement créée en imposant deux débits d'huile différents pour focaliser le jet de suspension cellulaire, ce qui provoque un décalage du jet et donc des gouttes en résultant vers une des deux parois de la région de focusing. De plus, la PFF utilise le confinement stérique des particules selon leur taille le long des parois. Nous travaillons ici avec des gouttes légèrement déformables, et non mouillantes sur les parois du capillaire, et c'est un effet différent mais bien connu qui est à l'œuvre : compte tenu de leur viscosité nettement inférieure à celle de l'huile, les gouttes ont tendance à migrer vers le centre de l'écoulement de Poiseuille. La vitesse de migration des gouttes vers le centre de l'écoulement varie globalement comme le rayon des gouttes à la puissance 3, et une faible différence de taille peut donc suffire à induire une différence de position notable de celles-ci (équation 3.4, partie suivante).

Remarquons que même pour des gouttes de tailles différentes, la vitesse de migration des gouttes liée à la gravité varie seulement avec le carré du rayon des gouttes. De plus, notre huile est visqueuse et présente une différence de densité faible avec la solution aqueuse. Enfin, dans le cas de systèmes microfluidiques, les effets de la gravité sont justement contrés par l'effet des parois, la séparation étant difficile à mettre en œuvre dans un système horizontal.

Avec notre technique, les gouttes négatives, petites, sont poussées par la dissymétrie de flux contre une des parois du rétrécissement et restent sur leur ligne de vitesse, ressortant donc d'un côté de l'élargissement. A l'inverse, les grosses gouttes positives se recentrent dans la région de focalisation du fait de leur migration dans le profil de Poiseuille, et ressortent donc centrées dans l'élargissement. Notons de plus que comme le passage de cellules induit une rupture prématurée du jet, les gouttes positives passent plus de temps dans la constriction que les gouttes négatives et ont donc plus de temps pour se positionner au centre de celle-ci.

En arrivant dans la région post-focusing, les gouttes vont donc se trouver en fonction de leur taille sur des lignes de champ de vitesse différentes, et l'élargissement va amplifier cette différence de position. On retrouve une méthode apparentée dans Tan & Lee [2005]. Ils utilisent aussi un positionnement différentiel des gouttes lors de la formation par flow-focusing, mais elle est appliquée à des gouttes de tailles très différentes, en fait à la séparation des gouttes primaires des gouttes secondaires formées lors de la formation d'émulsions par flow-focusing. Elle est de plus combinée à des différences de résistance fluide de chaque circuit et ne permet pas une séparation en une étape des gouttes.

**Interaction entre gouttes.** Afin de rendre l'explication plus claire, nous considérons désormais que le jet et les gouttes en résultant sont initialement décalés vers le bas de la région de focusing (voir figure 3.3). Le débit d'huile du canal du haut

est donc supérieur au débit d'huile du canal du bas. La migration différentielle des gouttes sous l'effet des parois ne peut expliquer à elle seule la séparation des gouttes dans les deux canaux symétriques de sortie, puisque les gouttes les plus grosses sont centrées dans le canal mais pas dans la moitié haute de celui-ci. Un autre phénomène est donc à l'oeuvre : l'interaction stérique entre gouttes dans une suspension concentrée. La génération par flow-focusing implique en effet la formation d'un nombre conséquent de gouttes, qui interagissent lors du ralentissement (écoulement de compression) dans l'élargissement post-focusing. En effet, les gouttes formées, séparées initialement par une distance de  $10 \mu\text{m}$  dans la région de focalisation, se retrouvent en contact et tendent presque à s'aligner sur une ligne haut/bas dans l'élargissement (plus de 20 fois plus large). Pour des gouttes de même taille, on assiste par intermittence à un arrangement dynamique des gouttes en « zig-zag ». Cette morphologie de l'écoulement ressemble fortement à celle que l'on observe pour le repliement d'un jet visqueux dans un microcanal divergent [Cubaud & Mason, 2006].

Lorsque des gouttes positives, plus grosses, sortent du rétrécissement au centre, les gouttes négatives passent en dessous d'elles et interagissent donc avec elles en les poussant vers la sortie haute (voir figure 3.4). Ce phénomène au sein d'une suspension concentrée est généralement nommé diffusion induite par cisaillement.

Le phénomène de sortie vers le haut des gouttes centrées dans l'élargissement pourrait être à tort interprété comme une différence de chute de pression entre les deux canaux de sortie, liée à la présence de nombreuses gouttes négatives au sein du canal inférieur qui augmenteraient sa résistance. Il n'en est rien. Considérons ainsi la formule de Brenner (équation 2.1) : comme les gouttes négatives ne sont pas confinées et que leur viscosité est inférieure à celle de la paraffine, leur présence résulterait en une baisse de la chute de pression liée à l'écoulement plutôt qu'à une augmentation de celle-ci. Compte tenu de la largeur importante des canaux de sortie, les gouttes n'en occupent qu'une fraction relativement faible et leur influence peut de toute façon être négligée.

### 3.3 Caractérisation expérimentale

Notre système a été caractérisé expérimentalement afin d'obtenir une description complète de son fonctionnement. Compte tenu de la fréquence élevée de génération des gouttes, ces études ont été effectuées en vidéo-microscopie rapide (caméra Phantom 4.2, Vision Research). Nous présentons dans cette partie le diagramme de phase du système avec ses différents comportements selon les débits d'huile et de solution aqueuse et définissons sa zone optimale de fonctionnement. Nous étudions ensuite l'efficacité pour l'encapsulation de cellules et le tri des gouttes positives parmi les gouttes négatives dans cette zone. Pour toutes les mesures, le débit d'huile dans le canal d'amené inférieur est la moitié de celui du canal d'amené supérieur, la symétrie en résistance fluidique du système ayant été vérifiée en inversant cette configuration. Pour une dissymétrie de flux d'huile plus faible, la différence de position entre les

gouttes formées n'était pas assez importante pour permettre une séparation efficace, tandis qu'une dissymétrie des flux d'huile plus grande (type 1 et 1/4) empêchait la formation d'un jet stable, celui-ci étant trop dissymétrique et déporté vers la région de faible flux d'huile. Les mesures définissant le diagramme de phase sont réalisées avec une suspension de cellules dans leur milieu comme dans le cas des séparations afin de caractériser le système dans les mêmes conditions de mouillage que lorsque la séparation des cellules est visée.

### 3.3.1 Diagramme de phase

#### 3.3.1.a Mesures expérimentales

Les différentes zones du diagramme de phase sont délimitées par les diamètres « naturels »  $\Phi_N$  des gouttes négatives (en l'absence de cellules). Plutôt que de mesurer directement le diamètre des gouttes formées sur images, celui-ci est déduit par corrélation du nombre de gouttes formées en un temps donné avec la quantité de solution aqueuse dispensée par le pousse-seringue en ce laps de temps. Cette mesure est effectuée dans chaque cas sur plusieurs centaines de gouttes en utilisant une macro sous ImageJ. La cohérence du résultat est vérifiée par un comptage manuel sur une centaine de gouttes et la mesure effective du diamètre de celles-ci sur des images extraites des films.

Le diagramme est présenté en figure 3.5. La discussion est basée sur le débit d'huile maximum  $Q_o$  (celui de l'arrivée d'huile inférieure étant donc  $Q_o/2$ ), et le débit de solution aqueuse  $Q_c$ . Comme dans le travail fondateur de Anna *et al.* [2003], nous nous plaçons dans le cas où le débit d'huile  $Q_o$  est toujours supérieur au débit de solution aqueuse  $Q_c$ . Dans ces conditions, pour des débits d'huile inférieurs à 50  $\mu\text{L}/\text{h}$ , la formation d'un jet stable est difficile, et le système a tendance à fonctionner en mode de « dripping », c'est à dire que des gouttes se détachent directement de la sortie de solution aqueuse sans former de jet (non représenté sur le diagramme). Les différentes zones du graphique sont décrites dans la légende de la figure 3.5. Nous attribuons l'instabilité de la région A au couplage des pressions élevées dans le circuit (dues au débit important d'huile visqueuse) avec l'élasticité de ce dernier : le débit de solution aqueuse est trop faible pour assurer un écoulement constant face aux perturbations de pression liées à la rupture du jet en gouttes et aux à-coups du pousse-seringue. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'utilisation de la zone E de jet continu est tentante puisque le jet en l'absence de cellules s'évacue de façon continue par la sortie basse, mais pas réalisable dans notre configuration. A la formation de gouttes secondaires mal maîtrisées lors du passage d'une cellule, s'ajoute l'utilisation de flux relativement élevés qui auront tendance à endommager les cellules. La zone D ne permet pas la distinction en taille entre une goutte contenant une cellule et une goutte n'en contenant pas. De plus, le diamètre des gouttes formées dans cette zone est trop important pour garantir l'encapsulation d'une seule cellule par goutte. Les zones B et C permettent d'obtenir l'encapsulation d'une cellule unique

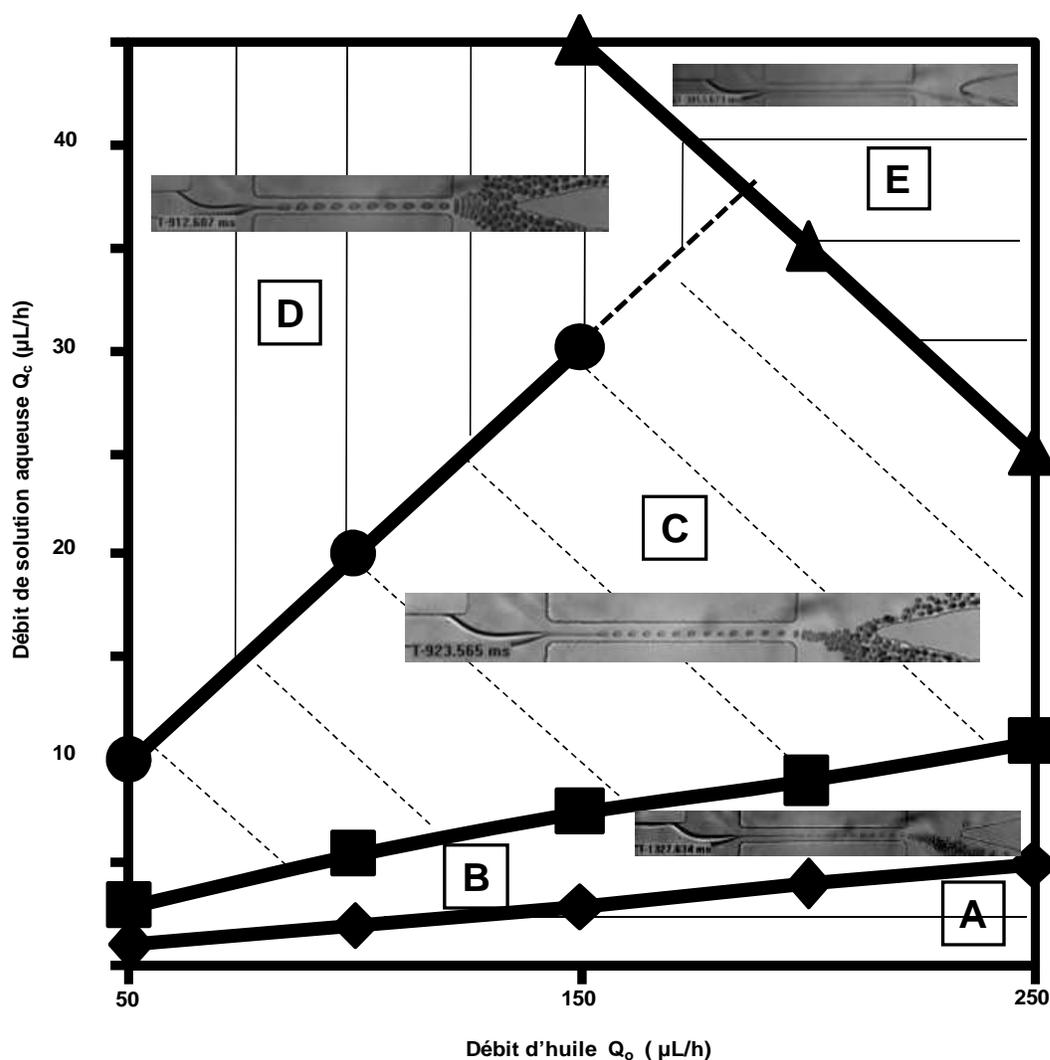


FIG. 3.5 – Diagramme de phase en fonction des débits d'huile  $Q_o$  et de solution aqueuse  $Q_c$ . La ligne matérialisée par des triangles pleins ( $\blacktriangle$ ) délimite le domaine E dans lequel un jet stable à travers toute la région de focusing et dans la sortie se forme. Les autres régions du diagramme correspondent à un jet se cassant dans la région de focalisation. Chaque ligne est une « equidiamètre », correspondant à un diamètre constant des gouttes formées :  $\blacklozenge \Phi_N = 7\mu\text{m} \pm 10\%$ ;  $\blacksquare \Phi_N = 10\mu\text{m} \pm 10\%$ ;  $\bullet \Phi_N = 17\mu\text{m} \pm 10\%$ . Ces equidiamètres délimitent 4 domaines. Dans le domaine A, les gouttes sont générées de façon instable, la rupture du jet n'étant pas régulière au cours du temps. Cette rupture est stable dans les autres domaines et chaque zone correspond à des tailles de gouttes différentes. Dans le domaine B, les gouttes négatives sortent toutes par la sortie inférieure. Dans le domaine C, les gouttes négatives empruntent les deux sorties, mais ont une taille naturelle inférieure à celle des cellules. Dans le domaine D, les gouttes formées ont un diamètre naturel supérieur à celui des cellules. Nous travaillons dans le domaine B pour réaliser l'encapsulation et le tri des cellules.

par goutte et de distinguer celle-ci des gouttes vides, mais seule la zone B est utilisable pour l'encapsulation ET le tri des cellules. On observe en effet dans la zone C une répartition des gouttes négatives entre les deux sorties qui rend le tri impossible. La zone utilisable pour le tri des cellules est donc relativement restreinte, et est comprise entre les lignes définies par  $\blacklozenge$  et  $\blacksquare$ . Nous le verrons dans la partie suivante, l'efficacité de l'encapsulation des cellules dans cette zone varie selon le point de fonctionnement choisi.

On observe une variation de comportement extrêmement rapide en fonction des débits imposés. Plus précisément, si la taille des gouttes varie relativement lentement en fonction de ceux-ci, comme cela avait déjà été mentionné pour un contrôle en flux dans une géométrie de flow-focusing [Ward *et al.*, 2005], le rayon des gouttes a une grande influence sur le positionnement des gouttes dans la région de focalisation et donc sur leur trajectoire dans l'élargissement subséquent. Sans prétendre à un calcul exact, nous pouvons estimer la vitesse de migration d'une goutte vers le centre du canal sous l'effet des parois, ce qui permet de comprendre la grande différence de positionnement entre deux gouttes de diamètres pourtant voisins.

### 3.3.1.b Estimation qualitative

**Position du jet.** Nous considérons que les parois verticales haute et basse du canal sont infinies, et nous intéressons au mouvement des gouttes dans le plan horizontal. Dans le système de coordonnées définies en figure 3.6, la loi de Poiseuille nous donne pour un écoulement stationnaire :

$$V(y) = 4V_M \frac{y}{W_F} \left(1 - \frac{y}{W_F}\right) \quad (3.1)$$

avec  $V_M = \frac{3}{2} \frac{Q_h}{W_F}$ , où  $Q_h$  est le débit par unité de hauteur du canal.

Estimons tout d'abord la position du jet. Pour ce faire, nous appliquons la conservation de la masse d'huile dans le rétrécissement en négligeant la présence de solution aqueuse et cherchons à localiser la position de l'interface des deux flux d'huile dissymétriques. Le débit total est  $3Q_o/2$ . Considérant que l'écoulement est laminaire et quasi-parallèle dans la région de réunion des deux flux d'huile, et que le flux du bas est moitié de celui du haut, l'interface entre ceux-ci est située à la coordonnée  $y$  du profil de Poiseuille telle que un tiers du débit total, soit  $Q_o/2$ , passe en dessous. Le débit par unité de hauteur dans le rétrécissement entre 0 et une coordonnée  $y$  s'écrit :

$$Q(y) = \int_0^y V(y) \cdot dy$$

Le débit total par unité de hauteur  $3Q_o/2h$  entre 0 et  $W_F$  vaut :

$$\int_0^{W_F} V(y) \cdot dy = \frac{2}{3} V_M \cdot W_F$$

On cherche  $W_J$  telle que :

$$Q(W_J) = \int_0^{W_J} V(y).dy = \frac{Q_o}{2h}$$

Ce qui donne l'équation d'ordre 3 suivante :

$$-\frac{2}{3W_F^2}W_J^3 + W_J^2 - \frac{W_F}{9} = 0 \quad (3.2)$$

Pour  $W_F = 40\mu\text{m}$ , la seule solution physiquement cohérente de l'équation 3.2 est :

$$W_J = 15,5\mu\text{m}$$

L'interface des deux flux d'huile se trouve dans ce modèle à  $15,5\mu\text{m}$  de la paroi du bas du rétrécissement. Dans le système d'axes défini en figure 3.6, la coordonnée du jet est donc environ  $3W_F/8$ . Ce calcul est évidemment imprécis puisque le canal est finalement plus large que haut, et nous considérons pourtant un profil de Poiseuille dans sa largeur couplé à un profil plan dans la hauteur. En considérant à l'inverse un profil de Poiseuille dans la hauteur, et un profil plan dans la largeur, la conservation des débits implique de façon évidente la coordonnée du jet  $W_F/3$ . Nous nous situons expérimentalement beaucoup plus proches du résultat obtenu en considérant un flux de Poiseuille à deux dimensions dans la largeur du circuit, c'est à dire une position du jet à environ  $3W_F/8$ .

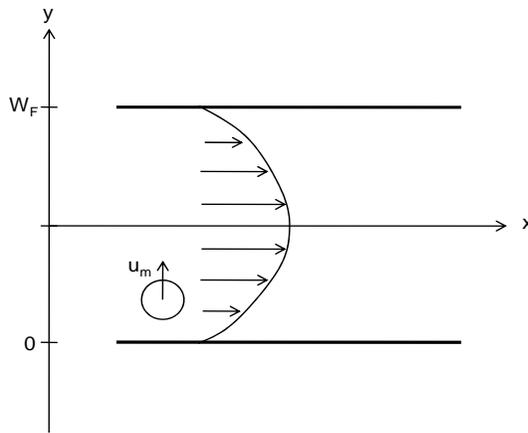


FIG. 3.6 – Système d'axes utilisé pour le calcul de la vitesse de migration des gouttes sous l'effet des parois. Les parois sont supposées infinies dans le plan perpendiculaire au plan de la feuille.

**Distance de migration des gouttes.** Intéressons nous désormais à la migration des gouttes perpendiculairement au flux les entraînant. Nous utilisons un modèle développé dans les années 1970 par le groupe de L.G. Leal présentant l'avantage d'être solvable analytiquement. Notons cependant que les calculs qui suivent sont principalement donnés à titre indicatif afin de faire sentir l'influence forte du rayon des gouttes sur leur vitesse de migration, mais restent qualitatifs. Nous ne nous

trouvons en effet pas dans l'approximation permettant de résoudre analytiquement le problème et qui consiste à considérer des gouttes de rayon beaucoup plus faible que les dimensions du canal dans lequel elles circulent. D'autre part, le terme dominant la migration des gouttes dans le modèle que nous utilisons est lié au gradient de cisaillement et non à la présence des parois. Dans le cas réel de notre expérience, on peut s'attendre à ce que la relative proximité des gouttes avec les parois ait aussi un effet.

Nous restons pour l'instant dans l'approximation d'un profil de Poiseuille à deux dimensions. La vitesse instantanée de migration des gouttes vers le centre du canal est donnée par [Chan & Leal, 1979] :

$\forall y \in ]0; W_F[$ ,

$$u_m = 16\alpha \frac{\eta_o}{\gamma} V_M^2 \frac{a^3}{W_F^3} \left[ 1 - 2 \frac{y}{W_F} \right] \quad (3.3)$$

où  $\alpha$  est un coefficient sans dimension valant 0,66 compte tenu du rapport de viscosité des liquides que nous utilisons, et  $a$  est le rayon de la goutte.  $\alpha$  peut être négatif selon le rapport des viscosités des liquides utilisés, par exemple si la phase dispersée est plus visqueuse que l'huile. La migration des gouttes se fait alors vers les parois, ce dont il convient donc de tenir compte dans la conception d'un système utilisant le principe de migration de gouttes.

Dans le cadre de notre application, nous voulons savoir quelle distance la goutte peut parcourir perpendiculairement au flux sur une distance donnée et nous intéressons donc à sa trajectoire dans le plan  $(xy)$ . On peut écrire selon l'axe  $x$  pour la vitesse de la goutte :

$$U = \frac{dx}{dt}$$

où  $U$  est la vitesse de la goutte en  $x$  obtenue à partir du flux de Poiseuille [Chan & Leal, 1979] :

$$U = 4V_M \frac{y}{W_F} \left( 1 - \frac{y}{W_F} \right) - \kappa V_M \frac{a^2}{W_F^2} \quad (3.4)$$

avec  $\kappa$  une constante dépendant du rapport des viscosités des phases dispersée et continue :  $\kappa = \frac{\sigma}{2+3\sigma}$ . La vitesse de migration selon  $y$  s'écrit :

$$u_m = \frac{dy}{dt}$$

La trajectoire de la goutte s'obtient par l'intégration de :

$$dx = \frac{U}{u_m} dy$$

Soit en utilisant les équations 3.3 et 3.4 et en réorganisant les variables, pour une goutte initialement située en  $(x_o, y_o)$  :

$$16\alpha \frac{\eta_o}{\gamma} V_M \frac{a^3}{W_F^3} [x - x_o] = \int_{y_o}^y \left[ \frac{4 \frac{y}{W_F} \left( 1 - \frac{y}{W_F} \right) - \kappa \frac{a^2}{W_F^2}}{1 - 2 \frac{y}{W_F}} \right] dy \quad (3.5)$$

Après changement de variable  $X = x/W_F$ , on obtient facilement :

$$16\alpha \frac{\eta_o}{\gamma} V_M \frac{a^3}{W_F^4} [x - x_o] = \frac{y^2 - y_o^2}{W_F^2} - \frac{y - y_o}{W_F} - \frac{1}{2} \left(1 - \kappa \frac{a^2}{W_F^2}\right) \ln \left( \frac{1 - 2 \frac{y}{W_F}}{1 - 2 \frac{y_o}{W_F}} \right) \quad (3.6)$$

Les résultats numériques du déplacement en  $y$  obtenus par résolution de l'équation 3.6 pour une distance  $(x - x_o) = 500 \mu m$ , une position initiale  $y_o = 15,5 \mu m$  et des rayons de gouttes variés sont présentés dans la deuxième colonne du tableau 3.1.

Toujours en nous appuyant sur Chan & Leal [1979], nous pouvons à titre de comparaison évaluer les migrations des gouttes dans un écoulement de Poiseuille en 3 dimensions, en assimilant la région de focusing à une conduite circulaire de rayon  $20 \mu m$ . En suivant le même raisonnement que ci-dessus, on arrive au résultat démontré par Chan & Leal [1979] pour la migration de gouttes dans un canal circulaire de rayon  $R$  :

$$2\alpha_o \frac{\eta_o}{\gamma} V_M \frac{a^3}{R^4} [x - x_o] = \frac{y^2 - y_o^2}{2R^2} - \left(1 - \kappa \frac{a^2}{R^2}\right) \ln \left( \frac{y}{y_o} \right) \quad (3.7)$$

avec  $\alpha_o$  un coefficient dépendant encore une fois du rapport des viscosités des liquides utilisés et valant 1,10 dans notre cas.

Comme on le voit dans le tableau 3.1, les résultats obtenus sont qualitativement similaires à ceux que l'on obtient avec un calcul en deux dimensions. Les deux calculs se confrontent correctement à l'expérience, puisque l'on mesure une distance de migration de  $1 \mu m \pm 1 \mu m$  pour les gouttes négatives et  $3,5 \mu m \pm 1 \mu m$  pour les gouttes positives. Les trajectoires des gouttes correspondantes sont représentées en figure 3.7. Comme on peut le voir, et bien que ces calculs ne correspondent pas à la réalité de notre circuit, une faible différence de rayon entre les gouttes induit une variation importante de leur vitesse de migration et donc de leur position dans la région de focusing, ce qui explique les zones assez resserrées de notre diagramme (figure 3.5) en termes de variations de débits nécessaires à une modification de comportement. On retrouve aussi que des gouttes de rayon inférieur à  $5 \mu m$  (rayon limite pour les gouttes négatives dans la région B du diagramme) ne peuvent pas migrer complètement vers le centre du canal sur la longueur de la région de focusing, tandis que des gouttes de rayon supérieur à  $7,5 \mu m$  (typique des gouttes positives) se retrouvent presque centrées.

**Effet de la gravité.** A titre indicatif, la vitesse de migration de gouttes sous l'effet de la gravité est donnée, compte tenu des différences de viscosité importantes entre nos gouttes et la phase continue, par :

$$u_g = \frac{1}{3} \frac{\rho_g - \rho_o}{\eta_o} g \cdot a^2$$

où  $g$  est la gravité.

Appliquée à notre cas, cette formule nous donne des vitesses de migration comprises

Rayon de la goutte ( $\mu\text{m}$ )	Distance de migration dans le rétrécissement ( $\mu\text{m}$ ), modèle 2D	Distance de migration dans le rétrécissement ( $\mu\text{m}$ ), modèle 3D
3,5	0,6	1,3
5	1,6	2,7
7,5	3,5	4,3
10	4,4	4,5

TAB. 3.1 – Positions finales de gouttes de divers rayons en sortie de la région de focusing, selon un modèle de profil de Poiseuille 2D ou 3D. Calculs effectués pour un débit d’huile de  $100 \mu\text{L}/\text{h}$ .

entre  $0,034 \mu\text{m}/\text{s}$  et  $0,3 \mu\text{m}/\text{s}$  pour des rayons de gouttes compris entre  $3,5 \mu\text{m}$  et  $10 \mu\text{m}$  respectivement, soit des vitesses de séparation nettement inférieures à celles obtenues par migration des gouttes sous l’effet des parois.

**Contraintes subies par les cellules.** Nous pouvons aussi essayer d’estimer le cisaillement subi par une cellule située en  $y = 3W_F/8$  dans un écoulement de Poiseuille 2D et en négligeant l’aspect diphasique de l’écoulement, et en considérant la

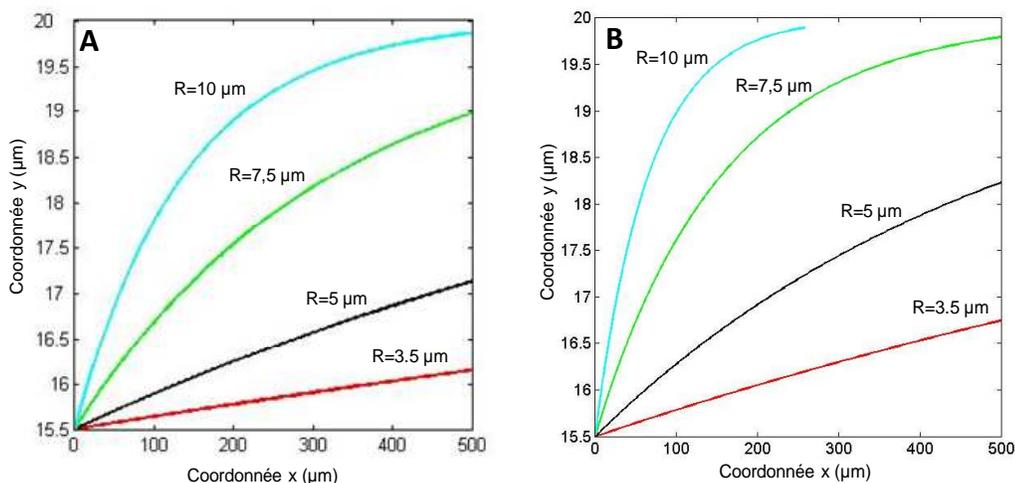


FIG. 3.7 – Trajectoires des gouttes en fonction de leur position en  $x$  pour divers rayons (débit d’huile de  $100 \mu\text{L}/\text{h}$ ). A : obtenues dans le cas d’un profil de Poiseuille 2D, les gouttes étant initialement situées en  $y = 15,5 \mu\text{m}$ . B : dans le cas d’un profil de Poiseuille 3D cylindrique. Afin de permettre une comparaison facile, les trajectoires sont tracées dans le même repère qu’en A. Il s’agit donc de la trajectoire des gouttes dans un plan passant par l’axe de symétrie du cylindre considéré.

cellule comme un point situé dans l'huile : on obtient des valeurs de l'ordre de  $100 N/m^2$ , ce qui représente des valeurs importantes en termes de cisaillement pour une cellule. Cette valeur est cependant très certainement surestimée, car la cellule au sein d'une goutte est protégée du cisaillement par une interface [solution aqueuse/huile] couverte de surfactants, et correspondant donc à un cisaillement faible. D'autre part, nous travaillons ici avec des cellules sanguines qui subissent aussi de forts cisaillements lors de leur circulation in vivo dans les capillaires sanguins. Si l'on se rapporte à la littérature (voir par exemple Chittur *et al.* [1988]), on trouve que des contraintes telles que celles que nous décrivons induisent statistiquement la lyse d'un nombre conséquent de cellules lorsqu'elles sont appliquées pendant une durée de plusieurs minutes. Dans notre cas, cependant, les cellules passent la région de focusing en une vingtaine de millisecondes. On peut supposer que ce passage s'apparente aux contraintes stochastiques parfois élevées subies par les cellules in vivo. Il est cependant évident que le mécanisme d'encapsulation des cellules induit à coup sûr une réponse physiologique de celles-ci, telle une diminution de la réponse proliférative ou une activation des canaux ioniques.

Plutôt que le cisaillement, les principaux effets mécaniques subis par la cellule sont peut-être les extensions et compressions liées à la forte accélération lors de l'entrée dans le rétrécissement et au fort ralentissement dans l'élargissement post-focusing. Il a été démontré que des contraintes de compression, mêmes importantes, avaient peu d'effet sur les lymphocytes ; ce phénomène ne devrait donc pas influencer le comportement des cellules après encapsulation.

Au stade actuel de développement de notre système, nous ne sommes cependant pas en mesure de quantifier exactement le devenir des cellules après encapsulation. Nous reviendrons plus loin aux premiers tests préliminaires effectués sur celles-ci.

### 3.3.2 Statistiques d'encapsulation et de tri des cellules

#### 3.3.2.a Résultats obtenus

Les mesures sont à nouveau effectuées sur des séquences capturées grâce à une caméra rapide montée sur un microscope. Le nombre total de cellules passant dans le système, le nombre de gouttes positives triées correctement ainsi que le nombre de gouttes contenant plus d'une cellule sont comptés manuellement sur des séquences d'une durée réelle de 7,4 s, correspondant généralement à une centaine de cellules. Les résultats présentés correspondent à une moyenne effectuée sur plusieurs séquences vidéo prises avec des circuits différents (mais évidemment avec une géométrie identique). Le nombre total de cellules compté pour réaliser chaque pourcentage est donné en même temps que ceux-ci. Toute la zone disponible pour le tri de cellules du diagramme de phase présenté dans la partie précédente a été explorée. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 3.2.

Dans des conditions optimales,  $Q_o = 150 \mu\text{L}/\text{h}$  et  $Q_c = 7 \mu\text{L}/\text{h}$ , près de 80% des gouttes contenant une cellule unique sont triées correctement et collectées avec une

pureté supérieure à 99 %, tandis que le nombre de cellules multiples encapsulées dans une même goutte représente seulement 1,5% du nombre total de cellules injectées. Ramené en termes plus simples, on peut calculer que plus de 76% des cellules injectées dans le système ressortent de celui-ci encapsulées seules dans une microgoutte qui est correctement séparée des gouttes vides.

Débit d'huile ( $\mu\text{L/h}$ )	Débit de solution aqueuse ( $\mu\text{L/h}$ )	Cellules multiples dans une goutte (% du nombre total de cellules)	Gouttes positives triées (%)	Nombre de cellules comptées	Gouttes vides parmi les gouttes positives (%)
50	3	2,4%	50,0%	172	<1%
<b>50</b>	<b>3,5</b>	<b>2,2%</b>	<b>69,4%</b>	<b>187</b>	<b>&lt;1%</b>
50	4	7,4%	70,2%	766	64,90%
100	2	8,8%	36,0%	341	<1%
100	3	2,0%	45,7%	310	<1%
100	4	3,1%	59,7%	256	<1%
100	5	4,6%	61,2%	389	<1%
<b>100</b>	<b>6</b>	<b>4,2%</b>	<b>74,0%</b>	<b>802</b>	<b>3,9%</b>
150	3	7,5%	36,7%	106	<1%
150	4	3,6%	49,1%	289	<1%
150	5	2,2%	59,2%	377	<1%
150	6	5,8%	70,5%	530	<1%
<b>150</b>	<b>7</b>	<b>1,4%</b>	<b>79,2%</b>	<b>936</b>	<b>&lt;1%</b>
150	8	7,5%	77,4%	1311	5,7%
200	6	4,2%	16%	379	<1%
200	7	5,4%	29,4%	286	<1%
200	8	4,9%	38,8%	444	<1%
200	9	7,4%	51,5%	607	<1%

TAB. 3.2 – Résultats obtenus pour l'encapsulation de cellules uniques dans des microgouttes et le tri conséquent de ces gouttes. Chaque résultat statistique est obtenu pour un nombre de cellules supérieur à 100. Les lignes en gras correspondent aux débits optimaux pour l'encapsulation et le tri dans le système.

### 3.3.2.b Interprétation des résultats

**Encapsulation de cellules multiples.** Plusieurs conclusions s'imposent à la lecture du tableau 3.2. Notons tout d'abord que le pourcentage de cellules se trouvant encapsulées à plusieurs dans une même goutte est relativement aléatoire et indépendant des débits utilisés, mais toujours inférieur à 10 %. Ce phénomène statistique est

lié aux propriétés intrinsèques des cellules plutôt qu'à notre méthode d'encapsulation. Les cellules, en suspension concentrée à  $10^7$  cellules/mL, ont tendance à arriver par paquets dans le jet plutôt qu'en un flux de concentration régulière. Comme nous l'avons vu, cela ne pose pas de problèmes particuliers puisque la géométrie de focalisation permet d'aligner les cellules dans le jet et de les encapsuler une par une. Cependant, certaines cellules ont aussi tendance à s'agréger, et le cisaillement induit dans le jet ne suffit pas à les séparer : c'est ce qui provoque l'encapsulation de cellules multiples au sein d'une même goutte. C'est donc un problème d'ordre biologique qu'il convient ici de régler, ce qui est confirmé par l'absence totale de dépendance des pourcentages d'encapsulation multiple vis à vis des débits imposés et l'aspect non reproductible de ce résultat entre deux expériences effectuées avec les mêmes débits. Pour notre part, malgré l'ajout d'EDTA dans la suspension cellulaire, nous n'avons pu empêcher cette agrégation statistique des cellules, qui reste cependant marginale.

**Influence du débit d'huile.** Autre phénomène général et indépendant du débit de phase aqueuse : l'efficacité du tri des gouttes positives diminue fortement pour des débits d'huile supérieurs ou égaux à  $200 \mu\text{L/h}$ , quel que soit le débit de suspension cellulaire appliqué. Ce phénomène est attribué à la déformation trop importante à laquelle sont soumises les gouttes lorsqu'elles arrivent dans l'élargissement post-focusing à de tels débits d'huile. Rappelons que nous travaillons en effet à un nombre capillaire relativement élevé où la déformation des gouttes doit être prise en compte. Les grosses gouttes positives, centrées dans l'élargissement, sont plus sensibles que les gouttes négatives à ce phénomène et se déforment de façon importante. Cette déformation empêche l'interaction des petites gouttes avec les grosses, et leur tri devient difficile. De plus, les grosses gouttes peuvent, sous l'effet de la déformation, emprunter directement la mauvaise voie de sortie si elles n'arrivent pas parfaitement centrées dans l'élargissement post-focusing. D'une façon plus générale, de tels débits d'huile facilitent la formation d'un jet stable à travers toute la zone de focalisation qui, nous l'avons vu, n'est pas favorable à un fonctionnement « propre » du système. Pour finir, compte tenu de la viscosité de l'huile de paraffine et des dimensions de notre système, ces débits relativement hauts donnent lieu à des pressions importantes conduisant à un comportement fluide peu stable, et risquant d'endommager les cellules.

**Influence du rapport des débits.** Dans la zone de débit d'huile réellement exploitable, l'efficacité du tri des gouttes positives augmente avec le débit de suspension cellulaire. Ceci s'explique par le positionnement (donc la taille) et le nombre des gouttes négatives en sortie de focalisation pour un couple de débits donné. Plus le diamètre d'une goutte négative est important, tout en restant inférieur à la limite permettant son tri (ligne ■ en figure 3.5), plus celle-ci va sortir vers le centre de la région post-focusing et interagir avec les gouttes positives contenant les cellules.

Pour un débit d'huile donné, la taille des gouttes négatives formées est proportionnelle (faiblement), de même que leur nombre, au débit de solution aqueuse. Lorsque leur rayon est trop faible, ces gouttes sortent très bas dans le système, et n'interagissent pas ou peu avec les gouttes positives. D'autre part, étant en nombre plus faible, ces gouttes s'« étalent » moins dans l'élargissement post-focusing, ce qui participe aussi à réduire leur interaction avec les gouttes positives. A l'inverse, lorsque leur rayon et leur nombre sont à la limite leur permettant d'être triées dans la sortie inférieure, les gouttes négatives interagissent fortement avec les gouttes positives et les poussent vers la sortie haute (voir figure 3.8). Notons aussi qu'à des débits relatifs de suspension cellulaire trop faibles, le diamètre naturel des gouttes formées étant nettement inférieur à celui des cellules, l'encapsulation elle-même des cellules peut s'avérer difficile, celles-ci étant piégées dans les recirculations créées dans la solution aqueuse avant le jet et ne réussissant pas à pénétrer ce dernier.

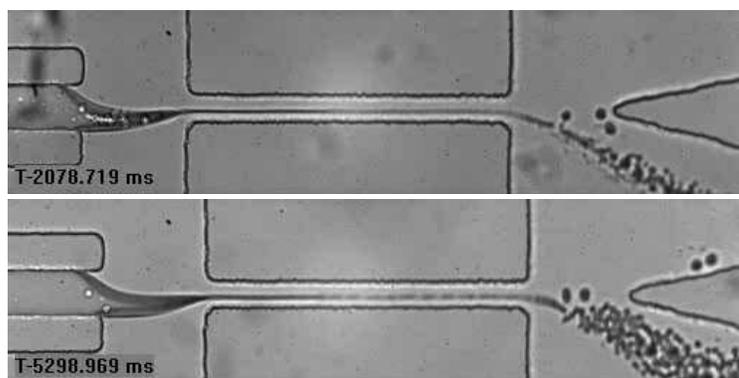


FIG. 3.8 – Variation du tri des gouttes positives en fonction du débit de solution aqueuse pour un débit d'huile donné. En haut :  $Q_o = 200\mu L/h$ ,  $Q_c = 5\mu L/h$ . Débit de solution aqueuse trop faible. Les gouttes négatives, trop petites et trop peu nombreuses, passent bien en dessous des gouttes positives, et ces dernières ne partent pas du bon côté. En bas :  $Q_o = 150\mu L/h$ ,  $Q_c = 7\mu L/h$ . Débit de solution aqueuse à la limite de ce qui permet la séparation des gouttes négatives. Ces dernières interagissent fortement avec les gouttes positives et les poussent vers la bonne sortie.

**Tri dans la zone de fonctionnement optimal.** La zone optimale pour l'encapsulation de cellules et le tri des gouttes positives se situe donc finalement sur la ligne matérialisée par ■. Comme le fait apparaître le tableau, dépasser cette ligne en augmentant le débit de solution aqueuse pour un débit d'huile donné amène très vite à envoyer un nombre conséquent de gouttes négatives dans la sortie des gouttes positives, le système perdant alors tout son intérêt. Cette transition est d'autant plus brusque que le débit d'huile est faible. Elle est liée d'une part à la très forte dépendance en rayon de la position des gouttes dans le rétrécissement, et d'autre part

à l'augmentation de la concentration de la suspension dans l'élargissement post-focusing résultant en des interactions stériques accrues. Dépasser cette transition permet toutefois de déterminer pour un flux d'huile donné le débit optimal de suspension cellulaire à utiliser, celui-ci étant d'autant plus délicat à évaluer que le débit d'huile est faible.

La légère augmentation de l'efficacité du tri lorsque le débit d'huile augmente peut être interprétée à partir de l'équation 3.4 : la vitesse de migration des gouttes positives vers le centre du rétrécissement augmente linéairement avec le débit d'huile.

Enfin, dans les cas où les gouttes négatives sont toutes triées et envoyées vers la sortie du bas, on peut parfois retrouver des gouttes vides parmi les gouttes positives, d'où la mention « <1% » plutôt que 0%. Ces gouttes vides sont principalement liées à la rupture de gouttes de taille importante contenant de multiples cellules lors de leur arrivée dans l'élargissement.

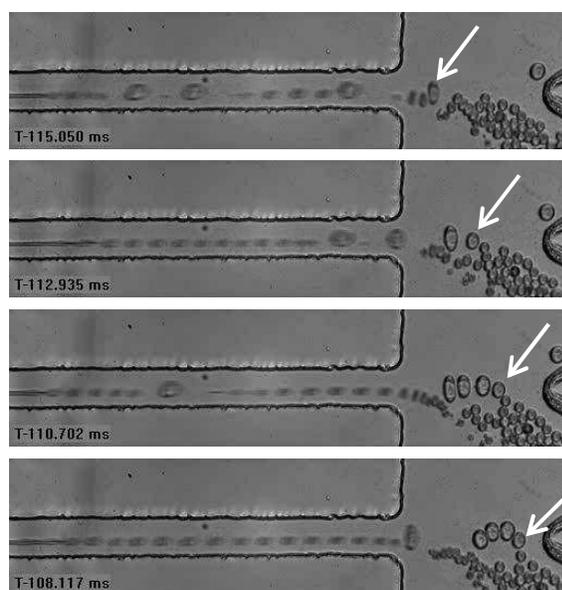


FIG. 3.9 – Erreur d'orientation d'une petite goutte positive lors de l'encapsulation de multiples cellules successivement dans la région de focusing. La goutte positive désignée par la flèche est « poussée » vers le bas par des gouttes positives plus grosses.

Notons enfin que notre système de tri comporte encore une part statistique et que le meilleur taux d'encapsulation et de récupération des gouttes positives que nous puissions obtenir est actuellement de 80 %. Ce chiffre peut être expliqué par l'arrivée simultanée de plusieurs cellules dans la région de focalisation et par les variations en taille inhérentes à une population de cellules. Les cellules les plus petites sont encapsulées dans des gouttes de plus faible diamètre que les cellules de taille plus importante. Lorsque de multiples cellules non agrégées arrivent simultanément dans le jet, elles sont encapsulées individuellement dans des gouttes successives séparées par peu ou pas de gouttes négatives, d'où deux effets concourant à nuire à l'efficacité de séparation. D'une part, l'interaction des gouttes négatives avec les gouttes positives est réduite puisque les premières sont en nombre réduit. D'autre part, les gouttes positives de petit diamètre vont sortir de la région de focalisation

en dessous des gouttes positives plus grosses et du fait de leur interaction avec elles se placer dans la sortie du bas (voir figure 3.9), toujours à cause du quasi-alignement des gouttes selon l'axe  $y$  dans l'élargissement post-focusing. L'efficacité de notre méthode devrait donc se trouver améliorée dans le cas d'utilisation d'une suspension plus diluée de cellules, ou du moins si les cellules arrivaient de façon régulière dans la région de focusing et non par paquets. Remarquons enfin que quelles que soient les conditions utilisées, la variabilité de taille inhérente à une population de cellules implique des erreurs liées au positionnement de gouttes positives trop petites sur des lignes de champ de vitesse trop basses.

**Viabilité des cellules.** Revenons enfin sur la viabilité des cellules encapsulées dans des microgouttes par notre méthode. Nous n'avons pu avec notre système actuel mener une étude complète de la viabilité des cellules après encapsulation, comme par exemple vérifier que les cellules pouvaient encore se diviser après avoir été remises dans leur milieu. En effet, à cause des surfactants présents en quantité conséquente dans l'huile, il est difficile après récupération des gouttes positives de remettre les cellules qu'elles contiennent dans leur milieu monophasique, même après plusieurs centrifugations. Une solution consisterait à centrifuger l'émulsion obtenue sur un filtre permettant de séparer huile et solution aqueuse, mais on peut craindre que les effets de centrifugation à travers un filtre faussent l'analyse en abîmant aussi les cellules. D'autre part, la récupération des gouttes immédiatement après encapsulation dans notre système s'avère pour l'instant difficile, et si les cellules ne meurent pas du fait de l'encapsulation en elle-même, il est clair qu'elles ne peuvent supporter l'encapsulation dans une goutte de milieu d'une taille proche de la leur que pendant des temps courts de l'ordre de la minute. Il faudrait idéalement intégrer cette méthode dans une plateforme microfluidique plus importante permettant d'ajouter des solutions aqueuses aux gouttes positives ainsi que de conserver celles-ci pendant des temps conséquents afin d'étudier les réactions des cellules.

Les tests que nous avons effectués, relativement primaires, ont consisté à vérifier l'intégrité de la membrane lipidique de la cellule (si la membrane n'est pas intacte, la cellule est définitivement morte, mais ce n'est parce que sa membrane est intacte que la cellule n'est pas en apoptose). Une observation visuelle de la membrane cellulaire juste après encapsulation semble révéler une membrane intacte (voir figure 3.10). D'autre part, entre l'instant d'encapsulation et celui où la goutte quitte le circuit, il s'écoule quelques secondes. Après ces quelques secondes, une cellule encapsulée dans un milieu contenant du bleu de Trypan n'est pas colorée, ce qui atteste a priori que sa membrane est intacte. Notons cependant que le laps de temps entre l'encapsulation de la cellule et l'observation de sa coloration au bleu de Trypan est relativement court, ce qui bien que ce type de coloration soit généralement rapide peut laisser un doute sur l'aspect intact de la membrane.

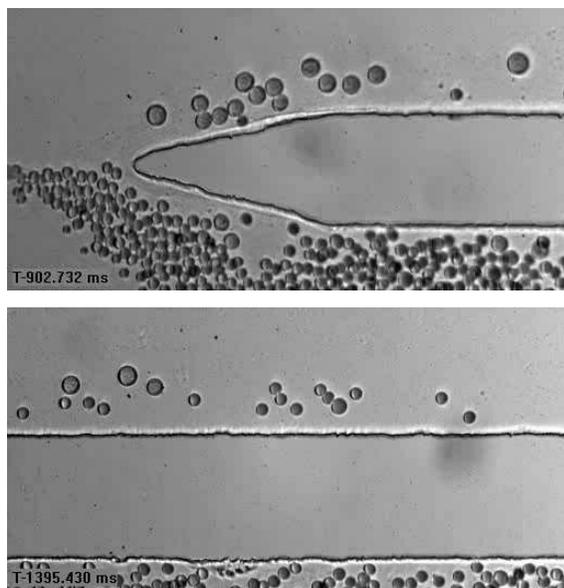


FIG. 3.10 – Cellules à la membrane intacte encapsulées dans des gouttes positives. En haut : immédiatement après l’encapsulation. En bas : quelques secondes après l’encapsulation (quelques gouttes négatives, plus petites, se sont glissées parmi les gouttes positives).

**Remarques.** Notre système permet d’encapsuler des cellules uniques dans des microgouttes dont le diamètre est de l’ordre de celui des cellules et de trier ces gouttes positives des gouttes négatives avec un taux de récupération de l’ordre de 80% et une pureté supérieure à 99%. Pour une suspension de cellules relativement concentrée à  $10^7$  cellules/mL, le rendement d’encapsulation maximal est de l’ordre de 20 cellules par seconde par des effets totalement passifs, sans utilisation d’éléments extérieurs.

Au vu de l’efficacité de notre système dans des situations où les cellules arrivent par « paquets » plutôt que de façon régulière, on peut penser que l’utilisation de suspensions plus concentrées (d’un facteur 10 au minimum) ne poserait aucun problème à condition de réussir à répartir les cellules plus harmonieusement dans le canal d’injection, permettant de gagner ainsi un facteur 10 en rendement sans perdre sur les autres paramètres. Par exemple, une analyse statistique effectuée sur les films correspondant aux débits  $Q_o = 150\mu\text{L}/h$ ,  $Q_c = 7\mu\text{L}/h$ , uniquement dans les situations où les cellules arrivent par paquets (165 cellules/s en moyenne sur 1350 ms de temps total) donnent un taux de récupération de 72% tout à fait honorable lorsqu’on le compare aux 80% obtenus avec 20 cellules/s en moyenne.

### 3.4 Conclusion

Nous avons présenté ici une méthode d’encapsulation de cellules uniques et de séparation binaire goutte positive/goutte négative permettant de discriminer en taille une goutte contenant une cellule d’une goutte n’en contenant pas. Une des premières améliorations à apporter à ce système est très certainement la suppression de cette séparation dès la sortie de la région de focusing. Le flux étant laminaire dans l’élar-

gissement post-focusing et cet élargissement grand par rapport au rayon des gouttes, les gouttes y circulant devraient rester sur les lignes de champ de vitesse sur lesquelles elles sont situées en sortie de focalisation. Le temps nécessaire à leur diffusion vers le centre du canal sous l'effet des parois ou de phénomènes d'auto-diffusion est bien supérieur à celui qu'elles mettent à sortir du canal. On peut dès lors imaginer un système qui au-delà de séparer les gouttes vides des gouttes contenant un objet, permettrait après encapsulation de séparer les gouttes positives sur la taille de l'objet qu'elles contiennent. Une autre amélioration importante doit être portée sur l'huile utilisée. L'utilisation d'huiles fluorées, couramment utilisées pour transporter de l'oxygène, à la place de l'huile minérale actuelle devrait permettre une meilleure oxygénation de la cellule et donc un temps de survie plus important. D'autre part, des tensio-actifs permettant une stabilité à plus long terme des microgouttes doivent être étudiés.

Le lecteur l'aura sans doute ressenti, la méthode présentée dans cette partie n'est que le premier pas vers un système plus intégré qui au-delà de l'encapsulation de cellules, permettra d'ajouter aux gouttes les contenant divers réactifs grâce à la technique présentée dans le chapitre suivant. Une fois ces réactifs ajoutés, une analyse moléculaire du contenu de la cellule peut éventuellement être menée, par exemple sur le principe de la PCR en microgouttes décrite au chapitre 2. On peut aussi imaginer, si la viabilité de la cellule est confirmée, utiliser la goutte comme un micro-compartiment permettant d'étudier ses réactions temporelles à divers produits, comme décrit dans l'introduction de ce chapitre. Concluons en mentionnant que le système tel qu'il est aujourd'hui est déjà utilisé avec succès pour encapsuler de faible nombre de bactéries dans des gouttes et étudier leur croissance dans ces conditions de confinement (V. Semetey, Institut Curie).



# Chapitre 4

## Électrocoalescence de microgouttes

*Quand certains entendent un écho,  
ils s'imaginent avoir produit le son.*

Ernest Hemingway

Ce chapitre présente une réponse possible à un problème fondamental de la microfluidique de gouttes : comment, au sein d'un canal, faire se rencontrer deux gouttes et les fusionner afin de pouvoir en mélanger le contenu ? Après une introduction aux méthodes envisagées pour atteindre ce but, nous présenterons les principes physiques sur lesquels repose notre méthode basée sur des champs électriques, avant d'en venir à nos principaux résultats. Il me semble important de préciser que la technique présentée ci-dessous avait originellement été mise au point pour être intégrée dans le système présenté en chapitre 2. Comme le lecteur l'aura constaté, nous avons pu dans ce dernier utiliser une méthode encore plus simple et ne nous en sommes donc pas privés. Le travail présenté ici n'est cependant pas perdu puisqu'il devrait se révéler utile dans le cadre de la méthode présentée au chapitre 3.

### 4.1 Coalescence de gouttes : introduction

#### 4.1.1 État de l'art « microfluidique »

Pour deux gouttes de taille égale séparées par un épais film d'huile dans un microcanal, la coalescence n'a aucune raison d'avoir lieu naturellement puisque les deux gouttes se déplacent à vitesse égale dans le canal. Pour une petite goutte en suivant une plus grosse dans un flux de Poiseuille, la coalescence peut avoir lieu puisque la petite goutte circulant au centre du tube se déplacera plus vite et rattrapera la plus grosse. Cependant, une fois que les deux gouttes sont au contact, elles peuvent se déplacer sur des distances de plusieurs fois le diamètre du tube (de 30 à 100 fois

selon les vitesses) avant que la coalescence effective ait lieu [Olbricht & Kung, 1987]. Le temps correspondant est, toujours selon Olbricht & Kung [1987], proportionnel à l'inverse de la différence de vitesse entre les deux gouttes. Celui-ci correspond au temps de drainage du film d'huile séparant les deux gouttes. Ce temps peut être allongé notablement par la présence de surfactants, induisant des effets Marangoni [Rommel *et al.*, 1992]. Lorsque les gouttes deviennent suffisamment proches, les effets des forces de Van der Waals peuvent intervenir et mener à la coalescence. Bien que des méthodes complètement passives aient été utilisées avec succès dans les premières applications de microfluidique de gouttes en flux avec des gouttes préalablement parfaitement synchronisées [Song *et al.*, 2003b], cette stratégie n'est donc pas rationnelle pour les applications microfluidiques puisqu'elle ne permet pas un contrôle précis en temps.

Excluons dans un premier temps les méthodes utilisant le déplacement d'une goutte sur un substrat plan de type électromouillage pour nous concentrer sur les gouttes en microcanaux. Lorsque le « microfluidicien de gouttes » se creuse la tête pour trouver une méthode lui permettant de coalescer des gouttes dispersées dans un milieu continu au sein d'un microcanal, il se rend compte que la physique ne met pas à sa disposition une grande variété de champs de forces. Pour des gouttes ne présentant pas de propriétés magnétiques (ne contenant pas de particules magnétiques), ce type de champ est sans effet. La gravité seule est souvent négligeable en microfluidique, particulièrement dans le cas de gouttes ayant la forme de plots (faible nombre de Bond). On peut penser aux forces centrifuges, mais on imagine sans peine la complexité d'un système utilisant celles-ci pour manipuler deux gouttes l'une par rapport à l'autre. L'univers des possibles est donc relativement restreint, et seules trois types d'actions sur les gouttes restent envisageables : hydrodynamiques, électrostatiques ou électromagnétiques (optiques). Pour nos applications, la méthode choisie se doit d'être simple et de ne pas provoquer de contamination dans les microréacteurs. Lorsque les travaux présentés ici ont été effectués, ces méthodes en étaient à leur balbutiement, et l'état de l'art présenté ici est globalement postérieur ou contemporain du travail que nous avons effectué en 2004.

#### 4.1.1.a Approches passives

**Mélange au sein d'une jonction en T.** L'approche étant de façon évidente la plus simple pour mélanger plusieurs produits au sein du même capillaire est de le faire dès la formation de la goutte. C'est la méthode utilisée par le groupe de R. Ismagilov. On fait arriver à une jonction en T deux flux de produits que l'on souhaite faire réagir, séparés par un flux de tampon inerte [Song *et al.*, 2003b]. Du fait de la laminarité des écoulements, les deux flux d'intérêt ne se mélangent pas avant d'être encapsulés au sein d'une même goutte transportée par de l'huile (voir figure 4.1A). Cette méthode ne permet cependant pas d'ajouter d'autres réactifs au cours de la réaction, et la présence du flux séparateur de tampon implique une

dilution des produits contenus dans la goutte.

**Coalescence dans un élargissement.** Les premiers travaux utilisant des méthodes « passives », donc des facteurs géométriques et hydrodynamiques pour coalescer deux gouttes, ont été présentés par le groupe d'A.P. Lee [Hung *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2004]. Le principe utilisé est relativement simple et consiste à affiner l'espaceur d'huile séparant deux gouttes en « retirant » celle-ci. Ceci peut-être réalisé en faisant passer le flux segmenté dans un canal plus large que le canal d'origine (voir figure 4.1B), le film d'huile s'en trouvant affiné, ou en retirant directement l'huile séparant deux gouttes grâce à une architecture en croix jouant sur les résistances fluidiques de chaque circuit. Les interfaces des deux gouttes initialement séparées se retrouvent en contact, et la coalescence s'ensuit. Afin que cette coalescence soit rapide, il faut cependant que les gouttes soient « poussées » l'une vers l'autre plus efficacement que par une simple différence de vitesse (cf. Olbricht & Kung [1987]). Cette méthode présente l'avantage indéniable de la simplicité puisqu'elle est entièrement passive, et n'est a priori pas source de contamination puisque les gouttes ne rentrent pas en contact avec les parois ou des éléments extérieurs. Elle n'est cependant pas sans inconvénients.

Tout d'abord, les gouttes doivent être générées de façon synchronisée préalablement à la coalescence afin d'assurer le bon déroulement des opérations. Ceci n'est pas forcément réalisable dans le cadre d'applications biologiques en flux continu puisque des réactifs doivent être ajoutés à divers moments de la réaction sans perturber les vitesses de circulation de l'ensemble d'un train de gouttes. Ensuite, le déroulement de la coalescence est étroitement lié à la géométrie choisie pour la zone d'élargissement : ainsi, selon l'espacement des gouttes et leur nombre dans un train, on peut avoir coalescence de multiples gouttes au lieu des deux gouttes choisies seulement. Plus généralement, la coalescence est ici possible pour des gouttes de dimension caractéristique plus faible que celles du canal et ne s'applique pas à des plots, pourtant indispensables à la stabilité d'un train de gouttes. Enfin, les résultats présentés dans Tan *et al.* [2004] et Hung *et al.* [2006] ne font aucune mention d'un quelconque surfactant dans l'huile de transport séparant deux gouttes. S'il est clair que deux interfaces « propres » finiront par coalescer en venant au contact, on peut douter que le phénomène ait lieu rapidement si celles-ci sont recouvertes d'une couche de tensio-actifs. Remarquons cependant que c'est finalement une variante de cette méthode que nous avons retenu pour l'injection et le mélange des échantillons avec les réactifs dans le système automatisé de PCR (chapitre 2), malgré la présence de tensio-actifs.

**Coalescence dans une jonction en T.** Une autre alternative à la coalescence de deux gouttes indépendantes pour mélanger leur contenu est de faire entrer en contact une goutte déjà formée avec une partie de phase dispersée statique contenue dans un canal annexe. Cette approche est aussi développée par le groupe de R.

Ismagilov [Shestopalov *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006a]. Elle implique nécessairement une contamination de la phase statique, la rendant par exemple inexploitable dans la réaction de PCR, mais cette contamination peut-être réduite en utilisant des géométries et des matériaux appropriés, ce qui rend la méthode attractive pour certaines applications.

L'approche la plus simple consiste à faire entrer directement en contact le plot échantillon avec une partie de phase dispersée contenant les réactifs à ajouter poussée à flux constant dans une jonction en T [Shestopalov *et al.*, 2004]. La coalescence n'est pas systématique, les auteurs avançant qu'elle dépend du nombre capillaire sans pour autant réussir à décrire entièrement la dépendance du phénomène. On comprend cependant bien cette tendance, déjà mentionnée dans Olbricht & Kung [1987] : si la tension de surface est abaissée, la formation d'un plug plus long à partir de deux plots primaires n'est pas nécessairement très favorable énergétiquement. D'autre part, la présence de surfactants à l'interface aura tendance à retarder la coalescence. De la même façon, si la viscosité augmente, le drainage du film d'huile séparant deux gouttes sera d'autant plus long et difficile.

Un autre problème associé à cette méthode est la nécessaire synchronisation à obtenir entre les plots primaires et la solution destinée à être coalescée avec ceux-ci, débouchant sur une limitation des flux utilisables dans le système. En outre, à faible vitesse du plot principal, une large contamination de la solution secondaire est induite, d'autant plus que la branche du T contenant la solution secondaire est large. L'utilisation d'un T hydrophobe de faible section rend pour sa part la synchronisation entre gouttes impossible. Song *et al.* [2006a] reprennent donc cette méthode, mais en utilisant une jonction en T où la solution aqueuse secondaire est contenue dans une jonction en T à branche hydrophile, arrivant ainsi à des résultats satisfaisants pour leur application.

On trouve aussi dans Song *et al.* [2006a] et Li *et al.* [2007] une méthode intéressante utilisant le flux de l'huile de transport dans un bras de circuit relié à la partie de la jonction en T contenant la solution secondaire pour déplacer cette dernière (voir figure 4.1C). Bien qu'encore peu avancée, cette technique mériterait d'être approfondie pour la génération et la synchronisation de gouttes.

#### 4.1.1.b Méthodes « actives »

**Utilisation de champs électriques.** Les méthodes « actives » utilisant des effets électrostatiques font leur apparition un peu plus tard. Notre groupe propose en 2005 [Chabert *et al.*, 2005] une méthode basée sur le principe de l'électrocoalescence, permettant de fusionner sans contact deux gouttes en mouvement ou statiques sous l'effet d'un champ électrique alternatif. Nous y reviendrons dans la section suivante. Le principe en sera repris dans plusieurs articles avec des géométries différentes et appliqué à la caractérisation de cinétiques enzymatiques simples [Ahn *et al.*, 2006; Tan & Takeuchi, 2006]. Comme dans les méthodes passives, les gouttes sont ici géné-

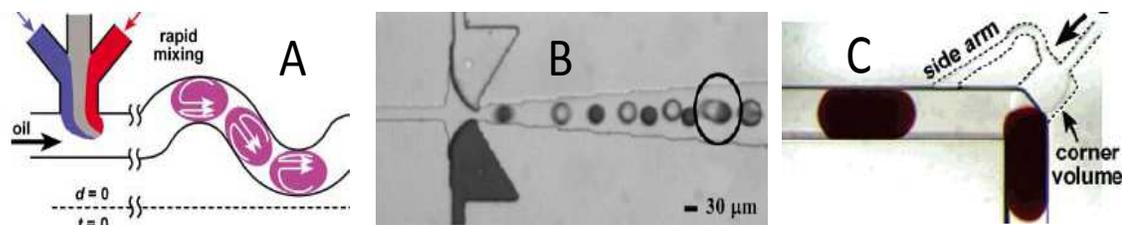


FIG. 4.1 – A. Mélange direct pendant la formation d’une goutte de deux flux de réactifs séparés par un tampon. D’après Song *et al.* [2003b]. B. Coalescence passive en flux de deux gouttes, utilisant un élargissement du canal les contenant. D’après Hung *et al.* [2006]. C. Coalescence passive d’un plot à une jonction en T contenant une solution secondaire. La solution secondaire est poussée par l’huile de transport. D’après Song *et al.* [2006a].

rées par décrochement simultané en flux à deux jonctions en T légèrement décalées, rendant la synchronisation délicate.

Une autre méthode fait son apparition en 2006 et consiste à former des gouttes avec une charge opposée par contact direct des deux flux permettant de former ces gouttes avec deux électrodes soumises à une différence de potentiel (ddp) constante [Link *et al.*, 2006] (voir figure 4.2). En plus du chargement des gouttes, cette méthode permet de synchroniser le décrochement de celles-ci dans la géométrie de flow-focusing utilisée. Dans l’hypothèse où plusieurs réactifs sont utilisés en flux successifs pour former ces gouttes, on peut présumer que le contact direct des solutions aqueuses avec les électrodes soit une cause d’adsorption des produits d’intérêt et de contamination croisée.

Citons enfin une méthode hybride fonctionnant indifféremment avec contact direct des électrodes avec la solution considérée dans le cas d’utilisation d’un courant continu ou sans contact direct dans le cas de l’utilisation d’un courant alternatif [Priest *et al.*, 2006], avec de très faibles voltages. Cette dernière application est utilisable pour coalescer des gouttes séparées par de fines lamelles d’huile au sein d’une émulsion concentrée.

Toutes les applications mentionnées dans ce paragraphe ont en commun le désavantage de ne pouvoir être appliquées qu’à des cas où la phase dispersée est plus conductrice que la phase continue, c’est à dire d’une façon générale à des gouttes de solution aqueuse dans l’huile. C’est cependant ce qui nous intéresse dans le cadre d’applications biologiques.

**Pincés optiques.** Une autre méthode active, permettant de manipuler cette fois-ci un objet d’indice de réfraction supérieur au milieu dans lequel il se trouve, consiste à utiliser le principe des pincés optiques. Nous l’avons vu dans la partie précédente,

celles-ci ont déjà été utilisées pour encapsuler de façon contrôlée des cellules dans des gouttes d'eau (chapitre 3).

Pour des gouttes, cette méthode est a priori mieux adaptée à la manipulation de gouttes d'huile dans l'eau, mais la situation inverse est rendue possible en utilisant des huiles fluorées (indice optique inférieur à celui de l'eau) ou des additifs permettant d'augmenter l'indice de la solution aqueuse [Lorenz *et al.*, 2006; Reiner *et al.*, 2006]. On peut alors déplacer et fusionner les gouttes piégées.

Une alternative consiste à utiliser un piège optique en vortex, c'est à dire un faisceau laser dont le centre présente une région d'intensité nulle (faisceau de Gauss-Laguerre). Cette méthode permet alors effectivement de piéger un objet d'indice optique supérieur à l'indice du milieu dans lequel il se trouve dans le minimum d'énergie se trouvant au centre du faisceau. Cette cage optique étant entourée de maxima d'énergie, chaque goutte peut être déplacée dans le milieu sans risque de coalescence non voulue avec les autres gouttes, mais il n'est pas possible directement de faire fusionner deux gouttes piégées dans ce type de faisceau. Une modulation du faisceau permettant de créer un minimum secondaire au sein de la barrière d'énergie est nécessaire à la réalisation de la coalescence [Lorenz *et al.*, 2007]. Au delà de la plateforme optique relativement perfectionnée que demandent ces manipulations, elles présentent le désavantage d'être lentes puisque chaque goutte doit être manipulée individuellement, limitant ainsi les possibilités de haut débit offertes par la microfluidique de gouttes. De plus, du fait des forces relativement faibles mises en jeu, ces techniques ne permettent pas de manipuler des plots confinés en hauteur et en largeur dans des canaux.

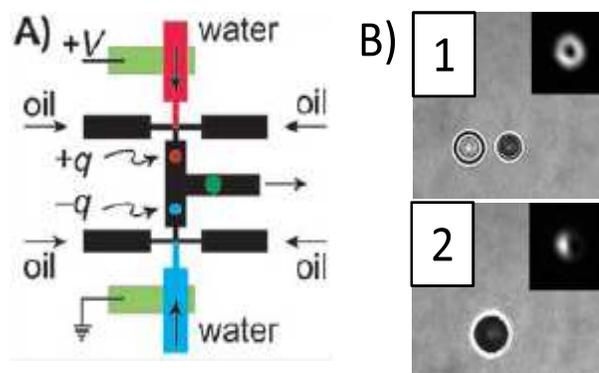


FIG. 4.2 – A) Formation et fusion de gouttes par application d'une différence de potentiel aux points de génération. D'après Link *et al.* [2006]. B) Coalescence de deux gouttes piégées dans une cage optique générée par un faisceau laser en vortex. 1. Piégeage des deux gouttes avant coalescence. 2. Deux gouttes coalescées. Les encarts représentent l'intensité du faisceau piégeant la goutte de gauche. D'après Lorenz *et al.* [2007].

**Déplacement sur substrat plan.** Mentionnons brièvement les méthodes permettant de déplacer des gouttes non confinées horizontalement sur un substrat solide plan de type électromouillage : les avantages et inconvénients de ces techniques ont déjà été présentés en introduction de cette thèse. Il est évident qu’au vu du mode de fonctionnement de ces systèmes, la coalescence de gouttes peut-être initiée aisément en utilisant simplement le principe utilisé pour déplacer ces gouttes et en les faisant se rencontrer sur une même « case ».

### 4.1.2 Électrocoalescence : principes

L’électrocoalescence repose sur un principe relativement simple : deux gouttes d’eau séparées par un milieu isolant placées dans un champ électrique peuvent être considérées comme des dipôles électriques (l’eau, même pure, étant plus conductrice qu’un milieu isolant de type huile ou air, le champ électrique est nul à l’intérieur des gouttes). Précisons bien que la polarisation considérée ici est liée à la grande *conductivité* de l’eau par rapport à l’huile qui l’entoure et non à sa constante diélectrique élevée. Il s’agit donc d’une polarisation « macroscopique » liée au déplacement des charges, qui correspond à un champ électrique nul à l’intérieur de la goutte. Cette hypothèse impose donc une condition sur les fréquences de travail utilisables, puisque les temps caractéristiques correspondants doivent être assez grands pour permettre l’équilibration des charges à l’interface. Partant de là, on estime la valeur des dipôles formés en utilisant les conditions aux limites à l’interface huile/solution aqueuse pour le champ électrique, les résultats obtenus ne dépendant que des propriétés diélectriques de l’huile. Les dipôles formés par les gouttes d’eau vont interagir et tendre à se rapprocher, pour finalement aboutir à la coalescence. Les principes basiques de cette méthode sont bien résumés dans une revue d’Atten [1993]. Une revue des phénomènes à l’œuvre peut-être trouvée dans Eow *et al.* [2001].

Le champ principal d’application de l’électrocoalescence se trouve une fois de plus dans l’industrie pétrolière, avec un brevet remontant à 1911 [Cottrell & Speed, 1911] : cette méthode est utilisée pour augmenter la vitesse d’extraction des gouttes d’eau résiduelles dans le pétrole. L’émulsion est placée dans une grande cuve aux parois de laquelle est appliquée une différence de potentiel, les gouttes coalescent plus vite qu’en l’absence de champ et se séparent de l’huile par gravité. On trouve aussi des études de ce phénomène dans le domaine de la physique atmosphérique, où le phénomène d’électrocoalescence joue un rôle dans la formation des gouttes d’eau du fait des forts champs électriques existant au sein des nuages [Braziers *et al.*, 1972].

Si le principe de l’électrocoalescence est simple, son étude détaillée est relativement complexe. D’autre part, au vu des domaines cités plus haut, le phénomène est souvent étudié sur un ensemble de gouttes plutôt que deux gouttes isolées, et les résultats obtenus ne sont donc que partiellement adaptables à notre cas. Notre système fluidique est en effet le même que dans le chapitre 2 : deux gouttes sont confinées dans un capillaire en Teflon et suspendues dans une huile fluorée. Ici, le

rayon absolu des gouttes est de l'ordre de celui du capillaire. Une fois de plus, le fait de travailler en microcanaux avec des gouttes confinées en plot ne facilite pas l'analyse théorique. Nous nous limiterons donc ici à quelques principes basiques liés au phénomène en général, et caractériserons expérimentalement notre système dans la prochaine partie.

#### 4.1.2.a Comportement d'une goutte isolée

Rappelons tout d'abord qu'une goutte d'eau a une fréquence naturelle d'oscillation, calculée pour la première fois par Lamb [1932] dans le cas de fluides parfaits, et modifiée ultérieurement pour tenir compte de la viscosité de chaque liquide [Subramanyam, 1969]. La formule de Lamb donne un bon ordre de grandeur des fréquences  $f$  obtenues pour une goutte de solution aqueuse oscillant en mode 2 dans une huile peu visqueuse avec :

$$f = \left[ \frac{24\gamma}{a^3(2\rho_o + 3\rho_d)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.1)$$

en utilisant les symboles définis en annexe de ce manuscrit.

Placée dans un champ électrique, la goutte va avoir tendance à se déformer sous son effet. Elle adopte une forme ellipsoïdale dictée par la compétition entre la tension de surface et la pression exercée par le champ électrique sur son interface (figure 4.3). Au delà d'une certaine valeur du champ électrique appliqué, la goutte se déstabilise et éclate : un « cône de Taylor » se forme à ses extrémités et émet des gouttelettes arrachées à la goutte principale [Taylor, 1964]. En équilibrant la pression exercée par le champ électrique  $\epsilon E_o^2$  et celle liée à la tension de surface  $\gamma/a$  (le rapport des deux effets étant parfois appelé nombre de Weber électrostatique), on obtient un critère d'instabilité pour le champ électrique limite  $E_c$  de la forme :

$$E_c = 0,64 \left( \frac{\gamma}{2\epsilon_o a} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.2)$$

Le temps caractéristique  $\tau$  d'établissement des dipôles au sein d'une goutte, dépendant à la fois de la permittivité et de la conductivité du milieu considéré, peut s'écrire :

$$\tau = \frac{\epsilon_d + 2\epsilon_c}{\sigma_d + \sigma_o} \quad (4.3)$$

La goutte, si elle est chargée, peut se déplacer par électrophorèse sous l'effet du champ. Pour une goutte neutre, le déplacement électroosmotique du milieu continu peut l'entraîner : même si les huiles ont un contenu très faible en ions, elles peuvent en contenir à cause de la fuite de ceux-ci de la solution aqueuse [Allan & Mason, 1962]. Enfin, si le champ appliqué n'est pas uniforme, la goutte peut-être déplacée par diélectrophorèse. Nous y reviendrons ci-dessous.

#### 4.1.2.b Ensemble de gouttes dans un champ

Dans une description où les gouttes conductrices sont éloignées d'une distance  $r$  bien supérieure à leur rayon  $a$  par un milieu isolant, et que ces gouttes perturbent faiblement le champ électrique appliqué  $E_o$ , on peut écrire en coordonnées polaires pour le champ en un point  $M(r, \theta)$  extérieur aux gouttes [Atten, 1993] :

$$E_r(r, \theta) = E_o \cos(\theta) \left[ 1 + 2 \frac{a^3}{r^3} \right] \quad (4.4a)$$

$$E_\theta(r, \theta) = E_o \sin(\theta) \left[ \frac{a^3}{r^3} - 1 \right] \quad (4.4b)$$

La force d'interaction résultante entre les dipôles s'écrit avec une dépendance en  $1/r^4$  :

$$F_r(r, \theta) = -12\pi\epsilon_c E_o^2 \frac{a^6}{r^4} [3 \cos^2(\theta) - 1] \quad (4.5a)$$

$$F_\theta(r, \theta) = -12\pi\epsilon_c E_o^2 \frac{a^6}{r^4} [\sin(2\theta)] \quad (4.5b)$$

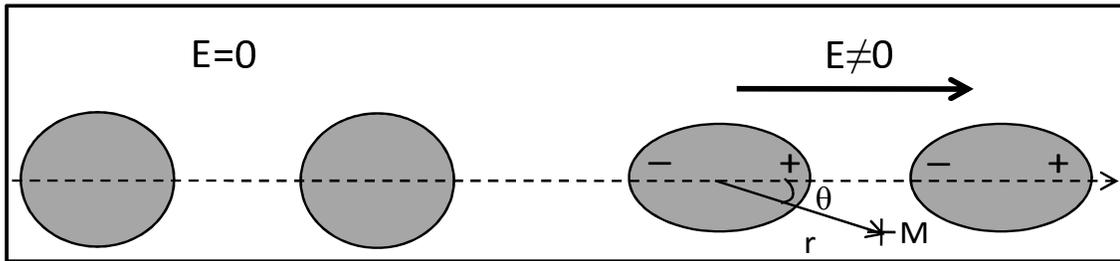


FIG. 4.3 – Effet d'un champ électrique sur deux gouttes alignées selon son axe.

Nous travaillerons dans le cas où la force tendant à rapprocher les gouttes est maximale, c'est à dire dans le cas où les deux gouttes sont alignées selon l'axe du champ appliqué (figure 4.3). Notons que dans le cas d'applications classiques, il existe un relativement grand champ de valeurs de  $\theta$  où les forces s'exerçant entre elles vont avoir tendance à aligner les gouttes dans la direction du champ. Dans notre cas, l'équation 4.5a donne pour  $\theta = 0$  :

$$F(r) = -24\pi\epsilon_c E_o^2 \frac{a^6}{r^4}$$

Dans cette situation, le champ électrique existant entre les deux gouttes est intensifié par rapport au champ électrique appliqué. Pour des gouttes se trouvant séparées

d'une distance très inférieure à leur rayon absolu, des formules plus compliquées doivent être utilisées [Davis, 1964], mais les équations 4.5 présentées ci-dessus suffisent dans le cadre de notre étude.

Partant de cette force et en l'équilibrant avec la force de Stokes, on peut déduire les temps caractéristiques de coalescence de deux gouttes. Dans notre cas, les gouttes étant confinées dans le capillaire, le problème est légèrement plus compliqué puisque la force s'opposant à la coalescence des gouttes est liée à l'évacuation du film d'huile séparant deux gouttes par l'espace annulaire d'huile séparant les gouttes non mouillantes des parois, cet espace dépendant lui-même de la vitesse à laquelle l'huile est évacuée. D'autre part, du fait de leur dimension comparable aux électrodes et à l'espace inter-électrodes, les gouttes perturbent fortement le champ électrique dans lequel elles se trouvent.

Le mécanisme de coalescence entre deux gouttes est généralement décrit en trois étapes, la première étant l'approche des deux gouttes, la seconde l'amincissement du film les séparant, et la dernière la rupture de ce film. Les deux premiers phénomènes sont ceux auxquels nous nous sommes principalement intéressés du fait de leur facilité d'observation. Concernant le troisième, la rupture du film d'huile séparant les deux gouttes sous champ électrique avant la coalescence est le plus souvent vue comme un claquage diélectrique [Allan & Mason, 1962] ou une instabilité électrohydrodynamique [Herminghaus, 1999] plutôt que comme un drainage du fait de la force s'exerçant entre les gouttes.

Finalement, le rapprochement des gouttes par interaction dipôle-dipôle peut aussi être vu comme un phénomène de diélectrophorèse, puisque les gouttes, plus polarisables que l'huile, ont tendance à se déplacer vers une zone de champ fort. On peut différencier les deux phénomènes en remarquant que l'inhomogénéité de champ est ici *induite* par les gouttes, alors que le champ imposé en diélectrophorèse est généralement *déjà* inhomogène.

#### 4.1.2.c Stratégies résultantes.

En se reportant à la littérature traitant de la coalescence dans l'industrie pétrolière, on peut tirer plusieurs conclusions utiles à la conception de notre microsystème de coalescence.

Tout d'abord, utiliser le phénomène d'électrocoalescence dans notre cas implique de s'affranchir des phénomènes pouvant le parasiter, c'est à dire des flux électrophorétiques ou électroosmotiques pouvant prendre place dans le système. Si ces phénomènes sont parfois exploités en cuve pour rassembler toutes les gouttes dans une même région de celle-ci, ils ne peuvent être que nuisibles en microcanaux pour deux gouttes identiques. Nous travaillerons donc en champ alternatif. C'est la configuration qui est couramment utilisée dans les « coalesceurs » industriels, parallèlement à l'utilisation, plus rare, de champ continu ou pulsés. Dans notre cas, les dimensions du système global étant relativement réduites, l'utilisation d'un champ alternatif

permet aussi d'éviter le chargement des différentes surfaces qui conduirait à une baisse conséquente d'efficacité.

Les champs électriques appliqués aux solutions sont de l'ordre de 1000 V/cm. Cette valeur est rarement dépassée afin d'éviter de fractionner les gouttes et d'obtenir finalement l'effet inverse de celui désiré. Du fait de l'intensification du champ entre les dipôles (équation 4.4), celui-ci peut en effet être assez fort pour induire une explosion des gouttes avec cône de Taylor, même si le champ appliqué est bien plus faible que la valeur théorique limite. D'autre part, nous savons que le champ limite est une fonction décroissante en  $1/\sqrt{a}$  du rayon de la goutte. Une goutte formée par coalescence de deux gouttes primaires sera donc plus susceptible que celles-ci d'éclater sous l'effet du champ appliqué. Dans notre système utilisant des gouttes confinées, il faut cependant s'attendre à devoir utiliser des valeurs de champ supérieures aux valeurs utilisées en cuve afin d'induire un déplacement des gouttes.

Enfin, en champ alternatif, une dépendance de l'efficacité de la coalescence à la fréquence du champ appliqué est souvent rapportée. L'hypothèse la plus probable permettant de l'expliquer est une résonance mécanique des gouttes favorisant leur déplacement lorsque la fréquence du champ électrique correspond à leur fréquence naturelle d'oscillation [Eow *et al.*, 2001]. Des études sur gouttes isolées montrent à la fois une stabilité de la goutte augmentée et un déplacement d'amplitude plus large à cette fréquence pour une valeur de champ donnée [Scott *et al.*, 1990].

## 4.2 Caractérisation du système d'électrocoalescence

Dans cette partie, nous décrirons le système expérimental dans lequel nous avons réalisé l'électrocoalescence de gouttes en microcanaux et tenterons d'en donner une première description par simulation numérique. Les résultats expérimentaux obtenus dans différentes configurations seront ensuite présentés.

### 4.2.1 Caractéristiques du système

#### 4.2.1.a Description

Le système utilisé est représenté sur la figure 4.4. Le capillaire contenant les gouttes et l'huile passe à travers 2 électrodes métalliques cylindriques de même diamètre alignées sur le même axe (longueur de 5 mm). Chaque électrode est maintenue par un bloc de Polyméthylméthacrylate (PMMA, permittivité relative 3,3), et les 2 blocs sont reliés par une vis, l'espacement entre les électrodes pouvant ainsi varier de 0,5 mm à 5 mm. Une tension est appliquée entre les électrodes grâce à un générateur de basses fréquences Hameg relié à un amplificateur de tension Trek, permettant de générer un signal créneau ou alternatif dont l'amplitude varie de 0 à 2000 V pour des fréquences comprises entre 0 et 1000 Hz. Au-delà de 1000 Hz, le signal est atténué de 20 dB par décade. Cette tension appliquée résulte en un champ électrique colinéaire

au capillaire et à l'axe de déplacement des gouttes. La plupart des manipulations ont été effectuées pour le même système biphasique que dans notre système de PCR. La solution aqueuse est composée d'eau distillée milli-Q tamponnée à pH 8 par du TBE 5x (0,45 M Trisbase, 0,45 M acide borique et 0,01 M EDTA ; Sigma), colorée par du bleu de bromophenol à 0,25% en masse (conductivité mesurée de 3 mS/cm, permittivité relative de l'eau 78). L'huile fluorée est toujours le FC40 (conductivité  $2,5 \cdot 10^{-13}$  mS/cm et permittivité relative de 1,9 d'après les données fournisseur) contenant le même surfactant fluoroalcool à 0,5% en masse. La tension interfaciale entre les gouttes d'eau et l'huile est toujours d'environ 20 mN/m. Le capillaire utilisé est cette fois en Teflon PTFE avec un diamètre interne de  $560 \mu\text{m}$  et une épaisseur de parois de  $250 \mu\text{m}$  (permittivité relative 2). Comme pour la machine de PCR, ce système permet d'assurer un déplacement des gouttes sans collage aux parois même sous champ électrique. Les électrodes ont un diamètre intérieur de 1,5 mm et sont généralement espacées de 2,5 mm.

Afin de réaliser l'électrocoalescence, les gouttes sont placées dans l'espace inter-électrodes. Dans la cohérence avec le but premier qui était l'intégration dans la machine de PCR microfluidique, les gouttes coalescées ont un diamètre de l'ordre de celui du capillaire, et forment ainsi un plot une fois fusionnées. Nous ne disposons pas à cette époque du système perfectionné d'injection décrit au chapitre 2. Les gouttes étaient donc formées en faisant osciller à l'interface eau/huile un capillaire relié à une seringue pompant à flux constant. L'observation est réalisée grâce à un binoculaire Olympus et une caméra 25 images/s reliée à un enregistreur digital. L'utilisation du shutter et ponctuellement d'une caméra rapide permet de figer les mouvements haute fréquence.

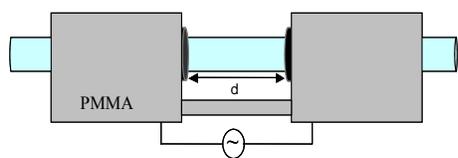


FIG. 4.4 – Appareil utilisé pour l'électrocoalescence. Les gouttes, non représentées ici, sont placées dans l'espace inter-électrodes.

D'autres compositions pour le capillaire et les huiles, d'autres diamètres pour le capillaire et les électrodes ainsi que des espaces inter-électrodes différents ont été testés et les différences de comportement par rapport au système présenté ci-dessus seront exposées dans la fin de cette partie.

#### 4.2.1.b Quelques valeurs numériques

Au vu des données du paragraphe précédent, l'équation 4.3 nous donne une valeur de l'ordre de  $10^{-9}$  secondes pour le temps de répartition des charges dans notre goutte. On peut donc considérer que l'établissement de la polarisation de charges sous l'effet du champ appliqué est absolument instantané, et considérer les gouttes comme conductrices tout en découplant les effets mécaniques des effets électriques. Pour des gouttes d'eau distillée, beaucoup moins conductrices (conductivité

de l'ordre du  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), le temps caractéristique est de l'ordre de  $1 \mu\text{s}$ , ce qui reste nettement inférieur aux temps caractéristiques du champ appliqué.

Le film d'huile séparant les gouttes des parois du capillaire garde le même ordre de grandeur que dans le cas du système de PCR et vaut environ  $1 \mu\text{m}$  pour des gouttes avançant à  $1 \text{ mm/s}$  dans celui-ci.

Pour la taille de gouttes que nous considérons, d'après la formule de Lamb, nous obtenons pour les fréquences naturelles d'oscillation des gouttes des valeurs de l'ordre de  $350 \text{ Hz}$ . Les valeurs corrigées sont inférieures et d'après [Scott *et al.*, 1990], les fréquences du mode d'oscillation naturelle de nos gouttes sont de l'ordre de  $200 \text{ Hz}$ . Cependant, nos gouttes étant confinées, ces valeurs sont sans aucun doute peu fiables dans notre cas, et nous accédons expérimentalement à des valeurs inférieures.

La valeur du champ de rupture des gouttes nous est donnée par l'équation 4.2 avec une valeur d'environ  $10000 \text{ V/cm}$ . Ceci correspond à la valeur théorique limite que nous pouvons atteindre avec notre équipement pour un espace inter-électrodes de  $2 \text{ mm}$ , mais l'intensification du champ liée aux dipôles peut nous amener à des valeurs beaucoup plus élevées. On peut donc s'attendre à des phénomènes de désintégration de gouttes dans le système.

Le champ électrique dans le système est atténué par la traversée des parois du capillaire en Teflon, isolant. D'autre part, compte tenu des dimensions du système, la présence des gouttes perturbe fortement les lignes de champ, puisqu'en ordre de grandeur, les gouttes sont de la même taille que les électrodes. Une valeur précise du champ a été obtenue numériquement et est présentée dans la partie suivante.

#### 4.2.1.c Calcul du champ créé

Le calcul du champ créé dans le système a été effectué en utilisant le logiciel Quickfield (Tera analysis), permettant de résoudre l'équation de Poisson en éléments finis (figure 4.5). Dans ces simulations, les électrodes sont séparées de  $2,3 \text{ mm}$ . Le rayon interne du capillaire est  $250 \mu\text{m}$  et l'épaisseur de ses parois  $250 \mu\text{m}$ . Le rayon des électrodes est de  $750 \mu\text{m}$ . On applique une tension de  $2000 \text{ V}$  entre les 2 électrodes. Les conditions aux limites loin de la zone d'intérêt (espace inter-électrodes) sont fixées par le bloc de PMMA dans lequel sont placées les électrodes. Les valeurs des permittivités mentionnées plus haut sont utilisées. Les simulations ont été réalisées pour le système « à vide » et pour 2 gouttes placées entre les électrodes.

Le champ électrique est relativement uniforme dans l'espace inter-électrodes et quasi nul à l'intérieur de celles-ci. Les dissymétries observées dans les équipotentielles par rapport à la symétrie du système, particulièrement hors de l'espace inter-électrodes, sont des artefacts liés à la construction de la maille de calcul du logiciel. Les calculs ont en effet été réalisés avec une version offrant un nombre de points limités pour le maillage, et nous avons donc concentré celui-ci dans la zone d'intérêt, perdant ainsi de la précision à plus grande distance. Par rapport au champ d'environ  $10^6 \text{ V/m}$  que l'on penserait obtenir en modélisant les 2 électrodes cylindriques par

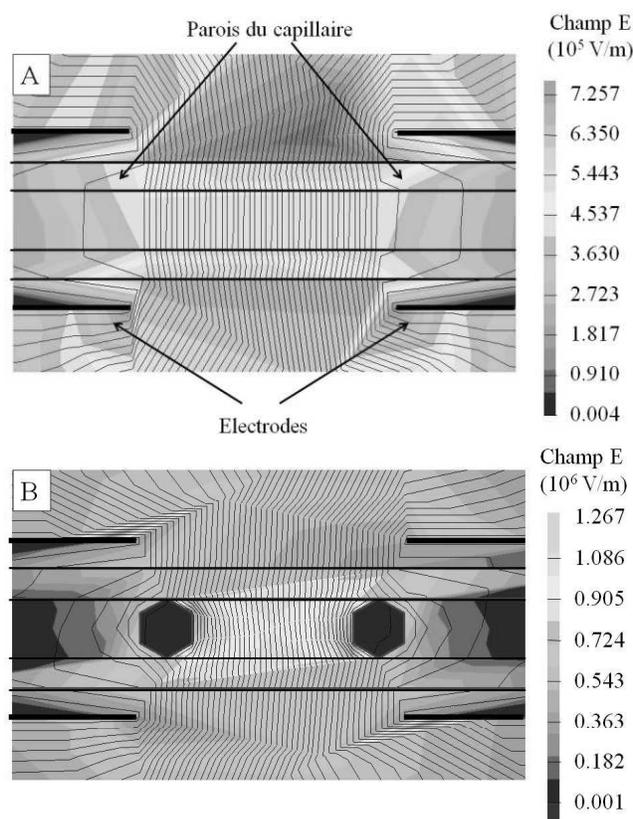


FIG. 4.5 – Champ dans le système obtenu par simulation numérique. Les lignes en trait fin représentent les équipotentielles. Les traits épais font ressortir l'architecture du système. La valeur du champ électrique est indiquée par les nuances de gris. Les échelles sont différentes sur chaque figure. A. Champ dans l'espace inter-électrodes sans présence de gouttes. B. Champ dans l'espace inter-électrodes avec des gouttes de solution aqueuse.

des plaques planes séparées de 2,3 mm auxquelles on applique une ddp de 2000V, on remarque que le champ obtenu dans le système vide est plus de deux fois plus faible, ce qui dénote l'effet important des parois du capillaire sur la décroissance du champ électrique.

Les différences significatives dans les valeurs du champ électrique entre ces 2 simulations montrent bien l'influence des dipôles induits par le champ dans les gouttes. On retrouve le champ nul à l'intérieur des gouttes, et l'amplitude du champ dans l'espace inter-électrodes en présence des gouttes d'eau est environ trois fois supérieure à celle obtenue en leur absence. Ceci correspond bien à ce que l'on obtient en considérant qu'une goutte dans un champ électrique peut être modélisée par un dipôle placé en son centre. En appliquant l'équation 4.4 parallèlement à l'axe du cylindre pour  $a = r$ , on obtient en effet  $E = 3.E_0$ , ce que l'on retrouve dans la simulation. Cette intensification du champ devrait donc bien nous amener sous certaines conditions à la formation de cônes de Taylor. D'autre part, on voit que la présence des gouttes perturbe significativement l'allure des équipotentielles avec un resserrement de celles-ci devant chaque goutte dans l'espace inter-électrodes, ce qui aura tendance à les amener l'une vers l'autre. Malgré l'imprécision de cette formule à courte distance, on peut estimer en utilisant l'équation 4.5a la force électrostatique s'exerçant entre les deux gouttes séparées par  $500 \mu\text{m}$  à une valeur de

$10^{-5}$ N environ.

## 4.2.2 Résultats expérimentaux

Les résultats présentés dans cette section sont tous obtenus avec le système modèle décrit au début de la partie 4.2. Notons en préambule que la taille des gouttes utilisées relativement à celle du capillaire joue un rôle prépondérant dans le phénomène. Pour des gouttes de rayon notablement plus faible que celui du capillaire, avec les champs que nous utilisons, le rapprochement des gouttes est extrêmement rapide, et on se rapproche malgré l'effet des parois du comportement obtenu pour deux gouttes interagissant dans un milieu non confiné. À l'inverse, pour deux gouttes ayant la forme de plots, initialement séparées de plus d'un rayon du capillaire, la coalescence est quasiment impossible en des temps raisonnables avec notre méthode car le drainage du film d'huile séparant les deux gouttes à travers l'anneau les séparant des parois du capillaire implique un frottement visqueux trop important.

Nous effectuons donc nos mesures pour des cas où les gouttes sont environ du même diamètre que le capillaire, c'est à dire  $0,9 < \lambda < 1,1$ . La mesure de la borne inférieure est basée sur l'hypothèse qu'au delà de  $\lambda \sim 0,9$ , l'épaisseur du film d'huile séparant les gouttes des parois devient indépendante de ce rapport [Martinez & Udell, 1990]. Selon la mesure effectuée, il sera cependant préférable d'utiliser des gouttes de  $\lambda > 1$ , puisque la déformation de la goutte sous l'effet du champ électrique peut aussi jouer un rôle sur l'épaisseur du film d'huile, des gouttes initialement à  $\lambda > 0,9$  se retrouvant à des valeurs inférieures.

### 4.2.2.a Limites du phénomène de coalescence

Comme je le mentionnais en introduction, l'utilisation d'un champ constant a peu de chances d'aboutir à un résultat dans le cas de notre système. À l'application d'un champ constant, on observe d'une part un étirement des gouttes dans la direction du champ, comme le prévoit la théorie, et un déplacement d'ensemble des deux gouttes qui se dirigent vers l'électrode négative. Après un intervalle de temps relativement court (de l'ordre de la dizaine de secondes), les gouttes reprennent quasiment l'allure qu'elles ont au repos. L'effet de déplacement global des gouttes vers une électrode peut-être vu comme un effet d'électrophorèse, on peut tout à fait imaginer que les gouttes portent une charge dès leur formation. Au vu de la très faible conductivité de l'huile fluorée, le développement d'effets électrosmotiques en son sein est très peu probable. De plus, lorsque l'on place des particules de Mica dans l'huile seule et que l'on applique une tension entre les électrodes, on n'observe aucun mouvement de ces particules. Elles s'alignent par contre dans la direction du champ électrique, ce qui permet d'observer aisément les lignes de champ (figure 4.6).

L'effet électrophorétique semble donc le plus plausible, le chargement des gouttes pouvant être dû à de l'électricité statique absorbée lors de leur stockage dans un Eppendorf (tout utilisateur d'Eppendorf aura pu constater qu'ils sont chargés et ont

une fâcheuse tendance à se coller aux gants en latex), ou lors de leur prélèvement. Le retour de la goutte à un état d'équilibre après quelques dizaines de secondes peut quant à lui s'expliquer par l'équilibration du champ appliqué par une réorganisation des charges sur la surface extérieure du capillaire.

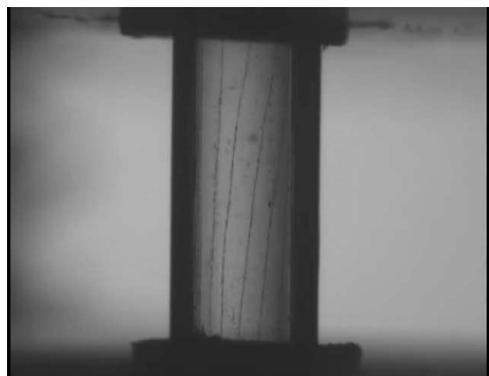


FIG. 4.6 – « Image » des lignes de champ créé dans le système d'électrocoalescence grâce à des particules polaires s'alignant en chaîne dans le champ.

L'électrocoalescence a donc été étudiée en champ alternatif en fonction de l'amplitude, de la fréquence et de la forme du champ appliqué. On peut réaliser la coalescence de façon reproductible pour des fréquences supérieures à 10 Hz. Les bornes fixant les zones de possibilité de coalescence en fonction de la fréquence et de l'amplitude du champ appliqué pour des tensions crête à crête et sinusoïdale sont présentées en figure 4.7. Ces mesures sont effectuées pour des gouttes initialement distantes d'environ une fois leur rayon soit  $500 \mu\text{m}$  et un espace inter-électrodes de 2 mm. Chaque point des courbes correspond à une dizaine de mesures sur des paires de gouttes différentes. L'erreur entre chaque mesure étant inférieure au pas de variation de la tension utilisé, nous avons choisi ce dernier comme erreur caractéristique du système.

**Borne inférieure en tension.** Pour un champ alternatif de fréquence donnée, la borne inférieure de coalescence correspond à une absence de mouvement détectable des gouttes en un temps raisonnable (1 minute). Cette borne est déterminée en augmentant graduellement la ddp appliquée aux électrodes par pas de 100 V (fréquence fixe), jusqu'à ce qu'un mouvement des gouttes soit détecté. Les gouttes utilisées avaient un rayon de  $570 \pm 10 \mu\text{m}$ . Il est particulièrement important pour la détermination de la borne inférieure en tension d'utiliser des gouttes avec un rayon absolu légèrement supérieur à celui du capillaire. Des gouttes de rayon légèrement inférieur auront tendance à se déplacer beaucoup plus rapidement, puisque leur déformation sous l'effet du champ induira une augmentation de l'épaisseur du film d'huile les séparant des parois et donc un frottement visqueux beaucoup plus faible.

Il est clair au vu de la configuration de notre système que les gouttes considérées laissées dans une situation de faible champ devraient finir par coalescer puisqu'elles ne mouillent pas le capillaire, ce qui exclut toute hysteresis de la ligne de contact et donc toute forme de frottement de type solide, mais les temps correspondants

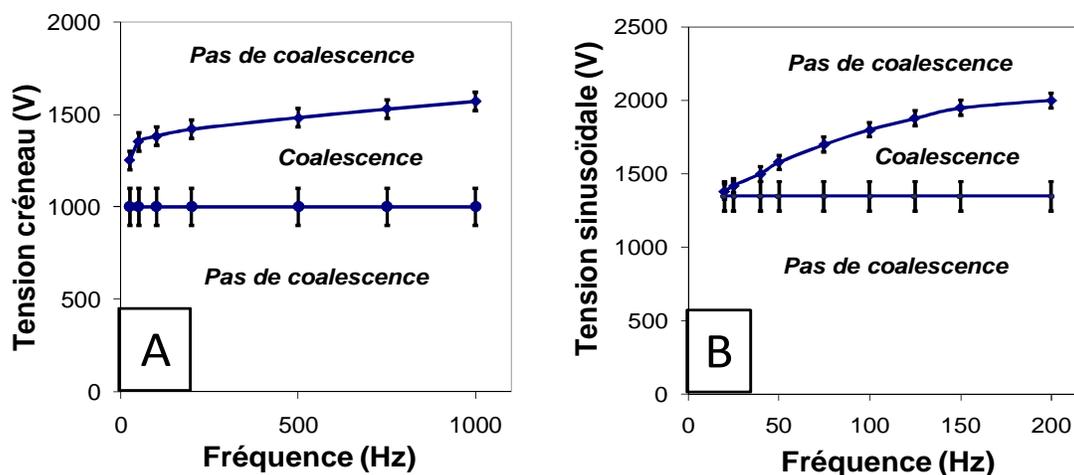


FIG. 4.7 – Diagramme de phase des bornes de coalescence pour une amplitude et une fréquence de champ données. Les barres d’erreur correspondent aux pas de tension entre chaque mesure. A. Signal crête. B. Signal sinusoïdal. Valeurs mesurées pour une espacement de 2 mm entre les électrodes et des gouttes de diamètre absolu  $570 \pm 10 \mu\text{m}$ .

sont trop longs pour présenter un intérêt quelconque dans les applications nous intéressant.

La borne inférieure de coalescence est plus élevée en tension sinusoïdale qu’en tension crête, ce qui s’explique facilement par le fait qu’à tension crête équivalente, un signal crête fournit une puissance 2 fois supérieure à un signal sinusoïdal. Même si cela semble un peu trop beau pour être vrai, on retrouve d’ailleurs le facteur  $\sqrt{2}$  dans le rapport de la tension minimale crête à la tension minimale sinusoïdale.

Les minima de tension à appliquer pour obtenir la coalescence correspondent à des champs électriques environ dix fois supérieurs aux champs mentionnés classiquement pour l’électrocoalescence d’émulsions, ce qui s’explique par la forte dissipation visqueuse dans l’anneau d’huile séparant les gouttes des parois du capillaire lorsqu’elles se déplacent. Cependant, du fait du faible espacement des électrodes, la tension à appliquer pour obtenir ce champ reste inférieure à celle utilisée dans le cas « macroscopique ». De plus, bien que les tensions mises en jeu soient élevées, les électrodes se comportent principalement comme un condensateur, et peu d’énergie est consommée.

La borne inférieure de tension nécessaire à la coalescence est indépendante de la fréquence du champ appliqué. Sous cette borne, le champ électrique fournit simplement trop peu d’énergie à la goutte pour pouvoir induire une oscillation suffisante de son interface avec l’huile ainsi que son déplacement.

**Borne supérieure en tension.** Étonnamment, on constate aussi l’existence d’une borne supérieure en tension à la coalescence. La borne supérieure de coalescence est

déterminée en se mettant en situation de non-coalescence et en diminuant progressivement l'amplitude du champ par pas de tension de 50 V, à fréquence fixe, jusqu'à ce que la coalescence ait lieu.

Pour une fréquence donnée, au-delà d'une certaine tension appliquée, les gouttes commencent à se rapprocher, puis arrivées à une certaine distance oscillent l'une près de l'autre avant de se repousser. Ce phénomène est cyclique, les gouttes éloignées recommencent à s'approcher l'une de l'autre, et finissent à nouveau par se repousser. On en trouve déjà mention dans l'article d'Allan & Mason [1962].

#### Interprétation.

Ce phénomène peut être expliqué sur la base d'une désintégration des gouttes avant la coalescence. Lorsque les gouttes se trouvent suffisamment proches l'une de l'autre, le champ électrique entre elles se trouve intensifié, et peut atteindre des valeurs dépassant le champ de rupture mentionné en introduction. Une observation fine des phénomènes à l'oeuvre lorsque les gouttes se repoussent permet bien d'observer un cône de Taylor et l'expulsion de gouttelettes de ce cône (figure 4.8). Ces gouttelettes forment un pont entre les deux gouttes et déchargent les deux dipôles correspondant. Les deux gouttes ne forment ainsi finalement plus qu'un seul dipôle placé dans un champ électrique élevé. La « goutte » formant ce dipôle, ayant une forme instable en sablier, se refractionne sous l'effet du champ sans pouvoir atteindre une forme stable. Une façon de voir les choses est donc d'imaginer ce phénomène comme une succession extrêmement rapide de coalescence des deux gouttes primaires et fractionnement de la goutte résultante. Ces événements de « pontage » ont lieu sur des périodes de temps inférieures à la milliseconde, et le matériel à notre disposition (caméra rapide 1000 images/s, utilisée pour la figure 4.8B) ne permettait malheureusement pas d'avoir accès à sa dynamique précise. Cependant, lors d'une expérience consistant à utiliser une goutte colorée et une goutte translucide et à les laisser dans ce mode de répulsion cyclique pendant une heure, la goutte initialement translucide se colore, ce qui témoigne de l'échange de fluide entre les deux gouttes.

Le phénomène cyclique évoqué ci-dessus n'a bien sûr pas lieu lorsque les gouttes sont initialement seulement séparées par un film d'huile se rompant sous l'effet du champ appliqué. On l'a vu, ce ne sont alors pas les mêmes phénomènes qui sont à l'oeuvre (rupture et non drainage du film d'huile) et à moins que le champ *appliqué* soit trop intense, les gouttes sont assez proches pour coalescer rapidement en formant une goutte stable.

#### Dépendance en fréquence

La limite supérieure de coalescence présente une dépendance en fréquence pouvant justement être interprétée comme un problème de distance entre les gouttes au moment du contact.

Nous avons vu que les gouttes présentent une fréquence naturelle d'oscillation, et que plus la fréquence du champ appliqué se rapproche de la fréquence de ces gouttes, plus ce champ provoque une oscillation conséquente de la goutte pour une amplitude donnée. C'est une des raisons avancées dans les applications classiques pour expliquer

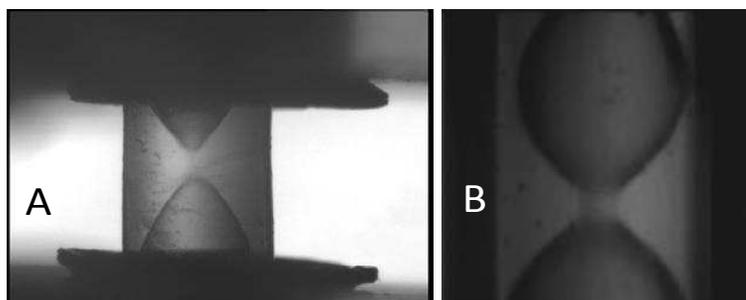


FIG. 4.8 – Gouttes soumises à un champ électrique trop intense. A. Formation et éclatement des cônes de Taylor. B. Les gouttes sont reliées sous la forme d’un seul dipôle par un pont de gouttelettes, formant une goutte unique instable qui se fractionne sous l’effet du champ. Images prises dans un champ alternatif créneau 100 Hz, ddp de 2000 V.

l’amélioration de la coalescence dans certaines conditions de fréquence.

Nous avons estimé la fréquence d’oscillation optimale d’une goutte au sein du système en appliquant un champ électrique d’amplitude constante et en faisant varier sa fréquence. La fréquence naturelle de la goutte est la fréquence du champ pour laquelle ses oscillations sont les plus importantes à une amplitude de tension donnée. La déformation symétrique en forme d’ellipsoïde de la goutte sous l’effet du champ permet de s’assurer qu’il ne s’agit pas d’un simple phénomène électrophorétique lié au changement de signe de la différence de potentiel. Nous estimons la fréquence naturelle du mode 2 d’oscillation de notre goutte à une cinquantaine de Hertz (soit une fréquence du champ appliqué de 25 Hz). Au delà d’une fréquence de 100 Hz pour le champ appliqué, l’interface des gouttes ne semble plus suivre le champ, mais celles-ci se déforment simplement comme si elles étaient placées dans un champ continu.

A basse fréquence, la goutte présentera donc des oscillations de plus forte amplitude qu’à haute fréquence pour une valeur donnée de champ : elle absorbera plus d’énergie du champ électrique. Les gouttes se déformant plus, on se retrouvera donc plus facilement dans une situation où les interfaces des deux gouttes sont proches, favorisant une décharge des dipôles amenant à la répulsion des gouttes, alors que les centres de gravité des deux gouttes ne sont pas suffisamment proches pour former une goutte stable sous champ électrique. A plus haute fréquence (supérieure à 100 Hz), les interfaces des gouttes sont relativement proches lorsqu’une décharge peut avoir lieu, et peuvent coalescer en formant une goutte stable à des valeurs de champ plus élevées qu’à basse fréquence. Le plateau atteint en champ créneau pour la limite supérieure correspond ainsi à des fréquences où la goutte cesse de suivre mécaniquement le champ appliqué. Ce plateau est tout juste atteint en champ sinusoïdal car la puissance de l’amplificateur n’est pas suffisante.

### 4.2.2.b Comportement des gouttes lors de la coalescence

Dans les conditions souhaitables des diagrammes de la figure 4.7, les gouttes s'approchent et coalescent rapidement. Une fois encore, pour un espacement initial donné (typiquement un diamètre de gouttes), les temps de coalescence dépendent fortement de la valeur de  $\lambda$ . Pour  $\lambda < 1$ , la déformation de la goutte sous l'effet du champ va lui permettre de diminuer fortement la dissipation visqueuse et donc d'avancer plus vite que des gouttes à  $\lambda > 1$ , dont la déformation n'est pas suffisante pour changer l'allure du film d'huile les séparant des parois. On retrouve cependant toujours dans la gamme de  $\lambda$  utilisés une allure d'approche des gouttes similaire. Les mesures présentées ici sont effectuées pour une ddp sinusoïdale de 2000V et 1000 Hz appliquée entre les électrodes distantes de 2 mm. Nous n'avons que peu étudié la dépendance en fréquence de l'approche des gouttes. Pour des gouttes distantes, un travail à plus basse fréquence semble favoriser la mise en mouvement des gouttes et leur rapprochement initial. L'effet principal reste celui lié à l'amplitude du champ appliqué, la vitesse d'approche des gouttes étant d'autant plus grande que la ddp appliquée aux électrodes est importante. On pourrait idéalement envisager une rampe, avec diminution progressive de la tension au fur et à mesure du rapprochement des gouttes, permettant d'optimiser les temps de coalescence sans créer de phénomènes de non-coalescence pour des gouttes proches.

**Coalescence dans une huile au repos.** Les gouttes sont placées dans l'espace inter-électrodes, le flux d'huile est arrêté et on applique le champ électrique. Les trajectoires résultantes sont analysées grâce à un programme de tracking d'interface développé au laboratoire par K. Zeldovich (erreur de 1 pixel soit 10  $\mu\text{m}$ ). Les trajectoires obtenues pour les gouttes sont représentées en figure 4.9.

La coalescence des deux gouttes, initialement séparées par deux diamètres environ a lieu ici en moins de 7 secondes. Contrairement à ce que l'idée d'une force dipolaire en  $\frac{1}{r^4}$  laisse entendre, on observe une vitesse d'approche linéaire des gouttes qui n'accélèrent pas en se rapprochant l'une de l'autre. C'est seulement lorsque les gouttes sont extrêmement proches que l'on observe une forte accélération et une coalescence quasi-immédiate. Alors que les expériences présentées ici tendent à caractériser le système pour des gouttes initialement lointaines, notre méthode devrait conduire à la coalescence immédiate de microgouttes initialement séparées par une faible distance dans un microcanal. La goutte supérieure (en haut sur la figure 4.9), légèrement plus petite, avance plus vite que la goutte inférieure.

Bien que nous nous soyons intéressés ici à l'approche des gouttes lors de la coalescence et non au phénomène final donnant lieu à celle-ci, mentionnons que les valeurs caractéristiques de notre système ne permettent pas de discriminer ici entre l'idée d'une rupture du film d'huile par instabilité électrohydrodynamique ou celle d'un claquage diélectrique. L'huile que nous utilisons présente un champ limite de claquage de l'ordre de 180 kV/cm. Pour des faibles épaisseurs d'huile, en tenant compte

de l'intensification du champ due à la présence des gouttes, les valeurs atteintes pour celui-ci peuvent tout à fait induire une rupture du film d'huile.

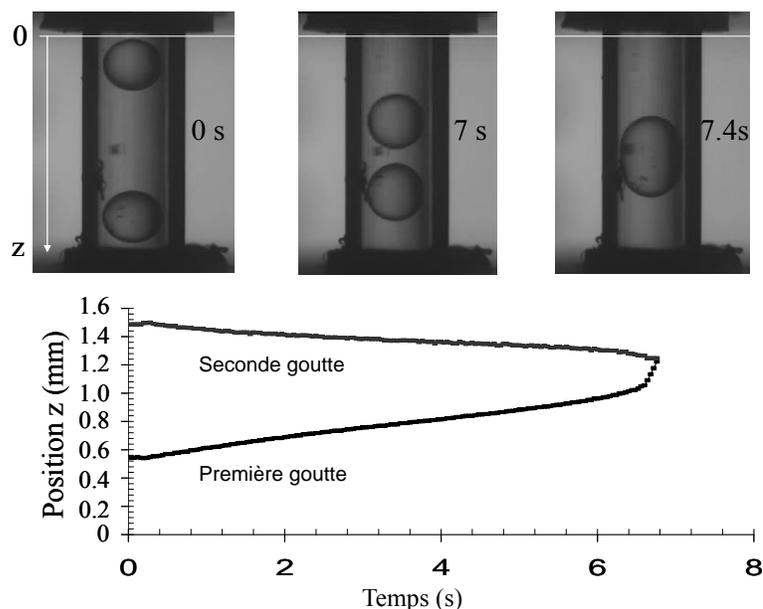


FIG. 4.9 – Trajectoire temporelle d'approche de deux gouttes lors du phénomène de coalescence. Cas statique où l'huile n'est pas en mouvement. De haut en bas, la première goutte a un diamètre absolu de  $540 \pm 10 \mu\text{m}$  et la seconde de  $560 \pm 10 \mu\text{m}$ .

**Coalescence des gouttes en flux.** La méthode présentée ici prend tout son intérêt lorsqu'elle permet de faire coalescer les gouttes en flux, puisque c'est le cas de la plupart des applications pratiques potentielles, comme par exemple dans le cadre de l'intégration avec le système d'encapsulation de cellules (chapitre 3). Le résultat correspondant est présenté en figure 4.10, pour des vitesses de gouttes relativement faibles, ici correspondant à un flux de  $50 \mu\text{L/h}$  soit une vitesse de  $15 \mu\text{m/s}$  dans le capillaire utilisé. Selon la taille des gouttes et leur espacement initial, la coalescence a pu être réalisée dans différentes conditions et en particulier pour des gouttes avançant à  $1 \text{ mm/s}$ , qui se trouve être la vitesse relativement élevée utilisée dans notre système de PCR (chapitre 2). Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la coalescence est quasiment instantanée pour des gouttes initialement proches.

Lors du phénomène de coalescence en flux, la première goutte entrant dans le système semble s'arrêter dans le système lorsqu'elle atteint l'électrode de sortie. Au delà de la force dipolaire qui la tire en arrière vers l'autre goutte, un phénomène diélectrophorétique peut être invoqué pour décrire ce phénomène. En effet, si la première goutte s'arrête, la seconde goutte ne semble pas accélérer par rapport au flux qui l'entraîne. Lorsqu'elle atteint l'électrode de sortie, la première goutte est poussée

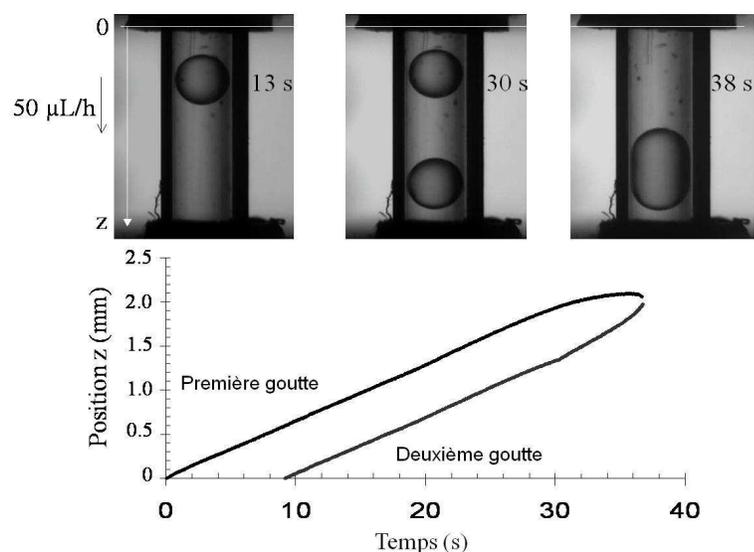


FIG. 4.10 – Trajectoire temporelle d'approche de deux gouttes lors du phénomène de coalescence. Cas où les gouttes sont entraînées par l'huile à  $50 \mu\text{L/h}$ . Par ordre d'entrée entre les électrodes, la première goutte a un diamètre absolu de  $570 \pm 10 \mu\text{m}$  et la seconde de  $560 \pm 10 \mu\text{m}$  environ.

par le flux vers des régions de champ faible (juste avant de passer sous l'électrode). Il semble qu'un phénomène diélectrophorétique s'ajoutant à l'interaction dipôle-dipôle aide à retenir la goutte à la sortie de la région de coalescence.

**Mélange des gouttes lors de la coalescence.** Le but dans la fusion de deux gouttes est bien entendu le mélange de leurs contenus. Le phénomène de coalescence est relativement « violent », et on pourrait s'attendre à ce que deux gouttes primaires soient immédiatement mélangées dès leur fusion. En utilisant une goutte contenant des particules de Mica et une autre en étant dépourvue et en faisant coalescer ces deux gouttes, on s'aperçoit qu'il n'en est rien (figure 4.11). Les particules restent dans la zone de la goutte fusionnée correspondant à leur goutte primaire. Ceci ne représente en soi pas un obstacle, puisque le contenu des gouttes sera mélangé du fait de leur entraînement par le flux d'huile. L'axe de symétrie des lignes de recirculations dans la goutte est orthogonal au plan « miroir » séparant deux gouttes primaires, entraînant une homogénéisation rapide du contenu.

#### 4.2.2.c Autres systèmes utilisés, autres phénomènes.

**Matériaux alternatifs.** L'utilisation d'autres compositions de capillaire, ainsi que d'autres huiles conduisent à des résultats insatisfaisants. D'une façon générale, dans des capillaires de composition différente (silicone ou Tygon), une huile carbonée



FIG. 4.11 – Mélange nul résultant de la coalescence de deux gouttes. La goutte supérieure contient des particules rhéoscopiques de Mica.

(hexadécane) à laquelle est ajouté un surfactant (sorbitan monooléate, Span 80) est utilisée. A l'application du champ électrique, on observe généralement un collage des gouttes aux parois, et une coalescence plus difficile que dans notre système standard pour un champ d'amplitude et fréquence données. A diamètre intérieur égal, les capillaires en silicone ou Tygon ont une épaisseur plus importante, d'où une atténuation plus grande du champ à leur traversée. D'autre part, des charges de surface sont susceptibles d'apparaître plus facilement sur du silicone ou du Tygon que sur du Teflon, ce qui tout en expliquant l'atténuation du champ à la traversée des parois, explique aussi les phénomènes de collage des gouttes aux parois à l'application du champ.

L'utilisation d'une huile carbonée, plus conductrice que le FC40, a tendance à atténuer l'attraction entre les deux gouttes. La présence d'un surfactant à tête hydrophile acide provoque un chargement de surface des gouttes qui peut impliquer leur collage aux parois. Pour une application où les gouttes sont confinées dans le capillaire et sentent fortement les parois, l'utilisation de Teflon semble la solution la plus adéquate. D'une façon plus générale, une huile fluorée inerte et très isolante, contenant un surfactant non chargé, se prête bien à l'électrocoalescence.

**Coalescence de gouttes d'eau pure.** L'électrocoalescence jouant sur l'aspect conducteur des gouttes d'eau, impliquant un champ nul et donc un dipôle électrique au centre de celles-ci, l'utilisation d'eau distillée permet de mieux comprendre l'effet des charges présentes dans la goutte d'eau par rapport à celui de sa grande permittivité diélectrique. Pour une eau milli-Q de conductivité mesurée  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$ , utilisée dans notre système standard, on observe une décroissance notable des effets du champ électrique.

A champ identique, les gouttes d'eau distillée se déforment moins et se rapprochent moins vite que les gouttes d'eau tamponnée, mais la coalescence est tout de même possible. La différence de conductivité entre l'eau et l'huile fluorée reste en effet de plusieurs ordres de grandeur. Sur ce point, nos observations diffèrent des conclusions d'Allan & Mason [1962], pour qui le comportement de systèmes de gouttes sous champ électrique dans un milieu isolant est indépendant de la force ionique de la solution considérée. Cette différence de comportement peut éventuel-

lement s'expliquer par l'effondrement de l'hypothèse de champ nul à l'intérieur des gouttes : pour des gouttes peu conductrices, on peut imaginer que la polarisation « macroscopique » des gouttes par répartition des charges à l'interface ne suffise pas à compenser le champ électrique. Par conséquent, le champ n'est pas nul à l'intérieur des gouttes, et l'approximation consistant à les considérer comme des dipôles n'est plus tout à fait valide : on a en quelque sorte des dipôles affaiblis. Le phénomène d'électrocoalescence est cependant utilisable même avec une eau ultrapure, qui contiendra toujours plus d'espèces ioniques qu'une huile.

**Effet de la taille du capillaire.** Nous avons déjà vu à plusieurs reprises que l'épaisseur du film d'huile séparant des gouttes non mouillantes des parois du capillaire varie linéairement avec le rayon du capillaire. D'autre part, la force s'exerçant entre deux gouttes de rayon  $a$  placées dans un champ électrique varie comme  $a^6$ , donc l'augmentation du rayon des gouttes aura tendance à augmenter cette force. Dans le cas de gouttes confinées ( $\lambda \sim 1$ ), le couplage de ces deux effets va donc avoir tendance à favoriser l'approche des gouttes lorsque le rayon du capillaire les contenant augmente. Ainsi, pour un capillaire de diamètre interne 1,32 mm avec la même épaisseur de parois, on observe les effets décrits dans la partie précédente avec des champs appliqués environ deux fois plus faibles.

Ceci est de mauvaise augure dans la perspective d'une miniaturisation du système, et il faudra alors envisager d'effectuer la coalescence dans un élargissement ponctuel des canaux pour s'affranchir d'effets de dissipation visqueuse trop importants. Relevons tout de même qu'une diminution des dimensions caractéristiques, qu'il s'agisse du rayon des gouttes ou de celui du capillaire, devrait a priori s'accompagner d'une réduction de la distance séparant initialement deux gouttes, et donc d'une interaction renforcée entre les deux dipôles puisque ce paramètre intervient à la puissance 4 dans l'expression de la force s'exerçant entre eux.

**Fractionnement des gouttes.** De la même façon qu'il peut être intéressant de fusionner deux gouttes afin de mélanger leur contenu, fractionner un plot en plusieurs gouttes secondaires peut se révéler utile, à des fins d'analyse par exemple. Pour des grosses gouttes, ayant la forme de plots dans le capillaire, l'application d'un champ haute fréquence de grande amplitude permet de fractionner celles-ci en micro-gouttelettes expulsées par les cônes de Taylor se formant à l'extrémité de chaque goutte (figure 4.12A). Cette méthode n'est malheureusement pas « propre », puisqu'elle ne permet aucun contrôle sur la taille et le nombre de gouttes formées.

L'utilisation d'un champ très basse fréquence ( $< 1$  Hz) permet d'utiliser la charge généralement portée par les gouttes pour les fractionner par effet électrophorétique : la goutte se déplace alternativement vers une électrode puis l'autre, et la résistance hydrodynamique s'opposant à ce déplacement finit par fractionner la goutte (figure 4.12B).

Dans des capillaires de diamètre plus important, il est possible de fractionner

un plot en deux gouttes de taille égale par application d'un champ haute fréquence sans observer de formation d'un cône de Taylor. Pour ces deux derniers cas, la longueur du plot excédant  $\pi$  fois son diamètre, nous supposons que le champ électrique permet principalement d'induire l'instabilité de la goutte puis sa rupture. Signalons ici une méthode élégante proposée par Link *et al.* [2006] consistant à faire arriver un plot à la tête d'un T et à appliquer un champ électrique perpendiculaire au plot initial le long de la tête du T, ce qui provoque un fractionnement du plot initial en deux gouttes portant des charges opposées. Cette méthode est une alternative à la méthode géométrique proposée plus tôt par le même auteur et consistant à faire arriver un plot à la tête d'un T : le plot se fractionne, la taille des gouttes formées dépendant de la résistance fluïdique de chaque canal de sortie [Link *et al.*, 2004]. On retrouve une approche similaire utilisant un contrôle en pression de chaque branche dans Menetrier-Deremble & Tabeling [2006].

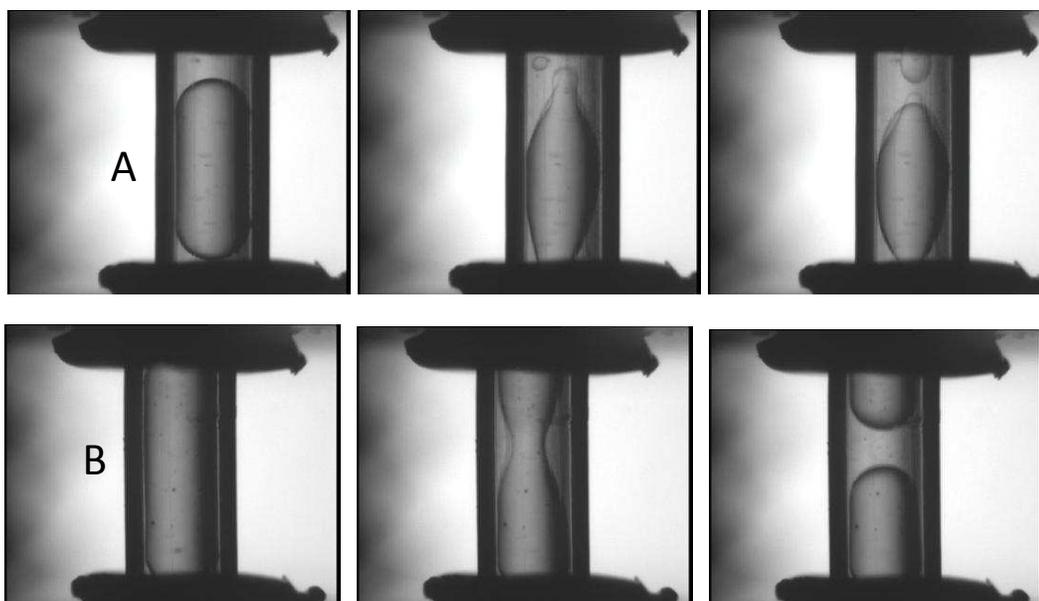


FIG. 4.12 – Modes de fractionnement de plots par application d'un champ électrique. A : application d'un champ haute fréquence, ddp créneau de 2000 V, 1000 Hz. B : application d'un champ basse fréquence, ddp créneau de 2000 V, 0,1 Hz.

### 4.3 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre une étude expérimentale du phénomène de coalescence pour deux gouttes d'un rayon absolu de l'ordre de celui du capillaire les contenant. L'utilisation d'une géométrie de symétrie cylindrique a permis de déterminer les phénomènes à l'oeuvre dans un cas standard simple, et d'en tirer les

diagrammes de phase utilisables pour de futures applications.

Les conséquences d'un champ trop fort devraient se retrouver à toutes les échelles géométriques utilisables pour la coalescence, et bien que la valeur du champ limite puisse varier, il s'agit d'un effet à prendre en compte dans la conception d'un micro-système utilisant des champs électriques pour manipuler des microgouttes.

L'utilisation de gouttes ayant environ le rayon du capillaire correspond à un cas plutôt défavorable concernant l'efficacité du système. Comme on l'a vu, une réduction des dimensions du capillaire, souhaitable pour manipuler des gouttes de rayons micrométriques comme celles utilisées dans le chapitre 3, engendrerait une coalescence plus difficile pour deux gouttes confinées. Il est donc recommandable de prévoir d'effectuer la coalescence en un point du circuit où les gouttes ne sont pas confinées, ce qui rend le phénomène plus facile à mettre en œuvre. Sans avoir mené une étude exhaustive, on constate que l'approche de gouttes non confinées se fait à des vitesses 10 fois supérieures aux vitesses mesurées pour des gouttes confinées, résultant en une coalescence quasi-immédiate des gouttes dans un champ approprié. Dans ce dernier cas, la force s'opposant au mouvement des gouttes est simplement la force de Stokes (modifiée pour tenir compte de la proximité des parois) et non celle nécessaire au drainage de l'huile séparant les deux gouttes dans le fin film séparant celles-ci des parois.

Si la phase finale de la coalescence n'a pas été étudiée dans notre système, les données fournies par la littérature récente semblent expliquer ce dernier phénomène comme une instabilité électrohydrodynamique plutôt que comme une rupture diélectrique du film d'huile séparant deux gouttes [Herminghaus, 1999]. Quoi qu'il en soit, l'application d'un champ, même faible, permet la coalescence quasi-immédiate de deux gouttes initialement en contact. L'élargissement du canal au niveau du lieu de coalescence devrait parallèlement permettre, comme nous l'avons vu en introduction, de rapprocher deux gouttes initialement séparées par plusieurs fois leur rayon jusqu'à les mettre au contact. L'application du champ permettra alors de réaliser la coalescence immédiate des deux gouttes sans risque de non-coalescence liée à la présence de surfactants.

Une fois de plus dans ce chapitre, la méthode utilisée dérive d'une application macroscopique connue et relativement bien documentée. On constate cependant dans la littérature que les études expérimentales de deux gouttes séparées par une huile isolante et placée dans un champ électrique restent rares, et sans conclusions définitives. La microfluidique, par la facilité de mise en œuvre de différentes géométries qu'elle offre, présente ici au delà du simple aspect applicatif une opportunité pour mieux comprendre et mieux étudier ce phénomène d'importance dans des domaines variés.

# Chapitre 5

## Conclusions

Nous avons au cours de cette thèse abordé divers aspects de la microfluidique diphasique appliquée à des problématiques biologiques. Dans une première partie, nous avons présenté une plateforme destinée à conduire la réaction de PCR dans des microgouttes. Au sein celle-ci, la PCR peut être réalisée sans contamination croisée dans des gouttes traitées comme des microréacteurs. En utilisant une microplaque d'injection originale couplée à un système d'injection automatique spécialement destiné à la manipulation de micro-écoulements diphasiques, nous avons réalisé l'automatisation du prélèvement des échantillons ainsi que du mélange de ceux-ci avec les réactifs, tout en associant ce mécanisme séquentiel avec la réaction en flux continu des réacteurs déjà formés. Une détection automatique du contenu des gouttes en fin de réaction a amené ce système à un rendement estimé de 3000 échantillons par jour environ, comparable à celui obtenu avec les thermocycleurs haut-débit classiques, avec en sus un mélange automatique des échantillons et des réactifs et une économie en produits d'un facteur 50 par rapport aux machines classiques. Il reste bien entendu encore beaucoup de chemin à parcourir avant de prétendre entrer en compétition avec des systèmes éprouvés par des années d'utilisation dans des laboratoires spécialisés, et l'intégration des canaux sur puce plane et le couplage de celle-ci avec un support de détection optique permettant de mesurer la quantité de produit présente à chaque cycle comme en PCR quantitative sera certainement la première étape de ce chemin. Nous espérons cependant par ce travail avoir réussi à démontrer que l'utilisation de la microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques et médicales classiques pouvait être au delà du concept une technique adaptable à la réalité d'un laboratoire d'analyse et fonctionnant selon les standards en vigueur dans celui-ci. Au delà de la PCR, notre plateforme automatisée peut-être appliquée à un vaste champ d'applications, allant d'autres techniques biologiques d'analyse à la chimie en microgouttes. Nous travaillons ainsi actuellement avec Guillaume Colas, post-doctorant récemment arrivé au laboratoire, à l'adaptation dans notre système d'une réaction d'amplification isotherme d'ADN, la « Rolling Circle Amplification »(RCA), à des fins de détection de virus.

Autour de cette réalisation pratique, qui a demandé de nombreuses « micro-

inventions », et qui sans déboucher sur un système fini représente un travail relativement abouti en termes de développement dans le cadre d'un laboratoire académique, nous avons travaillé à la mise au point de deux briques technologiques beaucoup plus amont, mais qui mises bout à bout représentent un réel atout pour avancer plus loin dans la miniaturisation des opérations d'analyse. Contrairement à sa grande sœur, la microfluidique monophasique, qui semble aujourd'hui arriver à un point de maturation et s'oriente vers plus d'intégration et moins d'invention, la microfluidique de gouttes, domaine plus jeune – et certainement plus complexe que son aînée du fait des multiples interactions qu'elle implique – reste un terrain fertile pour l'imagination. Nous avons ainsi pu avoir le plaisir de mettre au point deux méthodes originales, la première permettant d'encapsuler des cellules uniques au sein de microgouttes et de trier ces dernières, la seconde de coalescer sans contact deux microgouttes circulant dans un canal.

Notre méthode d'encapsulation de cellules a le mérite incontestable de la simplicité. En utilisant uniquement des phénomènes hydrodynamiques passifs et un microcircuit fabriqué en PDMS en une seule étape, elle permet d'isoler des cellules uniques au sein de microgouttes individuelles et de trier ces microgouttes positives des gouttes vides avec un rendement allant aujourd'hui jusqu'à 20 cellules par seconde. Il s'agit d'une démonstration supplémentaire que le contrôle accru des écoulements au sein des microsystèmes permet d'exploiter des effets qui sans être inédits sont trop souvent oubliés car peu accessibles dans le monde macroscopique. Notre système est extrêmement séduisant car il met à la portée de tout scientifique possédant deux pousse-seringue et du PDMS la possibilité d'isoler des cellules uniques au sein de microgouttes. Il est cependant évident que des tests plus approfondis devront être menés à bien afin de confirmer par exemple la viabilité des cellules encapsulées selon cette méthode. C'est cette possibilité que nous permet d'entrevoir la seconde « brique technologique » développée lors de cette thèse.

Ironiquement, le système d'électrocoalescence présenté en chapitre 4 avait vu le jour au début de cette thèse dans le but de l'intégrer au système de PCR rappelé plus haut. C'est bien finalement en association avec l'encapsulation de cellules qu'il devrait trouver tout son potentiel. Cette technique permet par l'application d'un champ électrique alternatif intense de coalescer deux microgouttes initialement séparées par plusieurs fois leur rayon. Nous travaillons actuellement avec Ghislaine Gavarin, stagiaire au laboratoire, au chaînon manquant entre les deux blocs que sont l'encapsulation et la coalescence de gouttes : la génération de gouttes à la demande. Au delà de l'aspect purement applicatif, l'étude de l'électrocoalescence en microcanaux nous a d'autre part permis d'observer nombre de phénomènes physiques aussi surprenants au premier abord qu'intéressants. Notons que cette technique, bien qu'alors inédite en microfluidique, est directement inspirée d'une technique en usage dans l'industrie pétrolière, ce qui nous rappelle que beaucoup de travail aujourd'hui utilisé en microfluidique a été réalisé par des scientifiques de domaines complètement différents il y a maintenant plusieurs décennies.

Quel est finalement l'avenir de la microfluidique ? Ce champ tiendra-t-il ses promesses en révolutionnant les méthodes classiques actuellement en cours dans les milieux de l'analyse biologique ou de la synthèse chimique, ou s'agit-il simplement d'un pétard mouillé ? Nous avons vu au cours de cette thèse que ses implications allaient de la recherche fondamentale, particulièrement en biologie, à des dispositifs commerciaux destinés au grand public (dispositifs médicaux de type « point of care ») ou aux professionnels (systèmes d'analyse portables), en passant par le renouvellement des techniques industrielles actuelles (découverte de médicaments, synthèse de colloïdes). Se pose évidemment la question de la rentabilité économique, qui permettra pour une grande part de faire le tri entre les différentes solutions proposées aujourd'hui. Mais le problème peut s'avérer plus complexe. On peut par exemple sérieusement se demander si les leaders mondiaux dans la vente de machines de PCR, qui sont aussi généralement les principaux fournisseurs des produits utilisés dans cette réaction, ont un intérêt à proposer demain un appareil permettant d'obtenir les mêmes résultats avec des quantités de réactifs 100 fois inférieures aux quantités actuelles. Mon sentiment est que les méthodes dérivées de la microfluidique finiront nécessairement par s'imposer dans les domaines où elles se révéleront plus performantes tant scientifiquement qu'économiquement. A l'heure où des thématiques telles que la situation sanitaire dans les pays en voie de développement ou la protection de l'environnement prennent une ampleur non négligeable, le contraire serait un réel gâchis tant la microfluidique a de réponses, particulièrement en termes de diminution de consommation de réactifs, de prix des systèmes et d'efficacité, à apporter à ces situations.

## Liste des symboles utilisés

$a$  : rayon absolu d'une goutte

$R$  : rayon du capillaire

$$\lambda = \frac{a}{R}$$

$Q_d$  : débit de la phase dispersée

$Q_o$  : débit de la phase continue

$\eta_g$  : viscosité du liquide dispersé

$\eta_o$  : viscosité du liquide continu

$$\sigma = \frac{\eta_g}{\eta_o}$$

$\epsilon_c$  : permittivité absolue du liquide continu.

$\epsilon_g$  : permittivité absolue du liquide dispersé.

$\sigma_o$  : conductivité du liquide continu.

$\sigma_d$  : conductivité du liquide dispersé.

$\gamma$  : tension de surface entre les liquides considérés (N/m).

$\gamma_o$  : tension de surface du liquide continu. (N/m).

$\gamma_d$  : tension de surface de la phase dispersée (N/m).

$\gamma_s$  : énergie de surface du solide (N/m).

$\gamma_{os}$  (resp  $\gamma_{ds}$ ) : tension de surface entre l'huile (respectivement la phase dispersée) et le substrat solide.

$V$  : vitesse moyenne du fluide continu.

$U$  : vitesse de la goutte

$\rho_o$  : densité du fluide continu

$\rho_d$  : densité du fluide dispersé

Équation de Navier-Stokes pour le fluide continu :

$$\rho_o \cdot \left[ \frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + (\vec{V} \cdot \vec{\nabla}) \vec{V} \right] = -\vec{\nabla} P + \eta_o \Delta \vec{V} + \vec{f}_v$$

où  $\vec{f}_v$  représente d'éventuelles forces en volume.

Les nombres sans dimension qui suivent sont calculés sur la base des propriétés de la phase continue et nous seront utiles pour caractériser nos systèmes, tant du point de vue fluïdique que du point de vue thermique.

Nombre de Reynolds (compare les effets de convection et de diffusion de la quantité de mouvement pour une taille caractéristique  $R$ ) :

$$Re = \frac{\rho_o \cdot V \cdot R}{\eta_o}$$

Nombre capillaire (compare les effets des contraintes visqueuses et de la tension de surface) :

$$C_a = \frac{\eta_o U}{\gamma}$$

Nombre de Péclet (compare le mélange de molécules par convection et par diffusion moléculaire sur une longueur caractéristique de variation de concentration  $l$ ) :

$$P_e = \frac{Vl}{D}$$

Nombre d'Ohnesorge (compare les effets de la viscosité à ceux couplés de la tension de surface et de la convection, pour une longueur caractéristique  $l$ ) :

$$O_h = \frac{\eta_o}{\sqrt{\rho_o \gamma l}}$$

Nombre de Bond  $B_o$  (compare les effets de la gravité et de la tension de surface) :

$$B_o = \frac{\rho g r^2}{\gamma}$$

## Annexe 1 : fluorosilanisation

Cette méthode de silanisation est tout à fait classique dans son déroulement : activation de la surface, mise en contact avec le silane, et enfin rinçage. La seule pointe d'originalité réside dans la méthode d'activation utilisée pour nos tubes en silicone. Cette méthode est la première que nous ayons essayé et s'est révélée efficace, nous l'avons donc adoptée. Il est en effet difficile de trouver une méthode universelle pour des tubes en silicone commerciaux, puisque si l'on connaît la structure principale (siloxane) de ce polymère, on ne connaît pas les chaînes qui sont fixées sur celle-ci et déterminent donc sa réactivité.

La réaction était au début effectuée sous atmosphère inerte d'Argon dans une boîte à gants, puis cette méthode a été abandonnée pour réaliser la silanisation dans l'air ambiant, en se contentant de chasser l'air du mélange de silane par circulation d'azote. D'autre part, la silanisation était d'abord effectuée manuellement puis a été automatisée pour être directement faite dans le système d'injection. Le protocole ne change pas, si ce n'est que les produits circulent aussi dans les tubes en Teflon. Celui-ci étant résistant à quasiment tous les solvants, ceci ne pose aucun problème.

Activation : de l'acide chlorhydrique à 1M circule pendant une heure dans les tubes en silicone. L'acide est vidé du circuit par poussée d'azote. Après cette étape, la surface de silicone est oxydée et présente des groupements Si—OH.

Rinçage : les tubes sont consciencieusement rincés avec le solvant choisi pour le silane, ici le méthanol.

Silanisation : le fluorosilane (1H,1H,2H,2H perfluorodecyltriéthoxysilane) à 5% en masse circule à 1 mm/s pendant deux heures dans les tuyaux. Il y a réaction du silane avec les fonctions Si—OH et hydrolyse. Les chaînes fluorées sont ainsi fixées sur la surface. Les tuyaux sont ensuite séchés par circulation d'azote.

Rinçage : les tubes sont à nouveau rincés consciencieusement avec du méthanol, puis séchés à l'azote et laissés au repos pour la nuit.

Attention à éviter toute introduction de bulles d'air pendant l'étape de silanisation. L'humidité endommagerait le silane et nuirait à la qualité du traitement de surface : on aurait formation d'un gel plutôt que d'une couche de silane attachée de façon covalente à la surface.

Dans le cas du protocole automatisé de silanisation, les tubes de silicone sont traités en ligne *in situ* dans les valves à pincement, et la circulation des fluides est automatisée.

## Annexe 2 : méthode de la goutte pendante

Le principe de la mesure de tensions de surface par la méthode de la goutte pendante est relativement simple : une goutte placée à la pointe d'un capillaire est soumise à son propre poids auquel s'oppose la tension de surface retenant la goutte accrochée au capillaire. Lorsque le poids de la goutte excède la force capillaire la retenant au tube, la goutte se détache (voir figure ci-dessous) :

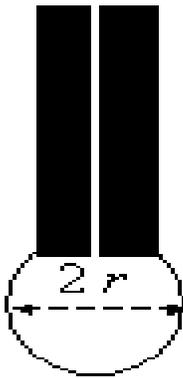


FIG. 1 – Schéma de principe de la mesure de tension de surface par goutte pendante.

A ce moment précis, l'angle de contact de la goutte avec le capillaire est de  $180^\circ$ , et on peut donc accéder à la tension de surface du liquide considéré par la loi de Tate :

$$R_g = \left( \frac{3R_c\gamma}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (1)$$

où  $R_g$  est le rayon de la goutte formée,  $R_c$  le rayon du capillaire,  $\rho$  la densité du fluide considéré et  $g$  la gravité.

La réalité expérimentale n'est malheureusement pas aussi simple, puisqu'un col se forme avant détachement de la goutte, et que seule une partie de la goutte se détache, le reste (jusqu'à 40%) restant dans le capillaire. Un traitement détaillé du phénomène peut-être trouvé dans Earnshaw *et al.* [1996]. On corrige ainsi la loi de Tate par un facteur  $\alpha$  fonction de  $R/R_g$  tel que :

$$R_g = \left( \frac{3R_c\gamma}{2\alpha\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2)$$

On trouve dans le même article une tabulation précise des facteurs  $\alpha$  en fonction du volume de la goutte et du rayon des capillaires afin d'obtenir la valeur exacte de la tension de surface recherchée à partir de la mesure du volume de la goutte détachée.

Dans notre cas, nous cherchons à mesurer la tension de surface entre la solution aqueuse et l'huile fluorée à différentes concentrations de surfactant. L'huile fluorée étant plus dense que l'eau, nous formons donc des gouttes d'huile à la pointe d'un capillaire dans de l'eau tamponnée. Le capillaire utilisé est un capillaire en Teflon de diamètre interne  $760 \mu\text{m}$ , mouillé par l'huile. Attention à bien remplacer la densité du liquide par la différence de densité entre les deux fluides dans l'équation 2.

Les solutions d'huile à diverses concentrations de surfactant correspondant aux mesures désirées sont placées dans une seringue connectée au capillaire de mesure, celui-ci est plongé dans la solution aqueuse et on pousse l'huile jusqu'à ce qu'une goutte se détache. Afin d'éviter des artefact de mesure, il est recommandé dans le cas de l'utilisation d'une seringue unique de procéder par concentrations de surfactant croissantes.

Juste après qu'une goutte se soit détachée, la mesure peut commencer. De l'huile est poussée par incréments de 25 nL grâce à une seringue de 50  $\mu$ L placée sur une pompe haute précision (Hamilton) commandée sous Labview. Lorsque l'on se rapproche du point de détachement de la goutte, on attend entre chaque incréments 10 à 15 secondes afin que le système puisse s'équilibrer. On déduit la tension de surface du volume qui a été dispensé lorsque la goutte se détache. La mesure est répétée une vingtaine de fois afin d'assurer un résultat reproductible. Dans le cas de présence d'un surfactant dans l'huile, il peut arriver que la tension de surface mesurée diminue à chaque mesure. Ceci est dû à la présence de surfactant restant des mesures précédentes dans la solution aqueuse, et il faut alors changer cette solution.

## Annexe 3 : Estimation de la longueur de thermalisation d'une goutte

Définissons d'abord quelques symboles et nombres caractéristiques propres à ce calcul :

$k_o$  : conductivité thermique de l'huile

$k_w$  : conductivité thermique de la paroi (0,26 W/m.K pour le Teflon)

$C_{po}$  : capacité calorifique massique de l'huile.

$C_d$  : capacité thermique massique d'une goutte d'eau ( $C_d = 4190$  J/g.K)

Nombre de Prandtl  $P_r$  (compare le transfert de chaleur par diffusion visqueuse à son transfert par conduction) :

$$P_r = \frac{\eta_o C_{po}}{k_o}$$

Nombre de Nusselt  $N_u$  (compare le transfert de chaleur par convection au transfert de chaleur par conduction, perpendiculairement au flux considéré pour une longueur caractéristique L, pour un coefficient de transfert thermique  $h_i$ ) :

$$N_u = \frac{h_i L}{k_o}$$

Moyennant les hypothèses mentionnée au chapitre 2, l'équation caractérisant le transfert d'énergie par unité de temps à travers le tube dans l'air ambiant  $Q_t$  s'écrit :

$$Q_t = U_o A_e \Delta T_m \quad (3)$$

où  $A_e$  est l'aire d'échange (partie extérieure du capillaire),  $U_o$  le coefficient de transfert thermique, et  $\Delta T_m$  la différence moyenne logarithmique de température :

$$\Delta T_m = \frac{T_i - T_e}{\ln\left[\frac{T_{air} - T_e}{T_{air} - T_i}\right]} \quad (4)$$

où  $T_i$  est la température initiale ( $T_i = 94$  °C),  $T_e$  la température finale désirée ( $T_e = 54,5$ °C) et  $T_{air}$  la température de l'air dans lequel est placé le capillaire ( $T_{air} = 54$ °C), soit finalement  $\Delta T_m = -8,4$  °C. D'après Perry & Green [1997], on peut écrire, avec les hypothèses simplificatrices mentionnées en préambule, pour le coefficient de transfert thermique :

$$U_o^{-1} = \frac{x A_e}{k_w A_m} + \frac{A_e}{A_i h_i}. \quad (5)$$

où  $A_i$  est l'aire intérieure et  $A_e$  l'aire extérieure du tube,  $A_m$  la moyenne de celles-ci,  $x$  l'épaisseur de la paroi, et enfin  $h_i$  le coefficient de transfert paroi/solution aqueuse défini ci-dessous d'après le nombre de Nusselt :

$$h_i = \frac{k_o}{2R_i} N_u \quad (6)$$

où  $R_i$  est le rayon intérieur du capillaire.

Par ailleurs, on trouve dans Perry & Green [1997] une relation semi-empirique relativement compliquée pour le nombre de Nusselt, mais qui compte tenu de nos hypothèses simplificatrices et de notre travail à faible nombre de Reynolds donne une valeur approchée du nombre de Nusselt  $N_u = 3,66$ , à partir de laquelle on peut facilement calculer  $h_i$ .

La quantité de chaleur devant être retirée de la goutte s'écrit :

$$Q = \rho_d \nu C_d \Delta T \quad (7)$$

où  $\nu$  est le volume de la goutte, et  $\Delta T$  la différence de température (ici  $39,5^\circ\text{C}$ ).

L'égalisation de  $Q \cdot \frac{V}{L}$  (quantité de chaleur évacuée de la goutte vers le capillaire par unité de temps, avec  $V$  vitesse de la goutte et  $L$  longueur d'échange) et  $Q_t$  (quantité de chaleur transférée entre le tube et l'air ambiant par unité de temps) donnée par les relations 7 et 3 nous donne après simplification, pour le temps  $t$  de thermalisation d'une goutte :

$$t = \sqrt{\frac{1}{V} \frac{Q}{2\Pi\Delta T_m} \left[ \frac{x}{k_w R_m} + \frac{1}{1,83k_o} \right]} \quad (8)$$

où  $R_m$  est le rayon moyen du capillaire.

# Bibliographie

- Adams, M.L., Enzelberger, M., Quake, S., & Scherer, A. 2003. Microfluidic integration on detector arrays for absorption and fluorescence micro-spectrometers. *Sensors and actuators A : Physical*, **104**, 25–31.
- Aharoni, A., Amitai, G., Bernath, K., Magdassi, S., & Tawfik, D.S. 2005. High-throughput screening of enzyme libraries : Thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chemistry and biology*, **12**, 1281–1289.
- Ahn, K., Agresti, J., Chong, H., Marquez, M., & Weitz, D.A. 2006. Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels. *Applied physics letters*, **88**, 264105–264108.
- Allan, R.S., & Mason, S.G. 1962. Particle in sheared suspension XIV : coalescence of liquid drops in electric and shear fields. *Journal of colloid science*, **17**, 383–408.
- Anderson, R.C., Su, X., Bogdan, G.J., & Fenton, J. 2000. A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. *Nucleic acids research*, **28**, e60.
- Anna, S.L., Bontoux, N., & Stone, H.A. 2003. Formation of dispersions using « flow focusing » in microchannels. *Applied physics letters*, **82**, 364–366.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., & Yamane, T. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, **330**, 769–771.
- Atencia, J., & Beebe, D.J. 2005. Controlled microfluidic interfaces. *Nature*, **437**, 648–655.
- Atten, P. 1993. Electrocoalescence of water droplets in an insulating liquid. *Journal of electrostatics*, **30**, 259–270.
- Auroux, P.-A., Iossifidis, D., Reyes, D., & Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 2. analytical standard operations and applications. *Analytical chemistry*, **74**, 2637–2652.
- Auroux, P.A., Koc, Y., deMello, A., Manz, A., & Day, P.J. 2004. Miniaturized nucleic acid analysis. *Lab on a chip*, **4**, 534–536.

- Balagadde, F.K., You, L., Hansen, C.L., Arnold, F.H., & Quake, S.R. 2005. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, **309**, 137–140.
- Barbier, V., Tatoulian, M., Li, H., Arefi-Khonsari, F., Ajdari, A., & Tabeling, P. 2006. Stable modification of PDMS surface properties by plasma polymerization : Application to the formation of double emulsions in microfluidic systems. *Langmuir*, **22**, 5230–5232.
- Baroud, C.N., Delville, J.-P., Gallaire, F., & Wunenburger, R. 2007. Thermocapillary valve for droplet production and sorting. *Physical review E (statistical, nonlinear, and soft matter physics)*, **75**, 046302–046306.
- Barret, R., Faucon, M., Lopez, J., Cristobal, G., Destremaut, F., Dodge, A., Guillot, P., Laval, P., Masselon, C., & Salmon, J.-B. 2006. X-ray microfocussing combined with microfluidics for on-chip x-ray scattering measurements. *Lab on a chip*, **6**, 494–499.
- Belgrader, P., Benett, W., Hadley, D., Long, G., Mariella, R., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Nelson, W., Richards, J., & Stratton, P. 1998. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clinical chemistry*, **44**, 2191–2194.
- Belgrader, P., Benett, W., Hadley, D., Richards, J., Stratton, P., Mariella, Jr., R., & Milanovich, F. 1999. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, **284**, 449–450.
- Belgrader, P., Okuzumi, M., Pourahmadi, F., Borkholder, D.A., & Northrup, M.A. 2000. A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis. *Biosensors and bioelectronics*, **14**, 849–852.
- Belgrader, P., Young, S., Yuan, B., Primeau, M., Christel, L.A., Pourahmadi, F., & Northrup, M.A. 2001. A battery-powered notebook thermal cycler for rapid multiplex real-time PCR analysis. *Analytical chemistry*, **73**, 286–289.
- Bontoux, N. 2006. *Analyse du transcriptome d'une cellule unique grâce à une puce microfluidique*. Ph.D. thesis, Université Paris VI.
- Brandrup, J., & Immergut, E.H. (eds). 1989. *Polymer handbook, third edition*. Wiley Interscience.
- Braziers, P. R., Jennings, S. G., & Latham, J. 1972. Interaction of falling water drops : coalescence. *Proceedings of the royal society of london serie a*, **326**, 393–408.
- Brenner, H., & Bungay, P.M. 1971. Rigid-particle and liquid-droplet models of red cell motion in capillary tubes. *Federal proceedings*, **30**, 1565–1576.

- 
- Bretherton, F.P. 1961. The motion of long bubbles in tubes. *Journal of fluid mechanics*, **10**, 279–301.
- Brivio, M., Verboom, W., & Reinhoudt, D.N. 2006. Miniaturized continuous flow reaction vessels : influence on chemical reactions. *Lab on a chip*, **6**, 329–344.
- Burg, T.P., Godin, M., Knudsen, S.M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J.S., Babcock, K., & Manalis, S.R. 2007. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, **446**, 1066–1069.
- Burns, J.-P., & Ramshaw, C. 2001. The intensification of rapid reactions in multi-phase systems using slug flow in capillaries. *Lab on a chip*, **1**, 10–15.
- Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmasandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Hedsinger, D., Mastrangelo, C.H., & Burke, D.T. 1998. An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, **282**, 484–487.
- Cady, N.C., Stelick, S., Kunnavakkam, M.V., & Batt, C.A. 2005. Real-time detection of lysteria monocytogenes using an integrated microfluidics platform. *Sensors and actuators b*, **107**, 332–341.
- Cai, L., Friedman, N., & Xie, X.S. 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, **440**, 358–362.
- Chabert, M, Dorfman, K.D., & Viovy, J-L. 2005. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. *Electrophoresis*, **26**, 3706–3715.
- Chabert, M., Dorfman, K.D., de Cremoux, P., Roeraade, J., & Viovy, J.-L. 2006. Automated microdroplet platform for sample manipulation and polymerase chain reaction. *Analytical chemistry*, **78**, 7722–7728.
- Chan, E.M., Alivisatos, A.P., & Mathies, R.A. 2005. High-temperature microfluidic synthesis of CdSe nanocrystals in nanoliter droplets. *Journal of the american chemical society*, **127**, 13854–13861.
- Chan, P.C.-H., & Leal, L.G. 1979. The motion of a deformable drop in a second-order fluid. *Journal of fluid mechanics*, **92**, 131–170.
- Chang, Y-H., Lee, G-B., Huang, F-C., Chen, Y-Y., & Lin, J-L. 2006. Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics. *Biomedical micro-devices*, **8**, 215–225.
- Chaudhury, M.K., & Whitesides, G.M. 1992. How to Make Water Run Uphill. *Science*, **256**, 1539–1541.

- Chen, D.L., Li, L., Reyes, S., Adamson, D.N., & Ismagilov, R.F. 2007. Using three-phase flow of immiscible liquids to prevent coalescence of droplets in microfluidic channels : Criteria to identify the third liquid and validation with protein crystallization. *Langmuir*, **23**, 2255–2260.
- Chen, J., Wabuyele, M., Chen, H., Patterson, D., Hupert, M., Shadpour, H., Nikitopoulos, D., & Soper, S.A. 2005. Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Analytical chemistry*, **77**, 658–666.
- Chen, J.Z., Darhuber, A.A., Troian, S.M., & Wagnera, S. 2004. Capacitive sensing of droplets for microfluidic devices based on thermocapillary actuation. *Lab on a chip*, **4**, 473–480.
- Chiou, J., Matsudaira, P., Sonin, A., & Ehrlich, D. 2001. A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine. *Analytical chemistry*, **73**, 2018–2021.
- Chittur, K.K., McIntire, L.V., & Rich, R.R. 1988. Shear stress effect on human T cell function. *Biotechnology progress*, **4**, 89–96.
- Chmela, E., Tijssen, R., Blom, M.T., Gardeniers, H.J.G.E., & van den Berg, A. 2002. A chip system for size separation of macromolecules and particles by hydrodynamic chromatography. *Analytical chemistry*, **74**, 3470–3475.
- Cohen, I., Li, H., Hougland, J.L., Mrksich, M., & Nagel, S.R. 2001. Using Selective Withdrawal to Coat Microparticles. *Science*, **292**, 265–267.
- Cottrell, F.G., & Speed, J.B. 1911. Separating and collecting particles of one liquid suspended in another liquid. *Us patent 987 115*.
- Coulliette, C., & Pozrikidis, C. 1998. Motion of an array of drops through a cylindrical tube. *Journal of fluid mechanics*, **358**, 1–28.
- Cristobal, G., Benoit, J.-P., Joanicot, M., & Ajdari, A. 2006a. Microfluidic bypass for efficient passive regulation of droplet traffic at a junction. *Applied physics letters*, **89**, 034104–034106.
- Cristobal, G., Arbouet, L., Sarrazin, F., Talaga, D., Brunel, J.-L., Joanicot, M., & Servant, L. 2006b. On-line laser raman spectroscopic probing of droplets engineered in microfluidic devices. *Lab on a chip*, **6**, 1140–1146.
- Cubaud, T., & Mason, T.G. 2006. Folding of viscous threads in diverging microchannels. *Physical review letters*, **96**, 114501–114504.
- Curcio, M. 2003. *Improved techniques for high-throughput molecular diagnostics*. Ph.D. thesis, KTH Stockholm, Sweden.

- Curcio, M., & Roeraade, J. 2003. Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification. *Analytical chemistry*, **75**, 1–7.
- Cygan, Z.T., Cabral, J.T., Beers, K.L., & Amis, E.J. 2005. Microfluidic platform for the generation of organic-phase microreactors. *Langmuir*, **21**, 3629–3634.
- Daniel, S., Chaudhury, M.K., & deGennes, P.-G. 2005. Vibration-actuated drop motion on surfaces for batch microfluidic processes. *Langmuir*, **21**, 4240–4248.
- Davis, M.H. 1964. Two charged spherical conductors in a uniform electric field : Forces and field strength. *Quarterly journal of mechanics and applied mathematics*, **17**, 499–511.
- de Cremoux, P., Bieche, I., Tran-Perennou, C., Vignaud, S., Boudou, E., Asselain, B., Lidereau, R., Magdelenat, H., Becette, V., Sigal-Zafrani, B., & Spyrtos, F. 2004. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrine related cancer*, **11**(3), 489–495.
- Dendukuri, D., Tsoi, K., Hatton, T.A., & Doyle, P.S. 2005. Controlled synthesis of nonspherical microparticles using microfluidics. *Langmuir*, **21**, 2113–2116.
- Di Carlo, D., H.-K., Jeong, & Lee, L.P. 2003. Reagentless mechanical cell lysis by nanoscale barbs in microchannels for sample preparation. *Lab on a chip*, **3**, 287–291.
- DiCarlo, D., Aghdam, N., & Lee, L.P. 2006. Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays. *Analytical chemistry*, **78**, 4925–4930. Voir aussi la revue correspondante accessible en ligne à [http://pubs.acs.org/subscribe/journals/ancham/78/i23/pdf/1206feature\\_ee.pdf](http://pubs.acs.org/subscribe/journals/ancham/78/i23/pdf/1206feature_ee.pdf).
- Dittrich, P.S., & Manz, A. 2006. Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nature reviews in drug discovery*, **5**, 210–218.
- Dittrich, P.S., Tachikawa, K., & Manz, A. 2006. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical chemistry*, **78**, 3887–3908.
- Dorfman, K.D., Chabert, M., Codarbox, J.-H., Rousseau, G., de Cremoux, P., & Viovy, J.-L. 2005. Contamination-free continuous flow microfluidic polymerase chain reaction for quantitative and clinical applications. *Analytical chemistry*, **77**, 3700–3704.
- Doyle, P.S., Bibette, J., Bancaud, A., & Viovy, J.-L. 2002. Self-Assembled Magnetic Matrices for DNA Separation Chips. *Science*, **295**, 2237.

- Dreyfus, R., Tabeling, P., & Willaime, H. 2003. Ordered and disordered patterns in two-phase flow in microfluidics. *Physical review letters*, **90**, 144505–144507.
- Duffy, D.C., McDonald, J.C., Schueller, O.J.A., & Whitesides, G.M. 1998. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical chemistry*, **70**, 4974–4984.
- Dupin, M.M., Halliday, I., & Care, C.M. 2006. Simulation of a microfluidic flow-focusing device. *Physical review E*, **73**, 055701–055705.
- Earnshaw, J.C., Johnson, E.G., Carroll, B.J., & Doyle, P.J. 1996. The drop volume method for interfacial tension determination : an error analysis. *Journal of colloid and interface science*, **177**, 150–155.
- Easley, C.J., Legendre, L.A., Roper, M.G., Wavering, T.A., Ferrance, J.P., & Landers, J.P. 2005. Extrinsic fabry-perot interferometry for noncontact temperature control of nanoliter-volume enzymatic reactions in glass microchips. *Analytical chemistry*, **77**, 1038–1045.
- Edgar, J.S., Pabbati, C.P., Lorenz, R.M., He, M., Fiorini, G.S., & Chiu, D.T. 2006. Capillary electrophoresis separation in the presence of an immiscible boundary for droplet analysis. *Analytical chemistry*, **78**, 6948–6954.
- El-Ali, J., Gaudet, S., Gunther, A., Sorger, P.K., & Jensen, K.F. 2005. Cell stimulus and lysis in a microfluidic device with segmented gas-liquid flow. *Analytical chemistry*, **77**, 3629–3636.
- El-Ali, J., Sorger, P.K., & Jensen, K.F. 2006. Cells on chips. *Nature*, **442**, 403–411.
- Engl, W., Roche, M., Colin, A., Panizza, P., & Ajdari, A. 2005. Droplet traffic at a simple junction at low capillary numbers. *Physical review letters*, **95**, 208304–208306.
- Eow, J.S., Ghadiri, M., Sharif, A.O., & Williams, T.J. 2001. Electrostatic enhancement of coalescence of water droplets in oil : a review of the current understanding. *Chemical engineering journal*, **84**, 173–192.
- Evander, M., Johansson, L., Lilliehorn, T., Piskur, J., Lindvall, M., Johansson, S., Almqvist, M., Laurell, T., & Nilsson, J. 2007. Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays. *Analytical chemistry*, **79**, 2984–2991.
- Fouillet, Y., Jary, D., Brachet, A.G., Chabrol, C., Boutet, J., Clementz, P., Lauro, D., Charles, R., & Peponnet, C. 2005. Design and validation of a complex generic fluidic microprocessor based on EWOD droplet for biological applications. *Proceedings of microtas 2005*, 58–61.

- Fu, A.Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F.H., & Quake, S.R. 1999. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nature biotechnology*, **17**, 1109–1111.
- Fu, A.Y., Chou, H.-P., Spence, C., Arnold, F.H., & Quake, S.R. 2002. An integrated microfabricated cell sorter. *Analytical chemistry*, **74**, 2451–2457.
- Fu, L.-M., Yang, R.-J., Lin, C.-H., & Chien, Y.-S. 2005. A novel microfluidic mixer utilizing electrokinetic driving forces under low switching frequency. *Electrophoresis*, **26**, 1814–1824.
- Fuerstman, M.J., Garstecki, P., & Whitesides, G.M. 2007. Coding/Decoding and Reversibility of Droplet Trains in Microfluidic Networks. *Science*, **315**, 828–832.
- Ganan-Calvo, A.M., & Gordillo, J.M. 2001. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Physical review letters*, **87**, 274501–274503.
- Garstecki, P., Gitlin, I., DiLuzio, W., Whitesides, G.M., Kumacheva, E., & Stone, H.A. 2004. Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device. *Applied physics letters*, **85**, 2649–2651.
- Garstecki, P., Stone, H.A., & Whitesides, G.M. 2005a. Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries : A route to monodisperse emulsions. *Physical review letters*, **94**, 164501–164504.
- Garstecki, P., Fuerstman, M.J., & Whitesides, G.M. 2005b. Nonlinear dynamics of a flow-focusing bubble generator : An inverted dripping faucet. *Physical review letters*, **94**, 234502–234504.
- Garstecky, P., Fuerstman, M.J., Stone, H.A., & Whitesides, G.M. 2006. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T junction : scaling and mechanism of break-up. *Lab on a chip*, **6**, 437–446.
- Gauglitz, P.A., & Radke, C.J. 1989. Dynamics of haines jumps for compressible bubbles in constricted capillaries. *Aiche journal*, **35**, 230–240.
- Gauglitz, P.A., & Radke, C.J. 1990. The dynamics of liquid film breakup in constricted cylindrical capillaries. *Journal of colloid and interface science*, **134**, 14–40.
- Gerdts, C.J., Sharoyan, D.E., & Ismagilov, R.F. 2004. A synthetic reaction network : Chemical amplification using nonequilibrium autocatalytic reactions coupled in time. *Journal of the american chemical society*, **126**, 6327–6331.
- Gervais, T., El Ali, J., Günther, A., & Jensen, K.F. 2006. Flow induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab on a chip*, **6**, 500–507.
- Giddings, J.C. 1993. Field-flow fractionation : analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science*, **260**, 1456–1465.

- Giordano, B.C., Ferrance, J., Swedberg, S., Huhmer, A.F.R., & Landers, J.P. 2001. Polymerase chain reaction in polymeric microchips : DNA amplification in less than 240 seconds. *Analytical biochemistry*, **291**, 124–132.
- Goldsmith, H.L., & Mason, S.G. 1963. The flow of suspensions through tubes II. single large bubbles. *Journal of colloid and interface science*, **18**, 237–261.
- Goulpeau, J. 2006. *Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluidique*. Ph.D. thesis, Université Paris VI.
- Grier, David G. 2003. A revolution in optical manipulation. *Nature*, **424**, 810–816.
- Griffiths, A.D., & Tawfik, D.S. 2006. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends in biotechnology*, **24**, 395–402.
- Grodrian, A., Metze, J., Henkel, T., Martin, K., Roth, M., & Kohler, J.M. 2004. Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosensors and bioelectronics*, **19**, 1421–1428.
- Gu, W., Zhu, X., Futai, N., Cho, B.S., & Takayama, S. 2004. Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, **101**, 15861–15866.
- Guillot, P., Panizza, P., Salmon, J.-B., Joanicot, M., Colin, A., Bruneau, C.-H., & Colin, T. 2006. Viscosimeter on a microfluidic chip. *Langmuir*, **22**, 6438–6445.
- Gunther, A., & Jensen, K.F. 2006. Multiphase microfluidics : from flow characteristics to chemical and materials synthesis. *Lab on a chip*, **6**, 1487–1503.
- Gunther, S.A., Khan, M.T., Trachsel, F., & Jensen, K.F. 2004. Transport and reaction in microscale segmented gas liquid flow. *Lab on a chip*, **4**, 278–286.
- Guttenberg, Z., Müller, H., Habermüller, H., Geisbauer, A., Pipper, J., Felbel, J., Kielpinsky, M., Scriba, J., & Wixforth, A. 2005. Planar chip device for PCR hybridization with surface acoustic wave pump. *Lab on a chip*, **5**, 308–317.
- Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z., Luedi, H., & Widmer, H.M. 1992. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Analytical chemistry*, **64**, 1926–1932.
- Hashimoto, M., Chen, P.-C., Mitchell, M.W., Nikitopolous, D.E., Soper, S.A., & Murphy, M.C. 2004. Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab on a chip*, **4**, 638–645.
- Hashimoto, M., Barany, F., & Soper, S.A. 2006. Polymerase chain reaction/ligase detection reaction/hybridization assays using flow-through microfluidic devices for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Biosensors and bioelectronics*, **21**, 1915–1923.

- Hatakeyama, T., Chen, D.L., & Ismagilov, R.F. 2006. Microgram-scale testing of reaction conditions in solution using nanoliter plugs in microfluidics with detection by MALDI-MS. *Journal of the american chemical society*, **128**, 2518–2519.
- He, M., Edgar, J.S., Jeffries, G.D.M., Lorenz, R.M., Shelby, J.P., & Chiu, D.T. 2005. Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets. *Analytical chemistry*, **77**, 1539–1544.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., & Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research*, **6**, 986–994.
- Herminghaus, S. 1999. Dynamical instability of thin liquid films between conducting media. *Physical review letter*, **83**, 2359–2361.
- Hertzog, D.E., Michalet, X., Jager, M., Kong, X., Santiago, J.G., Weiss, S., & Bakajin, O. 2004. Femtomole mixer for microsecond kinetic studies of protein folding. *Analytical chemistry*, **76**, 7169–7178.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., & Griffiths, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**, 413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis : Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026–1030.
- Ho, B.P., & Leal, L.G. 1975. The creeping motion of liquid drops through a circular tube of comparable diameter. *Journal of fluid mechanics*, **71**, 361–383.
- Hodges, S.R., Jensen, O.E., & Rallison, J.M. 2004. The motion of a viscous drop through a cylindrical tube. *Journal of fluid mechanics*, **501**, 279–301.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R.S., & Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' rightarrow 3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proceedings of the national academy of sciences usa*, **88**(16), 7276–7280.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R.S., Saiki, R.K, & Gelfand, D.H. 1992. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' rarr 3' Exonuclease Activity of Thermus aquaticus DNA Polymerase. *Clinical chemistry*, **38**, 462–463.
- Hong, J.W., Fuji, T., Seki, M., Yamamoto, T, & Endo, I. 2001. Integration of gene amplification and capillary gel electrophoresis on a polydimethylsiloxane-glass hybrid microchip. *Electrophoresis*, **22**, 328–333.

- Hong, J.W., Studer, V., Hang, G., Anderson, W.F., & Quake, S.R. 2004. A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nature biotechnology*, **22**, 435–439.
- Hoorfar, J., & Cook, N. 2003. Critical aspects of standardisation of PCR. *Methods in molecular biology*, **216**, 51–64.
- Hosokawa, K., Fujii, T., & Endo, I. 1999. Handling of picoliter liquid samples in a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device. *Analytical chemistry*, **71**, 4781–4785.
- Hu, X., Bessette, P.H., Qian, J., Meinhart, C.D., Daugherty, P.S., & Soh, H.T. 2005. Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, **102**, 15757–15761.
- Huang, F-C., Liao, C-S., & Lee, G-B. 2006. An integrated microfluidic chip for DNA/RNA amplification, electrophoresis separation and on-line optical detection. *Electrophoresis*, **27**, 3297–3305.
- Huang, L.R., Cox, E.C., Austin, R.H., & Sturm, J.C. 2004. Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement. *Science*, **304**, 987–990.
- Hudson, S. D. 2003. Wall migration and shear-induced diffusion of fluid droplets in emulsions. *Physics of fluids*, **15**, 1106–1113.
- Huebner, A., Srisa-Art, M., Holt, D., Abell, C., Hollfelder, F., deMello, A.J., & Edel, J.B. 2007. Quantitative detection of protein expression in single cells using droplets microfluidics. *Chemical communications*, 1218–1220.
- Huh, D., Bahng, J.H., Ling, Y., Wei, H.-H., Kripfgans, O.D., Fowlkes, J.B., Grothberg, J.B., & Takayama, S. 2007. Gravity-driven microfluidic particle sorting device with hydrodynamic separation amplification. *Analytical chemistry*, **79**, 1369–1376.
- Hung, L.-H. and Choi, K.M., Tseng, W.-Y., Tan, YC-C., K.J., Sheab, & Lee, A.P. 2006. Alternating droplet generation and controlled dynamic droplet fusion in microfluidic device for CdS nanoparticle synthesis. *Lab on a chip*, **6**, 174–178.
- Ichimura, K., Oh, S.-K., & Nakagawa, M. 2000. Light-Driven Motion of Liquids on a Photoresponsive Surface. *Science*, **288**, 1624–1626.
- Ionescu-Zanetti, C., Shaw, R.M., Seo, J., Jan, Y.-N., Jan, L.Y., & Lee, L.P. 2005. Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, **102**, 9112–9117.

- 
- Irimia, D., Tompkins, R.G., & Toner, M. 2004. Single-cell chemical lysis in picoliter-scale closed volumes using a microfabricated device. *Analytical chemistry*, **76**, 6137–6143.
- Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M., & Locascio, L.E. 2004. Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *Journal of the american chemical society*, **126**, 2674–2675.
- Jensen, K.F. 2001. Microreaction engineering – is small better? *Chemical engineering science*, **56**, 293–303.
- Jeong, W., Kim, J., Kim, S., Lee, S., Mensing, G., & Beebe, D.J. 2004. Hydrodynamic microfabrication via on the fly photopolymerization of microscale fibers and tubes. *Lab on a chip*, **4**, 576–580.
- Joanicot, M., & Ajdari, A. 2005. Applied physics : Droplet Control for Microfluidics. *Science*, **309**, 887–888.
- Jones, T.B. 2002. On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting. *Langmuir*, **18**, 4437–4443.
- Kamholz, A.E., Weigl, B.H., Finlayson, B.A., & Yager, P. 1999. Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel : The T-sensor. *Analytical chemistry*, **71**, 5340–5347.
- Khandurina, J., McKnight, T.E., Jacobson, S.C., Waters, L.C., Foote, R.S., & Ramsey, J.M. 2000. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis of microfluidic devices. *Analytical chemistry*, **72**, 2995–3000.
- Khine, M., Lau, A., Ionescu-Zanetti, C., Seo, J., & Lee, L.P. 2005. A single cell electroporation chip. *Lab on a chip*, **5**, 38–43.
- Kim, E., Xia, Y., & Whitesides, G.M. 1995. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, **376**, 581–584.
- Kim, J., Chaudhury, M.K., & Owen, M.J. 2000. Hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane elastomer exposed to partial electrical discharge. *Journal of colloid and interface science*, **226**, 231–236.
- Knight, J.B., Vishwanath, A., Brody, J.P., & Austin, R.H. 1998. Hydrodynamic focusing on a silicon chip : Mixing nanoliters in microseconds. *Physical review letters*, **80**, 3863–3866.
- Kobayashi, J., Mori, Y., Okamoto, K., Akiyama, R., Ueno, M., Kitamori, T., & Kobayashi, S. 2004. A Microfluidic Device for Conducting Gas-Liquid-Solid Hydrogenation Reactions. *Science*, **304**, 1305–1308.

- Kopp, M.U., de Mello, A.J., & Manz, A. 1998. Chemical amplification : Continuous-flow PCR on a chip. *Science*, **280**, 1046–1048.
- Kotz, K.T., Noble, K.A., & Faris, G.W. 2004. Optical microfluidics. *Applied physics letters*, **85**, 2658–2660.
- Krishnan, M., Ugaz, V.M., & Burns, M.A. 2002. PCR in a Rayleigh-Benard Convection Cell. *Science*, **298**, 793.
- Lagally, E.T., Mednitz, I., & Mathies, R.A. 2001. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Analytical chemistry*, **73**, 565–570.
- Lagally, E.T., Scherer, J.R., Blazej, R.G., Toriello, N.M., Diep, B.A., Ramchandani, M., Sensabaugh, G.F., Riley, L.W., & Mathies, R.A. 2004. Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Analytical chemistry*, **76**(11), 3162–3170.
- Lamb, H. 1932. *Hydrodynamics, 6th edition*.
- Landers, J.P. 2003. Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Analytical chemistry*, **75**, 2919–2927.
- Laval, P., Salmon, J.B., & Joanicot, M. 2007a. A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics. *Journal of cristal growth*, **303**, 622–628.
- Laval, P., Lisai, N., Salmon, J.-B., & Joanicot, M. 2007b. A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics. *Lab on a chip*, **7**, 829–834.
- Lee, D.-S., Park, S.H., Yang, H., Chung, K.-H., Yoon, T.H., Kim, S.-J., Kim, K., & Kim, Y.Y. 2004. Bulk-micromachined submicroliter-volume PCR chip with very rapid thermal response and low power consumption. *Lab on a chip*, **4**, 401–407.
- Legendre, L.A., Bienvenue, J.M., Roper, M.G., Ferrance, J.P., & Landers, J.P. 2006. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of dna from nanoliter-volume samples. *Analytical chemistry*, **78**, 1444–1451.
- Leng, J., Lonetti, B., Tabeling, P., Joanicot, M., & Ajdari, A. 2006. Microevaporators for kinetic exploration of phase diagrams. *Physical review letters*, **96**, 084503–084505.
- Leng, J., Joanicot, M., & Ajdari, A. 2007. Microfluidic exploration of the phase diagram of a surfactant/water binary system. *Langmuir*, **23**, 2315–2317.

- Li, H., Gyllenstein, U.B., Cui, X., Saiki, R.K., Erlich, H.A., & Arnheim, N. 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, **335**, 414–417.
- Li, L., Boedicker, J.Q., & Ismagilov, R.F. 2007. Using a multijunction microfluidic device to inject substrate into an array of preformed plugs without cross-contamination : Comparing theory and experiments. *Analytical chemistry*, **79**, 2756–2761.
- Liao, C-S., Lee, G-B., Liu, H-S., Hsieh, T-M., & Luo, C-H. 2005. Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses. *Nucleic acids research.*, **33**, e156.
- Liau, A., Karnik, R., Majumdar, A., & Cate, J.H.D. 2005. Mixing crowded biological solutions in milliseconds. *Analytical chemistry*, **77**, 7618–7625.
- Lidstrom, M.E., & Meldrum, D.R. 2003. Life-on-a-chip. *Nature reviews microbiology*, **1**, 158–164.
- Lien, K-Y., Lee, W-C., Lei, H-Y., & Lee, G-B. 2007. Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection. *Biosensors and bioelectronics*, **22**, 1739–1748.
- Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A., & Stone, H. A. 2004. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Physical review letters*, **92**, 054503–054507.
- Link, D.R., Grasland-Mongrain, E., Duri, E., Sarrazin, F., Cheng, Z., Cristobal, G., Marquez, M., & Weitz, D.A. 2006. Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angewandte chemie international edition*, **45**, 2556–2560.
- Liu, J., Enzelberger, M., & Quake, S. 2002. A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, **23**, 1531–1536.
- Liu, J., Hansen, C., & Quake, S.R. 2003. Solving the "world-to-chip" interface problem with a microfluidic matrix. *Analytical chemistry*, **75**, 4718–4723.
- Liu, R.H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J., & Grodzinski, P. 2004. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Analytical chemistry*, **76**, 1824–1831.
- Liu, Y., Ganser, D., Schneider, A., Liu, R., Grodzinski, P., & Kroutchinina, N. 2001. Microfabricated polycarbonate CE devices for DNA analysis. *Analytical chemistry*, **73**, 4196–4201.
- Lorenz, R.M., Edgar, J.S., Jeffries, G.D.M., & Chiu, D.T. 2006. Microfluidic and optical systems for the on-demand generation and manipulation of single femtoliter-volume aqueous droplets. *Analytical chemistry*, **78**, 6433–6439.

- Lorenz, R.M., Edgar, J.S., Jeffries, G.D.M., Zhao, Y., McGloin, D., & Chiu, D.T. 2007. Vortex-trap-induced fusion of femtoliter-volume aqueous droplets. *Analytical chemistry*, **79**, 224–228.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A., & Mather, E.J. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1–6.
- Luo, C., Yang, X., Fu, Q., Sun, M., Ouyang, Q., Chen, Q.Y., & Ji, H. 2006. Picoliter-volume aqueous droplets in oil : Electrochemical detection and yeast cell electroporation. *Electrophoresis*, **27**(10), 1977–1983.
- Lutz, B.R., Chen, J., & Schwartz, D.T. 2006. Hydrodynamic tweezers : 1. noncontact trapping of single cells using steady streaming microeddies. *Analytical chemistry*, **78**, 5429–5435.
- Lyuksyutov, I.F., Naugle, D.G., & Rathnayaka, K.D.D. 2004. On-chip manipulation of levitated femtodroplets. *Applied physics letters*, **85**, 1817–1819.
- Manz, A., Miyahara, Y., Miura, J., Watanabe, Y., Miyagi, H., & Sato, K. 1990a. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. *Sensors and actuators B : Chemical*, **1**, 249–255.
- Manz, A., Graber, N., & Widmer, H. M. 1990b. Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B : Chemical*, **1**, 244–248.
- Marcus, J.S., Anderson, W.F., & Quake, S.R. 2006a. Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Analytical chemistry*, **78**, 3084–3089.
- Marcus, J.S., Anderson, W.F., & Quake, S.R. 2006b. Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics. *Analytical chemistry*, **78**, 956–958.
- Margulies, M., & al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**, 376–380.
- Martinez, M.J., & Udell, K.S. 1990. Axisymmetric creeping motion of drops through circular tubes. *Journal of fluid mechanics*, **210**, 565–591.
- McClain, M.A., Culbertson, C.T., Jacobson, S.C., Allbritton, N.L., Sims, C.E., & Ramsey, J.M. 2003. Microfluidic devices for the high-throughput chemical analysis of cells. *Analytical chemistry*, **75**(21), 5646–5655.
- McDonald, J.C., & Whitesides, G.M. 2002. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of chemical research*, **35**, 491–499.

- Menetrier-Deremble, L., & Tabeling, P. 2006. Droplet breakup in microfluidic junctions of arbitrary angles. *Physical review E (statistical, nonlinear, and soft matter physics)*, **74**, 035303–035307.
- Minc, N. 2005. *Microfluidique et billes magnétiques auto-organisées pour les analyses biologiques*. Ph.D. thesis, Université Paris VI.
- Ménétrier-Deremble, L. 2007. *Gouttes et champs électriques dans un système microfluidique*. Ph.D. thesis, Université Paris VI.
- Morrison, T., Hurley, J., Garcia, J., Yoder, K., Katz, A., Roberts, D., Cho, J., Kaniyan, T., Ilyin, S.E., Horowitz, D., Dixon, J.M., & Brenan, C.J.H. 2006. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic acids research*, **34**, e123.
- Nakano, H., Matsuda, K., Yohda, M., Nagamune, T., Endo, I., & Yamane, T. 1994. High speed polymerase chain reaction in constant flow. *Biosciences, biotechnology and biochemistry*, **58**, 349–352.
- Nakayama, T., Kurosawa, Y., Furui, S., Kerman, K., Kobayashi, M., Rao, S., Yonezawa, Y., Nakano, K., Hino, A., Yamamura, S., Takamura, Y., & Tamiya, E. 2006. Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow pcr applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **386**, 1327–1333.
- Neuzil, P., Zhang, C., Pipper, J., Oh, S., & Zhuo, L. 2006. Ultra fast miniaturized real-time PCR : 40 cycles in less than six minutes. *Nucl. acids res.*, **34**, e77.
- Nie, Z., Xu, S., Seo, M., Lewis, P.C., & Kumacheva, E. 2005. Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors. *Journal of the american chemical society*, **127**, 8058–8063.
- Nisisako, T., Torii, T., & Higuchi, T. 2004. Novel microreactors for functional polymer beads. *Chemical engineering journal*, **101**, 23–29.
- Northrup, M.A., Ching, M.T., White, R.M., & Watson, R.T. 1993. DNA amplification in a microfabricated reaction chamber. *Transducer'93, seventh international conference on solid state sens actuators, Yokohama, Japan*, 924–926.
- Northrup, M.A., Benett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehew, S., Richards, J., & Stratton, P. 1998. A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. *Analytical chemistry*, **70**, 918–922.
- Obeid, P.J., Christopolous, T.K., Crabtree, H.J., & Backhouse, C.J. 2003. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Analytical chemistry*, **75**, 288–295.

- Oda, R.P., Strausbauch, M.A., Huhmer, A.F.R., Borson, N., Jurrens, S., Craighead, J., Wettstein, P.J., Eckloff, B., Kline, B., & Landers, J.P. 1998. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Analytical chemistry*, **70**, 4361–4368.
- Oh, H.-J., Kim, S.-H., Baek, J.-Y., Seong, G.-H., & Lee, S.-H. 2006. Hydrodynamic micro-encapsulation of aqueous fluids and cells via on the fly photopolymerization. *Journal of micromechanics and microengineering*, **16**, 285–291.
- Okushima, S., Nisisako, T., Torii, T., & Higuchi, T. 2004. Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices. *Langmuir*, **20**, 9905–9908.
- Olbricht, W.L. 1996. Pore-scale prototypes of multiphase flow in porous media. *Annual review of fluid mechanics*, **28**, 187–213.
- Olbricht, W.L., & Kung, D.M. 1987. The interaction and coalescence of liquid drops in flow through a capillary tube. *Journal of colloid and interface science*, **120**, 229–244.
- Olbricht, W.L., & Kung, D.M. 1992. The deformation and breakup of liquid drops in low reynolds number flow through a capillary. *Physics of fluids*, **4**, 1347–1354.
- Olbricht, W.L., & Leal, L.G. 1982. The creeping motion of liquid drops through a circular tube of comparable diameter : the effect of density differences between the fluids. *Journal of fluid mechanics*, **115**, 187–216.
- Paik, P., Pamula, V.K., Pollack, M.G., & Fair, R.B. 2003. Electrowetting-based droplet mixers for microfluidic systems. *Lab on a chip*, **3**, 28–33.
- Pal, D., & Venkataraman, V. 2002. A portable battery-operated chip thermocycler based on induction heating. *Sensors and actuators A*, **102**, 151–156.
- Pallandre, A., de Lambert, B., Attia, R., Jonas, A.M., & Viovy, J.-L. 2006. Surface treatment and characterization : Perspectives to electrophoresis and lab-on-chips. *Electrophoresis*, **27**, 584–610.
- Park, N., Kim, S.-J., & Hahn, J.H. 2003. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction. *Analytical chemistry*, **75**, 6029–6033.
- Paul, D., Pallandre, A., Miserere, S., Weber, J., & Viovy, J.-L. 2007. Lamination-based rapid prototyping of microfluidic devices using flexible thermoplastic substrates. *Electrophoresis*, **28**, 1115–1122.

- Peng, X.Y., & Li, P.C.H. 2004. A three-dimensional flow control concept for single-cell experiments on a microchip. 1. cell selection, cell retention, cell culture, cell balancing, and cell scanning. *Analytical chemistry*, **76**, 5273–5281.
- Perry, R.H., & Green, D.W. (eds). 1997. *Perry's chemical engineers handbook*. McGraw Hill, New York.
- Phongikaroon, S., Hoffmaster, R., Judd, K.P., Smith, G.B., & Handler, R.A. 2005. Effect of temperature on the surface tension of soluble and insoluble surfactants of hydrodynamical importance. *Journal of chemical engineering data*, **50**, 1602–1607.
- Pohl, H.A. 1958. Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *Journal of applied physics*, **29**, 1182–1188.
- Poiseuille, J.-L.-M. 1846. *Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres*. Imprimerie Royale.
- Pollack, M.G., Shenderov, A.D., & Fair, R.B. 2002. Electrowetting based actuation of droplets for integrated microfluidics. *Lab on a chip*, **2**, 96–101.
- Prakash, M., & Gershenfeld, N. 2007. Microfluidic Bubble Logic. *Science*, **315**, 832–835.
- Priest, C., Herminghaus, S., & Seemann, R. 2006. Controlled electrocoalescence in microfluidics : Targeting a single lamella. *Applied physics letters*, **89**, 134101–134103.
- Ramsey, J.M. 1999. The burgeoning power of the shrinking laboratory. *Nature biotechnology*, **17**, 1061–1062.
- Raser, J.M., & O'Shea, E.K. 2005. Noise in gene expression : Origins, consequences, and control. *Science*, **309**, 2010–2013.
- Ratulowski, J., & Chang, H.-C. 1990. Marangoni effects of trace impurities on the motion of long gas bubbles in capillaries. *Journal of fluid mechanics*, **210**, 303–328.
- Reiner, J. E., Crawford, A. M., Kishore, R. B., Goldner, L. S., Helmerson, K., & Gilson, M. K. 2006. Optically trapped aqueous droplets for single molecule studies. *Applied physics letters*, **89**, 013904–013907.
- Renaudin, A., Tabourier, P., Camart, J.-C., & Druon, C. 2006. Surface acoustic wave two-dimensional transport and location of microdroplets using echo signal. *Journal of applied physics*, **100**, 116101–116104.

- Rettig, J.R., & Folch, A. 2005. Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays. *Analytical chemistry*, **77**, 5628–5634.
- Reyes, D.R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A., & Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 1. introduction, theory, and technology. *Analytical chemistry*, **74**, 2623–2636.
- Roach, L.S., Song, H., & Ismagilov, R.F. 2005. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorosurfactants. *Analytical chemistry*, **77**, 785–796.
- Rolland, J.P., VanDam, R.M., Schorzman, D.A., Quake, S.R., & DeSimone, J.M. 2004. Solvent-resistant photocurable 'liquid teflon' for microfluidic device fabrication. *Journal of the american chemical society*, **126**, 2322–2323.
- Rommel, W., Meon, W., & Blass, E. 1992. Hydrodynamic modeling of droplet coalescence at liquid-liquid interfaces. *Separation science and technology*, **27**, 129–159.
- Roper, M.G., Easley, C.J., & Landers, J.P. 2005. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Analytical chemistry*, **77**, 3887–3894.
- Roper, M.G., Easley, C.J., Legendre, L.A., Humphrey, J.A.C., & Landers, J.P. 2007. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Analytical chemistry*, **79**(4), 1294–1300.
- Rye, H.S., Yue, S., Wemmer, D.E., Quesada, M.A., Haugland, R.P., Mathies, R.A., & Glazer, A.N. 1992. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes : properties and applications. *Nucleic acids research*, **20**, 2803–2812.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**(4732), 1350–1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839), 487–491.
- Schneegass, I., Bräutigam, R., & J.M., Köhler. 2001. Miniaturised flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler. *Lab on a chip*, **1**, 42–48.
- Scott, T. C., Basaran, O. A., & Byers, C. H. 1990. Characteristics of electric-field-induced oscillations of translating liquid droplets. *Industrial and engineering chemistry research*, **29**, 901–909.

- 
- Scully, R., & Puget, N. 2002. BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. *Biochimie*, **84**(1), 95–102.
- Seo, M., Nie, Z., Xu, S., Mok, M., Lewis, P.C., Graham, R., & Kumacheva, E. 2005. Continuous microfluidic reactors for polymer particles. *Langmuir*, **21**, 11614–11622.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., & Church, G.M. 2005. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*, **309**, 1728–1732.
- Shepherd, R.F., Conrad, J.C., Rhodes, S.K., Link, D.R., Marquez, M., Weitz, D.A., & Lewis, J.A. 2006. Microfluidic assembly of homogeneous and janus colloid-filled hydrogel granules. *Langmuir*, **22**, 8618–8622.
- Shestopalov, I., Tice, J.D., & Ismagilov, R.F. 2004. Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system. *Lab on a chip*, **4**, 316–321.
- Simonnet, C., & Groisman, A. 2006. High-throughput and high-resolution flow cytometry in molded microfluidic devices. *Analytical chemistry*, **78**, 5653–5663.
- Sims, C.E., & Allbritton, N.L. 2007. Analysis of single mammalian cells on chip. *Lab on a chip*, **7**, 423–440.
- Small, H.U.R. 1974. Hydrodynamic chromatography a technique for size analysis of colloidal particles. *Journal of colloid and interface science*, **48**, 147–161.
- Son, Y., Martys, N.S., Hagedorn, J.G., & Migler, K.B. 2003. Suppression of capillary instability of a polymeric thread via parallel plate confinement. *Macromolecules*, **36**, 5825–5833.
- Song, H., & Ismagilov, R.F. 2003. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *Journal of the american chemical society*, **125**, 14613–14619.
- Song, H., Bringer, M.R., Tice, J.D., Gerdts, C.J., & Ismagilov, R.F. 2003a. Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels. *Applied physics letters*, **83**, 4664–4666.
- Song, H., Tice, J.D., & Ismagilov, R.F. 2003b. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte chemie international edition*, **42**, 767–772.
- Song, H., Li, H.-W., Munson, M.S., VanHa, T.G., & Ismagilov, R.F. 2006a. On-chip titration of an anticoagulant argatroban and determination of the clotting time

- within whole blood or plasma using a plug-based microfluidic system. *Analytical chemistry*, **78**, 4839–4849.
- Song, H., Chen, D.L., & Ismagilov, R.F. 2006b. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte chemie international edition*, **45**, 7336–7356.
- Squires, T.M., & Quake, S.R. 2005. Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of modern physics*, **77**, 977–1027.
- Srinivasan, V, Pamula, V.K., & Fair, R.B. 2004. An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab on a chip*, **4**, 310–315.
- Stone, H.A., Stroock, A.D., & Ajdari, A. 2004. Engineering flows in small devices : Microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annual review of fluid mechanics*, **36**, 381–411.
- Stroock, A.D., Dertinger, S.K.W., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H.A., & Whitesides, G.M. 2002. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science*, **295**, 647–651.
- Subramanyam, S.V. 1969. A note on the damping and oscillations of a fluid drop moving in another fluid. *Journal of fluid mechanics*, **37**, 715–725.
- Sun, K., Yamaguchi, A., Ishida, Y., Matsuo, S., & Misawa, H. 2002. A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR. *Sensors and actuators b*, **84**, 283–289.
- Sun, Y., & Kwok, Y.C. 2006. Polymeric microfluidic system for DNA analysis. *Analytica chimica acta*, **556**, 80–96.
- Tabeling, P. 2003. *Introduction à la microfluidique*. Belin.
- Tabeling, P., Chabert, M., Dodge, A., Jullien, C., & Okkels, F. 2004. Chaotic mixing in cross-channel micromixers. *Philosophical transactions of the royal society A : Mathematical, physical and engineering sciences*, **362**, 987–1000.
- Takayama, S., Ostuni, E., LeDuc, P., Naruse, K., Ingber, D. E., & Whitesides, G. M. 2003. Selective chemical treatment of cellular microdomains using multiple laminar streams. *Chemistry and biology*, **10**, 123–130.
- Tan, N., Fisher, J.S., Lee, A.I., Cristini, V., & Lee, A.P. 2004. Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab on a chip*, **4**, 292–298.
- Tan, W-H., & Takeuchi, S. 2006. Timing controllable electrofusion device for aqueous droplet based microreactors. *Lab on a chip*, **6**, 757–763.

- Tan, Y.-C., & Lee, A.P. 2005. Microfluidic separation of satellite droplets as a basis of a micron and submicron emulsification system. *Lab on a chip*, **5**, 1178–1183.
- Tan, Y.-C., Hettiarachchi, K., Siu, M., Pan, Y.-R., & Lee, A.P. 2006. Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles. *Journal of the american chemical society*, **128**, 5656–5658.
- Tawfik, D.S., & Griffiths, A.D. 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature biotechnology*, **16**, 652–656.
- Taylor, G.I. 1953. The dispersion of soluble matter in a solvent flowing through a tube. *Proceedings of the royal society of london serie A*, **219**, 186–203.
- Taylor, G.I. 1964. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the royal society of london series A*, **280**, 383–397.
- They, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., & Bornens, M. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature cell biology*, **7**, 947–953.
- Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H., & Quake, S.R. 2001. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical review letters*, **86**, 4163–4166.
- Thorsen, T., Maerkl, S.J., & Quake, S.R. 2002. Microfluidic Large-Scale Integration. *Science*, **298**, 580–584.
- Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D., & Ismagilov, R.F. 2003. Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the reynolds and the capillary numbers. *Langmuir*, **19**, 9127–9133.
- Tice, J.D., Lyon, A.D., & Ismagilov, R.F. 2004. Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Analytica chimica acta*, **507**, 73–77.
- Tokeshi, M., Minagawa, T., Uchiyama, K., Hibara, A., Sato, K., Hisamoto, H., & Kitamori, T. 2002. Continuous-flow chemical processing on a microchip by combining microunit operations and a multiphase flow network. *Analytical chemistry*, **74**, 1565–1571.
- Toriello, N.M., Liu, C.N., & Mathies, R.A. 2006. Multichannel reverse transcription-polymerase chain reaction microdevice for rapid gene expression and biomarker analysis. *Analytical chemistry*, **78**(23), 7997–8003.
- Tyagi, S., & Kramer, F.R. 1996. Molecular beacons : Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*, **14**, 303–308.

- Unger, M.A., Chou, H.-P., Thorsen, T., Scherer, A., & Quake, S.R. 2000. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, **288**, 113–116.
- Urbanski, J.P., Thies, W., Rhodes, C., Amarasingheb, S., & Thorsen, T. 2006. Digital microfluidics using soft lithography. *Lab on a chip*, **6**, 96–104.
- Utada, A.S., Lorenceau, E., Link, D.R., Kaplan, P.D., Stone, H.A., & Weitz, D.A. 2005. Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device. *Science*, **308**, 537–541.
- Velev, O.D., Prevo, B.G., & Bhatt, K.H. 2003. On-chip manipulation of free droplets. *Nature*, **426**, 515–516.
- Vilkner, T., Janasek, D., & Manz, A. 2004. Micro total analysis systems. recent developments. *Analytical chemistry*, **76**, 3373–3386.
- Voldman, J., Gray, M.L., Toner, M., & Schmidt, M.A. 2002. A microfabrication-based dynamic array cytometer. *Analytical chemistry*, **74**, 3984–3990.
- Walsh, E. J., King, C., Grimes, R., & Gonzalez, A. 2005. Segmenting fluid effect on PCR reactions in microfluidic platforms. *Biomedical microdevices*, **7**, 269–272.
- Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M., & Stone, H.A. 2005. Microfluidic flow focusing : Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, **26**, 3716–3724.
- Warren, L., Bryder, D., Weissman, I.L., & Quake, S.R. 2006. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 17807–17812.
- Waters, L.C., Jacobson, S.C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R.S., & Ramsey, J.M. 1998. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Analytical chemistry*, **70**, 158–162.
- Watson, J.D., & Crick, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **171**, 737–738.
- Weber, J. 2005. *Nouvelle méthode de détection de mutations inconnues - applications au diagnostic génétique*. Ph.D. thesis, Paris 6.
- Wei, C.-W., Cheng, J.-Y., Huang, C.-T., Yen, M.-H., & Young, T.-H. 2005. Using a microfluidic device for 1 microliter DNA microarray hybridization in 500 s. *Nucleic acids research*, **33**, e78.

- Wheeler, A.R., Thronset, W.R., Whelan, R.J., Leach, A.M., Zare, R.N., Liao, Y.H., Farrell, K., Manger, I.D., & Daridon, A. 2003. Microfluidic device for single-cell analysis. *Analytical chemistry*, **75**, 3581–3586.
- Wheeler, E.K., Bennett, W., Stratton, P., Richards, J., Chen, A., Christian, A., Ness, K.D., Ortega, J., Li, L.G., Weisgraber, T.H., Goodson, K., & Milanovich, F. 2004. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Analytical chemistry*, **76**, 4011–4016.
- Wilding, P., Shoffner, M.A., & Kricka, L.J. 1994. PCR in a silicon microstructure. *Clinical chemistry*, **9**, 1815–1818.
- Willaime, H, Barbier, V., Kloul, L., Maine, S., & Tabeling, P. 2006. Arnold tongues in a microfluidic drop emitter. *Physical review letters*, **96**.
- Wittwer, C.T., & Garling, D.J. 1991. Rapid cycle DNA amplification : time and temperature optimization. *Biotechniques*, **10**, 76–83.
- Wittwer, C.T., Fillmore, G.C., & Hillyard, D.R. 1989. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic acids research*, **17**, 4353–4357.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A., & Balis, U.J. 1997. The lightcycler : a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, **22**, 176–181.
- Woolley, A.T., Hadley, D., Landre, P., de Mello, A.J., Mathies, R.A., & Northrup, M.A. 1996. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Analytical chemistry*, **68**, 4081–4086.
- Wu, H., Wheeler, A., & Zare, R.N. 2004. Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, **101**, 12809–12813.
- Xie, W.J., Cao, C.D., Lu, Y.J., Hong, Z.Y., & Wei, B. 2006. Acoustic method for levitation of small living animals. *Applied physics letters*, **89**, 214102–214104.
- Xu, Q., & Nakajima, M. 2004. The generation of highly monodisperse droplets through the breakup of hydrodynamically focused microthread in a microfluidic device. *Applied physics letters*, **85**, 3726–3728.
- Xu, S., Nie, Z., Seo, M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H.A., Garstecki, P., Weibel, D.B., Gitlin, I., & Whitesides, G.M. 2005. Generation of monodisperse particles by using microfluidics : Control over size, shape, and composition. *Angewandte chemie international edition*, **44**, 724–728.

- 
- Yamada, M., & Seki, M. 2006. Microfluidic particle sorter employing flow splitting and recombining. *Analytical chemistry*, **78**(4), 1357–1362.
- Yamada, M., Nakashima, M., & Seki, M. 2004. Pinched flow fractionation : Continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical chemistry*, **76**, 5465–5471.
- Yobas, L., Martens, S., Onga, W.-L., & Ranganathana, N. 2006. High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets. *Lab on a chip*, **6**, 1073–1079.
- Zeng, J., & Korsmeyer, T. 2004. Principle of droplet electrohydrodynamics for lab on a chip. *Lab on a chip*, **54**, 265–277.
- Zhang, C., & Xing, D. 2007. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis : latest advances and future trends. *Nucl. acids res.*, gkm389.
- Zhang, C., Xu, J., Ma, W., & Zheng, W. 2006a. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnology advances*, **24**, 243–284.
- Zhang, H., Tumarkin, E., Peerani, R., Nie, Z., Sullan, R.M.A., Walker, G.C., & Kumacheva, E. 2006b. Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *Journal of the american chemical society*, **128**, 12205–12210.
- Zhao, B., Moore, J.S., & Beebe, D.J. 2001. Surface-Directed Liquid Flow Inside Microchannels. *Science*, **291**, 1023–1026.
- Zheng, B., Roach, L.S., & Ismagilov, R.F. 2003. Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *Journal of the american chemical society*, **125**, 11170–11171.
- Zheng, B., Tice, J.D., Roach, L.S., & Ismagilov, R.F. 2004. A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction. *Angewandte chemie international edition*, **43**, 2455–2584.
- Zheng, B., Gerdts, C.J., & Ismagilov, R.F. 2005. Using nanoliter plugs in microfluidics to facilitate and understand protein crystallization. *Current opinion in structural biology*, **15**, 548–555.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. 2004. Investigations on dna intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*, **32**, e103.
-

---

## **Microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques**

Cette thèse présente divers dispositifs dédiés aux analyses biologiques fonctionnant sur le principe de la microfluidique diphasique.

Dans une première partie, nous décrivons la conception d'un système permettant d'effectuer en flux et sans contamination la réaction de PCR dans des microgouttes transportées par une huile immiscible. Cette étude a débouché sur une plateforme automatisée au débit théorique de 3000 échantillons par jour, égalant les systèmes actuels avec une consommation 50 fois moindre en réactifs.

Dans les parties suivantes, nous présentons deux nouvelles idées pour la manipulation d'objets en microfluidique digitale : l'utilisation de phénomènes hydrodynamiques pour encapsuler des cellules uniques dans des microgouttes et les trier, et l'application de champs électriques pour induire mélange et coalescence de gouttes aqueuses. La combinaison de ces deux méthodes au sein d'une même puce est le premier pas vers un système intégré d'analyse de cellules uniques.

## **Droplets microfluidics for biological analysis**

This thesis describes various tools for performing biological analysis in biphasic microfluidic devices.

In a first part, we demonstrate an automated droplets platform for performing PCR in microdroplets carried by immiscible oil. This system has a throughput comparable to that of the most recent classical devices and permits important savings in terms of manipulation times and reagents consumption.

We then study two new ideas for manipulating objects in droplets microfluidics. In a first part, we present a method for encapsulating single cells in drops and sorting these drops using only passive hydrodynamic effects. In the second part, we propose a technique to coalesce and mix two droplets using electric fields. Combination of these two methods is the first step toward an integrated single cell analysis device.

---