



**HAL**  
open science

# Outils microfluidiques pour la maladie d'Alzheimer: Etude de l'agrégation de l'amyloïde-B

Vincent Picot

► **To cite this version:**

Vincent Picot. Outils microfluidiques pour la maladie d'Alzheimer: Etude de l'agrégation de l'amyloïde-B. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2012. Français. NNT: . tel-00797071

**HAL Id: tel-00797071**

**<https://theses.hal.science/tel-00797071>**

Submitted on 5 Mar 2013

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Vincent PICOT**

**le** lundi 10 décembre 2012

**Titre :**

Outils microfluidiques pour la maladie d'Alzheimer :  
Etude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

**Unité de recherche :**

LAAS-Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

**Directeur(s) de Thèse :**

Pierre JOSEPH

**Jury (noms, prénoms et qualité des membres) :**

Mr Jean-Louis Viovy - Rapporteur

Mr Jean-Baptiste Salmon - Rapporteur

Mr Vincent STUDER - Examineur

Mr Peter Faller - Examineur

Mme Biscans Béatrice-Examinatrice



# Remerciements

Depuis mon arrivée au LAAS en octobre 2009, un peu plus de trois années se sont écoulées. Ce furent trois années enrichissantes aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Je poursuis mon aventure parmi vous pour encore une petite année que j'espère tout aussi épanouissante et puis après... un départ vers d'autres aventures qui je l'espère seront toutes aussi trépidantes que ces quatre années.

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Antoine Marty et Pierre Joseph, pour leur accueil, leur disponibilité, leur patience, leur conseil durant ces trois années qui m'ont permis de progresser et de découvrir l'univers fascinant de la recherche. Un grand merci à Peter Fallner, Christelle Hureau et Bruno Alies du Laboratoire de Chimie de Coordination pour les nombreuses discussions qui m'ont permis de mieux appréhender les mécanismes d'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ .

Je tiens aussi à remercier Jean-Louis Viovy et Jean-Baptiste Salmon d'avoir accepté le rôle de rapporteur, Peter Fallner pour avoir présidé le jury de thèse, Béatrice Biscans et Vincent Studer d'avoir fait le déplacement pour participer au jury de thèse.

Un grand merci à l'ensemble des personnels de Team qui m'ont permis de réaliser les différents dispositifs qui sont présentés dans ce manuscrit. Je tiens à remercier Xavier Dollat pour la conception et la réalisation des supports permettant l'utilisation des puces microfluidiques et l'ensemble des personnels de 2I avec lesquels j'ai collaboré durant ces trois années.

Bien sûr, ces trois années n'aurait pas été les mêmes sans les copains du laboratoire avec lesquels j'ai beaucoup échangé et pas seulement sur le plan scientifique, des blagues bien sûr, politique aussi autour d'un repas, d'un café ou de quelques bières... Merci donc à Ana, Fabien, Hubert, Joris, Loïc, Marc, Qihao, Sébastien, Stéphane, Teddy, Yannick...

Enfin, je tiens remercier Julia pour m'avoir accompagné dans les moments difficiles (surtout pendant la rédaction) et de joies qui ont émaillé ces trois années...

Merci à vous...



# Table des matières

<b>Avant propos</b>	<b>5</b>
<b>1 Contexte et positionnement de l'étude</b>	<b>7</b>
1.1 L'agrégation de l'Amyloïde- $\beta$ : une réaction clé dans la maladie d'Alzheimer . . .	7
1.1.1 La maladie d'Alzheimer . . . . .	7
1.1.2 Rôle de l'amyloïde- $\beta$ et de la protéine $\tau$ . . . . .	9
1.1.3 Conclusion . . . . .	13
1.2 Les laboratoires sur puces : des outils d'analyse biologique . . . . .	14
1.2.1 Une brève présentation . . . . .	14
1.2.2 Microfluidique pour l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . . . . .	15
1.3 Notre approche . . . . .	18
<b>2 Hydrodynamique et diffusion dans les systèmes microfluidiques</b>	<b>23</b>
2.1 Hydrodynamique des systèmes microfluidiques . . . . .	23
2.1.1 L'hydrodynamique à bas nombres de Reynolds . . . . .	23
2.1.2 Analogie entre hydrodynamique et électronique . . . . .	24
2.1.3 Conclusions . . . . .	26
2.2 Phénomène de diffusion dans les systèmes microfluidiques . . . . .	27
2.2.1 Notions de base de la diffusion . . . . .	27
2.2.2 Diffusion dans les microcanaux . . . . .	32
2.3 Application du phénomène de diffusion en microfluidique . . . . .	35
2.3.1 Les mélangeurs . . . . .	35
2.3.2 Génération de gradient de concentration à l'aide de puces microfluidiques	40
2.3.3 Étude de puce de réaction diffusion . . . . .	46
2.4 Conclusion . . . . .	50
<b>3 Microfabrication et intégration des systèmes microfluidiques</b>	<b>57</b>
3.1 Les technologies de fabrication des puces en silicium . . . . .	57
3.1.1 La photolithographie : . . . . .	57
3.1.2 La gravure du silicium . . . . .	59
3.1.3 Le scellement des puces . . . . .	60
3.2 La technologie de fabrication des puces PDMS . . . . .	61
3.2.1 L'étapes de fabrication de puces microfluidiques . . . . .	62
3.3 Intégration des systèmes . . . . .	63
3.3.1 Injections des fluides : . . . . .	63
3.3.2 Connexion des systèmes PDMS . . . . .	64
3.3.3 Connexion des systèmes en silicium . . . . .	65

<b>4</b>	<b>Conception de puces à "multi"-concentration pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde-<math>\beta</math></b>	<b>71</b>
4.1	Génération de gradient de concentration simple . . . . .	71
4.1.1	Conception et réalisation des puces . . . . .	71
4.1.2	Validation du fonctionnement des puces . . . . .	76
4.1.3	Expérimentation avec l'amyloïde- $\beta$ . . . . .	84
4.1.4	Conclusion . . . . .	86
4.2	Génération de gradient et déclenchement de l'agrégation sur puce . . . . .	87
4.2.1	Conception et réalisation des puces . . . . .	87
4.2.2	Validation du fonctionnement de nos puces . . . . .	93
4.2.3	Expérimentation avec l'amyloïde- $\beta$ . . . . .	99
4.2.4	Conclusion : Système de gradient avec déclencheur . . . . .	103
4.3	Conclusion : gradients pour le criblage . . . . .	105
<b>5</b>	<b>La mesure du coefficient de diffusion : une information sur l'agrégation de l'amyloïde-<math>\beta</math></b>	<b>109</b>
5.1	Notre approche et réalisation des systèmes . . . . .	109
5.1.1	Notre approche : mesure de la diffusion en présence d'agrégation . . . . .	109
5.1.2	Modèles permettant la mesure du coefficient de diffusion . . . . .	110
5.1.3	Conception des puces microfluidiques . . . . .	114
5.2	Validation de la mesure du coefficient de diffusion sur des molécules modèles . . . . .	115
5.2.1	Mesure avec les puces en PDMS . . . . .	116
5.2.2	Mesure avec les puces en verre-silicium . . . . .	119
5.2.3	Conclusion . . . . .	120
5.3	Étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . . . . .	121
5.3.1	Choix des peptides . . . . .	121
5.3.2	Marquage des peptides . . . . .	121
5.3.3	Mesure du coefficient de diffusion des peptides marqués . . . . .	127
5.3.4	Etude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . . . . .	131
5.4	Conclusion . . . . .	136
	<b>Conclusion</b>	<b>141</b>

# Avant propos

Dans les pays développés, nous assistons à un vieillissement de la population dû à l'amélioration des conditions de vie et à une baisse des taux de natalité. Il s'accompagne d'une augmentation des neuropathologies telles que la maladie d'Alzheimer, qui est due à la dégénérescence de neurones dans des zones localisées du cerveau. Au niveau clinique, cette maladie est caractérisée par des pertes de mémoire d'abord bénignes puis plus importantes ; avec l'évolution de la maladie nous assistons à une perte de la motricité donc de l'autonomie de la personne. Les malades nécessitent donc une prise en charge importante de la part des familles et des personnels soignant. Le très grand nombre de cas (860 000 en 2007), et son augmentation prévue (160 000 nouveaux cas chaque année), font de cette maladie un enjeu sociétal majeur.

Les recherches menées sur les mécanismes de la maladie ont permis de mettre en avant un peptide, l'amyloïde- $\beta$ , qui s'agrège au niveau des neurones pour former à leur surfaces des plaques séniles. Il semblerait que ce processus d'agrégation soit l'une des causes de la mort neuronale. Les études en biochimie ont montré qu'il s'agit d'un mécanisme complexe avec de nombreux intermédiaires et de nombreux paramètres influençant la réaction, tels que la concentration en peptide et en ions métalliques, le pH, la présence d'espèces oxydantes ou les propriétés de surfaces. De plus, il semblerait que les petits agrégats, qui sont difficilement caractérisables et observables avec les méthodes classiques, soient les plus cytotoxiques.

Les micro et nanotechnologies ouvrent de nouvelles pistes pour la biologie et la santé : les laboratoires sur puces sont prometteurs pour le diagnostic ou la délivrance de médicaments par exemple. Les microsystèmes sont cependant encore peu utilisés dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Dans le cadre de cette thèse, nous proposons de réaliser des outils microfluidiques permettant d'étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Nous nous intéresserons dans un premier temps à l'aspect multi-paramètres de la réaction en développant un dispositif de criblage simple permettant de tester l'influence d'une concentration sur l'agrégation. Pour cela, nous avons réalisé un système permettant de générer de nombreuses conditions de réaction tout en dissociant la préparation et le déclenchement de l'agrégation. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la cinétique des premiers instants de la réaction. Nous avons alors utilisé des configurations de réaction-diffusion qui permettent d'obtenir des informations sur les premiers intermédiaires de réaction.

Dans le chapitre 1, nous présentons un aperçu de la maladie d'Alzheimer, en nous intéressant particulièrement aux aspects biochimiques liés à l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Nous donnons ensuite les raisons qui font des laboratoires sur puces une technologie appropriée à l'étude de tels phénomènes. Enfin nous présentons plus en détails l'approche suivie dans ce travail.

Dans le chapitre 2, nous détaillons l'hydrodynamique dans les microcanaux et le phénomène de diffusion. Enfin, nous montrons comment hydrodynamique et diffusion guident la conception des systèmes microfluidiques, à travers un état de l'art sur les mélangeurs, la génération de gradient de concentration et l'étude des phénomènes de réaction-diffusion.

Dans le chapitre 3, nous détaillons les méthodes de fabrication utilisées pour réaliser nos systèmes microfluidiques, ainsi que les méthodes de connexion utilisées entre les puces et les systèmes

d'injection. Dans le chapitre 4, nous présentons la conception des systèmes microfluidiques à multi-conditions ainsi que les méthodes de validation de leur fonctionnement. Tout d'abord, nous avons réalisé un système microfluidique permettant d'échantillonner linéairement les concentrations sur neuf sorties dans lequel nous avons mené des tests sur l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Dès l'injection des peptides, nous avons observé la formation de gros agrégats qui rendent le système non fonctionnel. Pour remédier à ce problème, nous avons développé un design original où la préparation des échantillons et le déclenchement de l'agrégation sont séparés. Nous avons alors observé l'existence d'un seuil de concentration en amyloïde- $\beta$  en deçà duquel il n'y a pas d'agrégation.. Dans le chapitre 5, nous présentons la réalisation de systèmes microfluidiques de réaction-diffusion, dans le but d'étudier les premières étapes de l'agrégation. Tout d'abord, nous présentons le marquage de peptides modèles à l'aide d'une molécule fluorescente afin de pouvoir suivre leur diffusion le long de microcanaux. Puis, nous avons étudié leur diffusion en microcanaux en l'absence d'agrégation, les résultats obtenus sont compatibles avec des mesures RMN. Ensuite, les peptides sont mis en présence de déclencheur d'agrégation, nous observons alors les différences avec la première mesure afin d'obtenir des informations sur les premiers instants du mécanisme d'agrégation.

# Chapitre 1

## Contexte et positionnement de l'étude

### 1.1 L'agrégation de l'Amyloïde- $\beta$ : une réaction clé dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer touche essentiellement les personnes âgées. Elle se traduit par l'apparition de troubles de la mémoire, de démence et d'une perte d'autonomie. L'origine de ces symptômes provient de la perte de neurones et de liaisons synaptiques au niveau du cerveau, ce qui en fait une neuropathologie. Il semble que la mort neuronale et les pertes synaptiques soient déclenchées par l'agrégation de deux protéines : la protéine  $\tau$  et l'amyloïde- $\beta$ . Le rôle et la place de ces mécanismes sont encore très discutés au sein de la communauté scientifique. Dans cette partie, nous allons d'abord présenter les différents aspects de la maladie puis nous allons montrer en quoi il s'agit d'un enjeu de société important. Enfin nous nous attacherons à expliciter la place de mécanismes d'agrégation des protéines  $\tau$  et amyloïde- $\beta$  dans le développement de cette pathologie.

#### 1.1.1 La maladie d'Alzheimer

**Aspects cliniques :** Longtemps, la démence des personnes âgées a été considérée comme un effet normal du vieillissement. Il a fallu attendre 1907 et les travaux d'Aloïs Alzheimer pour montrer qu'une partie des cas de démence était due à une dégénérescence neuronale. Suite à des observations au microscope d'échantillons du cerveau d'une patiente décédée, Auguste D., atteinte de troubles de la mémoire et de démence, A. Alzheimer montre la présence de plaques séniles à la surface des neurones et d'amas de fibrilles à l'intérieur des neurones (les dégénérescences neurofibrillaires) [1]. Il a ainsi démontré qu'il s'agissait d'une neuropathologie et non de cas psychiatrique. Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, les connaissances sur la maladie vont nettement s'améliorer notamment grâce au développement de nouveaux moyens d'observation (Imagerie médicale : IRM, marqueurs spécifiques) et de diagnostic (mise en place de tests de détection des cas probables, utilisation de l'imagerie médicale comme outils de diagnostic) ce qui a permis d'affiner la définition de la maladie et aussi la compréhension des mécanismes. Ainsi au niveau macroscopique, des travaux ont montré que le volume et le poids du cerveau diminue tout au long de la maladie et que ces pertes sont concentrées dans des zones spécifiques (région de l'hippocampique, l'amygdale temporal et le pôle temporal (figure 1.1) [2].

L'observation microscopique des lésions a été rendue possible grâce au développement des techniques argentiques. Elles consistent à faire précipiter des ions argent sur la coupe microscopique. Ce précipité se dépose principalement sur des structures fibrillaires aussi bien normales (axones) qu'anormales (dépôt de protéines). Ces observations ont permis de montrer que la maladie d'Alz-

heimer s'accompagne d'une perte de neurones, de liaisons synaptiques mais aussi de l'apparition de dépôts fibrillaires de protéines : l'amyloïde- $\beta$  et la protéine  $\tau$ . Ces lésions sont qualifiées de négatives dans le cas des pertes neuronales et synaptiques et de positives pour l'accumulation des protéines. De plus ces lésions sont localisées dans des zones bien spécifiques. Pour obtenir un diagnostic efficace de la maladie, il convient donc de choisir avec soin les zones du cerveau à observer.

Au delà des aspects neuronaux, les premiers signes de la maladie sont des pertes de souvenirs au début mineures puis qui vont s'aggraver. Puis des zones importantes du cerveau pour l'autonomie de la personne sont atteintes ce qui provoque la perte du langage, des gestes et de la motricité. Des tests psychotechniques sont effectués pour diagnostiquer la maladie et juger de son stade. En complément, les moyens d'imagerie moderne permettent d'obtenir des informations complémentaires telles que le volume du cerveau et les zones atteintes.

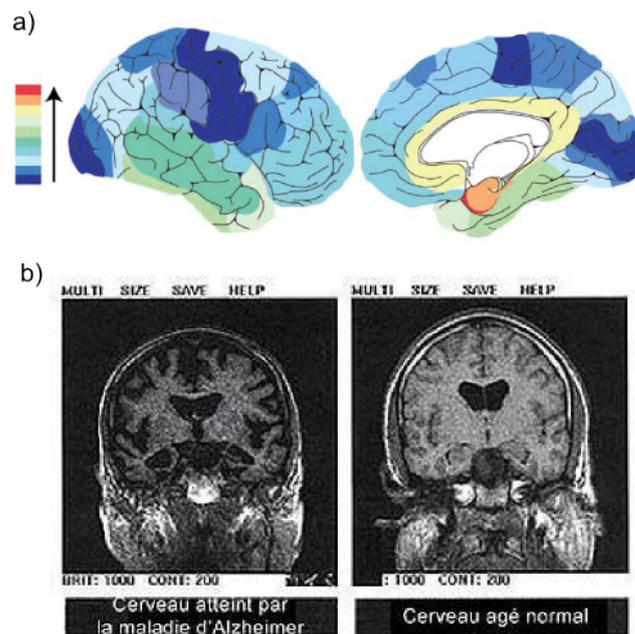


FIGURE 1.1 – a) Densité moyenne des lésions neurofibrillaires chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (face externe à gauche, face interne à droite) [2] b) Image IRM du cerveau d'une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer (à gauche) et d'une personne âgée saine (à droite) [3]

**Enjeux sociétaux :** Aujourd'hui, le nombre de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer est estimé à 26 millions dans le monde en 2005 et ce chiffre pourrait quadrupler d'ici 2050 [4]. En France, le nombre de cas était de 860 000 personnes en 2007, et chaque année 160 000 nouveaux cas sont diagnostiqués. Selon l'INSEE, le nombre de malades pourrait atteindre 1.3 millions en 2020. L'augmentation du nombre de malades peut s'expliquer par deux phénomènes : d'une part l'amélioration du diagnostic a conduit à une détection plus fine et plus précoce de la maladie, et d'autre part le vieillissement de la population conduit à une augmentation du nombre de malades. En effet, cette affection touche essentiellement les personnes âgées de plus de 65 ans (5% des plus de 65 ans et 15% des plus de 85 ans). Des statistiques ont montré que la durée de vie moyenne après le diagnostic de la maladie était d'une dizaine d'année. Comme nous l'avons vu précédemment la maladie d'Alzheimer se traduit par une perte d'autonomie de la personne, cela implique une prise

### 1.1.1 L'agrégation de l'Amyloïde- $\beta$ : une réaction clé dans la maladie d'Alzheimer

en charge permanente de la personne soit par des personnels de santé, soit par la famille. En 2000, l'Organisation de Coopération de Développement Économique (OCDE) estimait le coût des soins pour un patient à environ 20 000 euros par an, ce qui représente un coût annuel pour l'ensemble de la population d'environ 17 milliards d'euros.

Ce constat a conduit les pouvoirs publics à prendre des mesures qui sont détaillées dans le plan Alzheimer 2008-2012 [5]. Nous y retrouvons notamment une amélioration des diagnostics afin de détecter plus précocement les malades et ainsi ralentir le développement de la maladie, la création de centres d'accueil et l'amélioration de l'accompagnement des malades et de leurs familles par des personnels de santé. Un soin particulier a été donné à la recherche sur la maladie afin de mieux appréhender les mécanismes conduisant à son développement et de trouver des traitements efficaces.

### 1.1.2 Rôle de l'amyloïde- $\beta$ et de la protéine $\tau$

Nous avons vu que la maladie d'Alzheimer se manifeste au niveau du cerveau par quatre types de lésions : deux positives : l'agrégation d'amyloïde- $\beta$  et les dégénérescences neurofibrillaires (agrégation des protéines  $\tau$ ); deux négatives : les pertes des liaisons synaptiques et les pertes neuronales. Ces quatre types de lésions sont liés les uns aux autres. Dans la partie suivante nous montrerons comment l'agrégation des protéines  $\tau$  et de l'amyloïde- $\beta$  conduit aux lésions négatives.

#### 1.1.2.1 Les origines de l'amyloïde- $\beta$ et de la protéine $\tau$

**Les origines de l'amyloïde- $\beta$  :** Il a fallu attendre 1984 et les travaux de Glenner et Wong pour identifier la protéine qui compose les plaques séniles à la surface des neurones, l'amyloïde- $\beta$  [6]. Cette protéine provient de la dégradation par des enzymes d'une protéine transmembranaire, la  $\beta$ APP ( $\beta$ - Amyloid Precursor Protein). En effet, deux enzymes la  $\beta$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase coupent conjointement cette protéine pour libérer trois fragments : le premier contenant la partie N-terminal, le second contenant la partie C-terminal et le troisième étant le peptide d'amyloïde- $\beta$ , cette dégradation de la protéine est appelée voie amyloïdogénique (figure 1.2). Elle conduit à la formation de deux types de peptides, l' $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$  composés respectivement de 40 et 42 acides aminés. Cette différence est due au décalage du site de coupure de la  $\beta$ APP par la  $\gamma$ -sécrétase. Ceci a une importance capitale, en effet l' $A\beta_{42}$  a tendance à s'agréger plus facilement [7] et sa production est augmentée de manière sélective lors de la maladie [8]. Cette observation a permis le développement d'outils de diagnostic permettant de mesurer la concentration des différents types de peptide ( $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{38}$ ) dans le fluide cérébro-spinal et ainsi diagnostiquer des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [9].

Une autre voie de dégradation de la  $\beta$ APP ne conduit pas à la formation d'amyloïde- $\beta$ , en effet elle peut être aussi coupée par la  $\alpha$ -sécrétase au milieu de la séquence de l'amyloïde- $\beta$  (figure 1.2), cette voie d'élimination est appelée voie non-amyloïdogénique. Cette coupure engendre la formation de l'APP $\alpha$  (à partir de la partie N-terminal de la  $\beta$ APP) qui peut protéger les cellules neuronales contre la toxicité de l'amyloïde- $\beta$ . Favoriser cette élimination constitue une des voies possibles pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Il convient tout de même de noter que la production d'amyloïde- $\beta$  à partir de  $\beta$ APP n'est pas forcément pathogène car le peptide peut ne pas s'agréger sous forme amyloïde. C'est la dérégulation de sa production, de son élimination et de son repliement par les protéines chaperon (protéine permettant un bon repliement des autres protéines) qui conduit à la maladie d'Alzheimer.

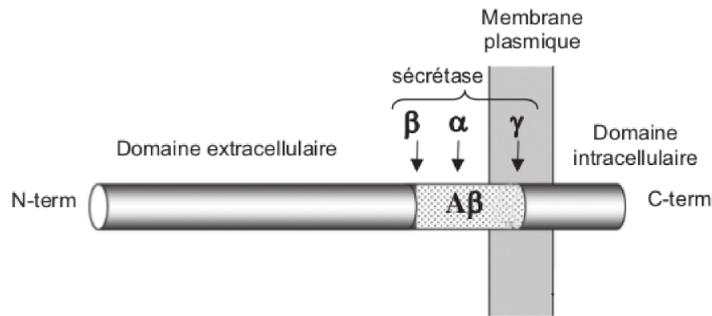


FIGURE 1.2 – Schéma présentant les différents lieux de coupure de l'APP par les enzymes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétase [10]

**La protéine  $\tau$  :** La protéine  $\tau$  (Tubulin-Associated Unit) joue un rôle important dans le bon fonctionnement des neurones. En effet, la rigidité des axones est assurée par des structures longilignes appelées microtubules (figure 1.3). Elles sont composées par la polymérisation de protéines de tubuline. En 1977, Cleveland *et al.* ont montré que la protéine  $\tau$  favorise la polymérisation des microtubules et est un facteur stabilisant [11]. Chez les sujets sains, les protéines se détachent régulièrement des microtubules et sont alors dégradées par l'organisme, tandis que pour des sujets malades, elles vont s'accumuler dans le corps neuronal et s'agréger pour former les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) [12] qui provoquent la mort neuronale. Depuis il a été montré que la présence de DNF dans les neurones n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer, de tels dépôts sont retrouvés dans le cas de la maladie de Parkinson, de Pick, de Steiner. L'ensemble des maladies faisant apparaître des DNF ont été regroupées sous le terme "taupathie" et la plus connue reste la maladie d'Alzheimer. Nous pouvons noter que ces agrégats ont été observés dans la région de l'hippocampe pour des cas de vieillissement normal.

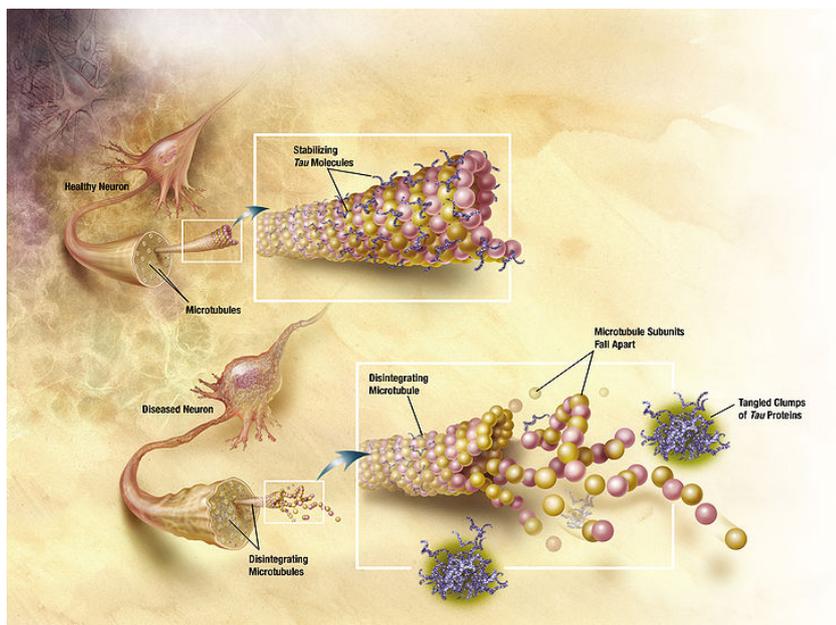


FIGURE 1.3 – Dessin présentant la structure du neurones et le rôle joué par la protéine  $\tau$  [3]

### 1.1.2.2 La cascade amyloïde : un processus clé de la maladie d'Alzheimer

L'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  et celle de la protéine  $\tau$  conduisent donc à l'apparition au niveau cérébral de pertes neuronales et synaptiques, se traduisant chez le patient par l'apparition des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Le rôle de ces deux processus dans la maladie est encore mal connu, mais les avancées de la biologie moléculaire semblent indiquer que l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  soit un facteur déclenchant. Une des hypothèses liant les deux mécanismes d'agrégation (amyloïde- $\beta$ , protéine  $\tau$ ) est la cascade amyloïde (figure 1.4). L'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  se passe en plusieurs étapes faisant intervenir différents intermédiaires tels que les feuillets  $\beta$ , les oligomères, les fibrilles et les plaques amyloïdes. Ces composés ont un impact différent sur les neurones. En effet, les oligomères sont cytotoxiques et conduisent directement à la mort neuronale, tandis que les plaques amyloïdes soit par l'inflammation des neurones soit par le déclenchement des DNF vont conduire indirectement au même résultat.

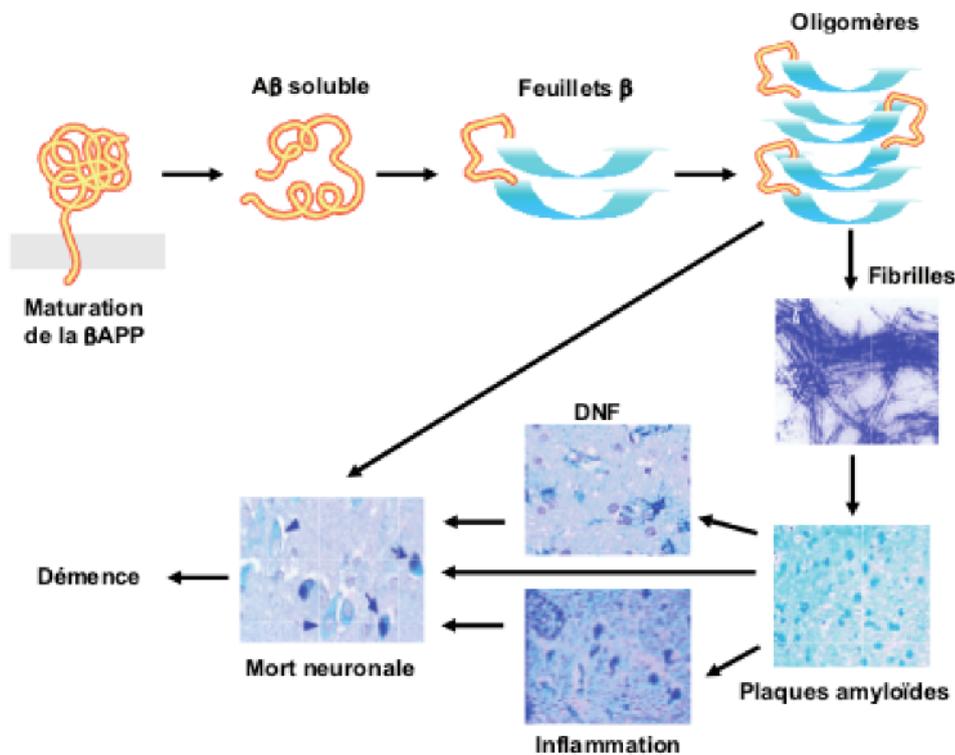


FIGURE 1.4 – Schéma représentant la cascade amyloïde [10]

**Notion d'amyloïdose :** Avant de nous intéresser plus précisément à la cascade amyloïde, nous allons introduire le notion d'amyloïdose qui est une voie d'agrégation des protéines. La synthèse des protéines à l'intérieur d'une cellule s'accompagne d'un risque d'agrégation qui est inhibé soit par les molécules chaperons (qui veillent au bon repliement des protéines et préviennent l'agrégation), soit par la dégradation des agrégats. Sous l'effet de facteurs environnementaux ou génétiques, ces processus d'inhibition sont inefficaces, nous assistons alors à la formation d'agrégats qui peuvent être amorphes ou fibrillaires, nous parlons alors d'amyloïdose. Ce processus intervient lors de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , mais il n'est pas propre à la maladie d'Alzheimer, nous le retrouvons notamment dans d'autres pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, l'en-

céphalopathie spongiforme, mais aussi dans d'autres pathologies ne touchant pas le cerveau, par exemple le diabète de type II.

**L'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  et la cascade amyloïde :** Les agrégats présents à la surface des neurones de personnes malades sont appelés plaques séniles (figure 1.4). L'étude de leur morphologie a permis de montrer que le cœur du dépôt est constitué d'amyloïde- $\beta$  organisé sous forme de feuillet- $\beta$ , ce dépôt suit un processus d'amyloïdose. Des données de spectrométrie de masse ont permis de montrer que les plaques séniles ne sont constituées que de peptides amyloïde- $\beta$  [13].

L'agrégation du peptide peut conduire à des agrégats ne présentant pas de caractéristiques amyloïdiques : les dépôts diffus. Ces derniers ne sont pas caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, en effet ils peuvent être présents en grand nombre chez des personnes âgées ne présentant pas de troubles intellectuels [14].

Nous nous intéressons donc au dépôt des plaques séniles, ces dernières semblent être l'une des causes de la mort neuronale. En effet, leur présence en surface des neurones provoque une inflammation en surface de la cellule pouvant entraîner son apoptose (figure 1.4). De plus, il semblerait que la présence de ces plaques conduisent à l'agrégation des protéines  $\tau$  [15] ce qui induit une perte de la rigidité neuronale (figure 1.3) et conduit aussi à la perte de neurones. La combinaison de ces deux processus constitue la cascade amyloïde.

Au vu de ces éléments, de nombreuses études se sont intéressées à la formation de ces plaques séniles et aux différents facteurs pouvant les influencer. Le processus permettant la formation des plaques séniles n'est pas encore totalement compris mais il est admis qu'il passe par l'association de petites unités de nucléation qui vont croître pour former des protofilaments qui s'enroulent pour être à l'origine des fibres amyloïdes (figure 1.5) [16]. Ces fibrilles vont alors s'assembler pour former les plaques séniles que nous retrouvons à la surface des neurones. Le grand nombre d'intermédiaires dans ce processus a poussé les chercheurs à s'intéresser à la toxicité des différents produits. A ce jour, il semblerait que la toxicité la plus importantes ne soit pas due aux plaques séniles mais aux oligomères de plus faibles poids moléculaires ( protofilaments, noyaux de nucléation, agrégats sphériques...) mais l'étude de ces composés est freinée par la difficulté à les isoler [17]. L'action de ces petits agrégats serait de provoquer une perméabilisation des parois des neurones et ainsi d'induire une perturbation de l'activité neuronale pouvant déboucher sur la mort cellulaire [18].

La difficulté de compréhension de ces mécanismes est aussi liée à leurs aspects multi-paramètres. En effet, de multiples facteurs environnementaux et génétiques jouent un rôle important dans l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  et le développement de la maladie d'Alzheimer [16]. L'étude des facteurs génétiques a permis de montrer l'existence de gènes favorisant le développement de la maladie. Nous pouvons citer entre autres des mutations sur les chromosomes 21 codant la  $\beta$ APP qui provoquent une augmentation de la production d'amyloïde- $\beta$  multipliant ainsi les risques d'agrégation du peptide. Les principaux facteurs environnementaux qui influent sur le développement de la maladie sont : l'âge (directement liés à la maladie), le sexe (les femmes présentent un risque accru); le niveau d'éducation; un taux élevé de cholestérol; les carences alimentaires en vitamines; l'hypertension artérielle.

Au delà de ces facteurs environnementaux qui influencent le développement de la maladie, il a fallu chercher des causes biochimiques pour expliquer l'agrégation. En effet, chez les malades atteints de formes héréditaires de la maladie, l'amyloïde- $\beta$  est sécrétée en forte quantité dès leurs plus jeunes ages, mais ils ne présentent pas de dépôts amyloïdes. Cela montre que la présence d'amyloïde- $\beta$  ne suffit pas à expliquer seule le phénomène d'agrégation. Parmi les facteurs influençant l'agrégation, les ions métalliques semblent jouer un rôle important. En effet des études ont montré que leur

### 1.1.1 L'agrégation de l'Amyloïde- $\beta$ : une réaction clé dans la maladie d'Alzheimer

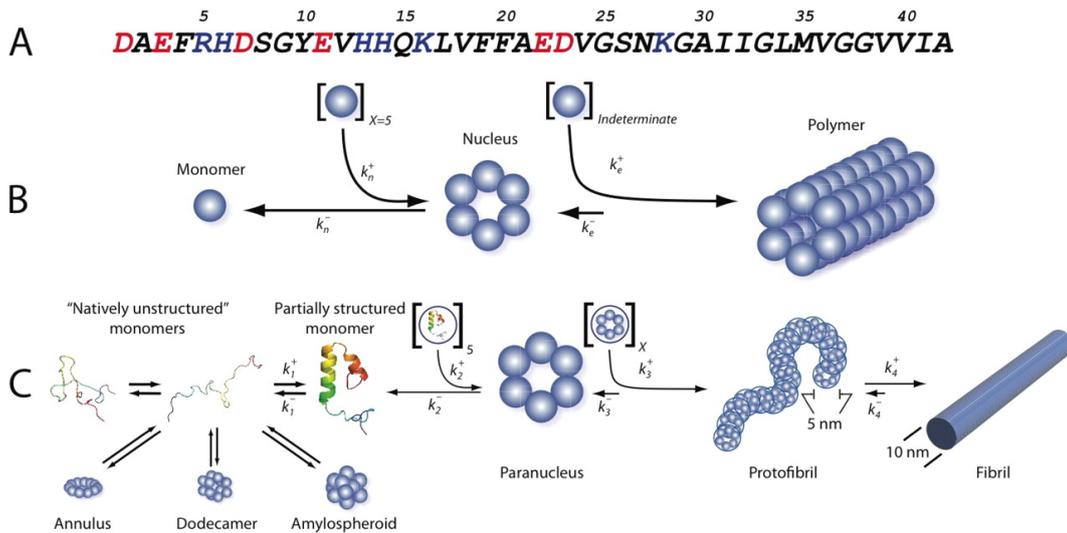


FIGURE 1.5 – a) Structure de l'A $\beta$ 42. b) et c) Schéma représentant les différentes étapes d'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  [16].

concentration dans le cerveau atteignait des concentrations anormales et que les mécanismes de régulation sont perturbés [19] [20] [21]. De plus d'autres facteurs favorisant l'agrégation ont eux aussi été mis avant tels que la concentration en peptide, le pH, les surfaces, les radicaux libres [16].

### 1.1.3 Conclusion

La maladie d'Alzheimer touche essentiellement les populations âgées (5% des plus de 65 ans et 15% des plus de 85 ans). Elle se traduit par des démences, des pertes de mémoires et d'autonomie. Avec les progrès de la médecine et de l'imagerie médicale, elle est détectée de plus en tôt ce qui permet une meilleur prise en charge des patients et un meilleur accompagnement des familles. Mais avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la durée de vie, le nombre de cas va augmenter fortement. Ce constat fait donc de cette maladie un enjeu sociétal important.

Au niveau neuropathologique, la maladie d'Alzheimer se traduit par la présence de quatre types de lésions : les plaques séniles (agrégats d'amyloïde- $\beta$ ), les dégénérescences neurofibrillaires (agrégats de protéine  $\tau$ ), les pertes neuronales et les pertes synaptiques. Il semble que les deux premières sont à l'origine de la mort neuronale et de la diminution du nombre de synapse. Une des principales hypothèses pour expliquer ces pertes est la cascade amyloïde (figure 1.4). Dans ce scénario, l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  joue un rôle central ; en effet, il semblerait quelle soit à l'origine de l'agrégation de la protéine- $\tau$  et de la mort neuronale. De plus, nous avons vu que cette agrégation est influencée par de nombreux facteurs environnementaux (alimentation, âge, sexe...) et génétiques. Au niveau biochimique, les métaux jouent un rôle prépondérant dans le développement des plaques séniles.

L'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  constitue un problème biochimique complexe. En effet, nous avons vu que de nombreux facteurs l'influencent et que les intermédiaires de réaction sont difficilement isolables avec les techniques classiques. Afin de surmonter ces difficultés, de nouveaux outils doivent être développés, la microfluidique à travers les laboratoires sur puce peut constituer un outil complémentaire aux méthodes classiques.

# 1.2 Les laboratoires sur puces : des outils d'analyse biologique

## 1.2.1 Une brève présentation

La microfluidique est la science qui étudie les écoulements dans des canaux de tailles micro-métriques. Nous pouvons commencer à parler de microfluidique lorsqu'une des dimensions de la canalisation atteint une dimension de l'ordre du micromètre ou de la dizaine de micromètres. Elle englobe aussi l'ensemble des développements technologiques permettant la fabrication de dispositifs.

La réalisation de microcanaux a été rendue possible par l'utilisation des technologies de la micro-électronique. Les débuts de la micro-électronique sur semi-conducteur remontent au début des années 50 avec la fabrication du premier transistor à semi-conducteur qui va progressivement remplacer les transistors à lampe jusque là utilisés. Puis dans les années 60, avec les recherches spatiales, nous assistons à une miniaturisation de plus en plus importante, cette course à la miniaturisation va conduire au développement des technologies de photolithographies que nous utilisons actuellement mais aussi à la démocratisation de l'ensemble des procédés de fabrication. Il a fallu attendre les années 80 pour que soient réalisés à l'aide des technologies de gravure, les premiers dispositifs sur silicium ayant une partie mobile : les MEMS (Micro Electro Mechanical Systems). Leurs représentants les plus connus et utilisés se retrouvent dans nos ordinateurs sous la forme des têtes de lecture des disques durs, et dans nos imprimantes sous forme des têtes d'impression. Au cours des années 90, des recherches visant à appliquer les MEMS à la biologie, la chimie et le biomédical ont été menées. La manipulation des fluides aux petites échelles s'est très rapidement montrée indissociable de ces systèmes. Cela a permis la naissance et le développement de la microfluidique. Ce développement va être encore accéléré par l'émergence au début des années 2000, des technologies de moulages des canaux dans des polymères comme le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane). Ces technologies permettent la réalisation rapide de dispositifs à faible coût. Nous assistons au développement de nombreuses fonctions intégrées directement sur les puces, tel que des pompes, des vannes, des mélangeurs...

La réalisation et le développement de l'ensemble de ces fonctions a permis l'émergence des laboratoires sur puces. Le concept est de regrouper un ensemble de fonctions microfluidiques sur un même dispositif permettant la réalisation d'analyses biologiques (détection de virus, cellules tumorales...). Les domaines d'applications de ces dispositifs ne s'arrêtent pas au domaine des analyses biologiques. En effet, les multiples fonctions ont permis le développement de système pour la biologie cellulaire, un exemple consiste à étudier le comportement de cellules soumises à un gradient de concentration (en sel, en sucre...) [22] ou à tester la toxicité de produits sur puce [23] [24]. Nous trouvons aussi des dispositifs permettant l'étude d'équilibre thermodynamique notamment sur la cristallisation des protéines : un grand nombre de conditions sont générées sur des puces afin de constituer les diagrammes d'équilibre thermodynamique ou pour trouver les conditions permettant d'obtenir rapidement des cristaux de bonne qualité en séparant nucléation et croissance [25] [26]. Le développement des laboratoires sur puce s'est fait dans l'optique de faciliter les diagnostics médicaux en complétant ou remplaçant les techniques jusqu'alors utilisées. Ces dernières nécessitent généralement des temps de préparation importants, des équipements onéreux, des volumes d'échantillons importants mais surtout des temps d'analyse importants. Ces délais entre le prélèvement et les résultats peuvent s'avérer particulièrement critiques pour certaines pathologies ; le but premier des laboratoires sur puce a donc été de développer des systèmes de détection permettant d'obtenir rapidement les résultats en se basant sur les technologies de la microfluidique.

Leur architecture est basée sur le regroupement sur un même dispositif de plusieurs fonctions

microfluidiques telles que l'actionnement des fluides (pompes), la préparation des solutions (séparation des espèces d'intérêt, mélange des réactifs...), et la détection (présence de cellules cancéreuse, concentration en produit...). L'ensemble de ces opérations se fait sur des dispositifs ayant des surfaces de quelques  $cm^2$ , ce qui est relativement faible au regard des surfaces occupées par le matériel classique d'analyse. Cette miniaturisation a aussi permis de concevoir des systèmes pouvant être amenés sur le terrain et ainsi utilisés dans un grand nombre de situations difficiles (catastrophes naturelles, guerre...) ou au quotidien (mesure du taux d'insuline pour les diabétiques, taux de d'hémoglobine...). De plus, leur miniaturisation a permis de diminuer les volumes d'échantillons nécessaires ce qui dans certains cas présente un confort pour le patient.

L'ensemble de ces fonctions sur une même puce permet de rendre de nombreuses étapes automatisables et plus rapides que des procédés macroscopiques. De plus, la miniaturisation rend possible le transport et son utilisation dans de nombreuses situations. Elle permet aussi l'utilisation de faible volume de réactif et d'échantillon ce qui permet de diminuer le coût de certains diagnostics où les réactifs sont très coûteux.

### 1.2.2 Microfluidique pour l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

Au vu des nombreux avantages de la microfluidique pour l'étude de phénomènes biologiques, chimiques, thermodynamiques, il est naturel d'envisager d'utiliser les laboratoires sur puces pour étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Dans le domaine, peu d'études ont été menées à ce jour sur l'aspect biochimique de la réaction.

Parmi les études les plus poussées, Meier *et al.* proposent l'utilisation de gouttes pour étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  [27]. A l'aide de puce en T (figure 1.8), ils génèrent des gouttes de solutions aqueuses portées par une phase d'huile. Les gouttes sont composées d'amyloïde- $\beta$ , de Thioflavine T (un marqueur permettant de détecter l'agrégation) et de solution tampon. En jouant sur les différents débits d'entrée, ils peuvent modifier les compositions des gouttes. De plus afin de stabiliser leurs gouttes ils ajoutent à l'huile un surfactant. L'avantage d'un tel système est de pouvoir rapidement changer les compositions des gouttes et ainsi cribler rapidement de nombreuses conditions expérimentales. De plus chaque goutte peut être considérée comme un microréacteur indépendant ce qui permet de réaliser aisément des statistiques sur le phénomène observé. En revanche, pour des observations longues ou des réactions particulières, le surfactant peut avoir une importance capitale en modifiant le comportement du microréacteur.

A l'aide de ces systèmes, ils montrent que les surfaces tiennent une place importante dans la cinétique d'agrégation et la répartition des agrégats dans la goutte. En effet en changeant le surfactant, ils observent une modification de la répartition de l'amyloïde- $\beta$  dans la goutte (figure 1.8 b) et c). Pour mener ces observations, ils utilisent un peptide commercial marqué. Sans surfactant, les peptides jouent le rôle de tensioactif ce qui provoque leur accumulation à la surface de la goutte et favorise l'agrégation, le temps typique d'agrégation est de 10 heures tandis que en tube il est d'environ 20 heures. De la même manière, l'utilisation d'un surfactant (non commercial) évite l'accumulation des peptides à l'interface, en revanche le temps typique d'agrégation passe à environ 100 heures. Cette étude permet de mettre en évidence le rôle important que peuvent jouer les surfaces dans le mécanisme d'agrégation.

Lee *et al.* proposent une autre approche [28], ils réalisent des canalisations en PDMS de largeur  $100 \mu m$ , de hauteur  $100 \mu m$  et de longueur 1.5mm. Elles sont scellées par une lamelle de verre (figure 1.7). Puis, ils fonctionnalisent la surface de verre avec des monomères d'amyloïde- $\beta$ . Ils injectent ensuite une solution contenant de l'amyloïde- $\beta$  et de la Thioflavine T (ThT), puis ils suivent au cours du temps l'évolution de l'agrégation en mesurant l'intensité de fluorescence de la ThT (figure 1.7). En parallèle, sur d'autres systèmes scellés de manière réversible, ils observent

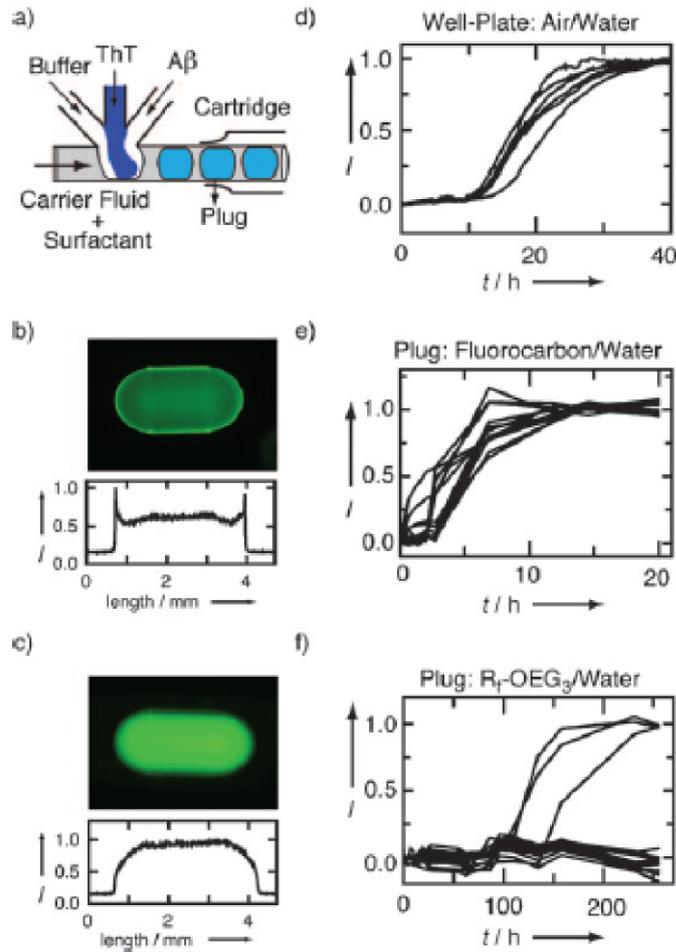


FIGURE 1.6 – a) Schéma représentant le système de génération de gouttes b) et c) Photographie des gouttes montrant la répartition du peptide, la première est une goutte produite sans surfactant (les peptides se mettent à l'interface), la seconde avec un surfactant, (la concentration en peptide est homogène). d), e) et f) présente la cinétique d'agrégation dans le cas d'un tube à essai, d'une goutte sans surfactant et d'une goutte avec surfactant [27].

l'évolution de la topologie des agrégats en surface par microscopie à force atomique (AFM). Ils observent ainsi la formation de structures fibrillaires à la surface du verre, ce qui veut dire que la voie d'agrégation est fibrillaire et non amorphe. Cela est donc pertinent pour l'étude de l'agrégation. Dans un second temps, ils procèdent de la même manière mais en ajoutant aux solutions précédentes des molécules pouvant freiner l'agrégation ou des ions métalliques. Ces observations montrent que certaines molécules comme l'ibuprofène, le curcuma ont des effets inhibiteurs sur l'agrégation en revanche d'autres n'ont aucun effet comme le HSA (Human Serum Albumin), ou le chlorure de sodium.

Ces expériences ont permis de tester l'influence de certaines protéines sur l'agrégation mais ne permettent pas de tester en parallèle l'influence des concentrations. De plus, la fonctionnalisation des surfaces permet de les contrôler et d'ainsi rendre l'étude de l'agrégation plus facile, en effet comme nous l'avons vu avec les travaux de Meier *et al.*, elles jouent un rôle important dans la cinétique d'agrégation. En revanche, cette étape paraît critique car la densité en monomère sur les surfaces est difficilement contrôlable.

Choi *et al.* proposent de combiner l'utilisation de la micro/nanofluidique et de la SERS (Surface

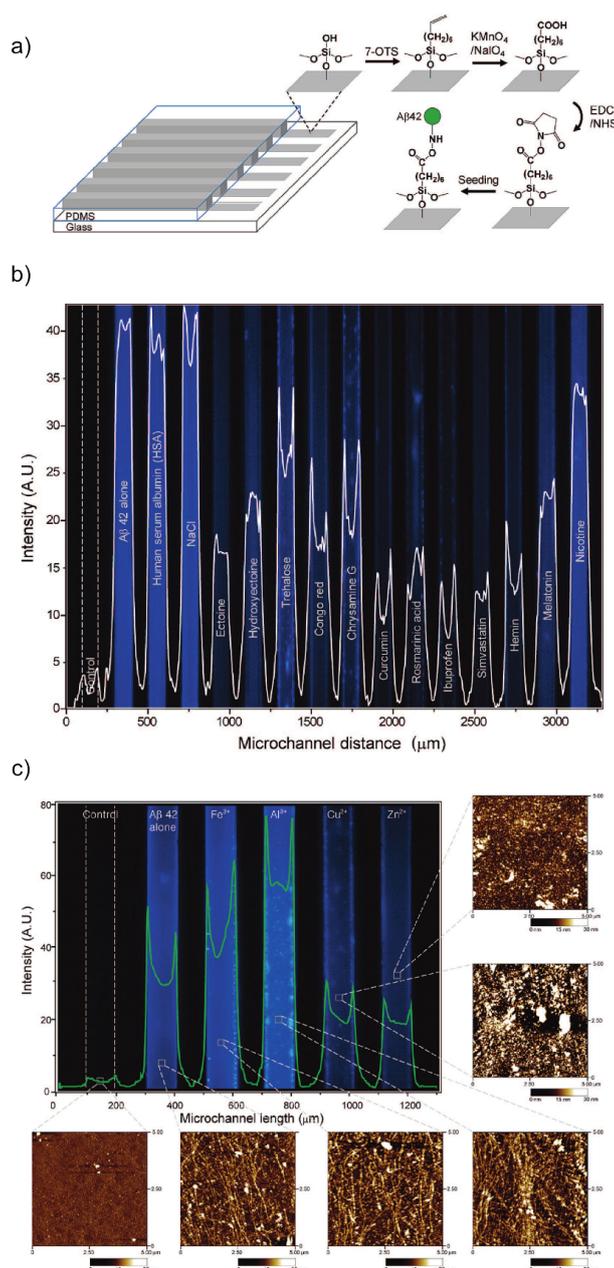


FIGURE 1.7 – a) Schéma présentant le processus de fonctionnalisation réalisé dans les microcanaux. b) Images en fluorescence de ThT pour différentes conditions expérimentales afin de tester l'inhibition par ces substances de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . c) Images en fluorescence de ThT pour différents métaux afin de tester leur impact sur l'agrégation, les images autour ont été prises à l'AFM et permettent de voir la structure de agrégats [28].

Enhanced Raman Spectroscopy) afin d'étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  [29]. Ils ont démontré que leur système permet de caractériser les propriétés structurales et de surfaces des agrégats ainsi qu'une concentration en agrégats plus faible que celle détectée actuellement par les instruments existants. Pour cela, ils réalisent une filtration des agrégats à l'interface entre les microcanaux et les nanocanaux. En effet, ils injectent dans leurs systèmes des concentrations en amyloïde- $\beta$  40 comprise entre 1fM et 1 $\mu\text{M}$ . Puis ils étudient à l'aide du SERS la structure et la conformation des agrégats de peptides. A l'aide de cette technique, ils ont montré que la conformation des agrégats

est dépendante des conditions initiales notamment la concentration en  $A\beta_{40}$ .

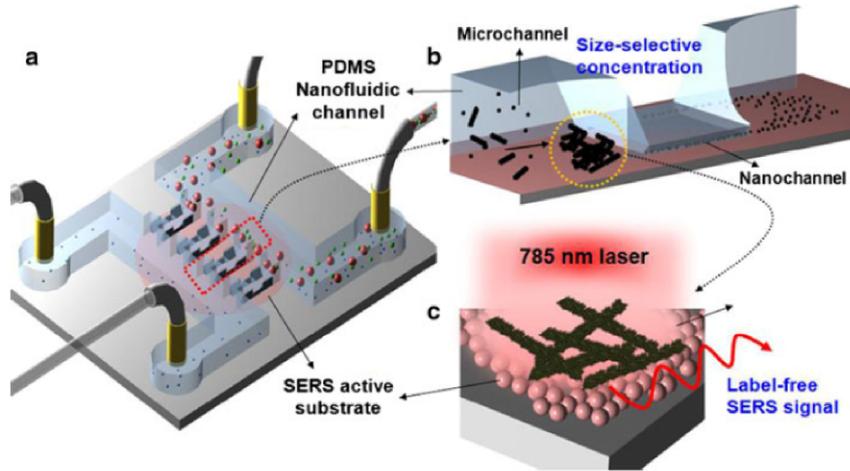


FIGURE 1.8 – Image Choi : système [29]

Une autre approche utilisant la microfluidique consiste à doser les concentrations des différentes espèces d'amyloïde- $\beta$  ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{38}$ ) dans le fluide cérospinal (CSF) dans le but de réaliser un outil de diagnostic. Pour cela, Verpillot *et al.* proposent l'utilisation de l'électrophorèse capillaire couplé avec une détection LIF (Laser Induced Fluorescence) des agrégats. Afin de pouvoir mesurer la présence d'agrégats, ils ont développé, sur des peptides synthétiques, une méthode permettant leur marquage par différents fluorophores (FAM X-SE, Alexa Fluorophore ,5-FITC) [9]. Ils les passent sur un banc d'électrophorèse capillaire couplé à la détection LIF. A l'aide de cet appareillage, ils arrivent à détecter des concentrations en peptides de l'ordre de l'attomole. En revanche, la gamme de bon fonctionnement de leur méthode se situe pour des concentrations comprises entre 35 et 750nM. En testant cette méthode sur du fluide cérospinal de personnes saines et atteintes de la maladie d'Alzheimer, ils montrent qu'il existe des différences fortes entre les deux populations mais cela n'est pas suffisant pour diagnostiquer la maladie, il est donc nécessaire de l'utiliser dans le cadre d'une analyse s'effectuant sur plusieurs marqueurs de la maladie.

### 1.3 Notre approche

Dans les années à venir, la maladie d'Alzheimer va devenir un problème de santé majeur notamment à cause du vieillissement de la population. L'étude de la maladie a permis de montrer qu'elle mettait en jeu de nombreux facteurs environnementaux mais aussi des réactions biochimiques complexes. L'une d'entre elle, l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , semble être au cœur du processus conduisant à cette neuropathologie. Les méthodes actuelles d'étude de ce mécanisme ne permettent pas l'étude des premiers instants de cette réaction, il convient donc de développer de nouveaux outils pour étudier ces intermédiaires qui sont les plus toxiques pour les neurones. Les laboratoires sur puces en utilisant la miniaturisation et leurs nombreuses fonctions peuvent constituer une alternative pour étudier ces phénomènes complexes et dynamiques. L'utilisation de ces technologies pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  est encore peu développée. Dans ce contexte, nous proposons d'utiliser les techniques de la microfluidique pour développer des systèmes permettant de réaliser un criblage réactionnel des conditions d'agrégation et d'étu-

dier sa cinétique. Pour cela nous avons conçu deux types de systèmes. Le premier permet de réaliser de nombreuses conditions expérimentales en recombinaison des solutions (chapitre 4). Nous avons été capable de réaliser un système permettant de dissocier la partie préparation des échantillons et déclenchement de l'agrégation. L'intérêt d'un tel système est de pouvoir connaître avec précision le temps de déclenchement de l'agrégation et d'éviter la formation d'agrégats dans la partie préparation qui pourrait entraîner un dysfonctionnement du système. Le second est basé sur le phénomène de diffusion, nous faisons couler côte à côte, dans une puce en Y, une solution d'amyloïde- $\beta$  contenant des peptides marqués en fluorescence et une solution tampon (chapitre 5). Les peptides vont diffuser vers la solution tampon. En relevant les profils de concentration le long de la canalisation, nous pouvons mesurer le coefficient de diffusion du peptide. Lorsque nous remplaçons la solution tampon par une solution contenant un déclencheur de l'agrégation, les peptides vont commencer à s'agréger, nous aurons alors la formation d'objets plus gros que des monomères ce qui entraîne une modification de la forme des profils. Cette modification va nous permettre d'obtenir des informations sur la taille des objets formés et la cinétique d'agrégation.



# Références bibliographiques

- [1] ALZHEIMER A. *Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde*. Allgemeine Zeitschr Psychiatr Gerichtlisch Med **64**, 146–148 (1907). 7
- [2] DUYCKAERTS C. AND DICKSON D. *Neuropathology of Alzheimer's disease. Neurodegeneration : the molecular pathology of dementia and movement disorders*. ISN Neuropath Press, Basel (2003). 7, 8
- [3] La maladie d'Alzheimer, (consulté en aout 2012). [http://fr.wikipedia.org/wiki/maladie\\_d'Alzheimer](http://fr.wikipedia.org/wiki/maladie_d'Alzheimer). 8, 10
- [4] FERRI C., PRINCE M., BRAYNE C., BRODATY H., FRATIGLIONI L., GANGULI M., HALL K., HASEGAWA K., HENDRIE H., HUANG Y., JORM A., MATHERS C., MENEZES P., RIMMER E., AND SCAZUFCA M. *Global prevalence of dementia : a delphi consensus study*. The Lancet **366**(9503), 2112 – 2117 (2006). 8
- [5] le plan Alzheimer 2008-2012, (consulté en aout 2012). <http://www.sante.gouv.fr/le-plan-alzheimer-2008-2012,2941.html>. 9
- [6] G. GLENNER AND C. WONG. *Alzheimer's disease : Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications **120**(3), 885 – 890 (1984). 9
- [7] BURDICK D., KOSMOSKI J., KNAUER M., AND GLABE C. *Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the alzheimer's amyloid peptide, a $\beta$ 1-42, in differentiated pc12 cells*. Brain Research **746**, 275 – 284 (1997). 9
- [8] SELKOE D. *Alzheimer's disease : Genes, proteins, and therapy*. Physiol. Rev. **81**, 746–766 (2001). 9
- [9] VERPILLOT R., ESSELMANN H., MOHAMADI M.R., H. KLAFKI, POIRIER F., LEHNERT S., OTTO M., WILTFANG J., VIOVY J-L., AND TAVERNA M. *Analysis of amyloid- $\beta$  peptides in cerebrospinal fluid samples by capillary electrophoresis coupled with lif detection*. Analytical Chemistry **83**(5), 1696–1703 (2011). 9, 18, 121
- [10] EXPERTISE COLLECTIVES INSERM. *Maladie d'Alzheimer - Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux*, (2007). <http://www.inserm.fr/mediatheque/infr-grand-public/fichiers/thematiques/sante-publique/expertises-collectives/alzheimer-enjeux-2007>. 10, 11
- [11] CLEVELAND DW, HWO SY, AND KIRSCHNER MW. *Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin*. J. Mol. Biol. **116**, 207–225 (1977). 10
- [12] BRION JP. *Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'alzheimer*. Arch. Biol. (Bruxelles) **95**, 229–235 (1985). 10

- [13] SODERBERG L., BOGDANOVIC N., AXELSSON B., WINBLAD B., NASLUND J., AND TJERNBERG L. *Analysis of single alzheimer solid plaque cores by laser capture microscopy and nanoelectrospray/tandem mass spectrometry*. *Biochemistry* **45**(32), 9849–9856 (2006). 12
- [14] DELAÈRE P., DUYCKAERTS C., MASTERS C., PIETTE F., AND HAUW JJ. *Large amounts of neocortical  $\beta$ a4 deposits without alzheimer changes in a nondemented case*. *Neuroscience Letter* **116**, 87–93 (1990). 12
- [15] ODDO S., CACCAMO A., SHEPHERD J. D., MURPHY M. P., GOLDE T. E., KAYED R., METHERATE R., MATTSON M. P., AKBARI Y., , AND LAFERLA F. M. *Triple-transgenic model of alzheimer’s disease with plaques and tangles : intracellular abeta and synaptic dysfunction*. *Neuron* **39**, 409–421 (2003). 12
- [16] R. ROYCHAUDHURI, M. YANG, M. HOSHI, AND D. TEPLOW. *Amyloid  $\beta$ -protein assembly and alzheimer disease*. *J. Biol. Chem.* **284**, 4749–4753 (2009). 12, 13, 109
- [17] HAASS AND STEINER H. *Protofibrils, the unifying toxic molecule of neurodegenerative disorders ?*. *Nature Neuroscience* **4**, 859–860 (2001). 12
- [18] STEFANI M. *Biological surfaces as catalysts of amyloid aggregate nucleation and primary sites of amyloid toxicit*. *Ital. J. Biochem.* **55**, 194–204 (2006). 12
- [19] C. S. ATWOOD, X. HUANG, R. D. MOIR, R. E. TANZI, , AND A. I. BUSH. *Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of alzheimer’s disease*. *Met Ions Biol Syst.* **36**, 309–364 (1999). 13
- [20] FALLER P. AND HUREAU C. *Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide*. *Dalton Trans* **21**(7), 1080–1094 (2009). 13
- [21] HUREAU C. AND FALLER P. *Abeta-mediated ros production by cu ions : structural insights, mechanisms and relevance to alzheimer’s disease*. *Biochimie* **91**(10), 1212–1217 (2009). 13
- [22] KIM D., LOKUTA M., HUTTENLOCHER A., AND BEEBE D. *Selective and tunable gradient device for cell culture and chemotaxis study*. *Lab Chip* **9**, 1797–1800 (2009). 14, 40, 41, 45
- [23] HYUNWOO BANG, SUN HEE LIM, YOUNG KYUNG LEE, SEOK CHUNG, CHANIL CHUNG, DONG-CHUL HAN, AND JUN KEUN CHANG. *Serial dilution microchip for cytotoxicity test*. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **14**(8), 1165 (2004). 14, 40, 42, 45
- [24] MAHTO S., YOON T., SHIN H., AND RHEE S. *Multicompartmented microfluidic device for characterization of dose-dependent cadmium cytotoxicity in balb/3t3 fibroblast cells*. *Biomedical Microdevices* **11**, 401–411 (2009). 14
- [25] ZHENG B., ROACH L., AND ISMAGILOV R. *Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets*. *Journal of the American Chemical Society* **125**(37), 11170–11171 (2003). 14
- [26] MERLIN A., SALMON J-B., AND LENG J. *Microfluidic-assisted growth of colloidal crystals*. *Soft Matter* **8**, 3526 (2012). 14
- [27] MEIER M., KENNEDY-DARLING J., CHOI SH., NORSTROM E., S. SISODIA, AND R. ISMAGILOV. *Plug-based microfluidics with defined surface chemistry to miniaturize and control aggregation of amyloidogenic peptides*. *Angewandte Chemie* **121**(8) (2009). 15, 16
- [28] LEE J. S., RYU J., AND PARK C. B. *High-throughput analysis of alzheimer’s  $\beta$ -amyloid aggregation using a microfluidic self-assembly of monomers*. *Analytical Chemistry* **81**(7), 2751–2759 (2009). 15, 17
- [29] CHOI I., HUH Y., AND ERICKSON D. *Ultra-sensitive, label-free probing of the conformational characteristics of amyloid beta aggregates with a sers active nanofluidic device*. *Microfluidics and Nanofluidics* **12**, 663–669 (2012). 17, 18

# Chapitre 2

## Hydrodynamique et diffusion dans les systèmes microfluidiques

La manipulation des fluides et les phénomènes diffusifs tiennent une place importante dans les laboratoires sur puces et l'ensemble des puces microfluidiques. Le but de ce chapitre est de poser les bases de la mécanique des fluides et des phénomènes diffusifs à l'échelle de ces systèmes afin de faciliter leurs conceptions. Nous nous intéresserons d'abord aux équations de la mécanique des fluides, puis à la diffusion sans et avec écoulements et enfin nous donnerons des exemples de réalisations de mélanges, de gradients de concentration et de dispositifs permettant l'étude d'une cinétique chimique.

### 2.1 Hydrodynamique des systèmes microfluidiques

#### 2.1.1 L'hydrodynamique à bas nombres de Reynolds

##### 2.1.1.1 Le nombre de Reynolds :

Le nombre de Reynolds est un nombre sans dimension qui permet de comparer les forces inertielles aux forces visqueuses (équation 2.1). La comparaison de ces deux forces amène à connaître la nature de l'écoulement. Pour un nombre de Reynolds inférieur à 1, nous serons en présence d'un écoulement laminaire tandis que pour des nombres de Reynolds très supérieurs à 1 l'écoulement sera turbulent.

$$Re = \frac{\text{Forces inertielles}}{\text{Forces visqueuse}} = \frac{\rho U l}{\mu} \quad (2.1)$$

où  $\rho$  et  $\mu$  sont respectivement la masse volumique et la viscosité dynamique du fluide tandis que  $U$  et  $l$  représentent la vitesse et la taille typique de l'écoulement.

Dans le cas des systèmes microfluidiques, la taille typique et les vitesses des écoulements sont au maximum respectivement de  $500\mu m$  et de la dizaine de millimètres par seconde, ce qui donne des nombres de Reynolds d'un ordre de grandeur proche de 1 ( $Re_{max} \sim 5$  avec  $\mu \sim 10^{-3} Pa.s$ ,  $\rho \sim 10^3 kg.m^{-3}$ ). Cela nous permet de dire que nous sommes dans le cas d'écoulements laminaires, que l'inertie est négligeable et que les équations de la mécanique des fluides sont alors linéaires.

##### 2.1.1.2 Équation de la mécanique des fluides dans les systèmes microfluidiques

La plupart des fluides que nous allons utiliser sont des fluides visqueux incompressibles newtoniens. Le mouvement de ces fluides dans une canalisation est donc régi par les équations de

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

Navies-Stokes (équation 2.2)

$$\left(\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho \vec{v} \cdot \vec{\nabla}\right) \vec{v} = -\vec{g} \text{rad } p + \mu \Delta \vec{v} + \vec{f} \quad (2.2)$$

où la force  $\vec{f}$  correspond aux efforts volumiques dans le fluide,  $\vec{v}$  est la vitesse de l'écoulement et  $p$  la pression.

Comme nous l'avons vu précédemment, les écoulements que nous allons étudier sont laminaires, les termes correspondants aux forces inertielles sont petits devant les forces visqueuses, ces termes peuvent donc être ignorés ( $\|\rho \vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{v}\| \ll \|\mu \Delta \vec{v}\|$ , c'est à dire  $Re \ll 1$ ). De plus, nous nous intéresserons uniquement aux régimes stationnaires ce qui implique  $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$ . L'équation de Navier-Stokes devient alors l'équation de Stokes :

$$-\vec{g} \text{rad } p + \mu \Delta \vec{v} + \vec{f} = 0 \quad (2.3)$$

Dans cette équation, les forces volumiques  $\vec{f}$  décrivent différents efforts :

- les forces électrostatiques (cas des écoulements électrosmotiques)
- les forces de pesanteur

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas utilisé les forces électrostatiques (pas d'utilisation de champs électriques), donc la seule force volumique s'appliquant lors des écoulements est la force de pesanteur ( $\rho \vec{g}$ ). Mais cette dernière est négligeable ( $\|\mu \Delta \vec{v}\| \gg \|\rho \vec{g}\|$ ) compte tenu des dimensions de nos systèmes. L'équation régissant les écoulements se simplifie donc :

$$-\vec{g} \text{rad } p + \mu \Delta \vec{v} = 0 \quad (2.4)$$

Cette équation signifie que la présence d'une différence de pression entre l'entrée et la sortie d'une canalisation permet de mettre en mouvement le fluide. De plus, la vitesse de l'écoulement est limitée par les frottements dans le fluide. Dans le paragraphe suivant, nous montrerons comment l'équation 2.4 permet de lier directement le débit et la pression dans le cas de canalisations rectangulaires. Nous verrons alors qu'il est possible de réaliser une analogie entre l'hydrodynamique et l'électronique.

### 2.1.2 Analogie entre hydrodynamique et électronique

Dans le cas des écoulements laminaires, il existe une relation de proportionnalité entre la différence de pression et le débit. En microfluidique la plupart des canalisations utilisées sont de section rectangulaire, nous allons montrer que cette relation est vraie et dépend de la géométrie de la canalisation, pour cela nous allons d'abord calculer le profil des vitesses dans la canalisation.

#### 2.1.2.1 Cas d'un microcanal rectangulaire :

Nous nous intéresserons à une canalisation rectangulaire de longueur  $L$ , de largeur  $w$  et de hauteur  $h$  avec  $L \gg w$  et  $L \gg h$ . Cette canalisation est soumise à une différence de pression  $\Delta P$  entre l'entrée et la sortie (figure 2.1). Pour connaître le profil des vitesses, nous allons résoudre l'équation 2.4. Comme nous étudions l'écoulement dans un microcanal, le nombre de Reynolds sera inférieur à 1, nous serons donc en présence d'un écoulement laminaire, la vitesse s'écrit donc  $\vec{v} = v(x, y, z) \vec{e}_x$ . De plus la vitesse ne dépend pas de la position en  $x$  car nous sommes dans le cas d'un écoulement incompressible, l'équation de conservation de la masse se simplifie en  $\text{div} \vec{v} = 0$  ce qui implique que  $\frac{\partial v_x}{\partial x} = 0$ . En injectant cette expression dans l'équation 2.4 et en projetant sur les axes  $x, y, z$ , nous obtenons le système suivant :

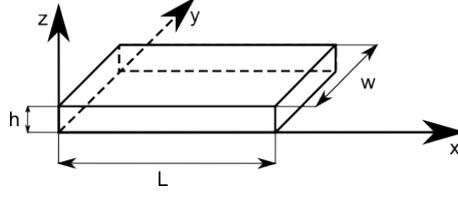


FIGURE 2.1 – Géométrie de la canalisation étudiée

$$\begin{cases} \frac{\partial P}{\partial x} = \mu \left( \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \right) \\ \frac{\partial P}{\partial y} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial z} = 0 \end{cases} \quad (2.5)$$

Du système 2.5, nous pouvons conclure que  $P$  ne dépend que de  $x$  ( car  $\frac{\partial P}{\partial y} = \frac{\partial P}{\partial z} = 0$ ) et que  $\frac{\partial P}{\partial x} = A$  où  $A$  est une constante. En appliquant les conditions aux limites pour la pression  $P$ , on en déduit que  $P(x) = P_0 - \frac{\Delta P x}{L}$ . Pour connaître l'expression de la vitesse sur une section il suffit de résoudre le système suivant :

$$\begin{cases} \frac{\Delta P}{L} = \mu \left( \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \right) \\ \text{C.L. : } v(\pm \frac{h}{2}) = 0 \text{ et } v(\pm \frac{w}{2}) = 0 \end{cases} \quad (2.6)$$

En utilisant un développement en série de Fourier, nous obtenons l'expression de  $v(x, y)$ . Des profils pour différents rapports d'aspect sont représentés sur la figure 2.2.

$$v(y, z) = \frac{8\Delta P}{\mu L w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{\beta_n^3} \left( 1 - \frac{ch(\beta_n z)}{ch(\beta_n \frac{h}{2})} \right) \cos(\beta_n y) \quad (2.7)$$

avec  $\beta_n = (2n - 1) \frac{\pi}{w}$

En intégrant cette expression sur la totalité de la section de la canalisation, nous obtenons l'expression du débit :

$$Q = \iint v(y, z) dz dy \quad (2.8)$$

$$Q = \frac{8\Delta P h}{\mu L w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left( 1 - \frac{2}{\beta_n} th(\beta_n \frac{w}{2}) \right)$$

Cette expression peut être simplifiée afin d'obtenir une bonne approximation du débit (à 10% près d'après [1]), le débit s'exprime alors :

$$Q = \frac{wh^3}{12\mu L} \left( 1 - \frac{6 \times 2^5 h}{\pi^5 w} \right) \Delta P \quad (2.9)$$

Cette expression peut être encore simplifiée dans le cas de canaux ayant un rapport d'aspect important ( $\frac{w}{h} > 10$ ), le terme  $\left( 1 - \frac{6 \times 2^5 h}{\pi^5 w} \right)$  tends vers 1, la relation entre le débit et la pression devient :

$$Q = \frac{wh^3}{12\mu L} \Delta P \quad (2.10)$$

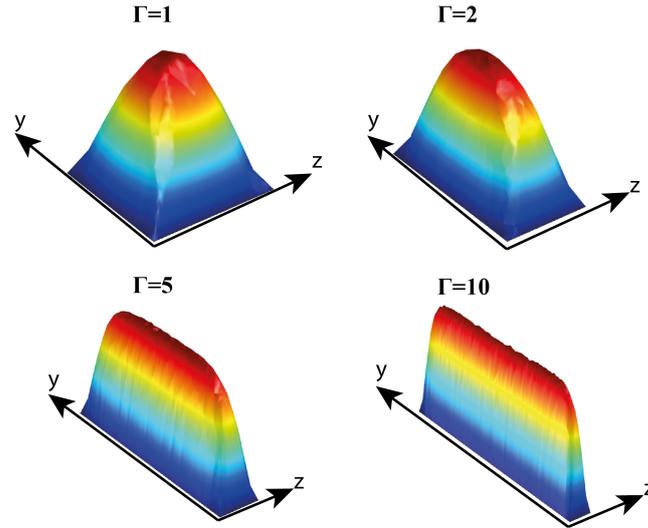


FIGURE 2.2 – Dessins illustrant l'évolution du profil des vitesses en fonction du rapport d'aspect  $\Gamma$ , ces profils ont été obtenus par simulation numérique à l'aide du logiciel Comsol

### 2.1.2.2 Analogie Hydrodynamique-Électronique

Nous avons vu dans la partie précédente que le débit dans un microcanal de longueur  $L$ , de largeur  $w$  et de hauteur  $h$ , est proportionnel à la chute de pression entre l'entrée et la sortie (équations 2.8, 2.9 et 2.10). Ce coefficient de proportionnalité dépend uniquement des grandeurs de la canalisation ( $L$ ,  $w$  et  $h$ ) que nous définirons comme l'inverse de la résistance hydrodynamique  $R_h$ . Nous pouvons donc écrire que :

$$Q = \frac{\Delta P}{R_h} \text{ donc } \Delta P = R_h Q \quad (2.11)$$

Dans l'équation 2.11, nous pouvons faire l'analogie avec l'électronique où  $\Delta P$  correspond à la tension,  $Q$  à l'intensité et  $R_h$  à la résistance électrique. Cette analogie est valable uniquement dans le cas d'écoulement à bas nombres de Reynolds, ce qui est bien évidemment le cas dans nos microcanaux.

L'expression de  $R_h$  est adaptée aux canalisations étudiées (canalisations carrées et rectangulaires : équation 2.8; canalisations rectangulaires : équation 2.9; canalisation à fort rapport d'aspect : équation 2.10). Cette analogie est intéressante pour modéliser des circuits microfluidiques complexes (plusieurs bifurcations, entrées, sorties...), cela nous permet de connaître la répartition des fluides dans les différentes branches de la puce en s'affranchissant des comportements locaux décrits par les équations de Navier-Stokes. Pour cela, il suffit d'écrire le schéma électrique équivalent puis de calculer les résistances hydrodynamiques de chaque branche. Sur le circuit électrique, en appliquant la loi des noeuds et la loi des mailles, nous pouvons connaître les débits dans les différentes branches ainsi que les pressions aux intersections. En utilisant ces particularités il a été possible de réaliser un système permettant d'échantillonner de manière logarithmique le temps de résidence dans la puce (figure 2.3) [2].

### 2.1.3 Conclusions

Dans cette partie, nous avons d'abord introduit le nombre de Reynolds, et montré que les écoulements sont laminaires dans nos microcanaux car le nombre de Reynolds est au maximum

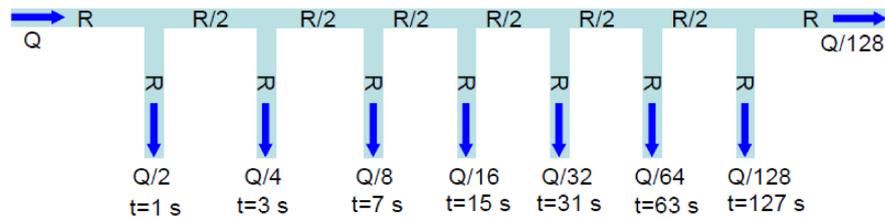


FIGURE 2.3 – Schéma illustrant la possibilité d'échantillonner le temps de résidence dans la puce en choisissant correctement les résistances hydrodynamiques [2]

de l'ordre de 1. Puis nous nous sommes intéressés aux équations de la mécanique des fluides, nous avons montré que les conditions dans lesquelles nous travaillons permettent de les simplifier. À l'aide de ces équations, nous avons démontré que dans le cas d'une canalisation rectangulaire (cas de nos canaux microfluidiques), il existe une relation linéaire entre le débit et le saut de pression entre les deux extrémités des canalisations. Nous avons alors montré qu'il existe une analogie entre l'hydrodynamique et l'électronique. Cette analogie nous permet de modéliser la répartition des fluides et les débits entre les différents canaux des microsystèmes. La connaissance de ces répartitions des fluides est une donnée importante dans la conception des systèmes microfluidiques car c'est ce qui va constituer la base des fonctions de puces. En effet, le choix des résistances hydrodynamique est crucial dans la conception du système car c'est cela qui dicte la répartition des débits dans le système. Ces répartitions s'avèrent extrêmement importantes dans le fonctionnement des systèmes, c'est le cas en particulier des puces microfluidiques permettant la réalisation de gradients de concentration que nous allons décrire par la suite.

## 2.2 Phénomène de diffusion dans les systèmes microfluidiques

Homogénéiser des solutions est un problème rencontré couramment aussi bien dans la vie courante (sucre son café, préparer des sauces...) que dans les problématiques industrielles (mise en contact de produits chimiques, cosmétiques, alimentaires...). Les phénomènes à l'origine du mélange sont dus à un transport de matière. Nous pouvons distinguer deux mécanismes à la physique bien distincte : la convection et la diffusion. Dans cette partie, nous présenterons d'abord le cas de problème purement diffusif dans le mélange de solutions, ensuite nous nous intéresserons à la diffusion dans des microcanaux en présence d'écoulements laminaires, enfin nous développerons les différentes applications à ce phénomène en microfluidique. Il nous intéressera tout particulièrement pour la conception de puces à gradient, et pour la mesure des coefficients de diffusion lors de l'étude cinétique de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ .

### 2.2.1 Notions de base de la diffusion

#### 2.2.1.1 Mécanisme à l'origine de la diffusion

La diffusion de matière est un phénomène qui peut avoir lieu aussi bien dans un fluide (liquide, gaz), que dans un solide (cristallin ou amorphe). Elle tend naturellement à homogénéiser les différences de concentration à l'intérieur d'un milieu. Il s'agit d'un processus irréversible, dont le moteur est l'agitation thermique qui va provoquer le mouvement des molécules des zones de forte concentration vers celles de faible concentration.

En 1855, Adolf Fick a l'intuition que le transport de matière par diffusion suit une loi proche de celle de Fourier (transfert de chaleur à l'intérieur d'un solide). Puis suite à des observations, il

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

énonce une loi qui sera appelée par la suite première loi de Fick : *Le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration* [3], le flux correspond à un nombre de particules traversant une surface par unité de temps. La loi de Fick se traduit alors sous forme mathématique par :

$$\vec{J} = -D \cdot \overrightarrow{\text{grad}} C \quad (2.12)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion de l'espèce dans le milieu, il dépend donc du milieu étudié, de la concentration et de la température. Le moyen de calculer et de déterminer ce coefficient sera explicité plus loin.

Ce phénomène s'explique et se démontre en utilisant des observations à l'échelle microscopique. En effet sous l'action de la température, les molécules ont un mouvement aléatoire de type brownien c'est à dire qu'elles vont subir des chocs avec les particules de fluides qui les entourent. Sous l'action de ces chocs, les molécules vont se déplacer dans le milieu et vont tendre à l'homogénéiser. Ce mouvement est caractérisé par un libre parcours moyen c'est à dire la distance que peut parcourir une molécule entre deux chocs. Cette distance varie selon le milieu considéré : pour un gaz elle est très grande comparée aux autres états de la matière ( $\sim 100nm$ ), pour un liquide elle est du même ordre que la taille de la molécule (quelques nanomètres) et pour un solide elle correspond à l'amplitude de la vibration des atomes autour de leurs positions d'équilibre (quelques Angstrom). En observant une particule soumise uniquement à la diffusion pendant un temps suffisamment long, il est possible de remonter à la valeur du coefficient de diffusion en utilisant l'équation liant le déplacement quadratique moyen et le temps (équation 2.13). Cette relation a été démontrée en 1905 par Einstein suite à ses travaux sur le calcul stochastique. Cela a notamment permis de démontrer la loi de Fick (équation 2.12) et de connaître l'origine microscopique de ce phénomène.

$$\langle X^2 \rangle = 2Dt \quad (2.13)$$

Suite aux travaux sur les calculs stochastiques, Einstein a démontré que le coefficient de diffusion d'une espèce est inversement proportionnel à sa taille. C'est à dire que plus une molécule est grosse, moins elle diffuse rapidement dans le milieu. Dans la loi Stokes-Einstein qui permet de calculer le coefficient de diffusion à partir du rayon hydrodynamique (équation 2.14), le terme  $kT$  représente l'agitation thermique qui va provoquer le mouvement des particules (où  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température), ce mouvement s'accompagne d'une force de frottement ( $6\pi\eta r$ ) qui est proportionnelle au rayon hydrodynamique ( $r$ ) de la particule. Ce rayon hydrodynamique est difficile à connaître pour les molécules car leur repliement dépend de nombreux paramètres tels que la salinité, le pH, le solvant.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (2.14)$$

Maintenant que nous avons explicité l'origine de la diffusion, nous allons poser dans le cas général l'équation différentielle qui régit cette physique.

### 2.2.1.2 Équation de la diffusion

Afin de mettre en équation un problème de diffusion précis, nous allons tout d'abord nous intéresser au cas général. Nous nous plaçons dans le cas où l'espèce étudiée se trouve dans un fluide que nous supposons incompressible. Son coefficient est homogène, indépendant de la concentration (nous considérons que l'étude porte sur la diffusion d'espèces diluées, dans le cas de fortes concentrations,  $D$  dépend de la concentration, et le problème n'admet pas toujours de solutions analytiques). Nous définissons  $J(x, \vec{y}, z)$  comme le flux de particules et  $C(x, y, z, t)$  la concentration au point  $(x, y, z)$  à l'instant  $t$ . En écrivant l'équation de conservation de la matière, nous avons la

relation suivante :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\text{div}(\vec{J}) \quad (2.15)$$

Dans le cas d'un écoulement, le flux particulaire est composé de deux termes : l'un décrivant les effets diffusifs  $\vec{J}_d$  qui suit la loi de Fick (équation 2.12), l'autre décrivant les effets convectifs  $\vec{J}_c$  qui s'écrit  $\vec{J}_c = C\vec{v}$  où  $\vec{v}$  est la vitesse du fluide. Le flux particulaire s'écrit donc :

$$\vec{J} = -D \cdot \overrightarrow{\text{grad}} C + C\vec{v} \quad (2.16)$$

En utilisant cette relation dans l'équation 2.15, nous obtenons l'équation régissant la diffusion en présence de flux convectif (équation 2.17). Les solutions de cette équation ne peuvent pas toujours être obtenues analytiquement, il faudra alors utiliser des logiciels de calcul numérique faisant appel à la méthode des éléments finis. La diffusion avec convection sera traitée plus en détails dans la suite de ce chapitre (partie 2.2.2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\Delta C + \text{div}(C\vec{v}) \quad (2.17)$$

Dans le cas d'un problème de diffusion simple (sans écoulement de fluide), cette équation se simplifie. En effet le flux particulaire  $\vec{J}$  suit uniquement la loi de Fick (équation 2.12), l'équation régissant la diffusion simple s'écrit alors :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\Delta C \quad (2.18)$$

### 2.2.1.3 Résolution des équations de diffusion dans des cas simples

Nous nous intéressons maintenant à la résolution des équations de diffusion dans le cas de tubes infiniment longs, sans phénomène convectif. Nous traitons donc un problème 1D. Les solutions de ces problèmes (solutions analytiques) serviront de base pour la compréhension des phénomènes de diffusion dans les microcanaux. Nous étudierons d'abord la diffusion d'un "Dirac", puis d'un demi-espace et enfin d'un créneau [4].

**Diffusion d'un "Dirac" de concentration :** Nous allons étudier la dispersion 1D d'un pic de concentration situé en  $x = 0$  au temps  $t = 0$ , nous posons  $M$  la quantité de matière déposée. Tout le long du phénomène de diffusion, nous n'avons pas d'apport de matière donc cette quantité est constante et s'écrit :

$$\forall t, M = \int_{-\infty}^{+\infty} C(x, t) dx \quad (2.19)$$

La résolution de ce problème sert de base à la résolution de la majorité des problèmes de diffusion. La solution de l'équation différentielle 2.18 s'écrit avec les conditions initiales précédentes :

$$C(x, t) = \frac{A}{\sqrt{t}} \exp \frac{-x^2}{4Dt} \text{ où } A \text{ est une constante} \quad (2.20)$$

En réinjectant cette solution dans l'équation 2.19 nous obtenons la valeur de  $A$  et ainsi la solution de l'équation différentielle 2.18 :

$$C(x, t) = \frac{M}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp \frac{-x^2}{4Dt} \quad (2.21)$$

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

Cette solution est une gaussienne d'écart-type  $\sigma = \sqrt{2Dt}$  lequel permet de quantifier la largeur d'étalement de la distribution initiale. C'est cette grandeur que nous mesurerons expérimentalement afin de déterminer le coefficient de diffusion ou sa variation (figure 2.4). Nous observons que l'étalement du Dirac suit une loi en  $\sqrt{t}$ , nous pouvons le rapprocher des observations microscopiques où une marche aléatoire suit aussi une loi en racine.

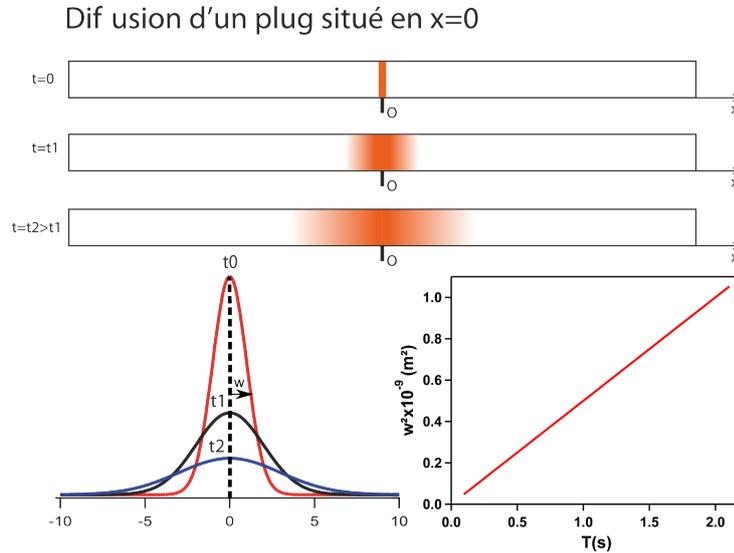


FIGURE 2.4 – Schéma illustrant la solution du problème de diffusion d'un plug en  $x=0$

**Diffusion d'un demi-espace et d'un plug de concentration :** Nous nous plaçons toujours dans le cas d'un tube infiniment long, nous sommes donc dans le cas d'un problème 1D. A l'instant initial, le tube contient sur la longueur comprise entre  $-\infty$  et 0 une solution contenant une espèce à la concentration  $C_0$  comme représenté sur la figure 2.6. Les conditions initiales d'un tel système s'écrivent :

$$C(x, 0) = \begin{cases} C_0 & \text{si } x < 0 \\ 0 & \text{si } x > 0 \end{cases} \quad (2.22)$$

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la distribution obtenue à partir d'un pic de concentration se propage selon une loi gaussienne d'écart type  $\sigma = \sqrt{2Dt}$ . La linéarité de l'équation 2.18 et le théorème de superposition nous permettent de ramener notre problème à une infinité de pics de largeur  $\delta\psi$  et diffusant tous de la même manière. La concentration due à la diffusion de ce petit élément  $\delta\psi$  au point P distant de  $\psi$  (figure 2.5) suit une loi gaussienne s'écrivant :

$$\forall t \quad dC(\psi, t) = \frac{C_0 \delta\psi}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp \frac{-\psi^2}{4Dt} \quad (2.23)$$

Pour remonter à la concentration  $C(x, t)$ , il suffit d'utiliser le théorème de superposition : la concentration en x va être la somme de toutes les concentrations issues des différents éléments  $\delta\psi$ .

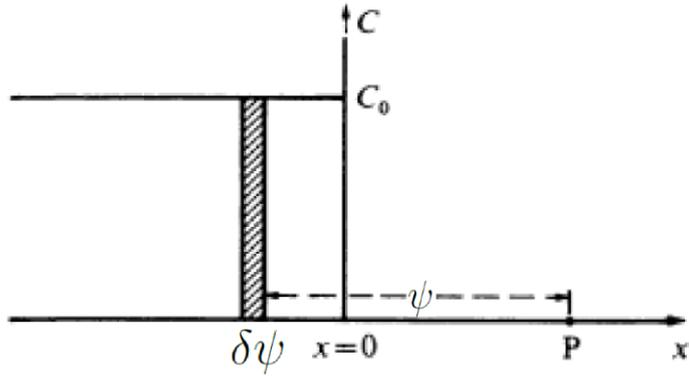


FIGURE 2.5 – schéma définissant l'élément  $\delta\psi$  [4]

Mathématiquement, ceci se traduit par :

$$\begin{aligned}
 C(x, t) &= \int_{-\infty}^x dC(\psi, t) \\
 &= \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \int_x^{\infty} \exp \frac{-\psi^2}{4Dt} d\psi \quad \text{nous posons } \eta = \frac{\psi}{2\sqrt{Dt}} \\
 &= \frac{C_0}{\sqrt{\pi}} \int_{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}}^{\infty} \exp -\eta^2 d\eta \quad \text{par définition de la fonction erreur : } \operatorname{erfc}(x) = \frac{2}{\pi^{1/2}} \int_x^{\infty} \exp -\eta^2 d\eta \\
 &= \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)
 \end{aligned}
 \tag{2.24}$$

Comme pour le problème précédent, nous observons que l'élargissement du profil dépend directement du coefficient de diffusion  $w = \sqrt{Dt}$ , nous pourrions déterminer aisément le coefficient d'une molécule diffusant selon cette configuration en traçant la courbe  $w^2$  en fonction du temps, il s'agira d'une droite dont le coefficient directeur est la valeur du coefficient de diffusion (figure 2.6).

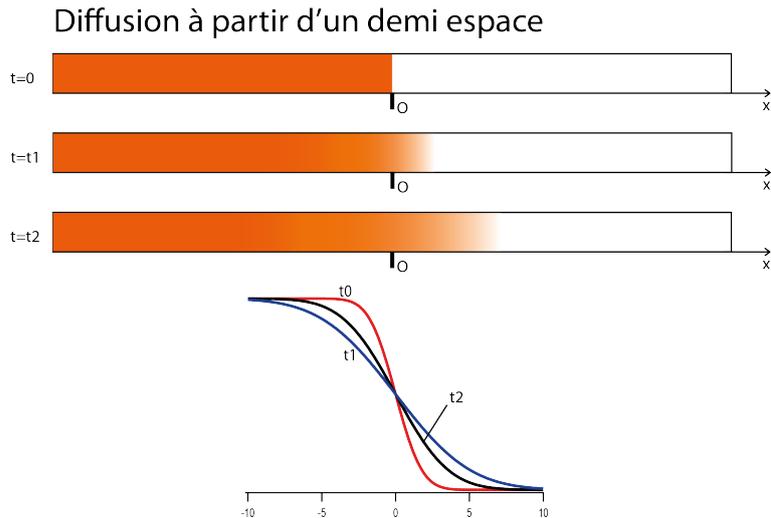


FIGURE 2.6 – Schéma illustrant la diffusion à partir d'un demi-espace

De la même manière, nous pouvons étudier la diffusion d'une substance contenue à l'instant initial dans la région comprise entre  $-h$  et  $+h$ . En décomposant cet espace en petits éléments comme

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

nous l'avons fait précédemment et en appliquant le théorème de superposition, nous obtenons la solution :

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2} \left\{ \operatorname{erfc} \left( \frac{h-x}{2\sqrt{Dt}} \right) + \operatorname{erfc} \left( \frac{h+x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right\} \quad (2.25)$$

### 2.2.2 Diffusion dans les microcanaux

En microfluidique, la nature de l'écoulement est laminaire, ce qui signifie qu'il n'y a pas de phénomène turbulent. Le mélange se fait uniquement par diffusion ce qui implique qu'elle joue une place importante dans le domaine. De nombreux systèmes microfluidiques sont basés sur ce principe physique tels que les filtres en H qui permettent la séparation de particules de différentes tailles, les mélangeurs et les puces générant les gradients de concentration. Il paraît alors important de décrire les différents phénomènes qui apparaissent lors de la diffusion d'une espèce soumise à un écoulement laminaire. Tout d'abord, nous présenterons le problème classique de diffusion dans des microcanaux, puis nous introduirons le nombre de Peclet, ensuite les phénomènes dus à la combinaison des écoulements et de la diffusion, enfin nous montrerons dans quelles mesures ils peuvent être négligés rendant possible l'utilisation des solutions analytiques présentées dans la partie précédente.

#### 2.2.2.1 Présentation du problème

Le problème classique de diffusion en microfluidique est présenté sur la figure 2.7. Par l'entrée B, nous injectons une solution contenant l'espèce C qui doit diffuser, et par l'entrée A une solution de solvant seul. Nous faisons l'hypothèse que les écoulements sont laminaires et dans un régime stationnaire. Nous nous placerons dans le cas de canaux rectangulaires, le profil des vitesses dans la section dépendra du rapport d'aspect (figure 2.2). L'étude de la diffusion dans les microcanaux consiste à étudier les profils de concentration le long de la canalisation et à en comprendre l'origine.

Les équations de diffusion sont modifiées par rapport au problème de diffusion simple, en effet

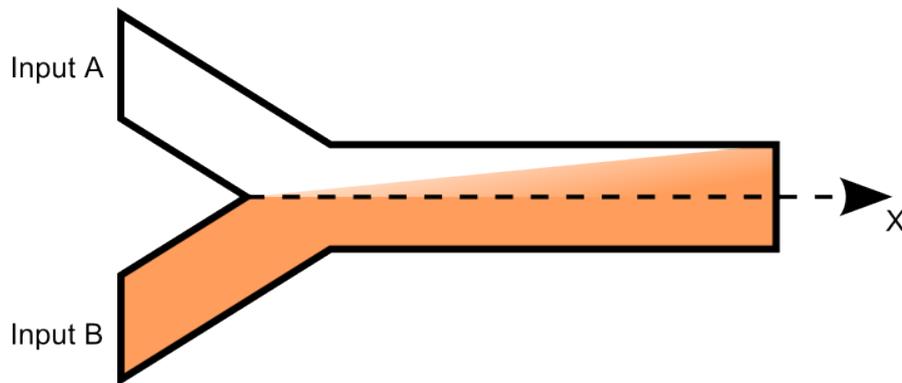


FIGURE 2.7 – Problème classique de diffusion dans les microcanaux

un terme convectif est ajouté au flux particulaire (équations 2.16 et 2.17). Il y a donc une compétition entre le terme convectif et diffusif pour réaliser le mélange. Afin de les comparer, nous utilisons un nombre sans dimension, le nombre de Peclet, il s'écrit :

$$Pe = \frac{L_c v}{D} \quad (2.26)$$

où  $L_c$  représente une longueur caractéristique de l'écoulement,  $v$  la vitesse de l'écoulement et  $D$  le coefficient de diffusion. Plus  $Pe$  sera grand plus les effets convectifs prédomineront sur les effets diffusifs.

La résolution de ce problème ne peut pas se faire analytiquement, mais uniquement à l'aide de simulations numériques basées sur des calculs d'éléments finis.

### 2.2.2.2 La longueur de mélange

Elle correspond à la longueur nécessaire pour obtenir une solution homogène dans le cas du problème classique présenté précédemment. Elle dépend de plusieurs paramètres : le débit à l'intérieur de la canalisation qui fixe la vitesse moyenne de l'écoulement, le coefficient de diffusion de la molécule d'intérêt et la largeur de la canalisation  $w$ . Une première approximation consiste à dire que la vitesse à l'intérieur de la canalisation est homogène et égale à la vitesse moyenne  $v_{moy}$ , cette composante est uniquement selon l'axe  $x$ . Donc seule la diffusion assure le transport de l'espèce selon la direction transverse de la canalisation. Donc le modèle 1D de diffusion d'un demi-espace constitue une bonne approximation, le temps ayant pour valeur  $x/v_{moy}$ . Le profil de concentration obéit donc à la loi suivante :

$$C(x, y) = \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc} \left( \frac{y}{2\sqrt{Dx/v}} \right) \quad (2.27)$$

Dans cette formule, nous posons  $A(x)$  la longueur de diffusion transverse tel que  $A(x) = \sqrt{Dx/v_{moy}}$ . Le mélange sera effectué pour une longueur  $L_m$  tel que  $A(L_m) = w$ , nous pouvons donc en déduire que la longueur de mélange s'écrit :

$$L_m = \frac{w^2 v}{D} \quad (2.28)$$

La connaissance de cette longueur est utile pour le dimensionnement des systèmes de gradient, elle permet de connaître son ordre de grandeur et ainsi d'optimiser les longueurs des canalisations (partie 2.3.2). Le mélange par diffusion est relativement lent et nécessite des longueurs importantes ( $L_m = 20 \text{ cm}$  pour  $w=100\mu\text{m}$ , coefficient de diffusion de la fluorescéine :  $D = 5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  et  $v=1\text{mm/s}$ ), ce constat a conduit au développement de techniques visant à améliorer la vitesse de mélange (partie 2.3.1).

### 2.2.2.3 Les dispersions dues aux écoulements laminaire

Dans la partie 2.1.1, nous avons vu que le profil des vitesses dans les canaux n'est pas homogène. Cette inhomogénéité est à l'origine de dispersions modifiant le profil de diffusion. Pour étudier ces phénomènes, nous nous placerons dans le cas d'un canal ayant un fort rapport d'aspect ( $w \gg h$ ), le profil des vitesses s'écrit :

$$v(z) = v_{\max} \left( 1 - \frac{4z^2}{h^2} \right) \text{ avec } v_{\max} = \frac{h^2}{8\mu} \frac{\Delta P}{L} \quad (2.29)$$

**La dispersion de Taylor-Aris :** Ce phénomène a été mis en avant lors de la dispersion d'un plug (dans le plan  $zx$ , figure 2.8) soumis à un écoulement laminaire et stationnaire. Sous l'action de l'écoulement parabolique, le plug va s'étirer et prendre la forme du profil des vitesses, cette forme est observable pour des temps petits devant le temps nécessaire à homogénéiser la concentration dans l'épaisseur ( $t \ll h^2/D$ ). Sous l'action de la diffusion, ce profil de concentration va s'homogénéiser pour former une bande de largeur  $l = v_{\max} h/D$ . Si nous découpons cette bande

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

en plug et en lui appliquant le même raisonnement nous obtiendrons alors une bande de concentration inhomogène à laquelle nous pouvons appliquer le même raisonnement. Si nous le répétons  $N$  fois, nous pouvons montrer que le plug initial s'est élargi de façon inhomogène et que le profil ainsi formé suit une gaussienne de largeur  $L_g = N^{1/2}l = \left(\frac{v_{max}^2 h^2}{D} t\right)^{1/2}$ . Nous pouvons alors définir un coefficient de diffusion apparent selon  $x$  ( $D_x$ ) qui va s'ajouter au coefficient de diffusion et qui n'influencera la diffusion que selon l'axe  $x$ . La valeur de  $D_x$  dépend de la géométrie, dans notre cas  $D_x = \frac{v_{moy}^2 h^2}{210D}$  [5]. Le coefficient réel selon  $x$  sera alors  $D_r = D + D_x$ , ce phénomène a donc tendance à améliorer le processus de mélange selon  $x$ . En revanche pour les systèmes microfluidiques de type puce de réaction diffusion (partie 2.3.3), la diffusion est transverse et ne se fait pas selon la direction  $x$  (flux stationnaire et peut être considéré comme uniforme selon la direction  $y$ ), la dispersion de Taylor-Aris n'influence pas leurs comportements [5]. Une des principales applications de ce phénomène est le mélangeur rotatif, dans un canal en forme d'anneau des plugs de réactifs sont injectés puis mis en rotation à l'aide d'une pompe péristaltique [6] ce qui permet d'obtenir des solutions homogènes en des temps très court. En revanche, ce phénomène ne permet pas de transporter un plug sans qu'il ne se déforme ce qui peut être limitant pour certaines applications et rend obligatoire l'utilisation de champs électriques pour mettre en mouvement les fluides.

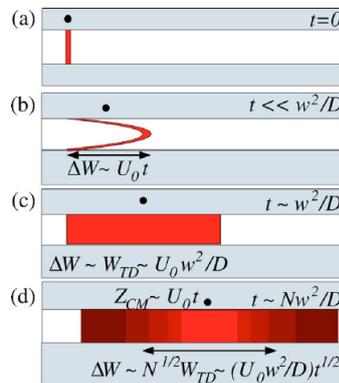


FIGURE 2.8 – Mécanisme de dispersion de Taylor-Aris [5]

**Phénomène de diffusion au voisinage des murs :** Il est particulièrement important pour les puces de réaction-diffusion (puce en T). Son origine vient de l'inhomogénéité des vitesses dans une canalisation de section rectangulaire. En effet, si nous regardons la section de la canalisation perpendiculairement à l'axe  $x$ , dans les premiers instants du processus de diffusion, nous observons que près des murs supérieurs et inférieurs le front de diffusion est plus avancé (figure 2.9). L'étude de ce phénomène a permis de montrer que, dans les premiers instants, la loi de diffusion n'est pas la même en fonction de la position dans le canal. En effet proche des murs inférieurs et supérieurs, la diffusion suit une loi en puissance  $1/3$  ( $w \sim x^{1/3}$ ) tandis que dans le centre de la canalisation, la loi est en puissance  $1/2$  ( $w \sim x^{1/2}$ ). Cette différence est due à l'effet couplé de la diffusion transverse et du gradient de vitesse dans la canalisation [7] [8]. En effet, la vitesse près des murs est plus lente à cause des conditions aux limites de non glissement, cela implique que la diffusion proche des murs est accélérée. Salmon *et al.* ont montré que la portée de cet effet est limitée selon la direction  $x$ . Pour  $x > 0.1Pe$  avec  $Pe = \frac{h^2 v_{moy}}{D}$ , la diffusion selon l'épaisseur a permis l'homogénéisation du profil et cet effet devient négligeable. Pour simplifier l'analyse, il convient donc pour la détermination des coefficients de diffusion et des constantes de réaction de se placer dans le cas où cet effet est négligeable. Nous reviendrons sur la détermination de ces constantes dans la partie 2.3.3.

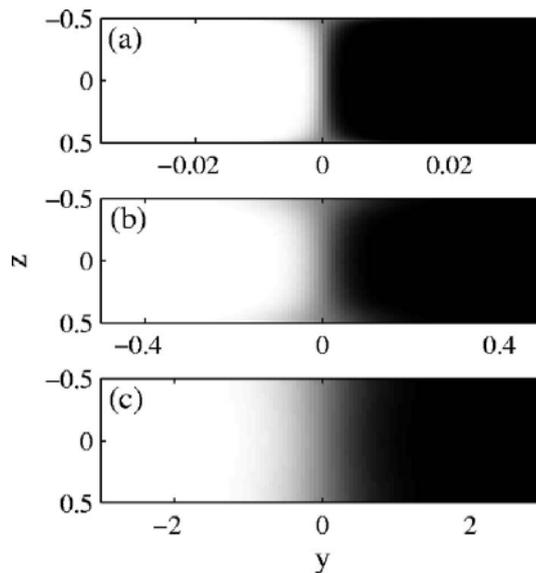


FIGURE 2.9 – Images montrant l’évolution de la diffusion dans la section de la canalisation pour différentes longueurs. Sur les deux premières, nous pouvons observer les effets dus à l’inhomogénéité du profil de diffusion. Sur la troisième, l’interface est homogène [7].

## 2.3 Application du phénomène de diffusion en microfluidique

L’hydrodynamique et la diffusion tiennent une place importante dans la conception des puces microfluidiques. Dans cette partie, nous verrons quelques applications faisant appel aux notions que nous avons développées précédemment. Nous présenterons d’abord les différents types de mélangeurs puis les puces permettant la génération de gradient de concentration et enfin l’étude des puces de réaction-diffusion.

### 2.3.1 Les mélangeurs

Nous avons vu que dans le cas d’écoulement laminaire, le mélange est purement diffusif, ce qui implique des longueurs de mélange importantes. Face à ce constat de nombreuses études ont été menées afin d’améliorer le mélange dans les systèmes microfluidiques dans le but de pouvoir réaliser des puces permettant d’étudier des réactions chimiques ou de cribler un grand nombre de conditions expérimentales. L’une des méthodes les plus employées est d’augmenter la surface de contact entre les deux espèces et ainsi d’accélérer le mélange par diffusion [9]. Nous pouvons classer ces mélangeurs en deux grandes familles selon qu’ils soient actifs (faisant appel à une force extérieure pour réaliser le mélange) ou passifs (uniquement basés sur la géométrie de la puce).

#### 2.3.1.1 Les micro-mélangeurs passifs

Les micro-mélangeurs passifs utilisent les propriétés des écoulements, et la géométrie des puces pour homogénéiser les solutions. Nous avons vu précédemment que les écoulements dans les microcanaux sont laminaires (partie 2.1.1), il n’y a donc pas de turbulence, le seul moyen utilisable pour diminuer les temps de mélange est d’augmenter les surfaces d’échange (front de diffusion).

**Les micro-mélangeurs en T et Y :** Ce type de micro-mélangeur constitue le mélangeur de base de la plupart des mélangeurs passifs. Ils se composent de deux entrées qui convergent dans un canal principal où les fluides coulent conjointement. Le mélange entre les fluides se fait par

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

inter-diffusion le long de la canalisation (figure 2.10). Les temps de mélange de ces dispositifs sont fixés par les coefficients de diffusion, la vitesse de l'écoulement et la largeur de la canalisation. En fonction de ces paramètres, nous connaissons donc la longueur de canalisation nécessaire au mélange ( $L_m = L_m = \frac{w^2 v}{D}$  :équation 2.28). Dans la partie 2.2.2, nous avons montré que  $L_m$  est relativement grande, ce qui implique des systèmes de mélange encombrants. En partant de ce constat, un moyen efficace de diminuer le temps de mélange est d'augmenter les surfaces d'échanges entre les deux fluides.

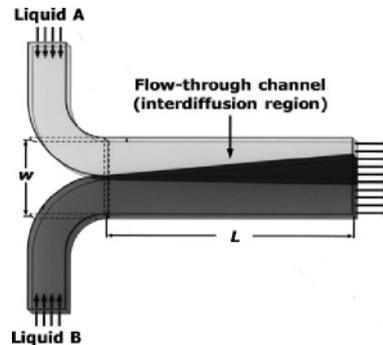


FIGURE 2.10 – Schéma d'un micro-mélangeur en T [9]

**Les micromélangeurs par lamination :** Dans les micromélangeurs en T, il n'existe qu'un seul front d'échange entre les deux fluides, le principe des mélangeurs par lamination est d'augmenter le nombre de fronts pour diminuer le temps de mélange. Erbacher *et al.* ont montré que le temps de mélange est inversement proportionnel au carré du nombre flux issue du flux principal  $n$  et  $T_m \sim \frac{w^2}{2n^2 D}$  [10]. Dans le cas d'un front unique, l'espèce doit diffuser sur une largeur de  $w$  ce qui donne  $t_m = \frac{w^2}{D}$ . Si maintenant nous avons  $n$  fronts, la largeur de diffusion de l'espèce sera alors  $\frac{w}{n}$ , ce qui implique un temps de mélange de l'ordre de  $\frac{w^2}{2n^2 D}$ . Devant ce constat, les premières géométries se sont attachées à diviser les deux flux entrant en une multitude de flux secondaires qui sont recombinaés en un empilement successif dans le canal principal [9] [10]. Puis le canal principal subit une restriction, le but est de diminuer la largeur de canalisation  $w$  donc le temps de mélange. Cette restriction provoque un amincissement des flux secondaires. Ces dispositifs ont des géométries relativement complexes nécessitant de nombreuses étapes de fabrication (superposition de couches, système encombrant). Afin d'améliorer ces systèmes, de nouvelles géométries ont été conçues, elles fonctionnent sur le principe de lamination successive. Les flux principaux sont coupés en deux flux secondaires chacun puis recombinaés pour créer un empilement des deux espèces (figure 2.11) [11]. Puis cette étape est répétée pour obtenir un grand nombre de front d'échange et ainsi diminuer fortement le temps de mélange.

**Les micromélangeurs à chevrons :** Ces mélangeurs sont constitués d'une canalisation principale au fond de laquelle sont creusés des séries de chevrons (figure 2.12). Ces motifs forcent le fluide à prendre une direction oblique par rapport à la direction de l'écoulement principal, cela provoque alors un mouvement hélicoïdal du fluide. Sur la figure 2.12 nous observons que l'orientation des chevrons influe sur la position du centre de l'hélice. Un changement d'orientation des chevrons se traduit par l'apparition de mouvements chaotiques au sein de l'écoulement qui provoque un repliement des interfaces, ce qui est propice à la réalisation des mélanges. Avec ce type de mélangeur, la longueur de mélange  $L_m$  ( $L_m = w \log(Pe)$  d'après [12]) peut être ramenée à une distance de quelques dizaines de fois la largeur de la canalisation, ce qui est bien inférieur à la longueur de diffusion simple.

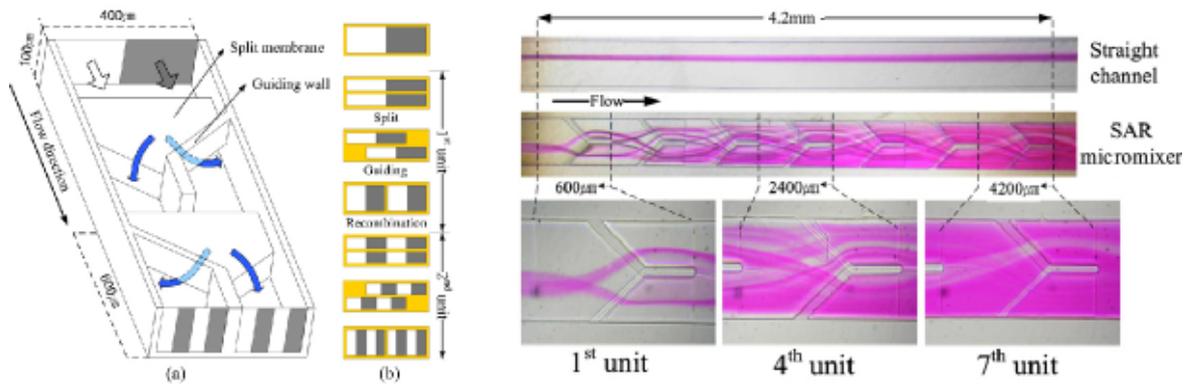


FIGURE 2.11 – Micro-mélangeur par lamination successives [11]

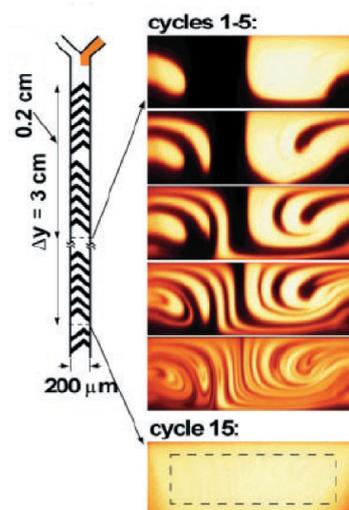


FIGURE 2.12 – Schéma d'un mélangeur à chevrons et image illustrant les recirculations de fluides [12]

**Conclusion :** Nous avons vu dans cette partie quelques exemples significatifs de mélangeurs passifs. Ces dispositifs présentent tous l'avantage d'améliorer significativement le processus de mélange sans faire appel à une source d'énergie externe. En revanche, leurs réalisations nécessitent des processus de fabrication complexes ce qui peut limiter leur intégration dans des systèmes microfluidiques plus évolués.

### 2.3.1.2 Les micro-mélangeurs actifs

Les micro-mélangeurs actifs font appels à une source d'énergie extérieure afin de perturber l'écoulement et ainsi améliorer le processus de mélange. Nous pouvons les classer en fonction de la source d'énergie utilisée :

- Champs de pression
- Instabilité électrocinétique
- Ondes acoustiques

**Les mélangeurs à champs de pression :** Le principe de ce type de mélangeurs est d'engendrer une perturbation de l'écoulement en créant des surpressions à l'intérieur du système. Pour cela plusieurs méthodes sont utilisées, l'une d'elle consiste à travailler avec des mélangeurs en T et à

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

moduler les débits d'entrée des solutions à mélanger afin de créer des inclusions, des repliements au niveau du front de diffusion [13]. Sur ce système, le déphasage entre les deux débits a un rôle important puisqu'il définit la forme du front de diffusion. Les meilleurs résultats sont obtenus pour un déphasage de  $180^\circ$  (figure 2.13). Une autre méthode faisant appel à un champ de pression consiste à ajouter de part et d'autre du canal principal deux canaux perpendiculaires permettant de générer des pulsations de pression [14]. Ces deux types de mélangeurs permettent d'augmenter la surface d'échange entre les deux solutions, ce qui conduit à améliorer les temps de mélange.

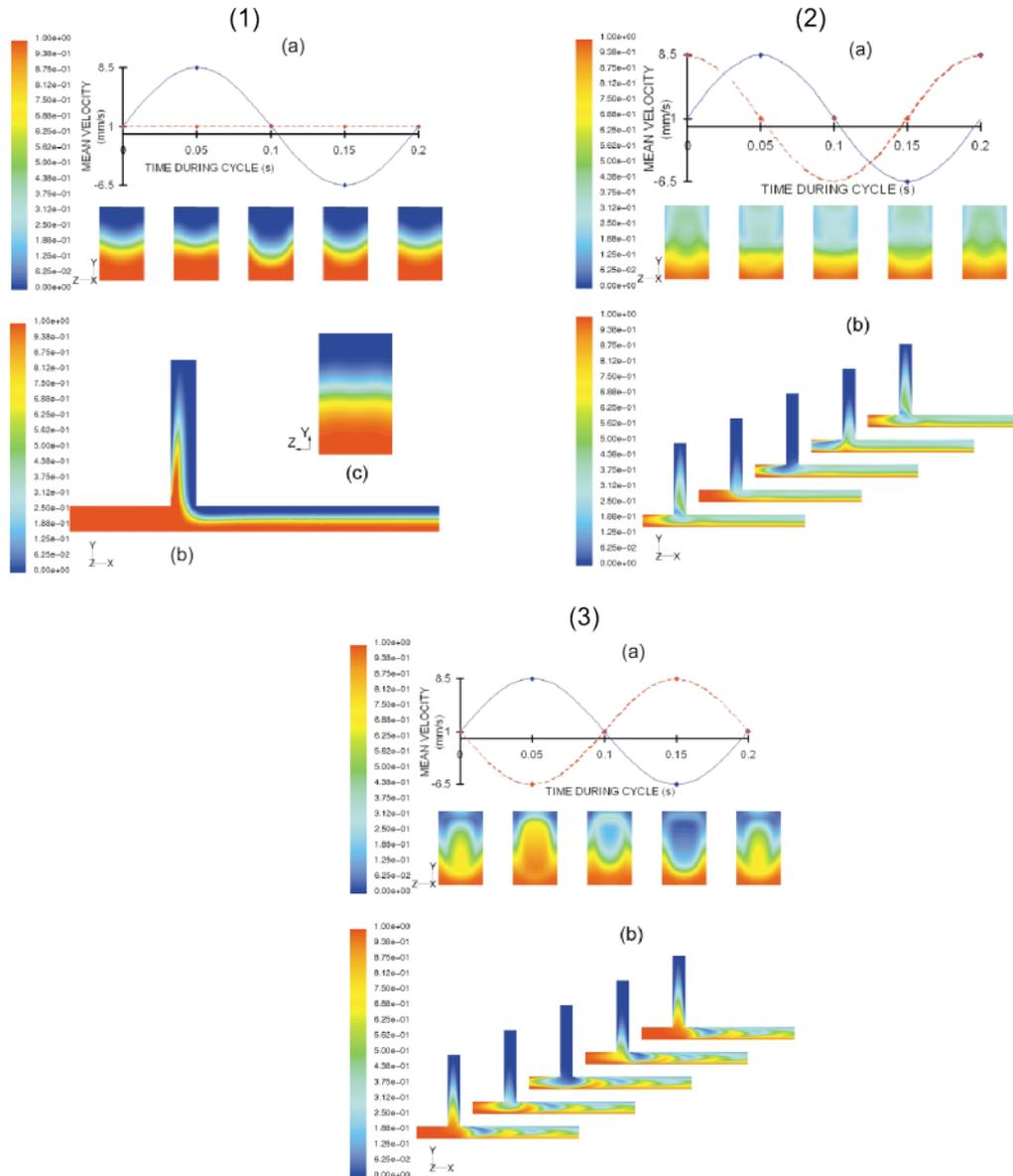


FIGURE 2.13 – Mélange par modulation des débits d'entrée [13] : (1) Un débit est fixe et l'autre est modulé selon une sinusoïde. (2) et (3) les débits sont modulés avec une sinusoïde et déphasés respectivement de  $90^\circ$  et de  $180^\circ$ .

**Les mélangeurs à instabilités électrocinétiques :** Une autre manière de mettre en mouvement des fluides est d'utiliser un champ électrique entre les entrées et sorties des canalisations en présence de solutions salines. Dans une puce en T, lorsque la concentration en solution saline est la même entre les deux entrées et qu'ils font circuler un marqueur fluorescent dans l'une d'elle,

## 2.2.3 Application du phénomène de diffusion en microfluidique

le front de diffusion sera alors stable. En revanche, si la concentration en solution saline est différente entre les deux entrées, pour certaines tensions, une instabilité électrocinétique se met en place provoquant un étirement et un repliement du front de diffusion [15]. Oddy *et al.* proposent une puce en T actionnée à l'aide d'un pousse-seringue muni d'un réservoir connecté à deux entrées fluidiques reliées à une source de tension (figure 2.14). Ce système permet de réaliser un mélange de la solution en 3 secondes. Ces systèmes sont efficaces pour homogénéiser rapidement des solutions, ils ne nécessitent pas de technologie importante pour leur réalisation. En revanche ils ne peuvent fonctionner qu'en présence d'un gradient de solution saline ce qui n'est pas compatible avec tous les types d'application. De plus l'ajout de champs électriques modifie aussi fortement le profil des vitesses (électro-osmose) ce qui a un impact sur le phénomène de diffusion.

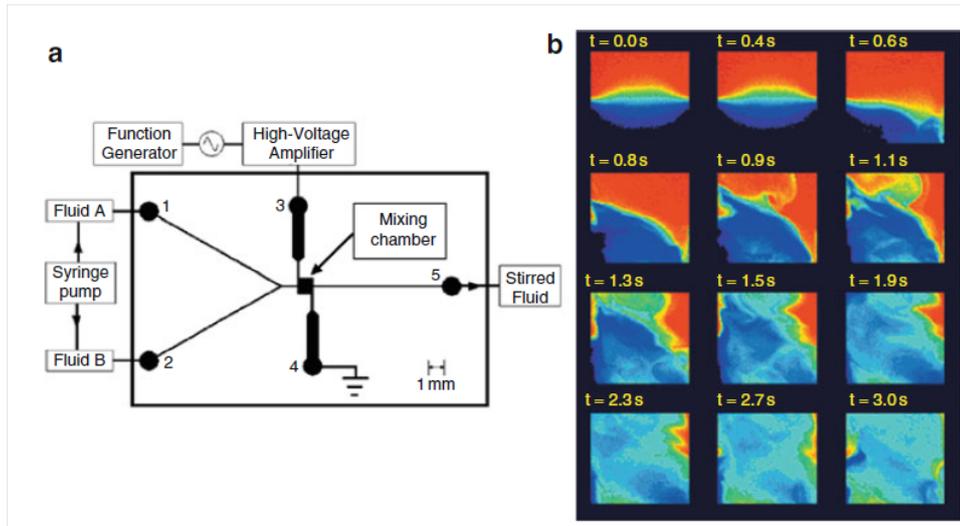


FIGURE 2.14 – Mélange par instabilité électrocinétique [16]

**Les mélangeurs utilisant les ondes acoustiques :** Le principe de fonctionnement de ces mélangeurs est de créer une onde acoustique ultra-sonore perpendiculaire à la direction du fluide. Elle engendre une perturbation de l'écoulement et génère un mélange comparable à celui obtenu pour des écoulements turbulents. Ces ultrasons sont produits à l'aide de céramiques piézoélectriques implantées au fond de la canalisation [17]. Le processus peut être encore amélioré en piégeant des bulles d'air au dessus des céramiques. La bulle est excitée jusqu'à sa fréquence de résonance, les ondes acoustiques transmises dans le fluide sont alors plus importantes, ce qui améliore la capacité de mélange du système (figure 2.15) [18].

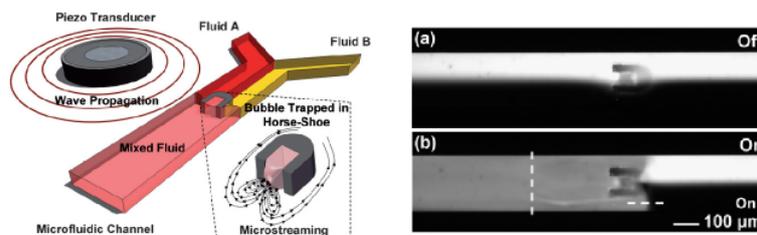


FIGURE 2.15 – Mélange par ondes ultra sonores générées par des actionneurs piézoélectriques implantés au fond de la canalisation avec bulles d'air [18].

### 2.3.1.3 Conclusion

Les mélangeurs passifs et actifs permettent d'améliorer le temps de mélange dans les microcanaux. Les mélangeurs passifs constituent une bonne option car ils ne nécessitent pas d'apport externe d'énergie, en revanche leur intégration peut être limitée à cause de la complexité de leur design ou de leur réalisation. D'un autre côté les mélangeurs actifs permettent d'avoir des designs beaucoup plus simples pour des temps de mélange intéressants, par contre leur fonctionnement nécessite parfois des conditions de fonctionnement particulières (propriété spécifique du fluide, solution saline, géométrie spécifique...) ce qui limite leurs utilisations. De plus, pour réaliser ces systèmes de nombreuses étapes sont nécessaires ce qui peut à terme freiner leur intégration dans des systèmes déjà complexes.

### 2.3.2 Génération de gradient de concentration à l'aide de puces microfluidiques

De nombreuses études biologiques (cytotoxicité, étude des milieux de cultures...) et chimiques (diagramme de phases, étude des cinétiques en fonction des concentrations...) nécessitent de réaliser des criblages de concentration. Les méthodes classiques de préparation font appel soit à des robots de pipetage, soit à un opérateur. Les principaux inconvénients sont pour la première le coût du matériel et pour la seconde le temps de préparation et les incertitudes de mesure des volumes. Face à ces constats, l'émergence des laboratoires sur puce a permis le développement de systèmes microfluidiques réalisant des gradients de concentration pouvant remplacer ces méthodes traditionnelles. Ces puces possèdent classiquement deux entrées : l'une accueillant le produit à diluer et l'autre le solvant servant à faire la dilution. Deux types de gradient de concentration sont générés par les puces microfluidiques : soit un gradient continu [19] [20] [21], soit un gradient discrétisé (échantillonnage des concentrations) [22] [23] [24]. Les applications de ces gradients sont différentes, le premier est surtout utilisé pour étudier la chemotaxie (déplacement induit par une inhomogénéité spatiale d'un produit chimique) des cellules, tandis que le second est plus adapté pour réaliser un criblage multicondition. Leurs conceptions se distinguent fortement, pour le premier il s'agira de contrôler, à l'entrée d'une chambre microfluidique fermée par des membranes, les apports en produit et en solvant afin de générer un gradient stable tandis que le second sera basé sur l'architecture du système microfluidique lequel déterminera le profil de concentration de sortie. Par la suite, nous nous attacherons à développer le principe de fonctionnement de ces deux types de systèmes mais nous nous attarderons plus sur le second car il est de loin le plus utilisé.

#### 2.3.2.1 Les puces à gradient continu

Le but de ces puces est de créer un gradient de concentration à l'intérieur d'une chambre microfluidique et de le maintenir dans le temps. Pour le générer, les chambres sont connectées à des sources permettant d'assurer les apports en produit et en solvant. Les sources se présentent sous la forme d'une membrane ou un canal de petite taille afin d'éviter tout flux convectif dans la chambre. D'un côté, il y aura le gradient et de l'autre un canal microfluidique dans lequel circule les produits. Le but de ce canal est d'assurer toujours un flux constant à travers la membrane ou un canal de petite taille (figure 2.16) et ainsi avoir une source à une concentration fixe dans le temps. Pour obtenir un gradient simple (1D), c'est à dire avec une seule espèce, l'architecture la plus simple sera composée d'une chambre microfluidique connectée à une source et à un puits (figure 2.16). La génération et le maintien du gradient sont régulés par le phénomène de diffusion, en effet dans le cas du problème 1D (selon l'axe  $x$ ) cela revient à résoudre l'équation régissant la diffusion sans convection (équation 2.18) dans le cas d'un canal, de longueur  $L$  et de hauteur  $h$ ,

### 2.2.3 Application du phénomène de diffusion en microfluidique

connecté à une source de concentration  $C_0$  constante et à un puits soumis à une concentration constante  $C_\infty$ . Ce problème admet une solution linéaire quasi-stationnaire pour les temps longs [4], le profil de concentration s'écrira alors :

$$C(x) = C_0 - (C_0 - C_\infty) \frac{x}{L} \quad (2.30)$$

Abhyankar *et al.* ont montré qu'il était possible de réaliser ce type de gradient dans une puce microfluidique qui était stable dans le temps (24 heures) avec une bonne corrélation entre les données théoriques (simulation numérique) et expérimentales (figure 2.17) [25]. Ces travaux ont permis le développement de puces microfluidiques beaucoup plus complexes [19] [20].

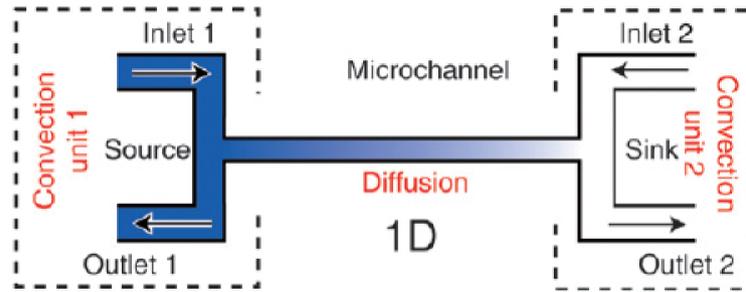


FIGURE 2.16 – Principe de génération de gradient 1D dans une chambre microfluidique [20].

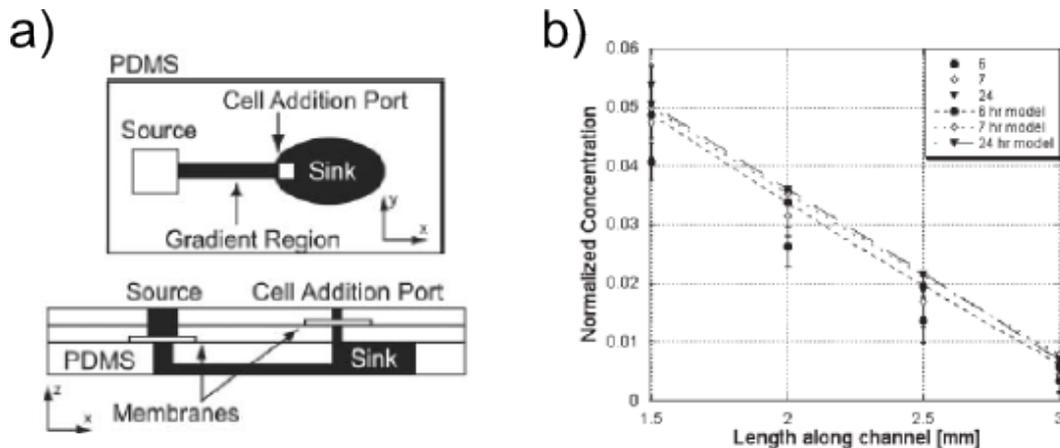


FIGURE 2.17 – a) Puce microfluidique permettant la réalisation d'un gradient 1D stationnaire b) Graphique présentant le gradient de concentration dans la canalisation (expérimental et simulation) [25].

Atencia *et al.* proposent notamment la réalisation de gradient microfluidique en 2D [20], ces gradients font alors intervenir trois entrées (figure 2.18). L'état quasi-stationnaire est atteint au bout d'environ 15 min et est maintenu tant que les entrées des 3 sources sont alimentées. Ils ont montré aussi qu'il était possible de couper les flux pendant 90 min et de garder un gradient relativement stable (10% de la valeur de l'état quasi-stationnaire).

Les principales applications de ces systèmes consistent à tester l'influence de différentes substances et du gradient sur le comportement des cellules. Parmi les tests menés, nous pouvons citer des expériences de cytotoxicité [21], de migration cellulaire par chemiotaxie [19] [20] [25]. Nous avons vu que ces systèmes permettaient d'obtenir des gradients de concentration continus, stables sur des temps relativement long. En revanche, leur réalisation est complexe, en effet, ils

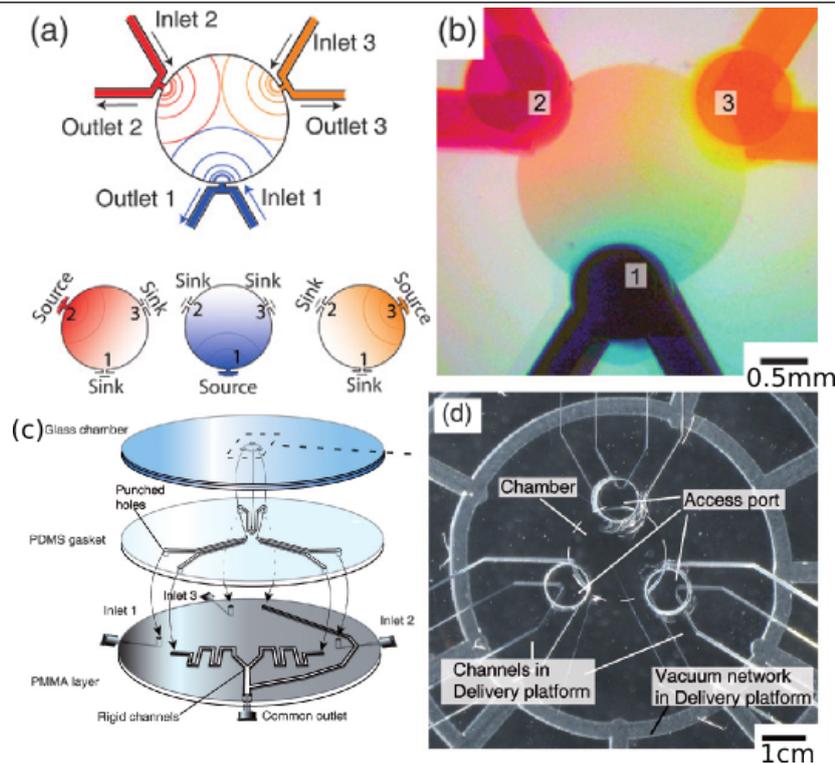


FIGURE 2.18 – (a) Schéma du système avec les gradients obtenus pour chaque source (b) Photo du système en fonctionnement, nous observons la présence des 3 gradients de concentration (c) Schéma présentant les différentes couches composant le système (d) Photo de la puce microfluidique [20].

nécessitent la plupart du temps l'empilement de plusieurs niveaux de canalisations et l'intégration de membranes pour éviter la présence de flux à l'intérieur de la chambre microfluidique. En revanche ils sont bien adaptés pour réaliser des études sur l'effet des gradients sur des cellules, mais ils sont inadaptés pour réaliser des criblages.

### 2.3.2.2 Les puces à gradient discret

Ce type de puces microfluidiques permet d'obtenir des gradients de concentration échantillonnés, ils seront donc adaptés à des opérations de criblage (diagramme de phase, conditions favorables pour une réaction chimique, test de toxicité...). Leur mode de fonctionnement peut être classé en deux grandes familles qui se différencient par l'architecture :

- Les solutions mères sont combinées afin d'obtenir plusieurs solutions filles qui sont à leurs tours utilisées pour créer une nouvelle génération de solution jusqu'à obtenir le gradient voulu.
- Les deux solutions mères sont fractionnées en un même nombre de branches ayant un débit propre (qui peut être différents des autres) puis les deux solutions sont combinées afin d'obtenir le gradient voulu.

Leurs conceptions relèvent de la même méthode consistant à écrire le réseau électrique équivalent au circuit désiré (partie 2.11) et à calculer la valeur des résistances électriques correspondant aux contraintes imposées [23] [26]. Notons que pour la plupart de ces deux types de gradient, la méthode de mélange retenue est d'utiliser seulement la diffusion sans faire appel aux différents types de mélangeur que nous avons vus dans la partie précédente. Cela s'explique essentiellement par les contraintes liées à leurs conceptions et à la difficulté d'intégrer des mélangeurs dans des systèmes microfluidiques complexes. Nous allons dans un premier temps expliciter les équations

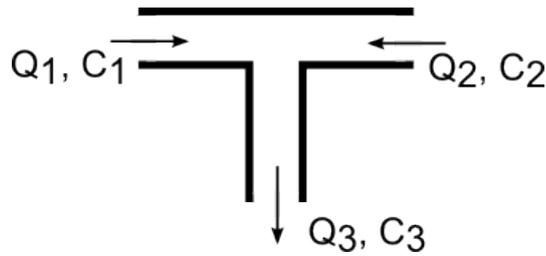


FIGURE 2.19 – Schéma définissant les notations au niveau d'une intersection

de base servant à la conception de ces systèmes puis nous présenterons plus en détails les deux architectures et la méthode de conception, enfin nous donnerons quelques exemples d'application de ces systèmes.

**Les notions de base :** Dans les deux types de gradients, il est nécessaire de réaliser des mélanges de solution ayant des concentrations et des débits différents, le cas le plus courant de mélange est présenté sur la figure 2.19, il met en jeu deux solutions. La concentration  $C_3$  en fonction des autres paramètres s'écrit :

$$C_3 = \frac{Q_1 C_1 + Q_2 C_2}{Q_3} \text{ avec } Q_3 = Q_1 + Q_2 \quad (2.31)$$

La répartition des débits vont être régis par l'architecture des systèmes et la valeurs des résistances hydrodynamiques. Afin de connaitre les débits, nous faisons l'analogie entre l'hydrodynamique et l'électronique (partie 2.11), nous pouvons alors appliquer à nos systèmes la loi des nœuds et la loi des mailles. De plus pour calculer la valeur des résistances, il convient de prendre soin d'utiliser la formule la mieux adaptée à la canalisation étudiée (section avec grand rapport d'aspect : équation 2.10 ; section rectangulaire 2.9) au risque de modifier la répartition des débits donc le fonctionnement des systèmes.

Les valeurs des résistances hydrodynamiques sont proportionnelles à la longueur, or cette dernière est importante pour assurer le mélange des solutions. En effet, la complexité des systèmes microfluidiques à gradient ne permet pas l'intégration de mélangeurs. Le mélange se fait donc uniquement par diffusion le long de l'écoulement. Nous avons vu dans la partie 2.2.2, que la longueur de mélange s'écrit  $L_m = \frac{w^2 v}{D}$ . Cette longueur devra être prise en compte lors de la conception des systèmes.

**Les puces gradient à recombinaisons :** Jeon *et al.* ont été à l'origine des premiers systèmes microfluidique à gradient de concentration [22]. Leurs travaux ont permis de montrer qu'il était simple de réaliser des gradients de concentration linéaires et paraboliques avec respectivement deux et trois entrées. En partant de deux solutions : l'une contenant la molécule d'intérêt à une concentration  $C_0$  et une solution sans cette molécule, générer un gradient de concentration revient à réaliser une gamme de solutions de concentrations comprises entre 0 et  $C_0$ , qu'ils vont ensuite recombiner entre elles pour en obtenir quatre et ainsi de suite jusqu'à obtenir un grand nombre de sorties ayant des concentrations échelonnées entre 0 et  $C_0$  (figure 2.20). Le diagramme électrique équivalent (figure 2.20) montre que l'obtention d'un gradient linéaire est conditionné à ce que la valeur de la résistance hydrodynamique de chaque branche d'un même étage soit la même. Il en va de même pour un gradient de forme parabolique hormis qu'il nécessite trois entrées et que la solution de l'espèce à échantillonner doit être placée au centre.

A partir de ces premiers travaux, d'autres puces microfluidiques à gradients, ont été développées afin de réaliser des gradients beaucoup plus complexes tel que logarithmiques, exponentiels [28] [26]

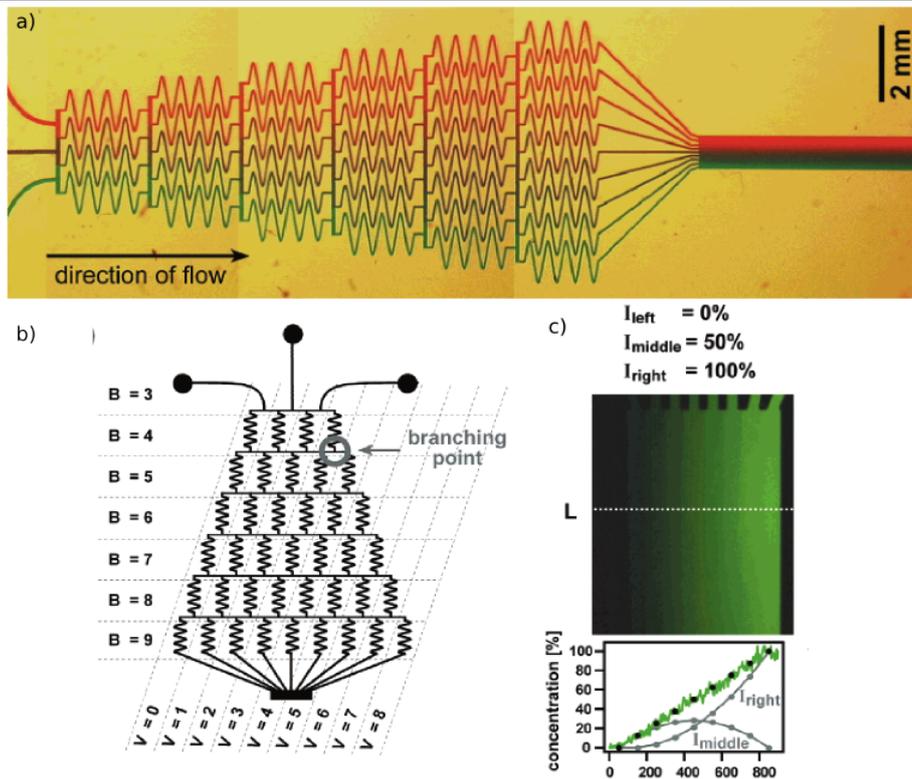


FIGURE 2.20 – a)Photo de la puce microfluidique permettant la réalisation des gradients, b) schéma électrique du système c) exemple de gradient linéaire [27]

mais aussi des fonctions puissances, sinusoïdales ou erreur [24]. Pour cela, l'architecture des systèmes et le mode de conception ont eux aussi évolués. La démarche classique consiste tout d'abord à déterminer la forme du gradient de concentration souhaitée. Il est ensuite nécessaire de définir les relations entre les concentrations et les débits des différents étages, ces dernières vont essentiellement dépendre des architectures du système (nombres d'étages, de sorties, connexion entre les branches...). Pour cela nous utilisons l'équation 2.31. Nous obtenons alors un système d'équations complexes qu'il est nécessaire de résoudre pour connaître les différentes longueurs de canalisation. Deux méthodes peuvent être utilisées pour résoudre de tels systèmes. La première consiste à utiliser un raisonnement de récurrence qui permet à l'aide de suites de déterminer l'ensemble des paramètres du système (résistances hydrodynamiques) afin d'obtenir le gradient de concentration souhaité [28]. La seconde méthode fait appel à un raisonnement de dichotomie, l'architecture du système et l'ensemble des contraintes sont définis. Puis à l'aide d'un algorithme itératif, il est possible de déterminer les valeurs des résistances hydrodynamiques permettant de respecter les contraintes imposées [24] [29] (figure 2.21).

**Les puces à gradient par mélange final :** Contrairement aux puces par recombinaison, ces puces ont la particularité de séparer l'étape de dosage des solutions et de mélange. Comme pour le gradient par recombinaison, la première étape consiste à définir la forme désirée pour le gradient (logarithmique, linéaire, exponentielle), puis les valeurs des débits de sorties. Une fois ces deux paramètres connus, nous pouvons alors connaître l'apport nécessaire de chaque solution. La plupart de ces systèmes sont composés de deux parties l'une apportant la solution à échantillonner et l'autre le solvant, ces dernières seront mélangées pour former le gradient de concentration. Le calcul des concentration obéit à un calcul de dilutions (équation 2.31). Etant donné qu'il n'y a



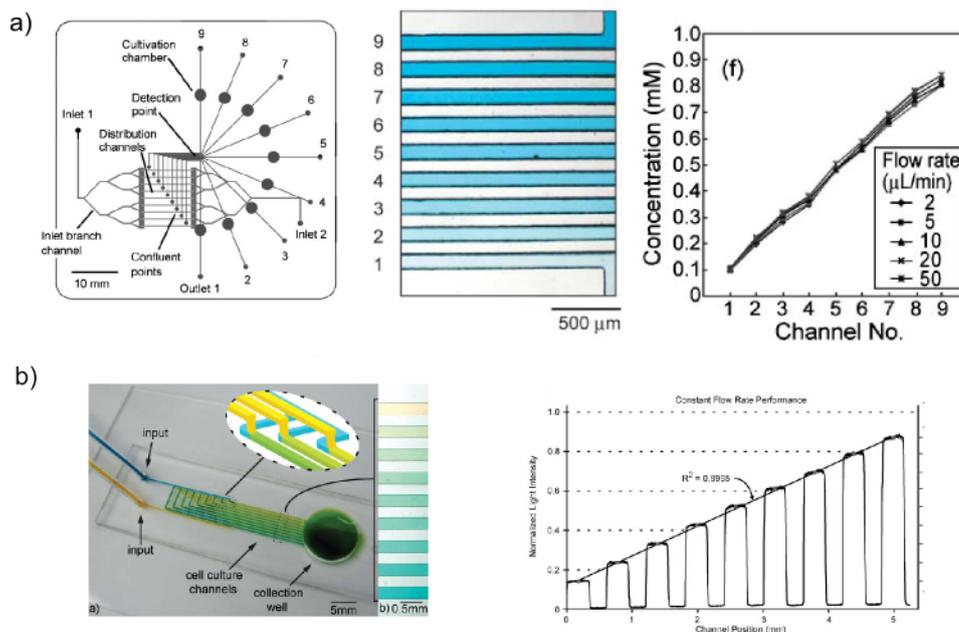


FIGURE 2.22 – Exemples de réalisation de gradient linéaire par recombinaison a) [30], b) [31]

de culture [30], étude des cellules cancéreuses [33]... Ces systèmes de gradients ont été aussi combinés avec des systèmes de génération de goutte, le principal intérêt est de pouvoir s'affranchir des surfaces mais leur contrôle et le choix du surfactant est important pour leur bon fonctionnement. Le principale avantage de ces différents systèmes est leur simplicité (généralement un seul niveau de canalisation), la réalisation de nombreuses formes de gradient (linéaire, parabolique exponentielle...). En revanche, ils sont sensibles aux défauts de fabrication ou au colmatage des canalisations, en effet cela induit une modification de la répartition des fluides et peut provoquer un dysfonctionnement du système.

### 2.3.3 Étude de puce de réaction diffusion

Afin d'apporter des informations sur les cinétiques de réaction dont les temps typiques sont très courts, de l'ordre de la milliseconde, les techniques classiques pour les étudier se révèlent alors limitées voir inefficaces. Face à ce constat, des systèmes microfluidiques, basés sur les interactions entre la diffusion et la réaction chimique, ont été développés afin de pouvoir connaître précisément les valeurs des constantes de réactions. Dans cette partie, nous nous attacherons tout d'abord à la description des puces microfluidiques permettant la mesure du coefficient de diffusion puis nous décrirons le mode de fonctionnement des puces de réaction-diffusion.

#### 2.3.3.1 Mesure du coefficient de diffusion

Nous avons vu précédemment à travers l'étude des mélangeurs, ou des gradients de concentration que la diffusion des espèces joue un rôle important dans la réalisation des mélanges. Il convient donc de connaître précisément les coefficients de diffusion des espèces, de plus ce coefficient est une caractéristique propre à la molécule, il est donc important de le connaître. Pour cela des puces ont été développées afin de pouvoir réaliser cette mesure dans des canaux microfluidiques [34] [35]. Le principal intérêt de ces méthodes est de pouvoir travailler avec des petits volumes (quelques centaines de microlitres). Dans les différents systèmes, le principe de base consiste à mesurer le profil

de diffusion soit d'un plug [35], soit d'un front dans le cas de puces en T ou en H [35]. Ces techniques fonctionnent bien dans le cas de molécules fluorescentes, en revanche d'autres procédés sont utilisés pour mesurer le coefficient d'espèces non visibles (ions métalliques, protéine...) [36] [37]. Culberton *et al.* proposent un système permettant de placer un plug d'espèce fluorescente (Rhodamine, fluorescéine...) au centre de la canalisation puis ils le laissent diffuser. Ils relèvent alors le profil du plug pour différents temps (figure 2.23) puis ils corrèlent les courbes expérimentales avec une gaussienne grâce à laquelle ils obtiennent les caractéristiques des pics. A partir de ces données ils arrivent à en extraire le coefficient de diffusion des différentes espèces.

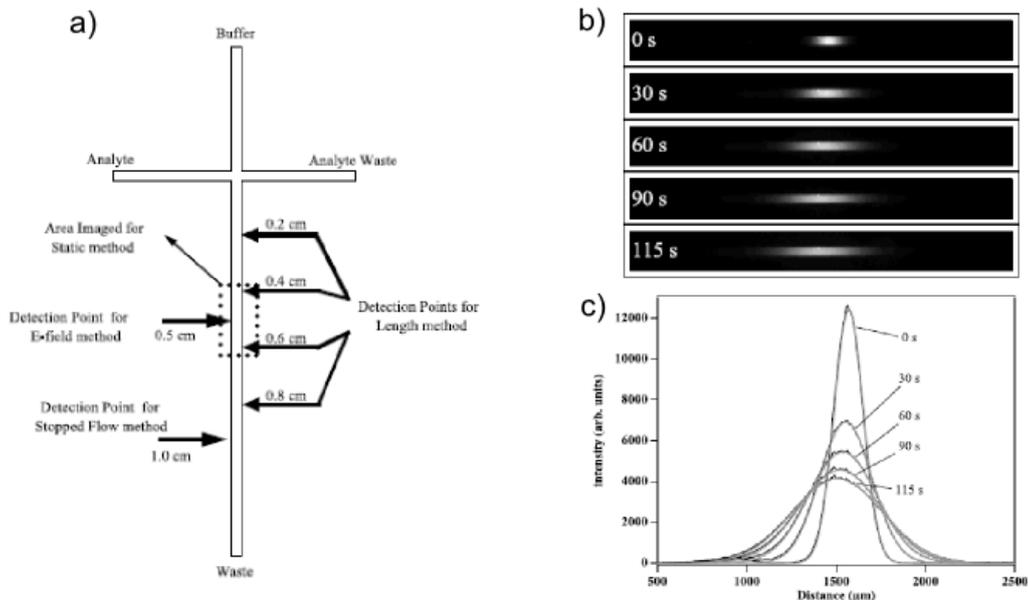


FIGURE 2.23 – a) Schéma du dispositif permettant la mesure du coefficient de diffusion d'un plug, b) Photographies montrant l'étalement du plug de concentration dans le temps c) Graphique des profils de concentration et leurs fits pour différents temps [34]

Une autre méthode pour déterminer le coefficient de diffusion consiste à utiliser des puces en T ou en H et à faire couler côte à côte une solution contenant l'espèce fluorescente et le solvant. L'espèce fluorescente va alors diffuser dans le solvant comme présenté dans la partie 2.2.2. A l'aide d'un microscope de fluorescence il est possible de connaître le profil de diffusion perpendiculairement à l'écoulement en un lieu donné. Puis, comme nous l'avons vu dans la partie 2.2.2, de corrélérer le profil avec la fonction correspondant au problème (équation 2.27). Nous obtenons alors la valeur de l'élargissement local  $w$  qui est directement reliée au coefficient de diffusion par la relation  $w = \sqrt{Dt}$  où  $t = x/v_{moy}$  (figure 2.24). Les mesures des profils peuvent se faire soit en variant le débit [38], soit en se déplaçant le long de la canalisation [35]. Il convient tout de même de prendre garde aux effets 3D aux temps courts (partie 2.2.2) qui peuvent perturber la mesure du profil [7] [8].

Häusler *et al.* ont montré qu'il était possible de mesurer le coefficient de diffusion d'une espèce non fluorescente. Pour démontrer le principe de fonctionnement de leur système, ils mesurent le coefficient de diffusion de différents sels (HCl, NaOH, NaCl...). Pour cela, ils utilisent une puce en H, dans une des entrée est introduit le sel dans l'autre le solvant ; au niveau des sorties un conductimètre est intégré du côté du solvant afin de connaître la concentration en sel dans cette sortie (figure 2.25). A partir de cette donnée, ils peuvent connaître la quantité de sel ayant diffusé dans le solvant ainsi remonter à la valeur du coefficient de diffusion [36].

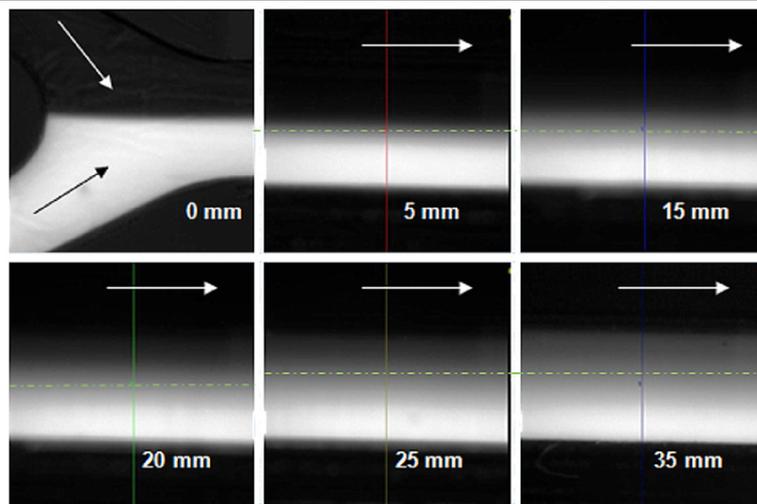


FIGURE 2.24 – Images montrant la diffusion le long d’une puce en T ( $v_{moy} = 2.4mm/s$ ) [35]

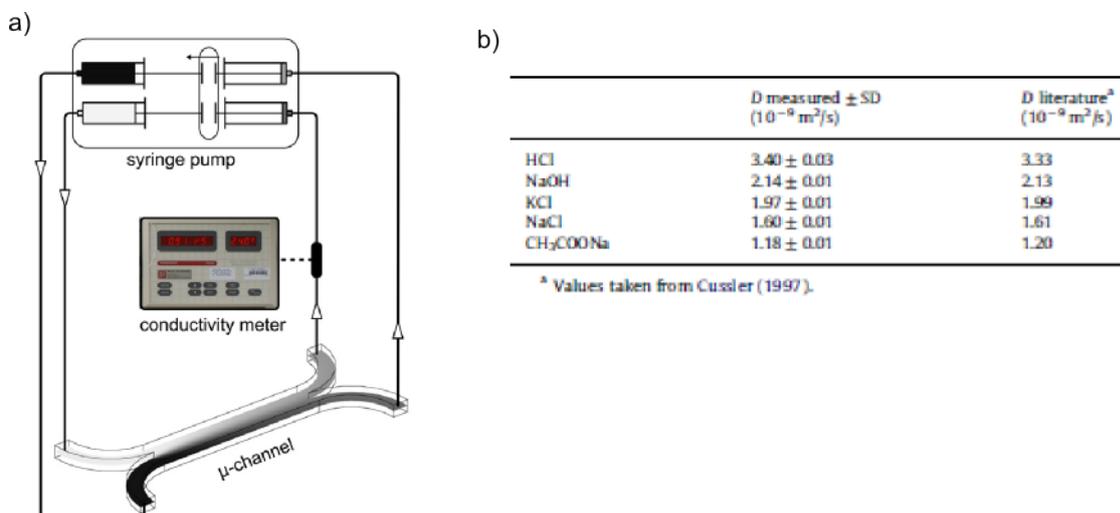


FIGURE 2.25 – a) Schéma de principe du système de Hausler *et al.* b) Table présentant les résultats obtenus pour différents sels [36]

### 2.3.3.2 Mesure des cinétiques chimiques :

Les mesures de cinétiques dans des puces microfluidiques ont permis d’accéder à des cinétiques (de l’ordre de la milliseconde) qui ne pouvaient être atteintes à l’aide de méthodes classiques. Pour que ces méthodes soient efficaces, il est nécessaire de pouvoir obtenir des informations sur ce qui se passe dans la zone d’interdiffusion. Pour cela, plusieurs méthodes ont été utilisées, la plus classique consiste à étudier une réaction où le composé formé devient fluorescent, nous pouvons alors suivre sa dynamique de formation tout le long de l’écoulement et en déduire les constantes réactionnelles. [39] [40]. D’autres méthodes telles que la spectroscopie Raman [41], la réfractométrie [42], permettent d’obtenir des informations sur la dynamique à l’interface. Baroud *et al.* proposent une étude théorique et expérimentale de la réaction permettant la liaison entre l’ion  $Ca^{2+}$  et un traceur qui devient fluorescent lors de la formation du complexe. Pour cela, ils utilisent une puce classique en T (figure 2.26), dans laquelle ils font couler côte à côte la solution contenant l’ion  $Ca^{2+}$  et le traceur fluorescent. A l’interface, ils observent l’apparition d’une bande fluorescente dont ils relèvent les profils en plusieurs points de la canalisation (figure 2.26). Afin

de comparer ces résultats, ils proposent un modèle théorique où ils se placent dans le cas d'une réaction simple  $A + B \rightarrow C$ . Pour résoudre ce problème, ils limitent l'étude du problème dans le plan de canalisation (pas d'étude selon la profondeur) et à un écoulement stationnaire dont la vitesse est constante dans la canalisation. A partir de ces hypothèses, ils écrivent les équations régissant le problème :

$$\begin{cases} U \frac{\partial A}{\partial x} = D_A \frac{\partial^2 A}{\partial y^2} - kAB \\ U \frac{\partial B}{\partial x} = D_B \frac{\partial^2 B}{\partial y^2} - kAB \\ U \frac{\partial C}{\partial x} = D_C \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + kAB \end{cases} \quad (2.33)$$

Dans ces équations,  $A, B, C$  sont les concentrations en produit,  $D_i$  sont les coefficients de diffusion des différents produit,  $k$  est la constante de réaction et  $U$  la vitesse de l'écoulement. Afin de simplifier la résolution, ils les transforment afin qu'elles soient sans dimension puis ils les résolvent par simulation numérique. Enfin, ils observent qu'il y a une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et théoriques (figure 2.26). Cette étude permet de mettre en avant plusieurs applications de ce système comme la microtitration, la mesure des coefficients de diffusion ou la connaissance des cinétiques de réactions chimiques. Ici, l'application est la détermination de la constante de réaction  $k$ .

De la même manière, Lee *et al.* proposent d'étudier la réaction de dégradation de la luciférine par une enzyme la luciférase, elle nécessite la présence de l'Adénosine TriPhosphate(ATP) qui constitue le carburant des cellules. De nombreux organismes cellulaires font appel à cette réaction, l'intérêt d'étudier une telle réaction est qu'elle provoque une bioluminescence des cellules. L'une des applications de cette réaction est le comptage de cellules mais cette dernière a de nombreuses limites à l'échelle macroscopique (coût des réactifs, peu reproductible...). Face à ce constat, l'utilisation de dispositifs microfluidiques peut être une alternative à ces différents problèmes. Pour étudier cette réaction, ils utilisent un système original faisant appel à trois entrées (figure 2.27). A l'aide de ce système, ils peuvent changer facilement les configurations d'entrée (ATP ou luciférase au centre) et aussi en contrôlant les rapports des débits entre les différentes entrées ils peuvent ajuster précisément les apports de chaque réactif. Cette versatilité permet de tester un grand nombre de conditions expérimentales différentes en utilisant peu de réactif et ainsi avoir plus d'informations sur les cinétiques de la réaction.

#### 2.3.3.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons vu qu'il existe de nombreux dispositifs permettant la mesure du coefficient de diffusion et des constantes de réaction. La plupart de ces systèmes fonctionnent avec des molécules fluorescentes ou colorées, les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus avec des systèmes macroscopiques. L'inconvénient de ce genre de dispositifs est de ne fonctionner qu'avec des molécules fluorescentes, pour éviter ce problème des méthodes alternatives ont été développées telles que la mesure par spectroscopie Raman, les mesures de la conductivité. En outre, ces systèmes présentent l'avantage de nécessiter peu de réactif et d'être peu encombrants comparés aux méthodes macroscopiques (mesure RMN par exemple). Les systèmes en T ont été aussi utilisés pour étudier les cinétiques de réaction chimiques. Pour cela, ils observent l'évolution de l'interface entre deux solutions réactives qui coulent dans une canalisation microfluidique. Plusieurs méthodes de mesure peuvent être utilisées soit la réaction crée un composé fluorescent ou coloré, il est donc facile d'avoir des informations sur sa formation le long de la canalisation, soit les composés sont

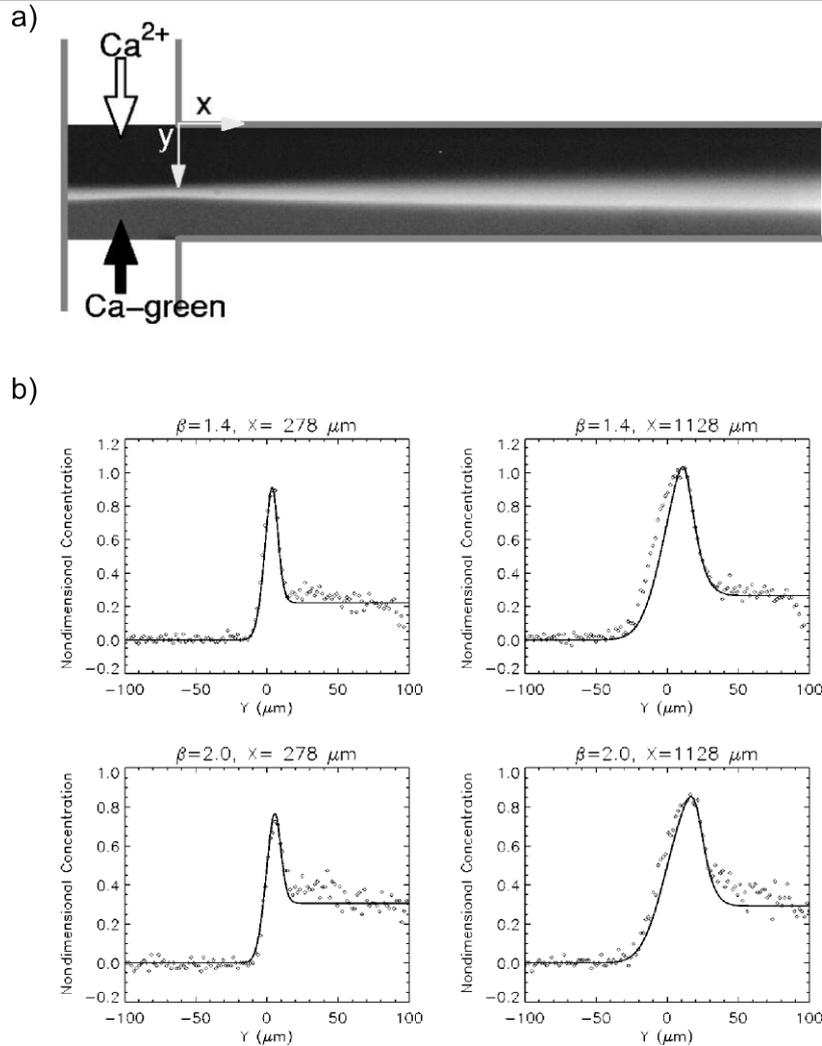


FIGURE 2.26 – a) Photographie montrant l'apparition d'une bande fluorescente à l'interface correspondant à la réaction entre le calcium et l'espèce fluorescente. b) Graphique présentant le profil dans la canalisation pour différentes longueurs, les lignes continues représentent les résultats des simulations numériques. [39]

invisibles, il faut alors développer des technologies alternatives telles que la spectroscopie Raman. A l'aide de ces techniques de mesures, il est possible d'observer les cinétiques des réactions ainsi que de déterminer les constantes de réactions. L'avantage majeur de ces systèmes est de permettre de pouvoir mesurer la cinétique des premiers instants de la réaction. Ils permettent d'avoir des informations que ne permettent pas d'atteindre les méthodes classiques de mesure.

## 2.4 Conclusion

La microfluidique est l'étude des écoulements dans des microcanaux. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons présenté les équations de la mécanique des fluides puis nous avons montré qu'elles peuvent être simplifiées et que les écoulements dans les canalisations sont laminaires. A partir de ces données, nous avons déterminé les expressions de la vitesse et du débit pour des canalisations rectangulaires. Cela nous a permis de mettre en avant qu'il existe une relation linéaire entre le débit et la pression. Nous avons démontré qu'il est possible de faire l'analogie

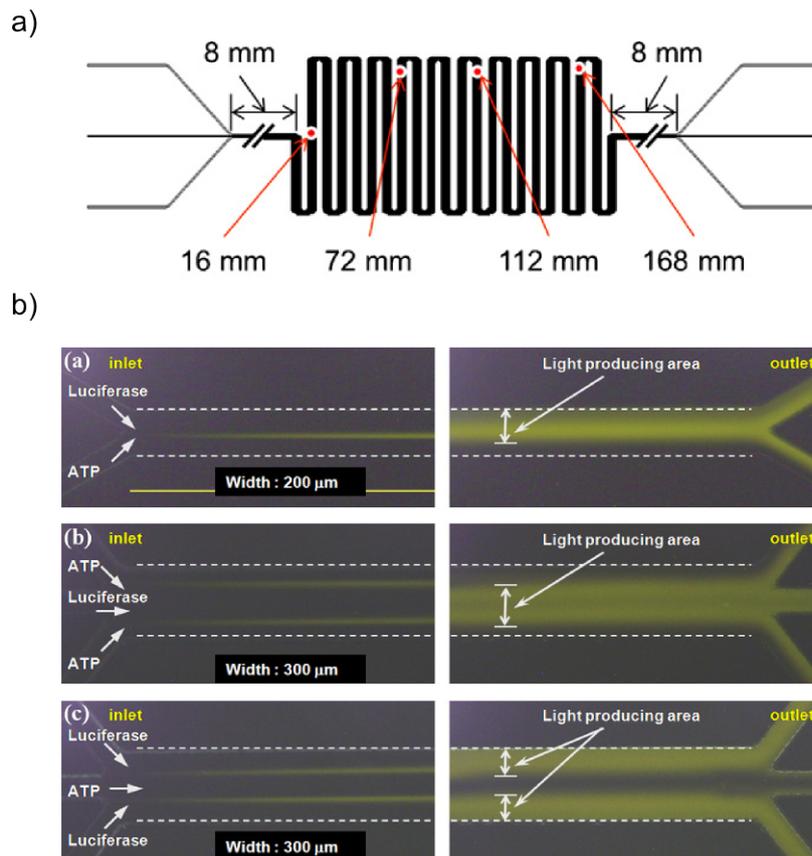


FIGURE 2.27 – a) Schéma de l'architecture du système. b) Photographie illustrant les différentes configurations possibles d'injection [40]

entre l'hydrodynamique et l'électronique, les lois des noeuds et des mailles sont applicables. Cette analogie nous permet de connaître la répartition des débits dans les canalisations sans s'intéresser aux phénomènes locaux.

La diffusion des molécules tient une place importante dans les systèmes microfluidiques. Étant donnée la nature des écoulements (laminaires), il n'y a pas de turbulence, le mélange de solution ne peut se faire que par diffusion. Nous avons alors expliqué quels sont les phénomènes physiques à l'origine de la diffusion puis nous avons posé les équations régissant le phénomène. Ensuite, nous avons montré la résolution de ces équations dans des cas simples sans écoulement. Ces différentes solutions nous serviront pour la mesure des coefficients de diffusion dans les microcanaux (chapitre 5). Enfin, nous avons présenté les différents phénomènes qui apparaissent lors de la diffusion en présence d'écoulements (dispersion de Taylor-Aris, effet 3D à proximité des murs).

Ensuite, nous avons présenté les différents mélangeurs existants en microfluidiques. La plupart de ces systèmes permettent d'améliorer la vitesse de mélange par rapport à la diffusion seule. En revanche, l'intégration de ces systèmes dans des dispositifs complexes peut s'avérer difficile. Nous nous sommes intéressés à la génération de gradient de concentration à l'aide de dispositifs microfluidiques. Nous avons distingué deux types de dispositifs, les premiers génèrent des gradients de concentration continus, les seconds permettent de créer de nombreuses conditions expérimentales. Ces derniers sont particulièrement adaptés à la réalisation de criblage, nous nous en sommes inspirés pour concevoir les systèmes de criblage de multiconditions pour l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  (chapitre 4). Enfin, nous présentons l'utilisation de différents dispositifs basés sur la diffusion permettant la mesure du coefficient de diffusion et des cinétiques de réaction, nous nous servons de ce type de système pour étudier les premiers instants de la cinétique d'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

## CHAPITRE 2. HYDRODYNAMIQUE ET DIFFUSION DANS LES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

---

(chapitre 5).

# Références bibliographiques

- [1] PATRICK TABELING. *Introduction à la microfluidique*. Editions Belin (2003). 25
- [2] SALMON JB. cours de microfluidique. 26, 27
- [3] ADOLF FICK. *Ueber diffusion*. *Annalen der Physik* **170**, 59–86 (1855). 28
- [4] CRANK J. *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press Oxford (1975). 29, 31, 41
- [5] SQUIRES T. AND QUAKE S. *Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale*. *Rev. Mod. Phys.* **77**, 977–1026 (2005). 34
- [6] CHOU HP. AND QUAKE S. *A microfabricated rotary pump*. *Biomedical Microdevices* **3 :4**, 323–330 (2001). 34
- [7] JB. SALMON AND A. AJDARI. *Transverse transport of solutes between co-flowing pressure-driven streams for microfluidic studies of diffusion/reaction processes*. *Journal of Applied Physics* **101**, 074902 (2007). 34, 35, 47
- [8] ISMAGILOV R., STROOCK A., KENIS P., WHITESIDES G., AND STONE H. *Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels*. *Journal of Applied Physics* **76**, 2376 (2000). 34, 47
- [9] CAPRETO L. AND HILL M. ZHANG X. CHENG W. *Micromixing within microfluidic devices*. *Top. Curr. Chem.* **304**, 27–68 (2011). 35, 36
- [10] ERBACHER C., BESSOTH F., BUSCH M., VERPOORTE E., AND MANZ A. *Towards integrated continuous-flow chemical reactors*. *MIKROCHIMICA ACTA* **131**(1-2), 19–24 (1999). 36
- [11] LEE S. W., KIM D. S., LEE S., AND KWON T. H. *A split and recombination micromixer fabricated in a pdms three-dimensional structure*. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **16**(5), 1067 (2006). 36, 37
- [12] STROOCK A., DERTINGER S., AJDARI A., MEZIĆ I., STONE H., AND WHITESIDES G. *Chaotic mixer for microchannels*. *Science* **295**(5555), 647–651 (2002). 36, 37
- [13] GLASGOW I. AND AUBRY N. *Enhancement of microfluidic mixing using time pulsing*. *Lab on Chip* **3**, 114–120 (2003). 38
- [14] NIU X. AND LEE YK. *Efficient spatial-temporal chaotic mixing in microchannels*. *J. Micro-mech. Microeng.* **13**, 454–462 (2003). 38
- [15] Electrokinetic instability in microflows with conductivity gradients, (consulté en juillet 2012). <http://microfluidics.stanford.edu/Projects/Archive/cheninstability.htm>. 39
- [16] ODDY M., SANTIAGO J., AND MIKKELSEN J. *Electrokinetic instability micromixing*. *Analytical Chemistry* **73**(24), 5822–5832 (2001). 39
- [17] YARALIOGLU G., WYGANT I., T. MARENTIS, AND B. KHURI-YAKUB. *Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers*. *Analytical Chemistry* **76**(13), 3694–3698 (2004). 39

- [18] AHMED D., MAO X., SHI J., JULURI B. K., AND T. J. HUANG. *A millisecond micromixer via single-bubble-based acoustic streaming*. Lab on Chip **9**, 2738–2741 (2009). 39
- [19] KIM D., LOKUTA M., HUTTENLOCHER A., AND BEEBE D. *Selective and tunable gradient device for cell culture and chemotaxis study*. Lab Chip **9**, 1797–1800 (2009). 14, 40, 41, 45
- [20] ATENCIA J., MORROW J., AND LOCASCIO L. *The microfluidic palette : A diffusive gradient generator with spatio-temporal control*. Lab Chip **9**, 2707–2714 (2009). 40, 41, 42, 45
- [21] DU Y., SHIM J., VIDULA M., HANCOCK M., LO E., CHUNG B.G., T. BORENSTEIN J., KHABIRY M., M. CROPEK D., AND KHADEMHOSEINI A. *Rapid generation of spatially and temporally controllable long-range concentration gradients in a microfluidic device*. Lab Chip **9**, 761–767 (2009). 40, 41
- [22] JEON N.L., DERTINGER S., CHIU D., CHOI I., STROOCK A., AND WHITESIDES G. *Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems*. Langmuir **16**(22), 8311–8316 (2000). 40, 43, 71, 72
- [23] HYUNWOO BANG, SUN HEE LIM, YOUNG KYUNG LEE, SEOK CHUNG, CHANIL CHUNG, DONG-CHUL HAN, AND JUN KEUN CHANG. *Serial dilution microchip for cytotoxicity test*. Journal of Micromechanics and Microengineering **14**(8), 1165 (2004). 14, 40, 42, 45
- [24] IRIMIA D., GEBA D. A, AND TONER M. *Universal microfluidic gradient generator*. Analytical Chemistry **78**(10), 3472–3477 (2006). 40, 44
- [25] ABHYANKAR V., LOKUTA M., HUTTENLOCHER A., AND BEEBE D. *Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies*. Lab Chip **6**, 389–393 (2006). 41, 45
- [26] CAMPBELL K. AND GROISMAN A. *Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps*". 42, 43
- [27] DERTINGER S., CHIU D., JEON N. L., AND WHITESIDES G. *Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks*. Analytical Chemistry **73**(6), 1240–1246 (2001). 44, 73, 76
- [28] K. LEE, KIM C., AHN B., PANCHAPAKESAN R., FULL A., NORDEE L., KANG J.Y., AND OH K. *Generalized serial dilution module for monotonic and arbitrary microfluidic gradient generators*. Lab Chip **9**, 709–717 (2009). 43, 44
- [29] YUSUF H., BALDOCK S., BARBER R., FIELDEN P., GODDARD N., AND BROWN B. *Novel microsystems for concentration gradient generation through computer optimization with validation using optical instrumentation*. Microelectronic Engineering **85**, 1265 – 1268 (2008). 44, 45
- [30] YAMADA M., HIRANO T., YASUDA M., AND SEKI M. *A microfluidic flow distributor generating stepwise concentrations for high-throughput biochemical processing*. Lab Chip **6**, 179–184 (2006). 45, 46
- [31] WALKER G., MONTEIRO-RIVIERE N., ROUSE J., AND O’NEILL A. *A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays*. Lab Chip **7**, 226–232 (2007). 45, 46
- [32] RUAN J., WANG L., XU M., CUI D., ZHOU X., AND LIU D. *Fabrication of a microfluidic chip containing dam, weirs and gradient generator for studying cellular response to chemical modulation*. Materials Science and Engineering **29**(3), 674 – 679 (2009). 45
- [33] SIYAN W., FENG Y., LICHUAN Z., JIARUI W., YINGYAN W., LI., BINGCHENG L., AND QI W. *Application of microfluidic gradient chip in the analysis of lung cancer chemotherapy resistance*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **49**(3), 806 – 810 (2009). 46

- [34] CULBERTSON C., JACOBSON S., AND RAMSEY M. *Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices*. *Talanta* **56**(2), 365 – 373 (2002). 46, 47, 115
- [35] BROBOANA D., BALAN C., WOHLAND T., AND BALAN C. *Investigations of the unsteady diffusion process in microchannels*. *Chemical Engineering Science* **66**(9), 1962 – 1972 (2011). 46, 47, 48
- [36] HÄUSLER E., DOMAGALSKI P., OTTENS M., AND BARDOW A. *Microfluidic diffusion measurements : The optimal h-cell*. *Chemical Engineering Science* **72**, 45 – 50 (2012). 47, 48
- [37] SALMON J-B., AJDARI A., TABELING P., SERVANT L., TALAGA D., AND JOANICOT M. *In situ raman imaging of interdiffusion in a microchannel*. *Applied Physics Letters* **86**(9), 094106 (2005). 47
- [38] KAMHOLZ A.; SCHILLING E.; YAGER P. *Optical measurement of transverse molecular diffusion in a microchannel*. *Biophysical journal* **80**(4), 1967–1972 (2001). 47
- [39] C. BAROUD, OKKELS F., MÉNÉTRIER L., AND TABELING P. *Reaction-diffusion dynamics : Confrontation between theory and experiment in a microfluidic reactor*. *Phys. Rev. E* **67**, 060104 (2003). 48, 50
- [40] TAE-WOO LEE, HAN-SUNG KIM, THUAN-HIEU TRAN, JAESUNG JANG, DAE SUNG YOON, JIN-HWAN KIM, EUN-KI KIM, YOON-MO KOO, SANG WOO LEE, AND WOO-JIN CHANG. *Diffusion-based multi-stream bioluminescent reaction in a microfluidic device*. *Chemical Engineering Journal* **185-186**, 321 – 327 (2012). 48, 51
- [41] SARRAZIN F., SALMON J-B., TALAGA D., AND SERVANT L. *Chemical reaction imaging within microfluidic devices using confocal raman spectroscopy : The case of water and deuterium oxide as a model system*. *Analytical Chemistry* **80**(5), 1689–1695 (2008). 48
- [42] MARIN A., JOANICOT M., AND TABELING P. *Microchannel edge refractometry*. *Sensors and Actuators B : Chemical* **148**(1), 330 – 336 (2010). 48



# Chapitre 3

## Microfabrication et intégration des systèmes microfluidiques

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'émergence des laboratoires sur puce a été possible grâce à l'utilisation des technologies de la micro-électronique. Dans ce chapitre, nous allons décrire les techniques standards de fabrication des systèmes microfluidiques (technologie silicium et PDMS, PolyDiMethylSiloxane) puis nous intéresser à l'interface entre les systèmes microfluidiques et leurs environnements (connexion, observation sous microscope...). L'ensemble de ces technologies nous ont été utiles pour la réalisation de nos systèmes microfluidiques. Un travail important a été réalisé pour développer des supports permettant l'interface entre les puces en verre-silicium et les différentes techniques d'injection des fluides.

### 3.1 Les technologies de fabrication des puces en silicium

La fabrication de puces microfluidiques en silicium consiste à usiner le silicium, dans le but de créer des microcanaux. Cet usinage comprend trois principales étapes : la photolithographie qui définit les zones d'usinage, la gravure qui permet la réalisation des microcanaux et enfin le scellement des puces. Dans la partie suivante, nous expliciterons ces trois procédés.

#### 3.1.1 La photolithographie :

L'étape de photolithographie est le procédé de base permettant de structurer la matière dans les technologies de la micro-électronique. Elle a pour but de venir reporter des motifs sur une résine photosensible préalablement déposée à la surface d'un wafer en silicium. Cette résine est tout d'abord insolée à travers un masque afin de la texturer. Elle est ensuite développée afin de faire apparaître les motifs du masque sur le silicium. Nous pouvons distinguer deux types de résines : les négatives et les positives. Sur les résines positives, la partie insolée va disparaître lors du développement tandis que pour les résines négatives, la partie insolée reste.

Pour enduire les wafers de résine, deux techniques sont utilisées : le spin coating et le spray coating. Le spin coating (ou enduction) est de loin la plus utilisée, elle consiste à déposer de la résine au centre du wafer et à faire tourner ce dernier à une vitesse comprise entre 500 et 5000 tr/min. L'épaisseur de résine déposée dépend essentiellement de deux paramètres : la viscosité de la résine et la vitesse de rotation. Les épaisseurs peuvent aller d'une fraction de micromètres à la centaine de micromètres. Le spray coating est une technique moins utilisée, mais en plein développement car contrairement au spin coating elle permet le recouvrement de wafers ayant une forte topologie. Pour enduire les wafers, la résine est passée sous pression à travers une buse. Au

## CHAPITRE 3. MICROFABRICATION ET INTÉGRATION DES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

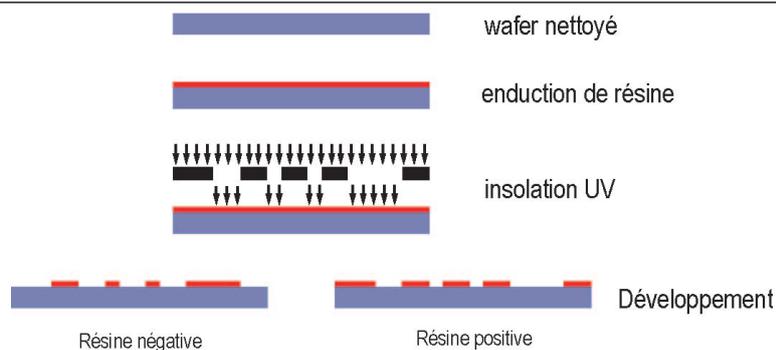


FIGURE 3.1 – Principe de la photolithographie

passage dans cette dernière, la résine est mise sous forme de gouttelettes qui vont se déposer sur le wafer (figure 3.2). Plusieurs passages sont nécessaires afin de réaliser une couche d'épaisseur homogène. Les épaisseurs de résines pouvant être réalisées avec cette technique sont comprises entre 3 micromètres et une dizaine de micromètres.

Une fois la résine déposée, elle est insolée afin d'être structurée à la surface du wafer. Nous pouvons

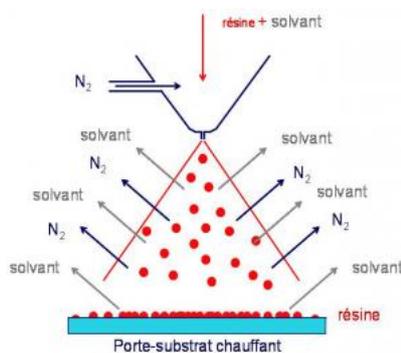


FIGURE 3.2 – Schéma de principe du spray coating [1]

distinguer plusieurs méthodes d'insolation : la photolithographie par UV , la lithographie par Laser, ou par e-beam. Ces différentes techniques se distinguent essentiellement par le rayonnement utilisé. La photolithographie par UV consiste à insoler la résine à travers un masque. La distance entre le masque et le wafer est un des paramètres importants pour obtenir une bonne résolution. En effet plus cette distance est faible, meilleure est la résolution. Dans ce cas, en fonction de la résine et de son épaisseur, la résolution latérale est de l'ordre de la longueur d'onde utilisée (phénomène de diffraction). Les techniques de lithographie par écriture directe n'utilisent pas de masque ; à l'aide d'un faisceau focalisé sur le wafer, les zones d'intérêt sont directement insolées. Ces techniques sont utilisées pour la réalisation des masques. La différence entre la lithographie par laser et par e-beam réside dans le rayonnement utilisé, l'e-beam (faisceau d'électrons) permet d'obtenir des résolutions de l'ordre de la dizaine de nanomètres tandis qu'avec un laser elle est d'environ un micromètre. Le principal inconvénient de ces deux techniques est la lenteur d'écriture à la surface du wafer (écriture en série, point par point) tandis que la photolithographie UV permet de traiter rapidement de nombreux wafers à la suite.

Une fois la résine insolée, elle est révélée à l'aide d'un photo-développeur qui permet d'enlever la partie insolée pour la résine positive, et la partie non-insolée pour la négative. La différence entre ces deux résines se fait durant l'insolation, pour les positives l'insolation va activer une réaction

permettant de rendre la résine soluble tandis que pour la négative, elle active un catalyseur de réticulation. L'étape suivante est la gravure du silicium que nous allons ensuite développer.

#### 3.1.2 La gravure du silicium

La gravure permet d'enlever les zones de silicium non protégées par la photolithographie. Pour certains procédés, la couche de protection ne sera pas constituée de résine, mais d'une couche plus résistante et durable comme par exemple du nitrure de silicium. Les techniques de gravure peuvent être classées en deux grandes familles : les gravures humides et les gravures sèches.

##### 3.1.2.1 Les gravures humides

Pour la gravure humide, les plaquettes de silicium sont plongées dans une solution qui attaque les zones non protégées. Cette attaque du silicium peut être soit isotrope, c'est à dire qu'il est gravé à la même vitesse dans toutes les directions, soit anisotrope c'est à dire que la gravure se fait selon une direction privilégiée (figure 3.3)

Pour une gravure isotrope sur du silicium, nous utiliserons par exemple un mélange d'acide fluorhydrique, d'acide nitrique et d'éthanol ; alors que pour le verre de l'acide fluorhydrique sera plutôt utilisé. Cette technique présentera l'avantage d'obtenir une vitesse de gravure importante, en revanche la résolution, la profondeur accessible, le contrôle peu précis du profil (influence de l'agitation) et les faibles rapports d'aspect sont des facteurs limitants.

La gravure anisotrope du silicium se fait à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium ou de tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH). L'attaque va s'effectuer selon les plans cristallins des wafers. Cette technique permet la réalisation simple de membranes suspendues en silicium mais les motifs sont imposés par les plan cristallins, toutes les géométries ne sont donc pas faisables.

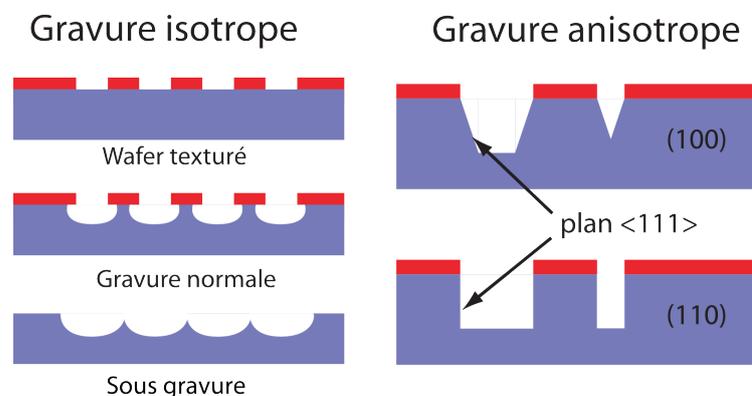


FIGURE 3.3 – Schéma présentant le principe de la gravure humide

##### 3.1.2.2 Les gravures sèches

Lors de cette gravure, les substrats sont exposés à des gaz ionisés. Deux interactions sont possible entre ces derniers et les substrats : l'une physique résultant de l'action des chocs des ions sur la surface qui vont "arracher" la matière, et l'autre chimique où ces ions réagissent avec les matériaux (figure 3.4). La mise en pratique de cette technique se fait en introduisant les gaz dans la chambre contenant le substrat, ils sont alors ionisés sous l'action d'une radiofréquence. Lorsque

## CHAPITRE 3. MICROFABRICATION ET INTÉGRATION DES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

les gaz sont composés uniquement d'espèces inertes tel que l'argon, l'hélium, ou le néon, le procédé de gravure est purement physique, il résulte du bombardement des ions sous l'action d'un champ électrique sur la surface du substrat situé sur la cathode. La gravure est alors totalement anisotrope, mais elle est lente et non sélective.

Pour la composante chimique, sous l'action d'un plasma des gaz réactifs ( $\text{SF}_6$ ,  $\text{CF}_4$ ...) produisent des radicaux qui réagissent avec le substrat et le gravent. Dans ce cas, il y a une possibilité de concurrence entre un dépôt et de la gravure. La gravure va être favorisée en jouant sur les paramètres du procédé (Température, pression, composition du gaz...). Cette gravure présente une bonne sélectivité, une cinétique de gravure importante, en revanche elle est isotrope.

Il existe une technique qui combine les deux approches : il s'agit de la RIE (Reactive Ion Etching). Des gaz réactifs sont introduits dans la chambre et ionisés par un plasma puis bombardés sur la surface sous l'action d'un champ électrique. La combinaison des deux phénomènes de gravure procure à cette technique l'avantage d'avoir une bonne cinétique et d'être anisotrope. Un procédé basé sur la RIE a été développé pour atteindre des rapports de forme importants : la DRIE (Deep Reactive Ion Etching, gravure profonde). Le principe est simple : il s'agit de réaliser une RIE puis de venir protéger les murs à l'aide d'une couche de passivation réalisée avec du  $\text{C}_4\text{F}_8$  (composé proche du téflon) et de répéter cette opération jusqu'à la profondeur désirée. L'avantage de cette technique est de pouvoir réaliser des motifs ayant des rapports de formes importants (20/1), d'être fortement anisotrope, et d'avoir une vitesse de gravure importante. En revanche, les murs latéraux peuvent présenter des motifs de "scalopping" dû à la répétition des cycles de protection et de gravure.

Nos puces en silicium seront réalisées à l'aide des techniques de RIE ou de DRIE selon les profondeurs de gravure.

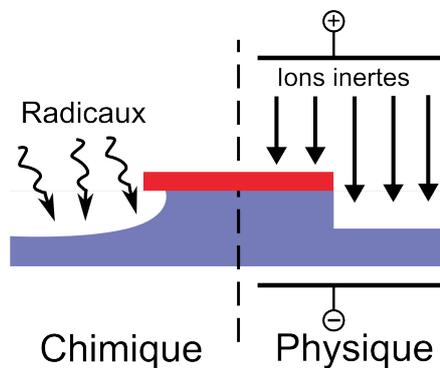


FIGURE 3.4 – Principe des gravures sèches

### 3.1.3 Le scellement des puces

Cette étape consiste à fermer les canaux réalisés à la surface du wafer. Plusieurs matériaux peuvent être utilisés tel que le silicium, le verre, ou encore un polymère comme le PDMS (polydiméthyl siloxane). Le choix du capot impose la technique de collage, nous pouvons les classer en trois grandes familles :

- les techniques de collage direct tel que la soudure anodique ou la soudure thermique,
- les techniques faisant appel à une couche intermédiaire adhésive tel que la soudure eutectique ou la soudure adhésive,
- les techniques par activation plasma,

#### 3.1.3.1 Les techniques de collage direct

**La soudure anodique** La soudure par collage anodique permet de coller un substrat en silicium avec un substrat en verre dopé en sodium. Les deux substrats sont mis en contact, chauffés (température comprise entre 300 et 400°C), puis un champ électrique (de l'ordre de quelques centaines de volts) est appliqué entre les deux wafers. Ce champ provoque la migration d'ions sodium  $\text{Na}^+$  du verre vers le silicium, c'est ce déplacement qui assure le collage entre les deux substrats par la création de liaisons covalentes. Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle s'applique seulement à un collage verre-silicium.

**La soudure thermique :** La soudure thermique permet le collage de deux substrats de même nature (verre-verre ; Si-Si) qui vont être mis en contact, puis sous pression et enfin chauffés jusqu'à une température suffisamment élevée pour que le substrat devienne malléable (c'est à dire plus de 600°C pour le pyrex, 800°C pour la silice et 1000 °C pour le silicium). Cela permet la création de liaisons entre les deux substrats.

#### 3.1.3.2 Les techniques faisant appel à une couche de liaison

Le principe est simple, il s'agit de venir intercaler entre les deux substrats de la matière qui va permettre de réaliser la liaison. La mise en œuvre est la même quelque soit l'adhésif utilisé. Il faut d'abord venir structurer la couche de liaison à la surface d'un des substrats, puis aligner les deux surfaces, les mettre en contact, puis sous pression et enfin chauffer afin d'assurer la liaison. Le principal inconvénient de cette technique est de présenter une couche intermédiaire qui peut perturber le fonctionnement du système , en revanche elle permet de coller entre elles un grand nombre de surface.

#### 3.1.3.3 Les techniques d'activation par plasma :

Une technique, couramment utilisée, est celle faisant appel à un plasma à oxygène pour coller du PDMS (Polydiméthylsiloxane) et du verre ou du silicium. Après un nettoyage des deux surfaces, une activation est pratiquée à l'aide d'un plasma qui permet la création de fonctions Si-OH à la surface du verre (il en est de même avec le silicium qui présente une couche d'oxyde à sa surface) et du PDMS. Les deux surfaces activées sont mises en contact puis chauffées afin de réaliser des liaisons Si-O-Si qui assurent la bonne tenue mécanique entre le verre (Silicium) et le PDMS. Cette technique présente l'avantage d'être reproductible, d'être facile à mettre en œuvre et d'avoir un faible coût.

## 3.2 La technologie de fabrication des puces PDMS

L'émergence des systèmes microfluidiques est due pour beaucoup au développement de techniques de fabrication faisant appel à des polymères [2]. En effet, ces techniques dont la mise en œuvre est aisée, permettent la réalisation de systèmes à faible coût, nécessitant peu de matériel. Le PDMS s'est rapidement imposé comme polymère de référence, en raison de ses propriétés physiques et chimiques intéressantes. En effet, il est optiquement transparent (pas de limitation pour la microscopie), biocompatible (il peut être utilisé avec le vivant sans problème de viabilité), déformable (il permet la réalisation de fonctions fluidiques complexes par exemple des vannes, des pompes...) [3], facile à travailler (il ne nécessite pas une infrastructure lourde pour la réalisation de système, seulement une cloche à vide et une étuve), et fonctionnalisable même si ces procédés sont généralement difficiles à mettre en œuvre [4]. Toutes ces caractéristiques lui ont aussi permis

# CHAPITRE 3. MICROFABRICATION ET INTÉGRATION DES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

d'avoir des applications dans un nombre varié de domaines tel que le biomédical (implants), l'alimentaire (Émulsifiant E900), le packaging (insolation électrique de composant, adhésif) [5]. Le PDMS utilisé ici est le kit Sylgard 184 [6] qui est composé de deux bouteilles : l'une contenant le PDMS non réticulé et l'autre l'agent réticulant. La composition du PDMS non réticulé est décrite sur la figure 3.5. Sa chaîne principale est composée de  $\text{SiO}(\text{CH}_3)_2$ . Les extrémités de l'oligomère (fonction alcène) réagissent en présence de catalyseur sur le SiH d'autres oligomères. Cette réaction permet la formation d'une matrice donc d'un polymère solide (élastomère). La préparation du PDMS se fait en mélangeant le PDMS non réticulé et l'agent réticulant avec un ratio de 10 :1 en masse (pour 50 gr. de PDMS non réticulé, il faut 5 gr. d'agent réticulant). Une fois le mélange effectué, il est mis sous vide afin de le faire dégazer et d'éviter la formation de bulles d'air lors du processus de fabrication.

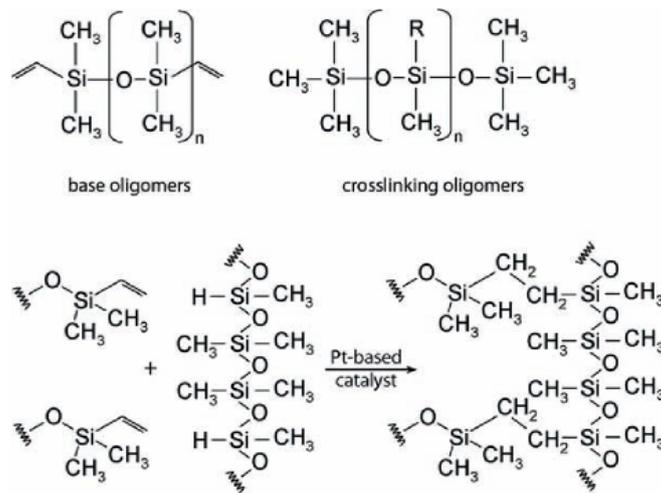


FIGURE 3.5 – Formule des principales composés du PDMS non réticulé et schéma explicitant la réaction de réticulation [7]

## 3.2.1 L'étapes de fabrication de puces microfluidiques

La fabrication des puces en PDMS commence par la réalisation d'un moule en SU8, une résine époxy [8] qui est déposée puis insolée à la surface d'un wafer (voir 3.1.1). Le wafer est ensuite silanisé, c'est à dire que sa surface est fonctionnalisée à l'aide d'un silane afin de la rendre antiadhésif. Le but de cette étape est d'éviter la création de liaisons covalentes entre le PDMS et le Silicium lors de l'étape de cuisson. Pour la fabrication de nos puces, le silane utilisé est l'OTS (OctaDecylTrichloroSilane). Pour la réaliser, le wafer est plongé dans une solution de xylène contenant le silane sous une atmosphère d'azote afin d'éviter la polymérisation du silane pendant 15 minutes. Ensuite le wafer est rincé dans trois bain de solvant successifs tout d'abord dans du xylène, puis de l'acétone et enfin de l'éthanol. Le wafer est laissé 3 minutes dans chaque bain. Il est ensuite séché par un flux d'azote. Le PDMS est ensuite préparé puis coulé sur le wafer et recuit pendant environ une heure et demi à 75°C. Le PDMS est alors démoulé du wafer, puis les puces microfluidiques sont découpées, les entrées et les sorties fluidiques sont percées à l'aide d'un

emporte-pièce (ce procédé de perçage sera développé dans le paragraphe 3.3.2). Puis des lames de verres sont ensuite nettoyées à l'aide d'un traitement piranha (mélange 1 pour 1 d'acide sulfurique à 98% et d'eau oxygénée à 20%), les puces, quand à elles le sont par passage aux ultrasons dans un bain d'isopropanol pendant dix minutes. Les deux parties sont enfin passées au plasma  $O_2$  afin de sceller les puces (plasma Tepla, pour le verre :  $P=800W$ ,  $Q_{O_2} = 1000ml/min$ ,  $t=2min$ ; pour le PDMS :  $P=300W$ ,  $Q_{O_2} = 1000ml/min$ ,  $t=30s$ ). Les différentes étapes de la fabrication sont résumées sur la figure 3.6

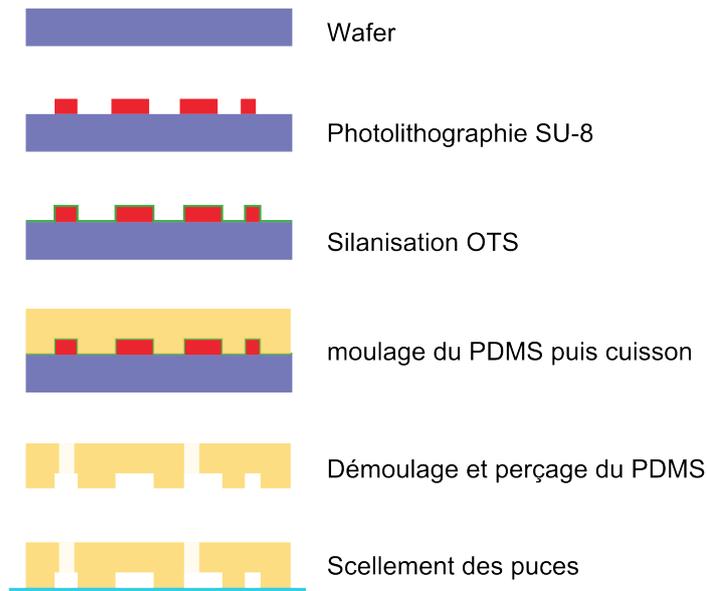


FIGURE 3.6 – Etapes de fabrication des puces en PDMS

## 3.3 Intégration des systèmes

Après avoir vu les techniques de réalisation des systèmes microfluidiques, nous nous intéressons ici aux différents moyens de les connecter avec l'extérieur. Nous commencerons par présenter les outils utilisés pour injecter les fluides dans les microcanaux, puis nous exposerons les méthodes pour réaliser l'interface entre ces systèmes et nos puces (en PDMS puis en Silicium).

### 3.3.1 Injections des fluides :

Au laboratoire, l'injection des fluides peut se faire à l'aide de deux dispositifs : un pousse-seringue ou un générateur de pression. Ces deux systèmes se distinguent par la variable d'entrée, leur temps de réponse et les connexions utilisées.

Pour le pousse-seringue, nous contrôlons le débit du fluide, et le principal avantage de cette approche est de pouvoir connaître précisément la vitesse moyenne de l'écoulement, donnée qui peut être cruciale pour certaines expériences (mesure de diffusion, génération de gouttes...). En revanche, le temps de réponse est relativement long, de l'ordre de quelques minutes, à cause de la compliance des tubes servant à amener le fluide sur la puce et à la déformation de la seringue (cela

## CHAPITRE 3. MICROFABRICATION ET INTÉGRATION DES SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

devient négligeable avec l'utilisation de seringues en verre). Une autre limitation est d'avoir un débit pulsé pour de faibles débits, dû à une mauvaise adéquation entre le diamètre de la seringue et le pas du moteur du pousse-seringue. Enfin l'utilisation de tubes (téflon ou tygon) pour réaliser la connexion entre la seringue et la puce, implique un volume mort important (de 20 à 150  $\mu\text{L}$ ) dû à la longueur du tube (environ 30 cm sur notre montage).

Pour le générateur de pression, le fluide est stocké dans un réservoir connecté à la puce fluidique, une pression est appliquée à la surface du fluide, ce qui permet la circulation du fluide dans la puce. Le principale avantage de ce système est d'avoir un temps de réponse rapide (celui du système de régulation, une fraction de seconde typiquement) et un volume mort faible (quelques  $\mu\text{L}$ ). En effet, le réservoir peut être soit déporté de la puce soit directement connecté sur la puce ce qui a pour effet de diminuer la longueur tube entre le réservoir et la puce donc les volumes morts (figure 3.7). En revanche, il est difficile de connaître précisément la vitesse à l'intérieur des canaux.

### 3.3.2 Connexion des systèmes PDMS

Nous allons nous servir de la déformabilité du PDMS pour réaliser les connexions fluidiques. Elle permet de monter en force un tube dans un trou de diamètre inférieur. Le tube est alors serré par le PDMS, cela suffit à assurer l'étanchéité de la connexion pour des pressions de l'ordre de quelques bars. Le choix du diamètre du trou dépend du diamètre du tube, si le trou est trop petit, le PDMS va se fissurer lors de la mise en place du tube et cela provoquera des fuites, en revanche si le trou est trop grand, le tube ne sera pas assez serré et l'étanchéité ne sera pas assurée. Pour réaliser des trous adaptés à nos tubes, nous utilisons une gammes d'emporte-pièces (Harris Uni-Core) permettant d'obtenir des diamètres de 0.35, 0.5, 0.75, 1 et 1.25 mm. La procédure pour réaliser les perçages est simple, l'emporte-pièce est enfoncé dans le PDMS (de la face où se trouve les canaux vers l'autre côté) à l'endroit prévu pour réaliser la connexion, la carotte de PDMS est alors éjectée, puis l'emporte-pièce est retiré, le trou ainsi formé est soufflé avec de l'azote afin d'enlever les débris de PDMS pouvant rester après le perçage (figure 3.7).

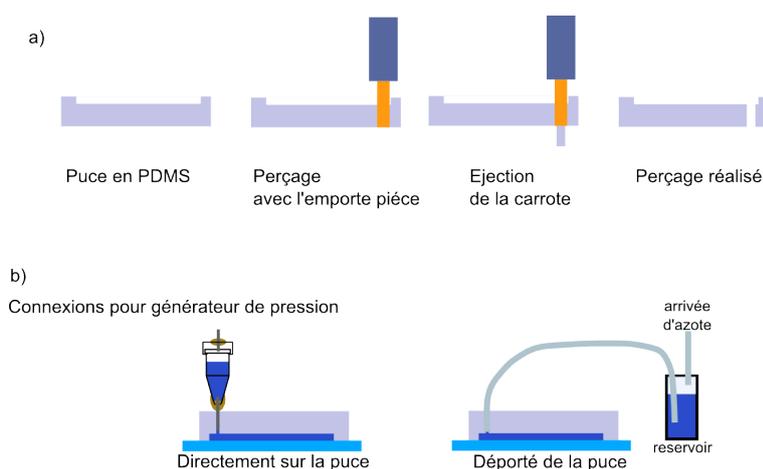


FIGURE 3.7 – a) Différentes étapes de perçages pour les puces en PDMS. b) Techniques permettant la connexion du générateur de pression sur les puces en PDMS

La connexion sur des systèmes PDMS pour les deux moyens d'injection est identique dans le cas du pousse-seringue et d'un réservoir déporté, nous utilisons un tube en téflon de diamètre extérieur 1.61 mm et de diamètre intérieur 0.81 ou 0.3 mm. En revanche pour les réservoirs mis

directement sur les puces, une solution a été développée au sein du laboratoire. Nous les réalisons à l'aide de tubes en polypropylène d'un volume de 1.5 mL dont nous venons percer le fond à l'aide d'un flux d'air chaud, puis nous introduisons un tube métallique que nous collons au tube avec de l'araldite. Afin d'assurer sa fonction de réservoir pour générateur de pression, le tube doit être fermé à l'aide d'un bouchon qui sera préparé de la même façon que le tube (figure 3.3.2).

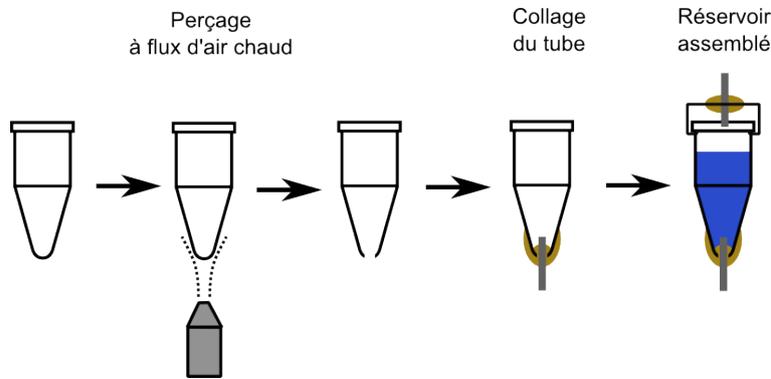


FIGURE 3.8 – Schéma décrivant les étapes de fabrication des réservoirs connectés directement sur les puces en PDMS

### 3.3.3 Connexion des systèmes en silicium

Avant de s'intéresser à la connexion fluide, nous devons expliciter la réalisation des entrées/sorties sur les puces silicium. Les perçages des entrées/sorties sont réalisés à l'aide d'une sableuse. Des grains d'oxyde d'aluminium de  $50 \mu\text{m}$  sont projetés sur le wafer (préalablement protégé par un film laminé de  $50 \mu\text{m}$  d'épaisseur) ce qui provoque l'abrasion du silicium sur une zone bien définie (cercle d'un diamètre de 1 mm environ). Cette abrasion répétée permet la réalisation des trous. Une autre technique pour réaliser les trous aurait été d'utiliser les techniques de gravures classiques mais ce procédé est long car nécessitant une étape supplémentaire de photolithographie et une forte profondeur de gravure. Les puces sont ensuite scellées (cf. 3.1.3). Une fois le scellement effectué, nos systèmes sont prêts à l'emploi, il faut alors les connecter au système d'injection. Trois solutions peuvent être distinguées : les connexions commerciales, les connexions utilisant le PDMS et enfin celle faisant appel à un support.

#### 3.3.3.1 Les solutions commerciales :

Une des solutions utilisées couramment est celle proposée par IDEX Health & Science (anciennement UpChurch Scientific) [9]. Un support en polymère est collé sur la puce à l'aide d'un ruban thermoadhésif (figure 3.9). Ces supports sont adaptés pour accueillir des vis ayant un pas de 1/32 pouces. Pour monter des tubes et injecter des fluides, nous utilisons des vis percées permettant le passage des tubes. Au bout de ces vis, une fêrulle en plastique est mise autour du tube, lors du serrage de la vis dans le support, elle se déforme et permet d'assurer l'étanchéité entre le support et le tube. Le principal avantage de cette connexion est d'être standard, réutilisable et de permettre l'utilisation de haute pression. En revanche, elle est relativement encombrante (diamètre extérieur 8.4 mm) ce qui limite le nombre d'entrées/sorties sur une même puce. De plus, elle impose l'utilisation de tube ce qui implique obligatoirement des volumes morts importants. Enfin leur coût est relativement élevé ( $\sim 10$  euros/pièce).



FIGURE 3.9 – Photographie présentant différentes connexions microfluidiques à l'aide des supports UpChurch [9]

### 3.3.3.2 La solutions utilisant le PDMS

Pour la mise en oeuvre de cette connexion, une pièce de PDMS percée au niveau des entrées/sorties est collée sur la puce en silicium. Deux techniques de collage sont utilisées, la première est de faire un collage par activation plasma (cf 3.1.3.3), la seconde fait appel à une colle UV déposée à la surface du PDMS, le PDMS est aligné avec le silicium puis mis contact et enfin insolé pour réticuler la colle. Le principal inconvénient de la deuxième méthode est le risque de colmatage par la colle des entrées/sorties. En revanche, cette connexion permet de s'affranchir des connexions commerciales et d'utiliser pour les tubes d'alimentation les solutions développées pour les puces en PDMS. Par contre le temps de préparation des puces est important et nécessite un certain doigté.

### 3.3.3.3 L'utilisation de supports avec joints

Ce type de connexion a été développé avec X. Dollat, à l'atelier de mécanique du LAAS, pour éviter les étapes de montage. Cela permet aussi un temps de mise en place des expériences beaucoup plus court, notamment pour le changement des solutions ce qui est crucial lors de la manipulation de peptide pouvant s'agréger tel que l'amyloïde- $\beta$ . La puce est placée dans un support en aluminium permettant l'observation sur un microscope inversé, puis une pièce en Téflon avec des trous au niveau des entrées/sorties est montée sur le support (à l'aide de deux vis). Afin d'assurer l'étanchéité entre la pièce en téflon et la puce, des joints toriques sont mis dans des gorges usinées au niveau des trous. Lors du serrage des vis, les joints sont écrasés ce qui permet d'éviter les fuites. Ces supports peuvent s'adapter aux deux moyens d'injection (contrôle en débit et en pression). Dans le cas du pousse-seringue, le support est usiné pour pouvoir être utilisé avec les connecteurs UpChurch montés sur le tube, la connexion se fait alors de la même manière qu'avec les supports commerciaux. Pour le générateur de pression, des réservoirs pour les entrées, d'un volume de  $150\mu\text{L}$ , sont directement usinés sur le support Téflon. Un bouchon avec une entrée pour le générateur de pression est mis sur le réservoir pour permettre l'injection du fluide. Pour les sorties, le même système que pour le pousse-seringue est utilisé (détails des connexions sur la figure 3.10). L'avantage de ces supports est de ne nécessiter aucune étape de montage des puces. De plus, ils peuvent être utilisés pour un grand nombre de puces différentes à conditions qu'elles

aient été dessinées avec la même position pour les entrées/sorties.

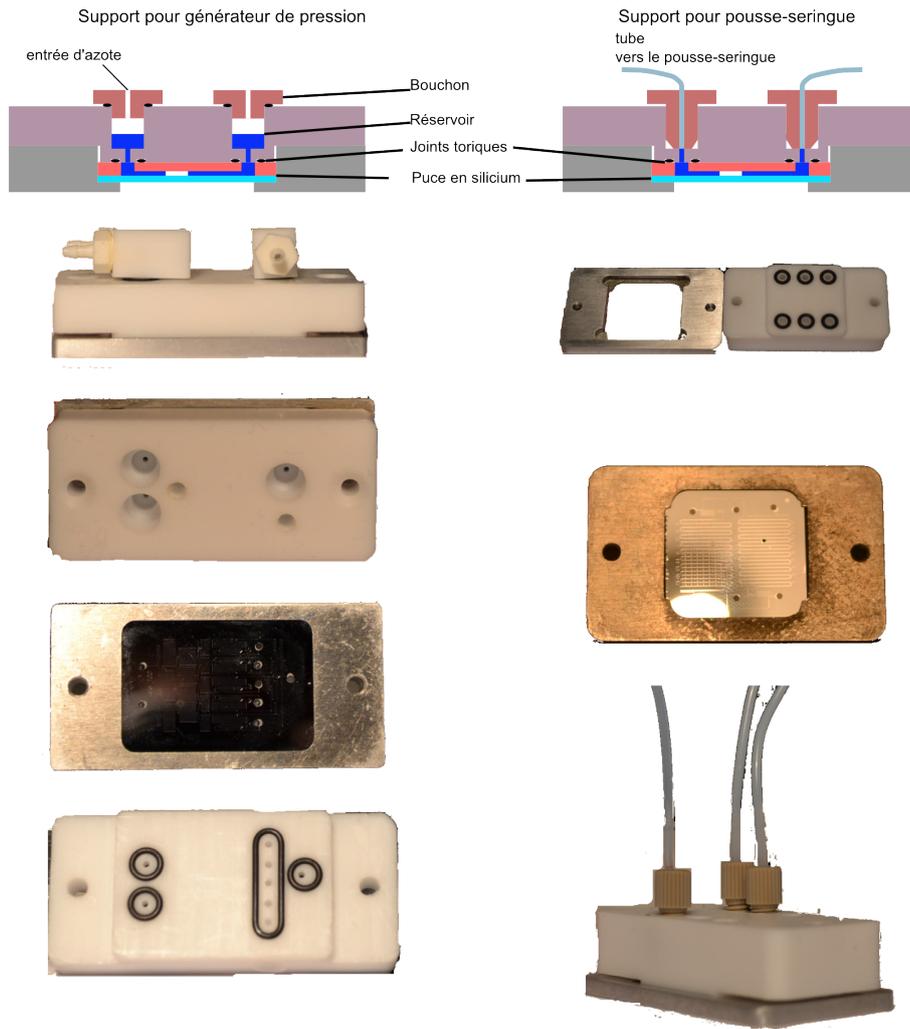


FIGURE 3.10 – Supports pour la connexion de puces silicium



# Références bibliographiques

- [1] Spray Coating, Enduction de surfaces de forte topologie, (consulté en avril 2012). <http://www.femto-st.fr/fr/Centrale-de-technologie-MIMENTO/Ressources-disponibles/Photolithographie/Spray-Coating.php>. 58
- [2] DUFFY D., McDONALD J., O. SCHUELLER, AND WHITESIDES G. *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry **70**(23), 4974–4984 (1998). 61
- [3] UNGER M., CHOU H-P., THORSEN T., SCHERER A., AND QUAKE S. *Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*. Science **288**(5463), 113–116 (2000). 61
- [4] SUI G., WANG J., LEE C-C., W. LU, LEE S., LEYTON J., WU A. M., AND H-R. TSENG. *Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels*. Analytical Chemistry **78**(15), 5543–5551 (2006). 61
- [5] HOCHENG H., CHEN C-M., Y-C. CHOU, AND LIN C-H. *Study of novel electrical routing and integrated packaging on bio-compatible flexible substrates*. Microsystem Technologies **16**, 423–430 (2010). 62
- [6] Informations sur le PDMS Sylgard 184, (consulté en avril 2012). <http://www.dowcorning.com/DataFiles/090007c8802d7bc4.pdf>. 62
- [7] S. THORSLUND. *Microfluidics in Surface Modified PDMS : Towards Miniaturized Diagnostic Tools*. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. Acta Universitatis Upsaliensis (2006). 62
- [8] Propriété de la SU8, (consulté en octobre 2012). [http://microchem.com/pdf/SU-82000DataSheet2000\\_5thru2015Ver4.pdf](http://microchem.com/pdf/SU-82000DataSheet2000_5thru2015Ver4.pdf). 62
- [9] Site internet présentant les différentes solutions de connexion fluide de IDEX Health& Science, (consulté en avril 2012). <http://www.http://webstore.idex-hs.com/default.asp>. 65, 66



# Chapitre 4

## Conception de puces à "multi"-concentration pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  joue un rôle important dans la maladie. Il s'agit d'un mécanisme complexe et multiparamètres, ce qui le rend mal compris. Parmi les nombreux paramètres impliqués, nous pouvons citer la concentration en amyloïde- $\beta$ , la présence d'ions métalliques, de radicaux libres, le pH... Les méthodes classiques nécessitent des volumes de solution importants, des temps de préparation longs, et du matériel coûteux (robot pipetage, spectromètre...) ce qui rend l'étude de l'agrégation difficile. Face à ce constat, nous proposons une approche complémentaire basée sur un système microfluidique permettant de réaliser de multiples conditions de concentration et d'obtenir ainsi des informations sur les conditions favorisant ou bloquant l'agrégation. Par rapport aux méthodes classiques, il permet la génération de plusieurs conditions expérimentales en parallèles tout en consommant peu de réactifs. De plus son principe de fonctionnement est simple, et il est possible d'intégrer le déclenchement de la réaction sur la puce.

### 4.1 Génération de gradient de concentration simple

Dans cette partie, nous allons présenter notre première génération de puces inspirées des travaux de Jeon *et al.* [1]. Dans un premier temps, nous développerons la démarche de conception de nos puces, puis nous expliciterons les méthodes qui nous ont permis de montrer que nous avons des gradients de concentration stables et reproductibles ; enfin nous présenterons les résultats et les limites de ce système pour l'étude de l'amyloïde- $\beta$ .

#### 4.1.1 Conception et réalisation des puces

##### 4.1.1.1 Définition des contraintes du problème

La concentration en amyloïde- $\beta$  ( $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$ ) tient une place importante dans la formation des plaques séniles, et le seuil de concentration critique est mal défini. Pour ces raisons, nous avons décidé de tester l'influence de la concentration en peptide sur son agrégation. Pour cela, nous devons concevoir une puce permettant d'échantillonner différentes concentrations dans un temps très court (de l'ordre de la seconde) pour éviter toute agrégation parasite avant la zone d'observation. Pour obtenir le maximum d'informations sur l'agrégation, la plage de concentration

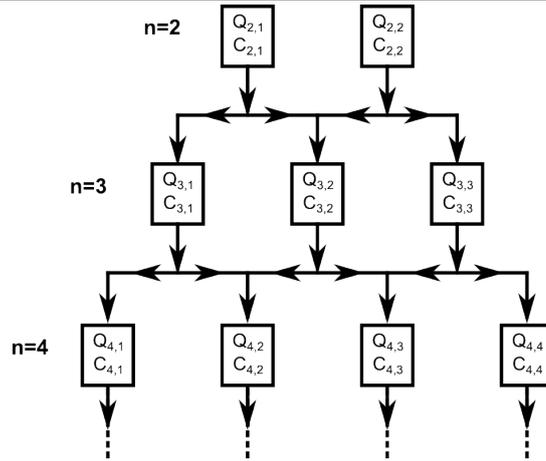


FIGURE 4.1 – Schéma présentant l'architecture du système,  $n$  correspond au numéro de l'étage  $Q_{n,i}$  et  $C_{n,i}$  sont respectivement le débit et la concentration dans la branche  $(n, i)$

explorée doit être suffisamment échantillonnée. De plus pour éviter de consommer trop de réactif (coût élevé du réactif et variabilité d'un lot à l'autre), il est intéressant de travailler avec un volume faible (volume de la puce et volume mort).

Face à ces diverses contraintes, nous avons fait le choix de concevoir un système de gradient de concentration discret selon le modèle présenté par Jeon *et al.* [1]. Nous avons choisi une forme linéaire pour le gradient avec neuf sorties afin d'avoir un bon échantillonnage. Pour les volumes morts, nous avons fait le choix de travailler avec des réservoirs placés directement sur la puce (cf. 3.3). Le temps de résidence dans la puce devra être raisonnable par rapport au temps d'agrégation (environ 20 minutes), nous fixons un temps inférieur à 30 secondes. Afin de simplifier la conception des puces, nous faisons le choix de travailler à une section constante de  $50 \times 50 \mu m^2$ . De plus, la contrainte de cisaillement due à l'écoulement peut influencer la formation d'agrégat, il est donc pertinent d'être dans les mêmes conditions expérimentales pour toutes les concentrations, donc nous souhaitons que les débits soient les mêmes pour chaque sortie.

#### 4.1.1.2 Principe de fonctionnement et dimensionnement

Nous souhaitons donc réaliser un gradient de concentration répondant aux critères énoncés ci-dessus. Pour cela, nous avons décidé de réaliser un système possédant deux entrées fluidiques : une pour le solvant seul et l'autre pour le peptide. Le principe de génération du gradient est simple : à partir des deux solutions que nous combinons, nous obtenons trois solutions différentes. Puis nous les mélangeons pour en avoir quatre, nous répétons cette opération jusqu'à obtenir neuf solutions différentes avec les concentrations désirées. La première étape de la conception consiste à définir l'architecture du système. A partir de cette dernière, nous écrivons les relations existantes entre les différents débits afin de poser les équations régissant le système que nous résolvons. Nous avons décidé de faire un système avec des étages successifs tel que le nombre de branches d'un étage à l'autre augmente d'une unité (figure 4.1). D'autres architectures de gradient sont envisageables (chapitre 2). Nous définissons  $n$  le numéro d'étage, nous commencerons la numérotation à  $n=2$  pour correspondre au premier étage où il n'y a seulement que les deux entrées. Les branches seront numérotées de 1 à  $n$ , nous noterons la grandeur  $X$  pour la branche  $k$  :  $X_{n,k}$ .

Maintenant que nous avons défini l'architecture du système, nous devons poser les équations reliant les débits et les concentrations. Nous écrivons tout d'abord la conservation des débits d'un

étage à l'autre, nous posons  $Q_0$  le débit total et  $Q_{n,k}$  le débit dans la branche  $k$  de l'étage  $n$ . Nous avons donc :

$$\sum_{i=k}^n Q_{n,i} = Q_0 \quad \forall n \quad (4.1)$$

Nous définissons ensuite deux grandeurs  $\alpha_{n,k}$  et  $\beta_{n,k}$  qui vont correspondre à la répartition du débit de la branche  $(n, k)$  entre le coté droit et le coté gauche (figure 4.2), elles sont définies telles que  $\alpha_{n,k} + \beta_{n,k} = 1 \quad \forall k \in [1; n]$ . Nous pouvons maintenant définir le débit dans une branche en fonction du débit dans les branches de l'étage précédent. Pour la première branche de l'étage  $n$ , la seule source de solution est celle de la branche  $(n - 1, 1)$ . Pour une branche située au milieu de l'étage  $n + 1$  et à la position  $k$ , elle est alimentée par les branches  $(n, k - 1)$  (contribution de droite,  $\beta_{n,k}$ ) et  $(n, k + 1)$  (contribution de gauche,  $\alpha_{n,k+1}$ ) (figure 4.2). Nous avons donc les relations suivantes :

$$Q_{n+1,k} = \begin{cases} \alpha_{n,k} Q_{n,k} & \text{pour } k = 1 \\ \beta_{n,k-1} Q_{n,k-1} + \alpha_{n,k} Q_{n,k} \\ \beta_{n,k} Q_{n,k} & \text{pour } k = n \end{cases} \quad (4.2)$$

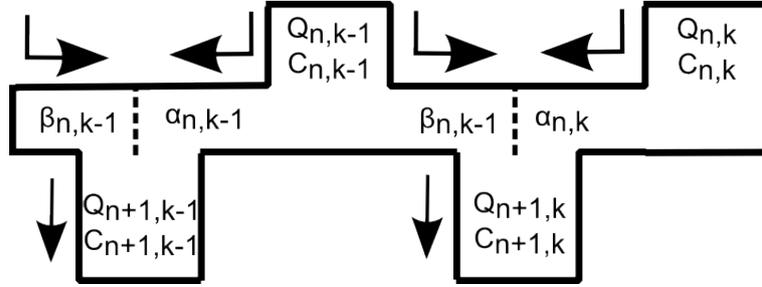


FIGURE 4.2 – Schéma présentant la répartition des fluides au niveau de l'étage  $n$ , les  $\alpha_{i,j}$  et  $\beta_{i,j}$  représente la fraction du débit  $Q_{i,j}$  servant à alimenter respectivement les branches  $(i + 1, j)$  et  $(i + 1, j + 1)$

Maintenant que nous avons les relations existantes entre les débits, nous pouvons définir la valeur de la concentration pour chaque branche. Pour cela, nous partons du principe d'un mélangeur en T classique : d'un côté arrive une solution A à un débit  $Q_A$  et avec une concentration en espèce à mélanger  $C_A$ , de l'autre coté une autre solution avec un débit  $Q_B$  et une concentration  $C_B$ . Pour calculer la concentration de la solution de sortie, nous appliquons une simple règle de dilution ( $C_{sortie} = \frac{\text{Quantité de matière}}{\text{Volume}}$ ) qui donne  $C_{Sortie} = \frac{C_A Q_A + C_B Q_B}{Q_A + Q_B}$ . En appliquant cette relation à notre système, nous obtenons l'équation suivante :

$$C_{n+1,k} = \begin{cases} C_{n,k} & \text{pour } k = 1 \\ \frac{\beta_{n,k-1} C_{n,k-1} Q_{n,k-1} + \alpha_{n,k} C_{n,k} Q_{n,k}}{Q_{n+1,k}} \\ C_{n,k} & \text{pour } k = n \end{cases} \quad (4.3)$$

Dimensionner la puce à gradient consiste à trouver les  $\alpha_{n,k}$  et  $\beta_{n,k}$  de tous les étages tels que les conditions définies précédemment soient respectées : débit égaux en sortie et gradient de concentration linéaire entre  $C_{21}$  et  $C_{22}$  qui sont les concentrations d'entrée. Dertinger *et al.* ont montré qu'il est possible de réaliser un gradient de concentration linéaire en prenant tout les débits d'un même étage égaux c'est à dire  $Q_{n,i} = Q_0/n$  [2]. A partir de cette donnée, nous pouvons trouver par récurrence les valeurs de  $\alpha_{n,k}$  et de  $\beta_{n,k}$  (équation 4.4).

$$\begin{cases} \alpha_{n,k} = \frac{n - (k + 1)}{n} \\ \beta_{n,k} = \frac{k + 1}{n} \end{cases} \quad (4.4)$$

A l'aide de ces expressions, nous connaissons maintenant la valeur et le comportement des débits dans nos systèmes. Avec ces informations nous connaissons aussi les concentrations aux différents étages et elles sont linéaires. Une fois ce travail fait, nous pouvons nous intéresser au schéma électrique équivalent à notre système (figure 4.4). Ce schéma nous permet de relier les débits (donc les valeurs de  $\alpha_{n,k}$  et  $\beta_{n,k}$ ) à l'architecture du système. Nous pouvons négliger les résistances horizontales correspondant aux connexions entre les différentes branches d'un même étage. En effet, la valeur de ces résistances est négligeable devant celle d'une branche car la longueur de ces canaux est très faible (quelques centaines de  $\mu m$ ) devant la longueur des canaux des branches (quelques dizaines de mm).

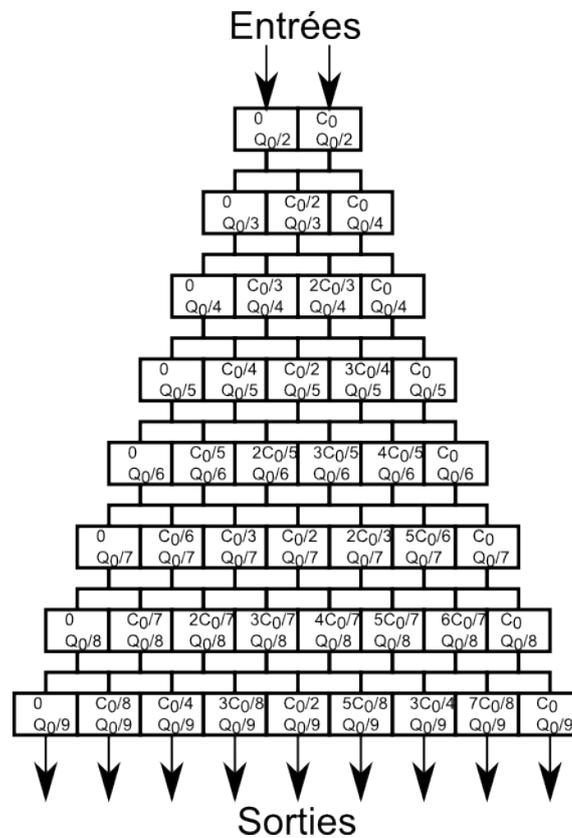


FIGURE 4.3 – Diagramme présentant les concentrations et les débits pour les différents étages à partir de débits d'entrée de  $Q_0/2$  et de concentration  $C_0$  et 0.

A chaque étage, une étape de mélange doit être effectuée. Nous avons fait le choix de ne pas utiliser de mélangeurs (partie 2.3.1), car l'ajout de mélangeurs actifs ou passifs rend la réalisation du système plus complexe et augmente sa dimension. Les mélanges se font donc uniquement par diffusion. Or nous avons vu que la longueur de mélange est directement liée au débit par la relation :  $L_m = \frac{w^2 v}{D}$  où  $v$  est la vitesse moyenne de l'écoulement,  $w$  la largeur de la canalisation et  $D$  le coefficient de diffusion de l'espèce étudiée. De plus la vitesse de l'écoulement est directement reliée au débit par la relation  $v = Q/S$  où  $S$  est la section de la canalisation. Le débit est aussi relié à la différence de pression existant entre l'entrée et la sortie d'une branche :  $\Delta P = R_h Q$

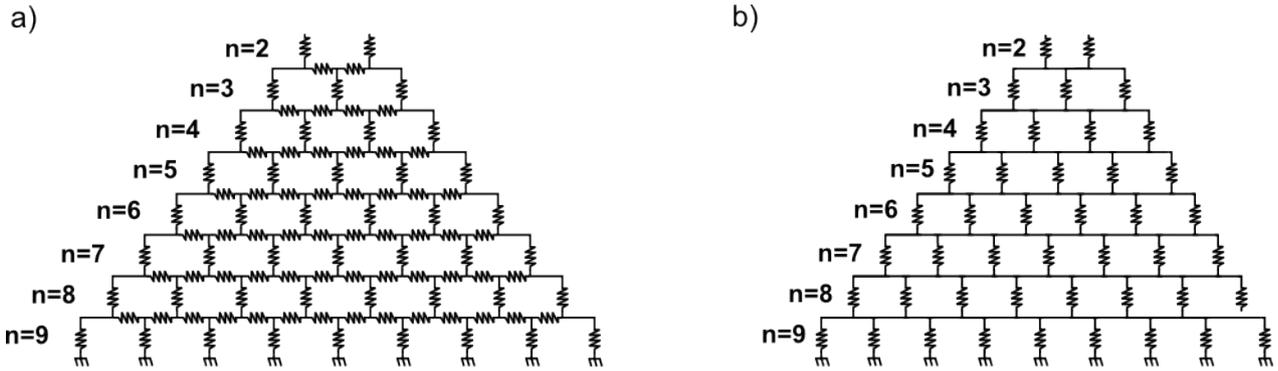


FIGURE 4.4 – Schémas électriques équivalents du système microfluidique, où  $n$  est le numéro de l'étage, a) est le schéma prenant en compte les résistances hydrodynamiques horizontales, nous avons vu qu'elles sont négligeables, nous utiliserons donc le schéma b) pour modéliser notre système

n	3	4	5	6	7	8	9
Débit max par branche ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	2	1.6	1.3	1	0.9	0.8	0.7
$L_m$ max (mm)	67	50	40	34	29	25	22.5
$R_h$ max ( $\times 10^{14} SI$ )	3.05	2.28	1.82	1.55	1.32	1.14	1.02

TABLE 4.1 – Récapitulatif des débits maximaux, des longueurs de mélange, et des résistances hydrodynamiques pour chaque étage

où  $R_h$  est la résistance hydrodynamique (Cf. partie 2.11). Maintenant que nous avons défini les différentes relations existant entre toutes les grandeurs du système, nous devons fixer un certain nombre de dimension afin de pouvoir dessiner le système.

Tout d'abord, nous choisissons de travailler avec des canaux de section  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ , le coefficient de diffusion choisi pour dimensionner le système est de  $5 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$  et correspond à celui de la fluorescéine dont l'ordre de grandeur est identique à celui des peptides. A partir de ces données, nous pouvons calculer les longueurs des différentes branches en fonction du débit, le choix de cette grandeur est contrainte par la plage de fonctionnement du générateur de pression (entre 0 et 1 bar). Au vu de ces éléments, nous faisons le choix de travailler à des débits ( $Q_s$ ) de sortie compris entre 0.1 et  $0.7 \mu\text{l}/\text{min}$  ce qui nous donne un débit d'entrée maximal ( $Q_0$ ) de  $6 \mu\text{l}/\text{min}$ . A partir de ces données, nous pouvons en déduire les longueurs de mélange pour chaque étage, elles sont résumées dans le tableau 4.1. Nous prendrons ces longueurs comme longueur de branche pour chaque étage.

La connaissance de ces longueurs permet le calcul des résistances hydrodynamiques de chaque branche (sur la figure 4.4.a cela correspond aux résistances électriques verticales). Maintenant que nous connaissons les longueurs de chaque branche pour les différents étages, nous pouvons facilement calculer la résistance hydrodynamique correspondante (voir tableau 4.1). De plus pour les deux entrées, nous faisons le choix de prendre comme longueur d'entrée 7 mm afin d'éviter tout échange de liquide entre les deux réservoirs. Cette longueur rajoute une résistance hydrodynamique assez importante entre les deux réservoirs ce qui limite les risques d'un échange de liquide. Cela pourrait être critique lors de l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  (début d'agrégation dans le réservoir contenant l'amyloïde- $\beta$ ). Maintenant que nous connaissons tous les paramètres de notre système (débit, longueur des canaux, résistances hydrodynamique...), nous pouvons calculer la résistance équivalente au système puis déterminer la différence de pression à appliquer entre les entrées et les sorties pour être dans la plage de fonctionnement du système. Nous calculons une

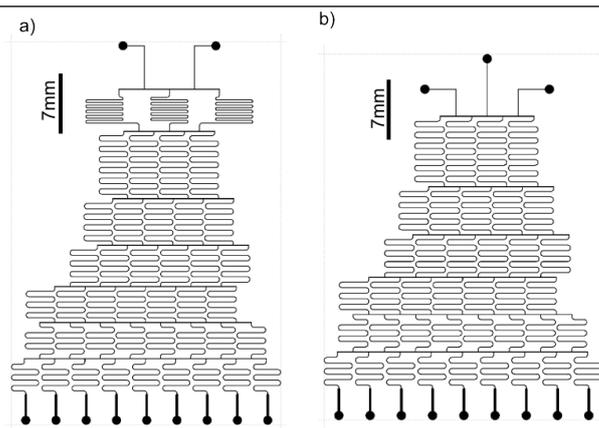


FIGURE 4.5 – Dessins des puces permettant la réalisation d'un gradient de concentration, la puce a) permet la réalisation de gradient linéaire, la puce b) permet de générer des gradients paraboliques

$\Delta P(mbar)$	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Débit total( $\mu l/min$ )	2.3	4.5	6.8	9	11.3	13.6	15.8	18.1	20.4	22.6

TABLE 4.2 – Valeur des débits en fonction des pressions d'entrée pour le système à deux entrées.

pression de 300 mbar, ce qui correspond aux plages de fonctionnement de notre générateur de pression. Nous pouvons donc maintenant dessiner nos puces microfluidiques à l'aide du logiciel Clewin. Nous avons décidé de réaliser deux types de puces, l'une avec deux entrées permettant la réalisation de gradient linéaire, et une autre avec trois entrées permettant la réalisation de gradient beaucoup plus complexe (figure 4.5) [2]. Cette puce à trois entrées a la même architecture que celle à deux entrées, la réalisation de gradient plus complexe se fait en jouant sur les concentrations des solutions des trois entrées, par exemple en mettant au centre seulement une solution contenant l'espèce et sur les deux autres entrées du solvant, nous obtenons alors un gradient parabolique.

## 4.1.2 Validation du fonctionnement des puces

Afin de tester et calibrer notre système et ses limites, nous avons injecté dans les puces microfluidiques des solutions de fluorescéine à l'aide d'un générateur de pression. Dans cette partie, nous allons tout d'abord présenter le banc permettant de réaliser les mesures sur nos puces puis les résultats obtenus.

### 4.1.2.1 Description du banc de microscopie utilisé

La microscopie de fluorescence repose sur la capacité de certaines molécules à absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) pour ensuite l'émettre sous forme de lumière de fluorescence. L'adsorption d'énergie correspond à l'excitation de la molécule par un photon dont l'énergie permet la transition électronique d'un état  $S_0$  à un état  $S_1$ . L'état excité dure environ  $10^{-8}$  secondes. Au cours de cette période la molécule va perdre une partie de l'énergie emmagasinée sous forme de vibration pour se retrouver à un niveau énergétique  $S_1'$ , elle émet ensuite un photon pour se retrouver à son état fondamental  $S_0$  : cette émission est le phénomène de fluorescence (figure 4.6). La différence d'énergie entre les photons incidents et les photons émis se traduit par un décalage entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'émission : c'est ce décalage qui

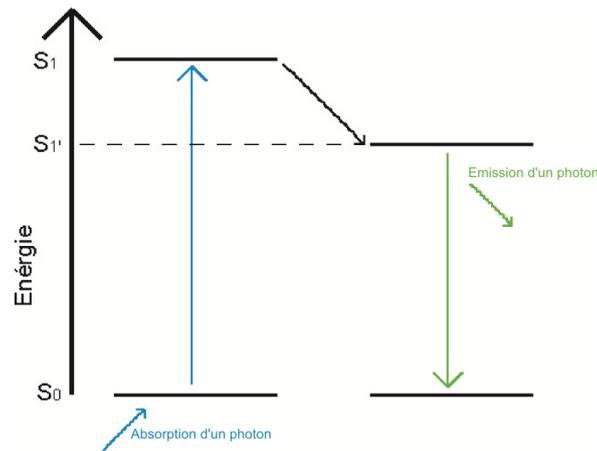


FIGURE 4.6 – Diagramme énergétique d'une molécule fluorescente [3]

va permettre l'utilisation du phénomène de fluorescence.

Dans la réalité, la longueur d'onde d'excitation et d'émission ne sont pas ponctuelles mais sur une gamme de longueur d'onde, nous parlons alors de spectre d'adsorption et d'émission qui est caractéristique de la molécule fluorescente. La molécule que nous allons utiliser pour la caractérisation de nos systèmes est de la fluorescéine dont le pic du spectre d'excitation est de 495 nm et d'émission de 517 nm (figure 4.7.a).

Le terme de microscopie de fluorescence regroupe plusieurs type de montages (TIRF (*Total Internal Reflexion Fluorescence*), microscopie confocale, FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*)...). Dans le cadre de cette thèse, nous avons un montage de microscopie d'épifluorescence ; il est basé sur un microscope optique classique, notamment sur son élément clé le miroir dichroïque. Le spectre de ce cube est composé de deux parties séparées par une longueur d'onde de coupure  $\lambda_c$ , en dessous de cette longueur d'onde, le cube reflète l'ensemble de la lumière, au dessus il la laisse passer. Avec une source monochromatique correspondant à la longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde de coupure adaptée, il est possible de faire de l'imagerie de fluorescence avec seulement un montage dichroïque. Mais ces conditions sont difficiles à atteindre, c'est pour cela que classiquement deux filtres lui sont rajoutés pour former un cube de fluorescence : le premier sert à filtrer la source lumineuse (spectre étendu) et ainsi avoir une source monochromatique, le second sera mis entre le dichroïque et le capteur afin de ne garder que la longueur d'onde d'émission (figure 4.8). Pour qu'un cube soit efficace, il faut qu'il soit adapté au fluorophore, pour cela les longueurs d'ondes des filtres d'excitation, d'émission et du cube dichroïque doivent être choisies avec soin afin d'avoir les moins de pertes possibles. Pour la caractérisation de notre système, nous avons pris un cube Zeiss adapté à la fluorescéine (filter set 38 HE, spectre figure 4.7.b).

Dans la majorité de nos expériences, une source utilisant une technologie à diodes laser (modèle SPECTRA 7 light engines) a été utilisée. Elle possède l'avantage de pouvoir délivrer une forte puissance lumineuse (jusqu'à 1W pour la voie la plus puissante ce qui est comparable à des sources lasers) à 7 longueurs d'ondes différentes. De plus, chaque voie possède un spectre relativement étroit ( $\pm 10\text{nm}$ ) ce qui permet une bonne sélectivité et la concentration de la puissance lumineuse sur une bande étroite. Pour des expériences nécessitant moins de puissance lumineuse (caractérisation des puces par exemple), nous utiliserons une lampe à mercure classique ayant un large spectre dans l'UV.

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

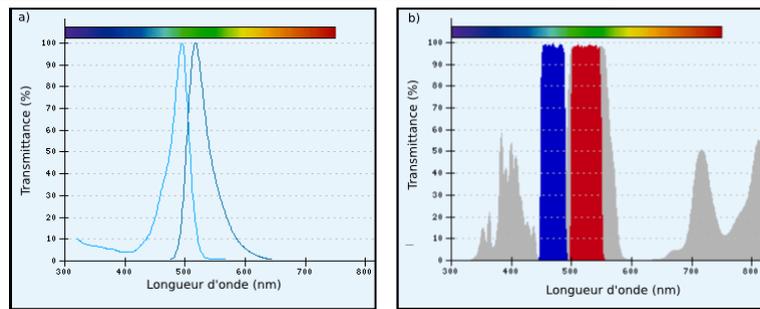


FIGURE 4.7 – Spectre de la fluorescéine(a) [4] et du cube de fluorescence adapté(b) [5]

Pour la prise d'image sur le microscope, nous avons utilisé une caméra EMCCD (*Electron Mul-*

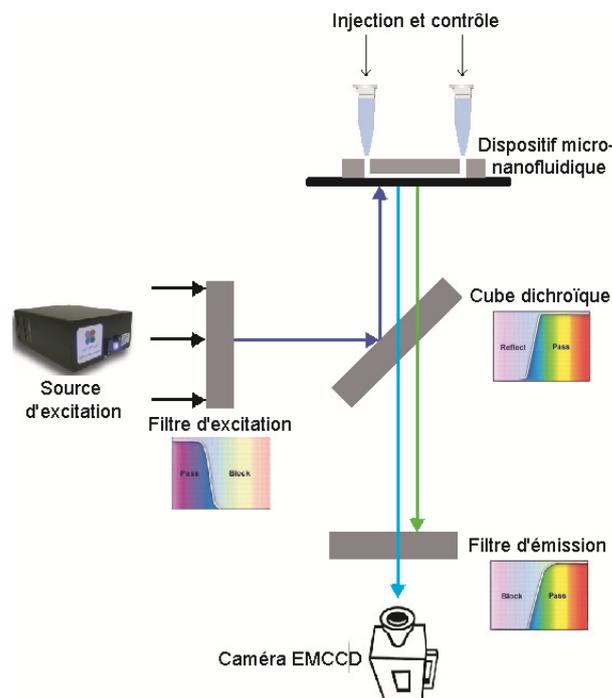


FIGURE 4.8 – Schéma d'un montage d'un cube de fluorescence [3]

*tipying Charge Coupled Device*) ANDOR "DU 885" refroidie à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cette caméra à une bonne sensibilité ce qui permet d'obtenir des images avec un bon contraste dans des conditions de faible signal. Elle est pilotée à l'aide du logiciel AndorIQ qui nous permet de gérer les différents paramètres (temps d'exposition, gain,...).

Ces différents éléments sont montés sur un microscope inversé Zeiss Observer D1, la figure 4.9 est une photographie de ce montage.

### 4.1.2.2 Protocole expérimental

**Réalisation des puces :** Les puces microfluidiques ont été réalisées en PDMS en suivant le protocole décrit dans la partie 3.2 (Fabrication des puces en PDMS). Ces systèmes ont été scellés par activation plasma sur des lames de verre de taille  $70 \times 50 \text{mm}^2$  et d'épaisseur 1mm. L'injection

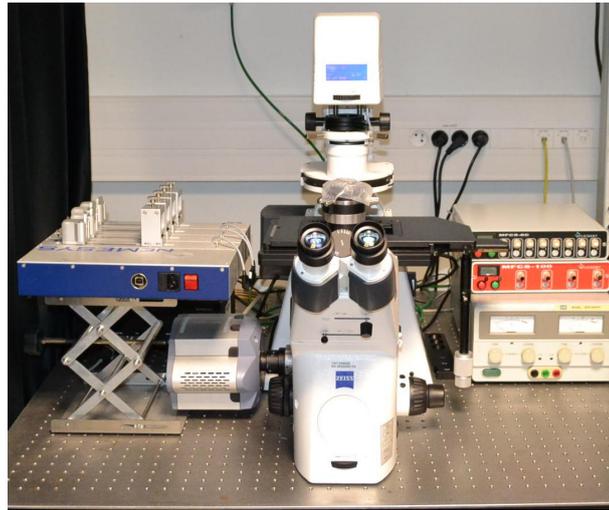


FIGURE 4.9 – Photo du banc de microscopie

des fluides se fait à l'aide de réservoirs intégrés sur la puce (partie 3.3). Les sorties sont connectées à l'extérieur à l'aide de tubes de téflon de dimensions :  $\varnothing_{ext} = 1.63mm$   $\varnothing_{int} = 0.8mm$ .

**Protocole expérimental :** Afin de tester nos puces, nous injecterons dans l'une des entrées une solution de fluorescéine à 1mM, cette solution a été préparée à partir de fluorescéine en poudre (Fisher Scientific) que nous avons dissoute dans quelques centaines microlitres d'une solution de NaOH à 1M afin de faciliter sa solubilisation puis nous la diluons dans de l'eau déionisée pour avoir une solution à une concentration d'environ 1M. Pour obtenir une concentration de 1mM, cette solution doit être diluée mille fois ce qui permet d'assurer un pH proche de l'eau déionisée. Dans un premier temps, nous remplissons nos puces à l'aide des solutions de fluorescéine et d'eau déionisée, nous contrôlons l'absence de bulles d'air dans le système. En effet, la présence de bulles d'air induit une modification de la résistance hydrodynamique de la canalisation, et perturbe donc le fonctionnement du système.

Ensuite, pour une pression d'entrée donnée ( $P_e$ ), nous mesurons les différentes intensités des sorties afin de connaître la concentration en fluorescéine et ainsi remonter à la forme du gradient. Cette méthode de mesure s'appuie sur l'existence d'une relation de proportionnalité entre la concentration en fluorophore et l'intensité de fluorescence pour des solutions peu concentrées. Afin de valider la mesure, nous avons vérifié cette relation. Pour cela, nous avons préparé différentes solutions de fluorescéine dont la concentration varie de 0 à 4.2mM. Puis nous avons déposé des gouttes de même volume pour chaque solution sur une lame de verre et mesuré leur intensité de fluorescence en adaptant les paramètres d'acquisition pour ne pas saturer la caméra. Nous recalculons alors l'intensité en prenant en compte ces paramètres ( par exemple :  $T_{exp}/2 \Rightarrow (I - bruit) \times 2$ ). Ensuite, nous avons tracé la courbe représentant l'intensité en fonction de la concentration (figure 4.10), nous observons que pour une concentration inférieure à 1.2mM, nous avons bien un comportement linéaire. Nos conditions expérimentales sont dans cette plage, cela nous permet donc de valider notre méthode de mesure de la forme du gradient.

La qualité du mélange en sortie de serpentin est importante pour obtenir un gradient linéaire. Nous contrôlons donc la qualité du mélange en mesurant le profil d'intensité sur la largeur de la canalisation pour différentes pressions. Ce profil nous permet de connaître la pression limite pour laquelle le mélange n'est plus complet, donc de connaître la limite de fonctionnement du système.

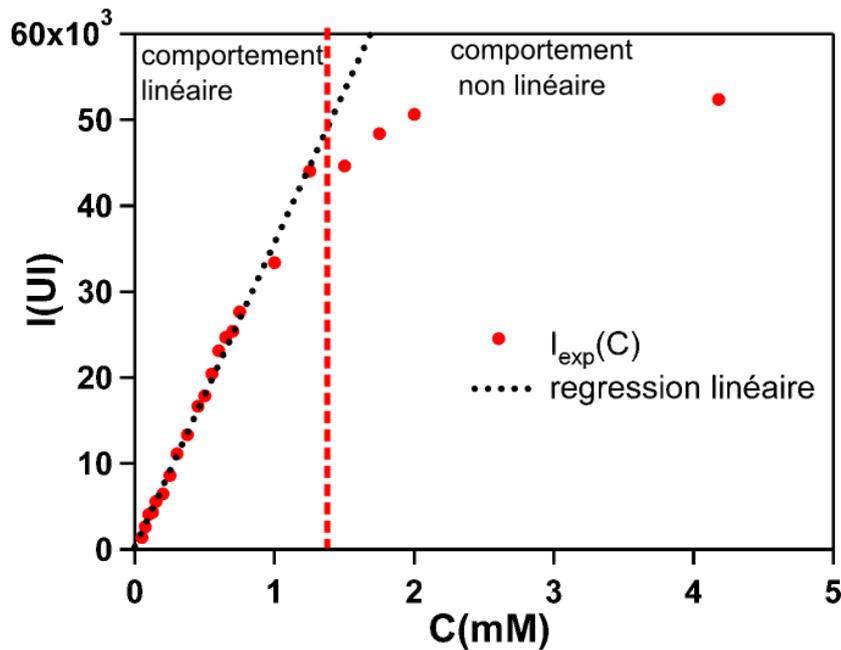


FIGURE 4.10 – Graphique présentant la relation existant entre l'intensité de fluorescence et la concentration, la ligne en pointillé rouge représente la limite de validité du comportement linéaire

Le mélange est correctement effectué tant que le profil d'intensité est constant sur la largeur de la canalisation. Dans le cas contraire, nous sommes en présence d'un mélange incomplet. Cela implique que le gradient de concentration réalisé est moins précis. En effet, lors de la répartition des fluides au niveau d'un étage, les concentrations ne sont pas homogènes donc lors du mélange pour l'étage suivant la concentration n'est pas la bonne ce qui provoque en sortie un changement de la forme du gradient.

Afin de connaître les limites de fonctionnement de notre système, nous faisons varier les pressions d'entrée entre 100mbar et 1bar. Le choix d'un contrôle en pression permet l'utilisation de réservoirs directement connectés sur la puce et ainsi de limiter les volumes morts (par rapport à des connections avec des tubes classiques) ce qui est important pour la manipulation de solution d'amyloïde- $\beta$  en raison des faibles volumes disponibles (de l'ordre de la centaine de  $\mu L$ ).

#### 4.1.2.3 Résultats expérimentaux

##### Puces microfluidiques à deux entrées : réalisation de gradient de concentration linéaire

Nous faisons varier la pression à l'entrée des puces, le débit total est compris entre 2.3 et 22.6  $\mu l/min$ , ces valeurs sont respectivement obtenues pour des pressions de 100 et 1000mbar, le débit dans le système et la pression sont reliés par une relation de linéarité ( $\Delta P = R_{h,systeme} Q_0$ ). Les valeurs du débit total en fonction de la pression sont résumées dans le tableau 4.2 (page 76). Nous allons d'abord nous intéresser à la forme des gradients obtenus. Pour cela, nous prenons une image de chaque sortie, à laquelle nous soustrayons le bruit dû à la caméra. Ensuite, sur une zone de taille définie (ROI "Region Of Interest"), nous mesurons l'intensité moyenne de fluorescence à l'aide du logiciel Image J (figure 4.11). Le traitement de l'image est résumé sur la figure 4.12.

Une fois ce relevé effectué, nous pouvons alors tracer l'intensité en fonction du numéro de sortie,

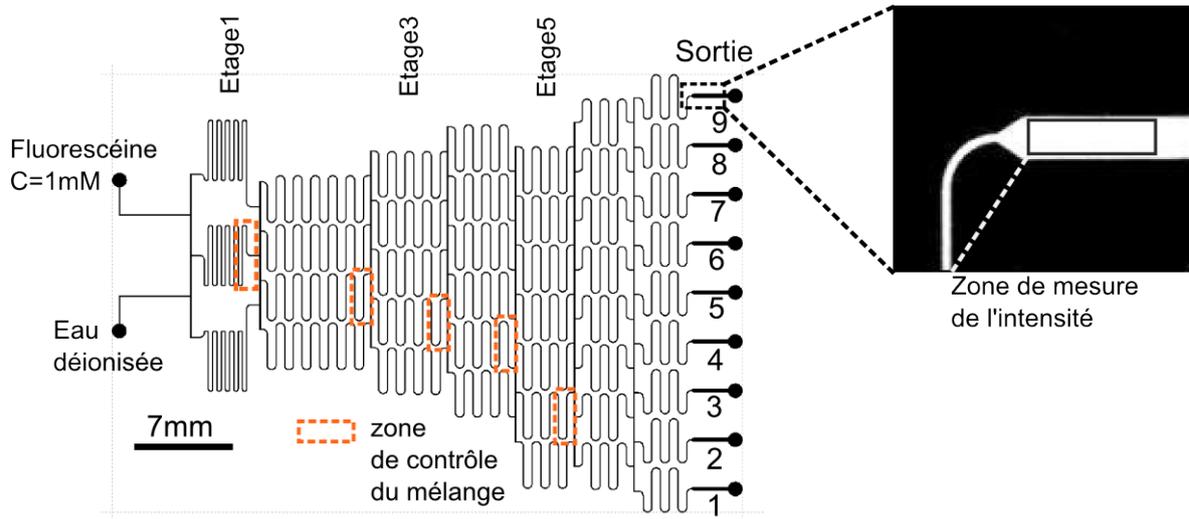


FIGURE 4.11 – Dessin du système présentant les conditions expérimentales des expériences de calibration et les différents points de mesure

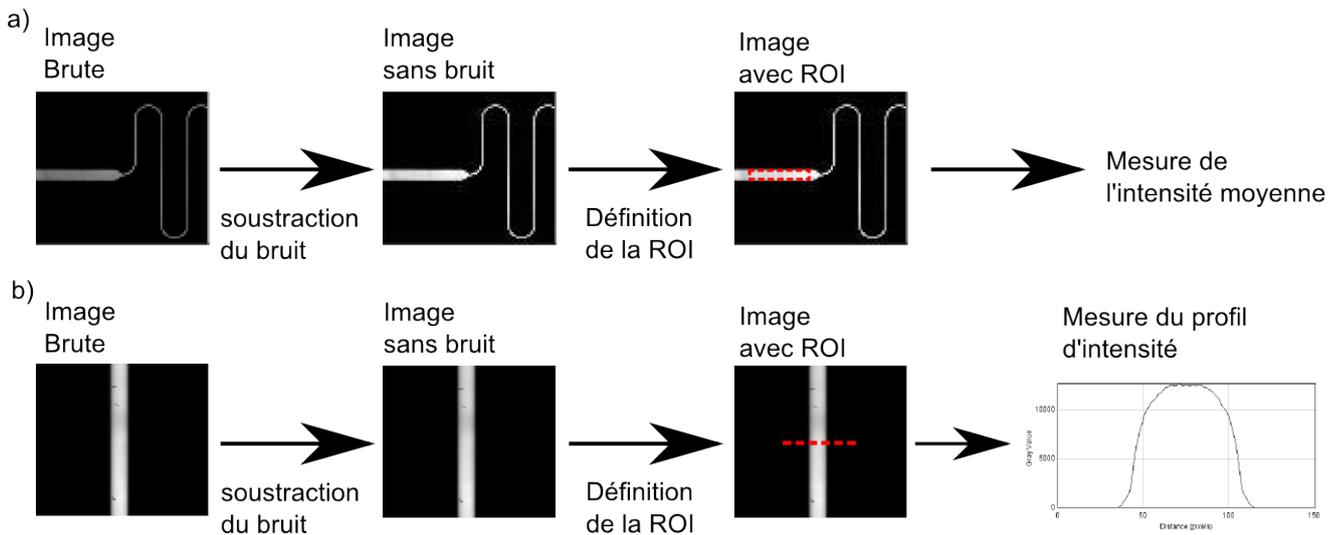


FIGURE 4.12 – a) Traitement de l'image pour la mesure de l'intensité moyenne en sortie du système gradient. b) Traitement de l'image pour extraire le profil d'intensité dans une canalisation

nous obtenons donc la forme du gradient de concentration (figure 4.13). La forme du gradient est globalement linéaire pour toutes les pressions. Nous pouvons tout de même noter que pour des pressions supérieures à 300mbar, nous observons une légère déformation du gradient (forme en S). Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait que lorsque la pression augmente le mélange n'est plus totalement réalisé en sortie de branche ce qui implique que les concentrations obtenues pour les étages suivants sont modifiées. Pour le côté où nous injectons l'eau déionisée cela va se traduire par une diminution de la concentration et du côté fluorescéine une augmentation de la concentration ce qui explique la forme en S. Malgré ces déformations, nous pouvons donc dire que nous avons un système robuste (fonctionnement correct jusqu'à 500mbar) même au delà de son point de fonctionnement normal c'est à dire pour des débits plus grands que ceux pour lesquels ont été dimensionnées les longueurs de mélange.

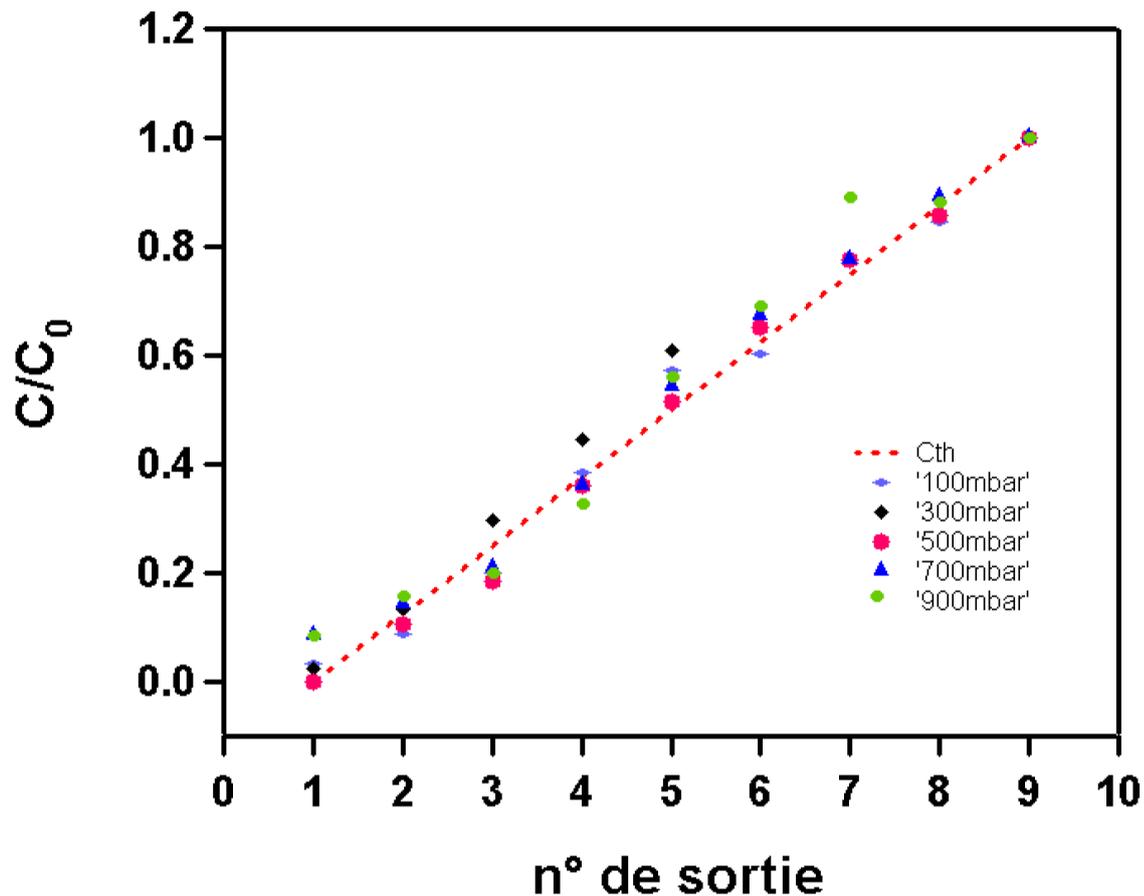


FIGURE 4.13 – Graphique représentant la concentration en fonction du numéro de sortie pour différentes pressions d'entrée

Nous nous intéresserons également à la réalisation du mélange en fonction de la pression. Pour rappel, le mélange des deux fluides se fait en les faisant couler côte à côte le long de la canalisation, pour contrôler l'efficacité du mélange de notre système, nous nous plaçons en différents points (figure 4.14) et nous mesurons l'évolution du profil transverse à la canalisation afin d'avoir des informations sur le degré de mélange.

La qualité du mélange n'est pas suffisante pour une pression supérieure à 700mbar, en effet nous observons que le profil d'intensité en sortie des différents étages n'est plus constant sur la largeur de la canalisation ce qui induit un biais dans la génération du gradient. Cette pression est supérieure à la pression limite de fonctionnement de notre système. Cette caractéristique est plutôt intéressante car cela nous permet de diminuer le temps de résidence dans la puce donc le temps de préparation des échantillons. De plus, la diminution du temps de préparation induit une diminution du risque d'agrégation dans les canalisations car les solutions instables y demeurent

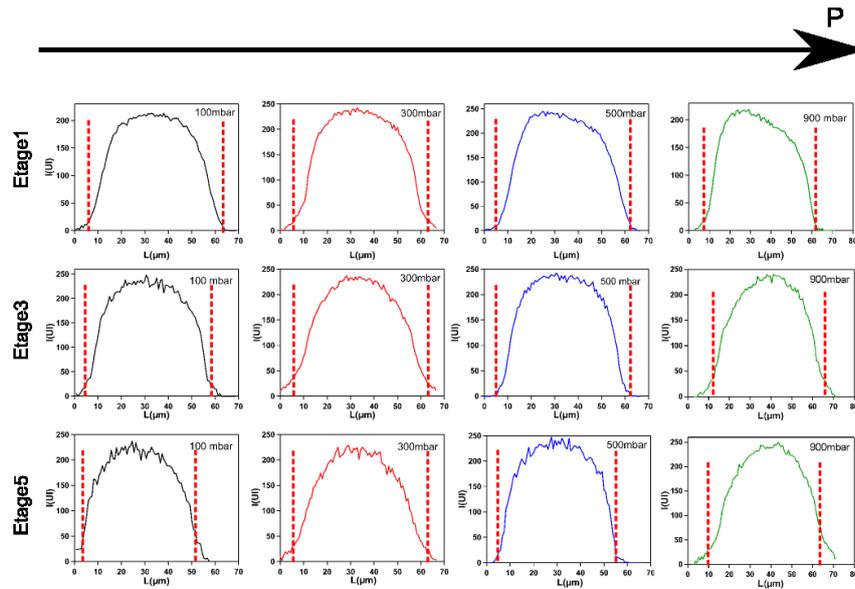


FIGURE 4.14 – Dessin présentant le profil d’intensité en sortie de mélangeur pour les étages 1, 3, 5 (figure 4.11), sur une même ligne la pression augmente (de 100mbar à 900mbar). Les lignes en pointillé rouge représentent les limites des canalisations. Pour les hautes pressions, les profils sont déformés donc le mélange n’est pas total.

moins longtemps.

### Puces microfluidiques à trois entrées

De la même manière que pour les puces à deux entrées, nous faisons varier la pression à l’entrée des puces entre 100mbar et 1bar, le débit total va varier entre  $3.7$  et  $37.7 \mu\text{l}/\text{min}$ . Nous avons fait ensuite le même type de mesure que pour le gradient à deux entrées. Selon les solutions que nous mettons aux entrées nous pouvons obtenir différentes formes de gradients. Dans le cas où nous mettons sur l’entrée centrale la solution de fluorescéine nous obtenons un gradient parabolique. Dans le cas où nous mettons la solution de fluorescéine sur l’une des extrémités, nous obtenons une demi-parabole. Les courbes expérimentales correspondant à ces deux configurations sont présentées sur la figure 4.15. Tout comme pour les puces à deux entrées, nous observons que nos puces sont surdimensionnées.

#### 4.1.2.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons explicité la méthode de conception de nos puces dont la pression maximale de fonctionnement est 300mbar. La caractérisation à l’aide de fluorescéine a permis de montrer que pour des pressions inférieures à 300mbar, les gradients à deux entrées ont bien une forme linéaire. Pour des pressions d’entrée de 300mbar à 500mbar, les gradients sont peu déformés. Au delà, la forme est très déformée et n’est plus exploitable. L’observation de la réalisation des mélanges dans les mêmes conditions confirme celle obtenue avec la forme du gradient.

Nous pouvons donc dire que nous avons des systèmes relativement robustes permettant d’obtenir des gradients de concentration stables dans le temps. Par la suite, nous utiliserons les gradients de forme linéaire pour étudier l’agrégation de l’amyloïde- $\beta$ .

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

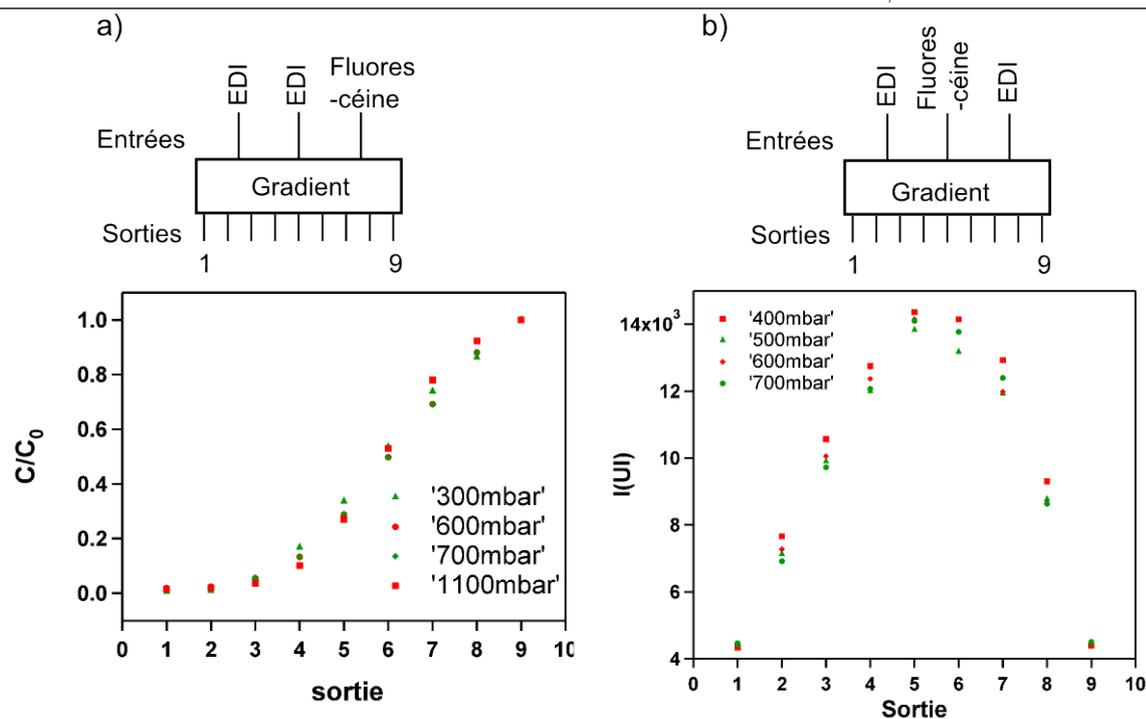


FIGURE 4.15 – Diagramme présentant la configuration d'injection et graphique représentant la concentration en fonction du numéro de sortie pour différentes pressions

### 4.1.3 Expérimentation avec l'amyloïde- $\beta$

Pour nos expériences sur le peptide, nous utiliserons uniquement un gradient linéaire car nous explorerons une plus grande plage de concentrations qu'avec les autres formes et il est plus robuste que ceux obtenus avec les puces à trois entrées. Nous présenterons d'abord le peptide utilisé pour cette étude, ensuite les moyens choisis pour le suivi de l'agrégation, enfin nous exposerons le protocole expérimental et les résultats obtenus.

#### 4.1.3.1 Choix du peptide

Nous avons dans le chapitre 1 vu que l'amyloïde- $\beta$  est produite par l'élimination de l'APP (*Amyloid Precursor Protein*) par des enzymes. Cette décomposition forme des peptides d'amyloïde- $\beta$  de deux tailles différentes : 40 et 42 acides aminés. Pour nos expériences, nous utiliserons l' $A\beta_{40}$  (Amyloïde- $\beta$  à 40 acides aminés) car il est présent en grande quantité chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.

Le peptide se présente sous forme de poudre (forme acide du peptide). Cela permet d'assurer sa stabilité lors de sa mise en solution. Nous préparons d'abord une solution mère en diluant le peptide avec de l'eau, puis nous contrôlons sa concentration en faisant des mesures d'absorbance UV-visible. Nous faisons des aliquotes de la solution mère que nous conservons au congélateur.

#### 4.1.3.2 Moyen de suivi de l'agrégation

Pour suivre l'agrégation du peptide, nous utilisons la microscopie de fluorescence (partie 4.1.2.1). Pour cela, nous nous servons des propriétés d'une molécule fluorescente, la thioflavine T (ThT). Cette molécule se fixe sur les agrégats fibrillaires d'amyloïde- $\beta$ . Cette liaison provoque un changement de sa fluorescence, son spectre est décalé et l'intensité du signal émis augmente

fortement (figure 4.16) [6] [7]. En présence d'agrégats, la longueur d'onde d'excitation est de 450nm tandis que la longueur d'onde d'émission est comprise entre 480 et 490nm. Nous utiliserons un cube de fluorescence adapté.

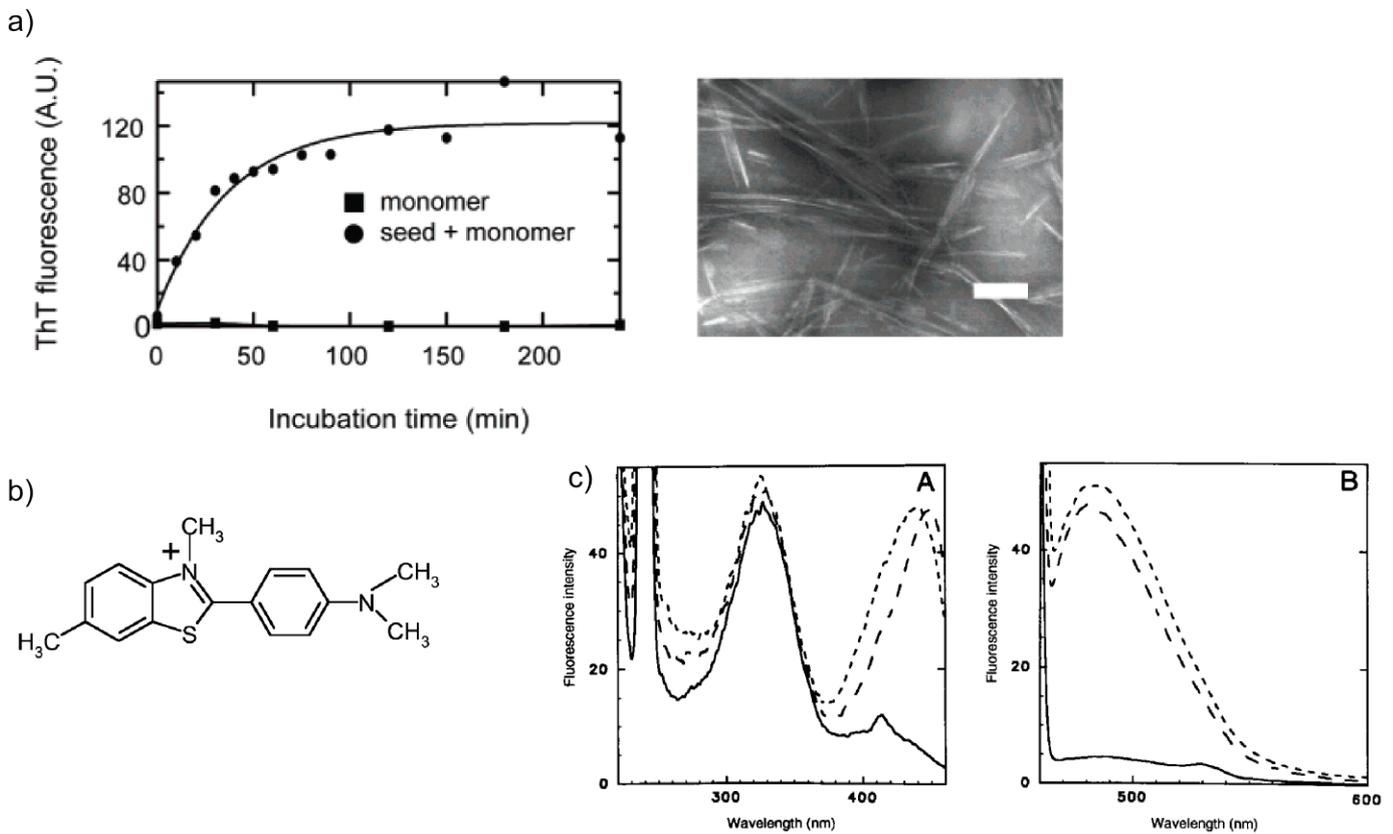


FIGURE 4.16 – a) Graphique présentant l'évolution de l'intensité de ThT durant la formation d'agrégat (rond) et en absence d'agrégation (carré), image au microscope électronique d'agrégat d'amyloïde-β (la barre représente 200nm) [6], b) Structure de la ThT, c) (A) Spectre d'absorbance de la ThT en présence d'agrégat d'amyloïde-β (Aβ40 trait pointillé long; Aβ1-28 (fragment d'Aβ40 comprenant les acides aminés de 1 à 28) : trait pointillé court) et absence d'agrégat (trait continu) (B) Spectre d'émission dans les mêmes conditions [7]

#### 4.1.3.3 Protocole expérimental :

Avant toute expérience avec l'amyloïde-β, nous testons nos puces avec de la fluorescéine afin d'être sûr de la forme de gradient et de vérifier qu'il n'y ait pas de défauts de fabrication. Avant d'injecter le peptide, nous remplissons nos puces avec la solution tampon qui sera utilisée pour l'expérience. Cette étape a pour but d'éviter la présence d'air qui pourrait engendrer une agrégation non souhaitée du peptide. Pour cela, nous mettons nos puces en PDMS sous-vide pendant 20 minutes. Le but de cette étape est de dégazer le PDMS, les bulles d'air qui seront piégées lors du remplissage se résorberont alors plus facilement. Ensuite, nous remplaçons la solution tampon par les solutions utilisées pendant l'expérience (solution d'amyloïde-β, solution tampon à différent pH...). Les peptides sont conservés au congélateur et sortis au dernier au moment afin d'éviter tout risque d'agrégation. Nous les diluons dans du tampon phosphate à 100mM et à pH=7. Enfin, nous observons les niveaux d'intensité des sorties (objectif 20x) afin de connaître le niveau

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

d'agrégation, puis nous regardons à l'aide de grossissement plus important (40x) pour voir quel est la morphologie des agrégats.

### 4.1.3.4 Résultats expérimentaux :

Nous avons injecté à l'intérieur de nos puces par une des entrées une solution d' $A\beta_{40}$  ( $100\mu M$ ) dans du tampon phosphate ( $100mM$ ) à  $pH=7$ , dans la seconde uniquement de la solution tampon phosphate à la même concentration. Dès l'injection, nous observons la formation d'agrégats macroscopiques dans nos canalisations et cela dès l'entrée du système. Ces agrégats ne sont pas purement fibrillaires en raison de leurs formes (figure 4.17) mais ils ne sont pas non plus totalement amorphes sinon nous n'aurions pas de signal en ThT qui est spécifique aux structures fibrillaires. Nous avons fait une autre expérience dans les conditions suivantes : d'un côté de l' $A\beta_{40}$  ( $15\mu M$ ) à  $pH=1.65$  de l'autre de l' $A\beta_{40}$  ( $15\mu M$ ) à  $pH=10.56$ . Nous avons observé le même comportement dans le système. Le but de cette expérience était de réaliser un gradient de  $pH$  en sortie de système est d'observer son influence sur l'agrégation du peptide.

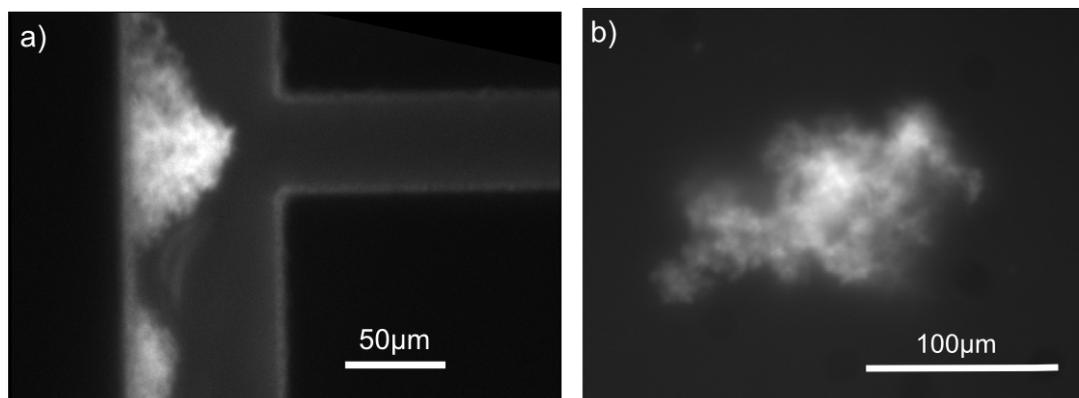


FIGURE 4.17 – a) Image d'agrégats collés sur les murs des canalisations au niveau d'une intersection, b) image d'un agrégat amorphe dans une des sorties du système microfluidique

La présence de ces gros agrégats perturbe le fonctionnement du système. D'une part, ils provoquent le colmatage des canalisations ce qui modifie la répartition des fluides entre les différentes branches. D'autre part, leur présence modifie la viscosité de la solution, ce qui induit le même effet. Si la répartition des fluides n'est plus bonne, alors les concentrations dans chaque branche sont modifiées, nous pouvons donc dire que dans ces conditions nous n'avons plus un gradient linéaire. Nous ne pouvons donc plus garantir dans ces conditions la forme du gradient.

### 4.1.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons vu les méthodes de conception de puces microfluidiques permettant la réalisation de gradient de concentration de diverses formes (linéaire, parabolique...). Ensuite, nous avons explicité les méthodes utilisées pour caractériser nos systèmes. A l'aide de cette caractérisation, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des gradients de concentrations stables, fiables dont la forme des profils est correcte.

Une fois le bon fonctionnement des puces vérifié, nous sommes passés aux expériences sur l'amyloïde- $\beta$ . Nous avons rapidement vu que le peptide que nous avons choisi ( $A\beta_{40}$ ) était difficile à maintenir dans des conditions stables et suivait une voie d'agrégation qui n'est pas purement fibrillaire. De plus dès l'injection dans le système, le peptide s'agrège et se colle aux murs perturbant le bon

fonctionnement des puces. De plus, l'agrégation commence dans le réservoir, donc en sortie de système, le peptide a été la plupart du temps à une concentration  $c_0$  dans des conditions agrégeantes. Dans ces conditions, il est difficile d'obtenir des renseignements précis sur l'agrégation.

Au vue des ces différents éléments, nous avons décidé de changer notre approche. Pour les prochains systèmes, il nous semble pertinent de dissocier la préparation des solutions et le mécanisme d'agrégation. Pour cela, il faut que le peptide puisse déclencher son agrégation en présence d'un élément extérieur (saut de pH, ions métalliques...) et qu'il soit stable et sous forme monomérique dans la solution tampon utilisée. L'A $\beta$ 40 ne répond pas à ces critères nous avons donc été amenés à changer de peptide et à utiliser des peptides modèles qui sont des fragments de l'A $\beta$ 42 pouvant déclencher leur agrégation en présence d'ions métalliques.

## 4.2 Génération de gradient et déclenchement de l'agrégation sur puce

Dans cette partie, nous allons présenter la deuxième génération de puces microfluidiques à gradient que nous avons réalisées. Dans un premier temps, tenant compte des contraintes mises en avant dans la partie précédente, nous expliciterons notre démarche de conception des systèmes. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus lors de la validation de leur fonctionnement à l'aide de molécules fluorescentes. Enfin nous ferons un bilan des expériences menées avec l'amyloïde- $\beta$  : nous avons montré l'existence d'un seuil de concentration critique, en revanche ce dernier n'est pas bien défini en raison de problèmes d'adsorption du peptide sur les parois des canalisations.

### 4.2.1 Conception et réalisation des puces

#### 4.2.1.1 Définition du problème

Dans la partie précédente, à travers les différentes expériences avec l'amyloïde- $\beta$ , nous avons mis en lumière qu'il était impératif pour obtenir des résultats exploitables de dissocier la phase de préparation des échantillons et la phase d'agrégation. Pour cela, nous souhaitons réaliser un système microfluidique en deux parties, l'une créant un gradient de concentration en peptide, lors de cette étape de préparation les protéines sont maintenues dans des conditions stables c'est à dire que l'agrégation n'est pas possible. L'autre partie se trouve en aval du gradient et permet le déclenchement de l'agrégation par l'apport d'une solution (figure 4.18). Ces deux parties sont suivies d'une zone d'observation permettant de caractériser l'agrégation.

Pour préparer les solutions, nous utiliserons un système permettant de réaliser un gradient de concentration basé sur la même architecture que celui présenté dans la partie précédente. Le système déclencheur amènera la même quantité de solution sur toute les sorties du gradient. Le système final devra réaliser un gradient de concentration linéaire échantillonné sur 5 sorties, nous avons limité le nombre de sorties car l'ajout du déclencheur complexifie le système. Afin de limiter la consommation en peptide, nous limitons le débit maximal dans les branches de sortie de la partie gradient à  $3\mu\text{L}/\text{min}$  soit un débit total de  $15\mu\text{L}/\text{min}$ . De même nous limiterons le débit dans une branche du système déclencheur à  $3\mu\text{L}/\text{min}$  soit un débit total de  $15\mu\text{L}/\text{min}$ . Le débit maximal dans une branche d'observation sera alors de  $6\mu\text{L}/\text{min}$ , la connaissance de cette grandeur permet de dimensionner le mélangeur entre les solutions venant du gradient et du déclencheur. Le débit total maximal du système sera alors de  $30\mu\text{L}/\text{min}$ . Le contrôle de l'injection se fait à l'aide d'un générateur de pression limité à 1bar, nous prendrons soin de vérifier que le débit maximal des puces puisse être atteint. L'architecture des puces devra être sur un seul niveau de canalisation afin de simplifier leur fabrication. De plus, nous fixons la section des canalisations à  $50 \times 50\mu\text{m}^2$  pour

**CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$**

les parties gradient et répartiteur. En revanche pour la zone d'observation, la partie mélange entre les solutions du gradient et du répartiteur a la même section tandis que pour la zone d'observation elle sera de  $200 \times 50 \mu m^2$ .

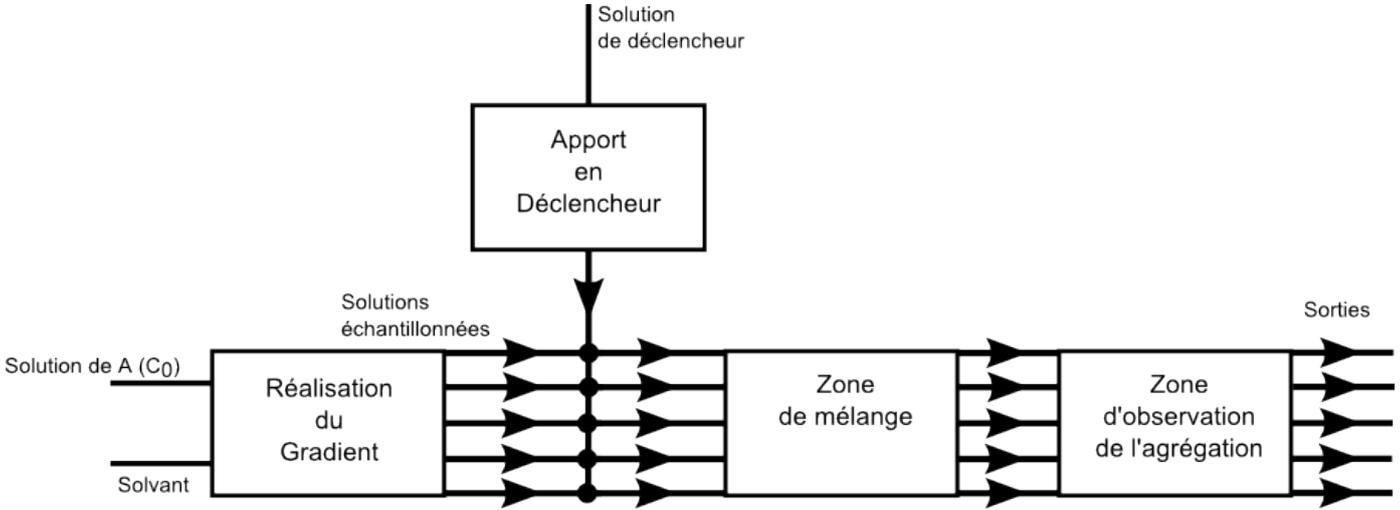


FIGURE 4.18 – Schéma présentant le fonctionnement du système

**4.2.1.2 Dimensionnement du système**

Dans cette partie, nous développerons tout d'abord le dimensionnement de la partie gradient (longueur de mélange des différents étages...), ensuite nous mettrons en avant les relations existantes entre les résistances hydrodynamiques du gradient et du déclencheur pour satisfaire aux contraintes de notre problème, enfin nous expliquerons le choix de l'architecture du système.

**Dimensionnement de la partie gradient :** Comme nous l'avons vu pour les systèmes à gradient simple, la réalisation d'un gradient de concentration linéaire peut se faire avec la même résistance hydrodynamique pour toutes les branches d'un même étage. Cette résistance est fixée par la longueur de mélange ( $L_m = w^2v/D$  où  $w$  est la largeur de la canalisation,  $v$  la vitesse moyenne). A partir du débit maximal d'entrée de la partie gradient ( $15 \mu L/min$ ), nous pouvons déterminer la vitesse maximale dans chaque étage du gradient. En utilisant pour valeur du coefficient de diffusion  $5 \times 10^{-10} m^2/s$  (correspondant à la fluorescéine), nous pouvons déterminer les longueurs de mélange critiques de chaque branche dont les valeurs sont résumées dans la table 4.3. Nous choisirons ces valeurs pour le dessin de la partie gradient, nous lui ajouterons une résistance hydrodynamique plus importante que pour la première génération au niveau des entrées afin d'éviter tout échange de fluides entre les deux réservoirs d'entrée. Nous prendrons une longueur de 20mm au lieu de 7mm.

n	3	4	5
Débit max par branche ( $\mu l/min$ )	5	3.75	3
$L_m$ (mm)	51.2	46.7	28.3
$R_h (\times 10^{14} SI)$	3.05	2.28	1.82

TABLE 4.3 – Récapitulatif des débits maximaux, des longueurs de mélange, et des résistances hydrodynamiques pour chaque étage

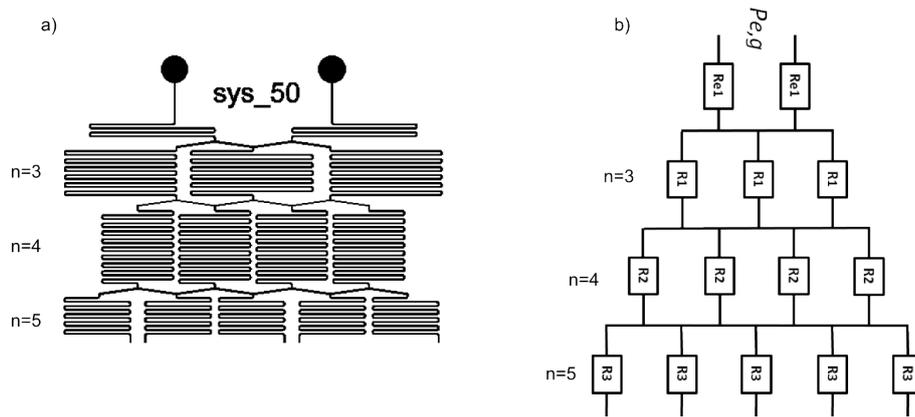


FIGURE 4.19 – a) Dessin de la partie gradient b) Schéma électrique correspondant à la partie gradient

**Dimensionnement de la zone d'observation :** Elle est composée de deux parties, l'une servant à faire le mélange entre les solutions venant de la partie gradient et de la partie déclencheur et l'autre permettant l'observation du gradient. Dans les contraintes que nous nous sommes fixées précédemment l'apport maximal de la partie gradient et de la partie déclencheur est de  $3\mu\text{L}/\text{min}$  soit un débit maximal de  $6\mu\text{L}/\text{min}$ . Connaissant la section du canal  $50 \times 50\mu\text{m}^2$ , nous obtenons la valeur de la vitesse maximale. Avec ces données, nous pouvons connaître la longueur de mélange, dans ce cas elle est de 46mm. La zone d'observation est reliée à cette canalisation, elle a une longueur de 3mm pour une section de  $200 \times 50\mu\text{m}^2$ . En sortie de cette zone une canalisation de 7.9mm permet de relier la zone d'observation à la sortie, sa largeur pouvant être soit de 50 soit de  $100\mu\text{m}$ . La sortie est excentrée par rapport à la zone d'observation afin d'éviter les artefacts de mesure pouvant être induits par la fluorescence du trou de sortie (tube téflon, visualisation du support, accumulation de composés...). L'ensemble constitué de la partie mélangeur et de la zone d'observation est identique pour l'ensemble des 5 sorties.

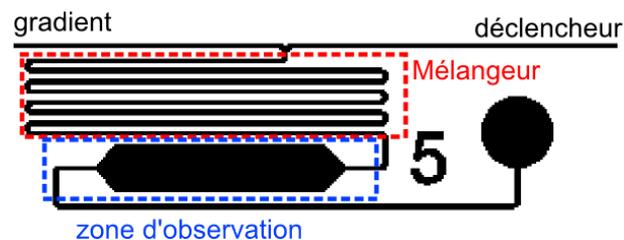


FIGURE 4.20 – a) Dessin de la zone d'observation composé d'une partie mélangeur (cadre en rouge) et d'un réservoir permettant l'observation (cadre en bleu)

**Dimensionnement de la partie déclencheur :** Maintenant que nous avons défini les résistances hydrodynamiques de la partie gradient et de la zone d'observation, nous allons définir les dimensions des canalisations de la partie déclencheur. Pour cela nous devons déterminer les différentes résistances hydrodynamiques. Nous dessinons donc le schéma électrique équivalent du système complet (figure 4.21). En observant le schéma électrique du système, nous pouvons dire que le débit pour chaque sortie est le même car la différence de pression entre l'entrée de la zone d'observation et les entrées est la même quelque soit la sortie, cela implique aussi que les apports

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

de la partie gradient et du déclencheur sont les mêmes pour chaque sortie. A partir de cette donnée, nous pouvons définir le ratio  $\alpha_i$ , qui est le rapport des débits entre le débit venant du gradient et le débit total pour une sortie telle que  $\alpha = Q_{g,i}/Q_{s,i}$  avec  $Q_{s,i} = Q_{g,i} + Q_{d,i}$ . Or, pour chaque sortie, les débits venant du gradient et du déclencheur sont les mêmes. Nous pouvons donc en déduire que tous les  $\alpha_i$  sont égaux, nous les noterons alors  $\alpha$  afin de simplifier les notations. Pour la partie gradient, nous écrivons les relations entre la différence de pression, le débit et les résistances hydrodynamiques pour chaque étage, nous en déduisons le débit venant de la partie du gradient. Nous faisons de même pour la partie déclencheur. En combinant ces deux expressions, nous obtenons les relations suivantes :

$$\begin{cases} P_{e,g} = Q_s \left( 5\alpha \left( \frac{R_{e1}}{2} + \frac{R_1}{3} + \frac{R_2}{4} + \frac{R_3}{5} \right) + R_4 \right) \\ P_{e,d} = Q_s ((5R_{e2} + R_5)(1 - \alpha) + R_4) \end{cases} \text{ où } Q_s \text{ est le débit de sortie du système} \quad (4.5)$$

Afin de simplifier les expériences, nous souhaitons que pour  $\alpha = 0,5$ , les pressions d'entrée du gradient et du déclencheur soient égales, cela nous permet d'avoir un débit identique venant de la partie déclencheur et de la partie gradient, ce qui implique un mélange contenant 50% de la solution de gradient et 50% de la solution déclencheur. Cela nous donne la relation suivante entre les résistances hydrodynamiques du gradient et du déclencheur :

$$\left( \frac{R_{e1}}{2} + \frac{R_1}{3} + \frac{R_2}{4} + \frac{R_3}{5} \right) = (5R_{e2} + R_5) \quad (4.6)$$

Précédemment, nous avons vu que les résistances hydrodynamiques de la partie gradient et de la zone d'observation sont fixées par les longueurs de mélange. Ces valeurs ont été fixées (donc  $R_{e1}$ ,  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$ ) dans les parties précédentes. Donc pour atteindre le point de fonctionnement désiré ( $\alpha = 0.5$  pour  $P_{e,g} = P_{e,d}$ ), les résistances hydrodynamiques du déclencheur doivent vérifier l'équation 4.6. Afin de simplifier le dessin de la puce, nous faisons le choix que la longueur correspondant à  $R_5$  soit de 15mm. Pour que l'équation 4.6 soit vérifiée, la longueur de canalisation pour la résistance hydrodynamique  $R_{e2}$  est obligatoirement de 41.4mm. Nous définissons alors  $A$  tel que :

$$A = \left( \frac{R_{e1}}{2} + \frac{R_1}{3} + \frac{R_2}{4} + \frac{R_3}{5} \right) = (5R_{e2} + R_5) \quad (4.7)$$

**Plage de fonctionnement du système :** Nous connaissons maintenant la valeur des différentes résistances hydrodynamiques composant le système, nous pouvons donc calculer le débit de sortie en fonction des pressions d'entrées (équation 4.8), et aussi le rapport des pressions d'entrées en fonction de  $\alpha$  (équation 4.9).

$$Q_s = \frac{P_{e,g} + P_{e,d}}{A + 2R_4} \quad (4.8)$$

$$\frac{P_{e,g}}{P_{e,d}} = \frac{A\alpha + R_4}{A(1 - \alpha) + R_4} \quad (4.9)$$

En faisant varier le rapport des pressions d'entrées, nous faisons varier la valeur de  $\alpha$ , donc pour différents rapports de pressions d'entrées nous avons différentes valeurs de concentrations pour les différentes sorties. Ainsi à l'aide de ce système, nous pouvons cribler un plus grand nombre de conditions en ajustant les pressions d'entrées. A titre d'exemple pour 2 valeurs de  $\alpha$ , nous avons 9 conditions différentes pour le gradient, pour 3, nous en avons 13 et ainsi de suite.

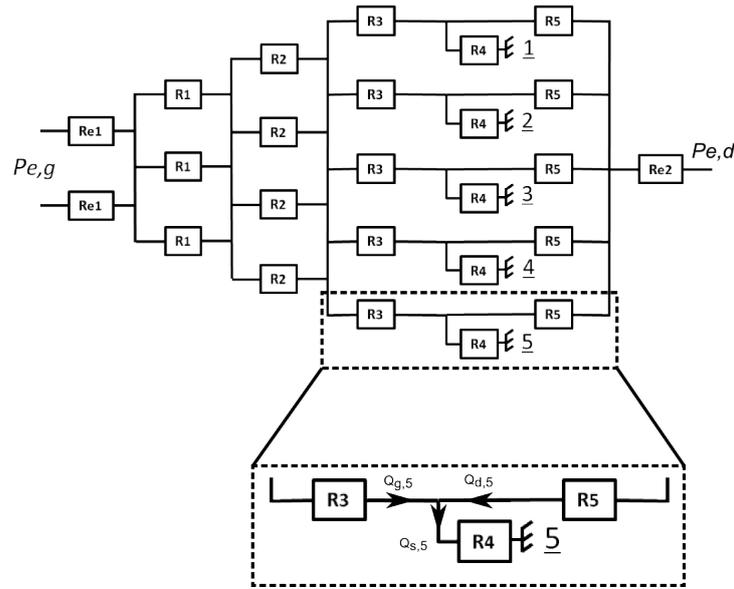


FIGURE 4.21 – schéma électrique du système

Par exemple, pour une solution de A de concentration  $C_0$  à une des entrée du gradient, avec  $\alpha = 0.5$ , nous allons échantillonner le gradient de sortie entre 0 et  $C_0/2$  par pas de  $C_0/8$  tandis que pour  $\alpha = 0.2$ , l'échantillonnage se fait entre 0 et  $C_0/5$  par pas de  $C_0/20$ . Nous obtenons donc avec deux valeurs de  $\alpha$ , neuf conditions de concentration ce qui fait de cette puce, un puissant outil pour réaliser rapidement du criblage simplement en faisant varier les pressions d'entrées (figure 4.22). Afin de simplifier l'utilisation du système nous calculons à l'aide d'un tableau, pour un grand nombre de couples de pressions d'entrées, les valeurs de  $Q_s$  et de  $\alpha$  que nous présentons dans un tableau (table 4.4). Les valeurs de  $Q_s$  supérieures à  $30\mu L/min$  sont au delà de la plage de fonctionnement du système car au delà de ce débit les mélanges dans la partie gradient et dans la zone d'observation ne sont plus assurés. Dans le tableau, ces conditions sont surlignées alors en rouge. Ainsi nous visualisons facilement quelles sont les pressions que nous pouvons utiliser. Dans la table 4.4, nous voyons clairement que les pressions limites de fonctionnement sont bien en dessous de la pression maximale du générateur de pression. Par exemple, pour  $\alpha = 0.5$ , la limite de pression est de 700mbar.

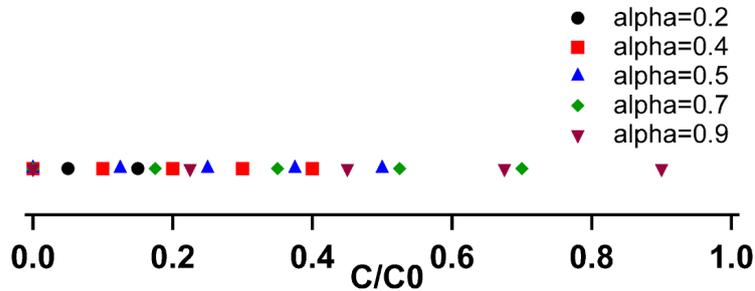


FIGURE 4.22 – Schéma représentant les concentrations obtenues en sortie du gradient en fonction du ratio ( $\alpha$ )

# CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

Pe,g(mbar)	100		200		300		400		500		600		700		800		900		1000	
Pe,d(mbar)	$\alpha$	Qs,i																		
100	0,50	0,84	0,74	1,26	0,85	1,68	0,92	2,10	0,97	2,52	1,01	2,94	1,03	3,36	1,05	3,78	1,07	4,20	1,08	4,62
200	0,26	1,26	0,50	1,68	0,64	2,10	0,74	2,52	0,80	2,94	0,85	3,36	0,89	3,78	0,92	4,20	0,95	4,62	0,97	5,04
300	0,15	1,68	0,36	2,10	0,50	2,52	0,60	2,94	0,68	3,36	0,74	3,78	0,78	4,20	0,82	4,62	0,85	5,04	0,88	5,46
400	0,08	2,10	0,26	2,52	0,40	2,94	0,50	3,36	0,58	3,78	0,64	4,20	0,69	4,62	0,74	5,04	0,77	5,46	0,80	5,88
500	0,03	2,52	0,20	2,94	0,32	3,36	0,42	3,78	0,50	4,20	0,56	4,62	0,62	5,04	0,66	5,46	0,70	5,88	0,74	6,30
600	-0,01	2,94	0,15	3,36	0,26	3,78	0,36	4,20	0,44	4,62	0,50	5,04	0,55	5,46	0,60	5,88	0,64	6,30	0,68	6,72
700	-0,03	3,36	0,11	3,78	0,22	4,20	0,31	4,62	0,38	5,04	0,45	5,46	0,50	5,88	0,55	6,30	0,59	6,72	0,62	7,14
800	-0,05	3,78	0,08	4,20	0,18	4,62	0,26	5,04	0,34	5,46	0,40	5,88	0,45	6,30	0,50	6,72	0,54	7,14	0,58	7,56
900	-0,07	4,20	0,05	4,62	0,15	5,04	0,23	5,46	0,30	5,88	0,36	6,30	0,41	6,72	0,46	7,14	0,50	7,56	0,54	7,98
1000	-0,08	4,62	0,03	5,04	0,12	5,46	0,20	5,88	0,26	6,30	0,32	6,72	0,38	7,14	0,42	7,56	0,46	7,98	0,50	8,40

TABLE 4.4 – Tableau récapitulant les valeurs de  $\alpha$  et  $Q_s$  pour différents couples de pressions

**Dessin des puces :** Nous connaissons les différentes longueurs des résistances hydrodynamiques composant notre système, nous pouvons maintenant dessiner nos puces à l'aide du logiciel Cléwin. Le principal changement par rapport aux puces de première génération est l'ajout de la partie déclencheur permettant de séparer la partie préparation des échantillons et le déclenchement de l'agrégation. Nous avons aussi fait évoluer les jonctions entre les branches d'un même étage. En effet, sur nos dernières puces elles étaient plates, nous avons remarqué que le peptide avait tendance à s'accumuler à cet endroit, pour éviter cet inconvénient nous avons mis un angle de  $120^\circ$  (figure 4.23). Par rapport à l'ancienne génération, nous avons réussi à diminuer la taille des serpentins permettant le mélange en resserrant les virages. Cette modification nous a permis de diminuer l'encombrement des puces et de pouvoir ainsi travailler sur des lamelles de verre de  $50 \times 26mm^2$  d'épaisseur  $170\mu m$ .

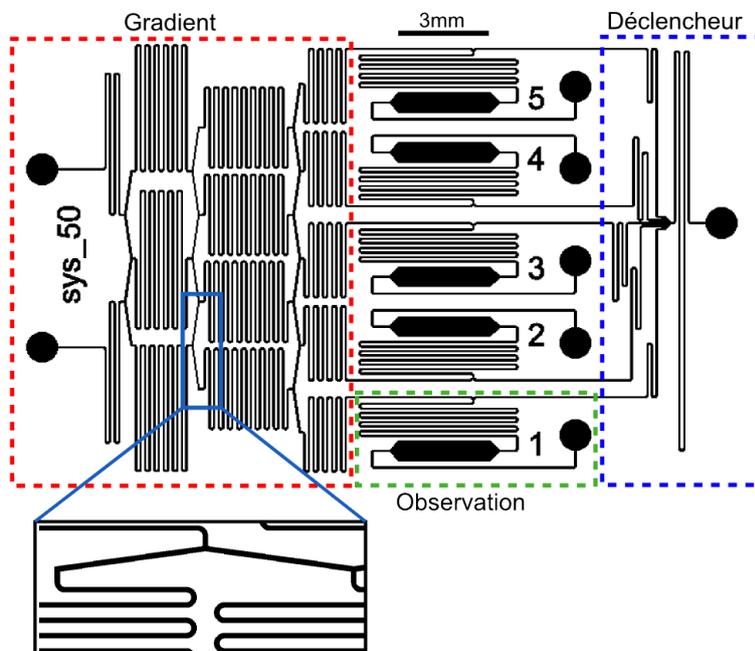


FIGURE 4.23 – Dessin de la puce microfluidique, la partie gradient est encadrée en pointillé rouge, le déclencheur en bleu et la zone d'observation en vert

## 4.2.2 Validation du fonctionnement de nos puces

Le but de cette partie est de montrer le bon fonctionnement de nos puces microfluidiques (réalisation de gradient linéaire avec déclenchement : dilution par une autre solution). Pour cela nous allons les tester sur le même banc de microscopie que dans la partie précédente avec le même fluorophore (fluorescéine). Nous présenterons le protocole expérimental utilisé, puis les résultats obtenus.

### 4.2.2.1 Protocole expérimental

**Réalisation des puces :** Les puces microfluidiques ont été réalisées en PDMS en suivant le protocole décrit dans la partie 3.2 (Fabrication des puces en PDMS). Ces systèmes ont été scellés par activation plasma sur des lames de verre de taille  $50 \times 26 \text{ mm}^2$  et d'épaisseur  $0.17 \text{ mm}$ . L'injection des fluides se fait à l'aide de réservoirs intégrés sur la puce (partie 3.3). Les sorties sont connectées à l'extérieur à l'aide de tubes de téflon de dimensions :  $\varnothing_{ext} = 1.63 \text{ mm}$   $\varnothing_{int} = 0.8 \text{ mm}$ . Nous avons décidé de réaliser nos premières puces en PDMS afin de pouvoir tester rapidement le fonctionnement de nos systèmes et aussi en raison de son faible coût. Nous verrons par la suite que nous avons été amenés à passer à une technologie verre-silicium (partie 3.1). Avec ces puces, il nous était impossible d'utiliser les mêmes réservoirs qu'avec les puces en PDMS, nous avons donc conçu un support permettant l'intégration des réservoirs sur la puce en silicium et ne nécessitant pas de long temps de préparation (partie 3.3 et figure 4.24).

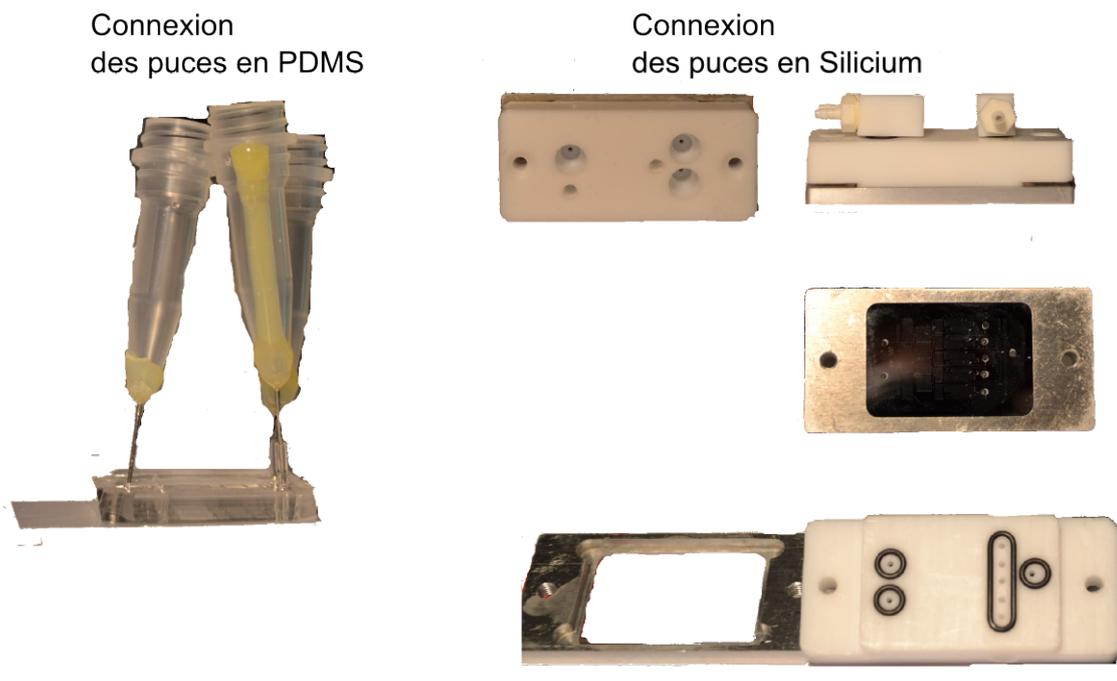


FIGURE 4.24 – Connexion des puces microfluidiques à gauche pour les puces en PDMS, à droite celles en silicium

**Protocole expérimental :** Afin de tester nos puces, nous injectons à l'une des entrées du gradient une solution de fluorescéine à  $1 \text{ mM}$  et dans l'autre entrée du gradient et celle du déclencheur de l'eau dé-ionisée. Nous observons ensuite pour différents couples de pressions d'entrée (pression à l'entrée du gradient et du déclencheur) si la forme du gradient est bien respectée ainsi que le ratio

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

$\alpha$  correspondant au rapport des débits venant de la partie gradient et de la partie déclencheur. Nous noterons les couples de pressions de la manière suivante :  $(P_{e,g}, P_{e,d})$  pour respectivement la pression d'entrée du gradient et la pression d'entrée du déclencheur. Pour connaître les différentes concentrations de sortie, nous mesurons l'intensité moyenne de fluorescence dans la zone d'observation puis nous traçons la courbe d'intensité en fonction du numéro de sortie. Nous obtenons ainsi la forme du gradient de concentration car dans ces conditions nous avons montré précédemment que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration.

Afin de mesurer le ratio  $\alpha$ , nous relevons le profil d'intensité au niveau de la jonction entre la partie gradient et répartiteur, puis nous en déduisons le rapport des largeurs entre la partie fluorescente et celle non fluorescente (figure 4.25). Ce rapport a la même valeur que  $\alpha$  car les fluides venant du gradient et du déclencheur ont la même viscosité et coulent donc à la même vitesse lors d'un co-écoulement. Cette mesure est doublée par une autre méthode plus précise. Tout d'abord, nous remplissons l'ensemble de notre puce avec une solution de fluorescéine à 1mM, nous mesurons ensuite l'intensité de fluorescence de toutes les sorties, ce qui nous donne la valeur de l'intensité  $I_0$  correspondant à la concentration de 1mM en fluorescéine. Ensuite, nous rinçons notre puce et injectons la même solution de fluorescéine dans la partie gradient. Puis nous mesurons alors l'intensité ( $I_i$  où  $i$  est le numéro de la zone d'observation) dans l'ensemble des zones d'observation. Le rapport  $\frac{I_i}{I_0}$  correspond à la valeur de  $\alpha$ . Cette même opération peut être aussi réalisée lors de la réalisation d'un gradient de concentration, le ratio  $\alpha$  sera alors le rapport de l'intensité de la sortie 5 avec  $I_0$ .

Pour ces puces, nous ne testerons pas la qualité du mélange pour chaque étage du gradient car nous avons montré dans la partie précédente que nos mélangeurs permettaient un fonctionnement correct au delà des pressions d'entrée limites. Afin d'éviter tout problème lors de nos expérimentations, nous nous placerons dans des cas où les pressions d'entrée sont inférieures aux pressions limites. Ces pressions sont atteintes dans deux conditions : soit lorsque le débit de sortie de la partie gradient dépassent  $3\mu$  L/min (débit limite de fonctionnement des mélangeurs du gradient), soit lorsque le débit dans une sortie de la zone d'observation est supérieur à  $6\mu$ L/min (débit limite de fonctionnement du mélangeur de la zone d'observation)(cellule en rouge dans le tableau 4.4). Pour le remplissage des puces en PDMS, nous suivons exactement le même protocole que pour les puces à gradient simple, c'est à dire une mise sous vide pendant 20 minutes puis injections des fluides. Cette étape a pour but d'éviter les bulles d'air dans le système qui peuvent perturber son fonctionnement.

### 4.2.2.2 Résultats expérimentaux

Tout les résultats que nous présentons ont été obtenus avec des puces en PDMS connectées comme présenté sur la figure 4.24. La caractérisation des puces est faite en deux étapes : la première a consisté à tester rapidement le gradient de concentration et les ratios (mesure par rapport des largeurs) afin de valider le principe de fonctionnement, car nous voulions rapidement le tester avec des peptides dans le but de montrer que nous n'avions pas d'agrégation dans les puces. Dans un second temps une fois cette étape validée, nous nous sommes attachés à connaître plus précisément les limites du système et la précision des ratios réalisés (mesure par rapport d'intensité). Nous présenterons tout d'abord les résultats de la caractérisation du gradient avec la fluorescéine, puis les résultats obtenus avec l' $A\beta$ 40.

**Caractérisation rapide :** Nous choisissons tout d'abord de tester la linéarité du gradient et la valeur de trois ratios ( $\alpha=0,3 ; 0,5 ; 0,7$ ). Pour cela nous fixons  $P_{e,g}$  à 300mbar et nous faisons varier  $P_{e,d}$  afin d'atteindre le bon ratio (530 mBar pour 0,3 ; 300mbar pour 0,5 et 165 mbar pour 0,7

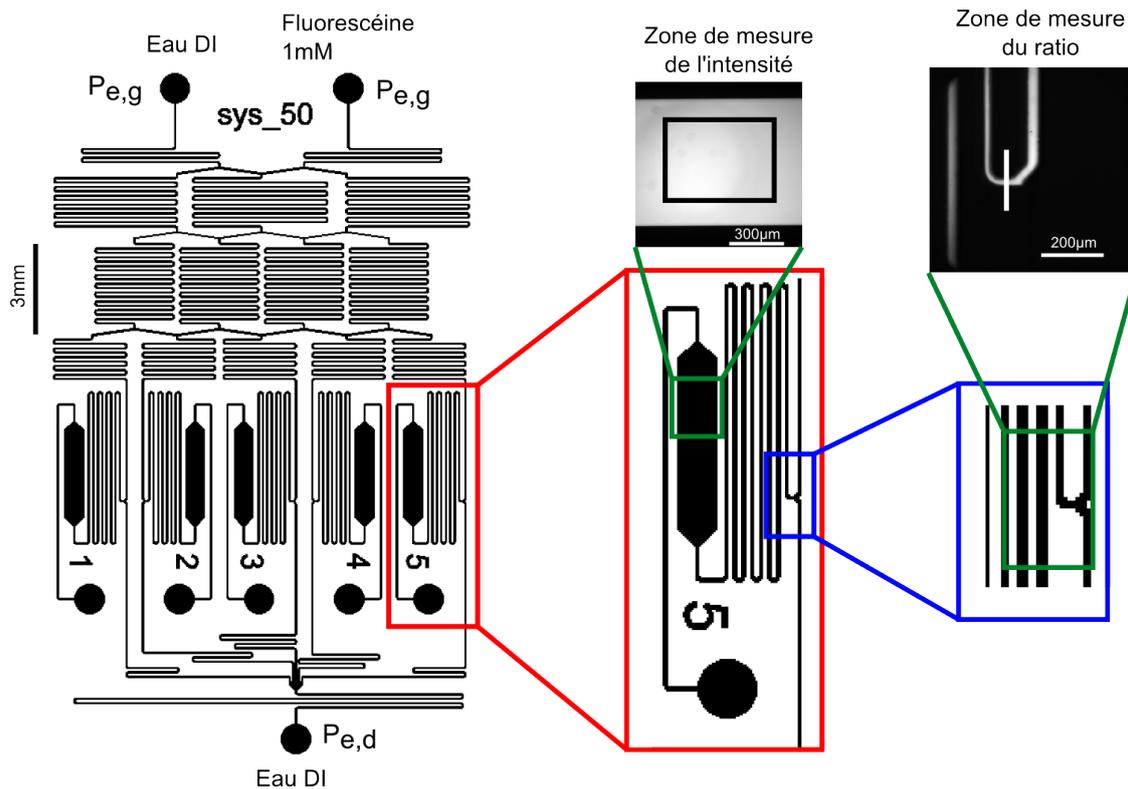


FIGURE 4.25 – Schéma présentant le protocole expérimental. Le dessin de gauche représente la puce complète avec la configuration expérimentale utilisée (solutions utilisées pour les différentes entrées). Les deux dessins de droite précisent les zones où sont réalisées les mesures du ratio et de l'intensité de fluorescence.

d'après les calculs). En mesurant les intensités de sorties, nous obtenons les 3 courbes de la figure 4.26. Nous observons que pour les trois valeurs de  $\alpha$ , les courbes sont légèrement déformées, cela est dû à des défauts des canalisations qui provoquent un changement de la répartition du débit dans le système, mais ces défauts altèrent peu le fonctionnement du gradient puisque la forme obtenue est très proche d'une droite. L'origine de ces défauts est l'utilisation d'un masque souple dont les dimensions sont moins bien contrôlées qu'avec un masque en chrome (moins bonne résolution).

Nous faisons aussi la mesure du ratio, en mesurant les rapports des largeurs au niveau des jonctions. Nous obtenons les résultats présentés sur la figure 4.27. Nous observons que les différents ratios mesurés sont proches de la valeur souhaitée. Ces résultats préliminaires confirment le bon fonctionnement de notre système, mais la méthode de mesure du ratio est peu précise (difficulté à déterminer précisément les largeurs), c'est pour cette raison que par la suite nous travaillerons en calculant des rapports d'intensité. Ces résultats ont montré le bon fonctionnement de notre système, mais quelques points restent à améliorer afin de supprimer les défauts dans la canalisation et par la même les différents dysfonctionnements du gradient. Pour cela, nous réaliserons les moules en SU8 à l'aide d'un masque en chrome, nous verrons lors de la caractérisation plus poussée que ce changement permet de supprimer tout les défauts de la réalisation du gradient. Nous utiliserons tout de même ces puces pour valider le fonctionnement de notre système avec l' $A\beta_{40}$ .

**Deuxième Caractérisation :** Cette partie a pour but de traiter plus en détails les limites de fonctionnement de notre système. Pour cela nous nous placerons à débit de sortie constant et nous

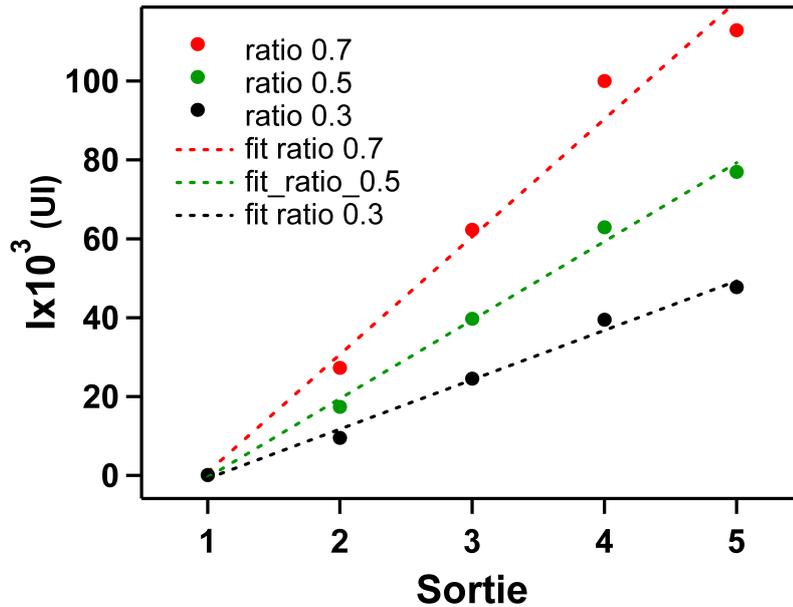


FIGURE 4.26 – Graphique représentant les intensités de fluorescence en fonction du numéro de sortie pour trois valeurs de  $\alpha$  (0.3,0.5 et 0.7)

ferons varier le ratio  $\alpha$ , en maintenant la pression  $P_{e,g}$  constante, nous changeons donc la pression d'entrée du déclencheur  $P_{e,d}$ . Nous choisissons un débit de sortie  $Q_{s,i}$  égal à  $2.5\mu\text{L}/\text{min}$ .

Dans un premier temps, nous mettrons aux entrées du gradient une solution de fluorescéine à 1mM et à celle du déclencheur de l'eau dé-ionisée. Nous mesurons d'abord l'intensité de la fluorescéine pure dans les réservoirs de sortie (c'est à dire en faisant couler uniquement de la fluorescéine dans la canalisation), cette mesure est notre référence pour connaître les ratios que nous mesurerons par la suite. Puis en faisant varier les pressions nous explorons une plage de ratio  $\alpha$  comprise entre 0.2 et 0.9 (par pas de 0.1). Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 4.28. Nous observons que pour l'ensemble des valeurs de  $\alpha$ , les ratios expérimentaux correspondent bien à ceux souhaités ( $\pm 2\%$ ).

Dans un deuxième temps, nous avons testé la linéarité des gradients de concentration. Avant de réaliser les mesures d'intensité, nous étalonnons de la même manière que précédemment notre système (mesure de l'intensité pour de la fluorescéine à 1mM). Puis nous injectons dans l'une des entrées du gradient une solution de fluorescéine à 1mM et dans les deux autres entrées de l'eau dé-ionisée (figure 4.29). Ensuite pour chaque ratio  $\alpha$  (compris entre 0.1 à 0.9), nous mesurons l'intensité lumineuse de chaque sortie et nous traçons les courbes de concentration pour chaque sortie. Nous observons que pour des ratios compris entre 0.1 et 0.9, l'intensité en fonction des sorties est bien linéaire. De plus quand nous calculons le rapport entre l'intensité de la sortie 5 ( $C = \alpha C_0$ ) et l'intensité de référence, nous observons que les ratios expérimentaux correspondent bien aux ratios théoriques (erreur de l'ordre de  $\pm 2\%$ ). Les résultats sont résumés sur la figure 4.29).

**Validation du fonctionnement avec l'amyloïde- $\beta$**  Pour le test avec l'amyloïde- $\beta$ , nous avons utilisé comme dans la partie précédente de l'A $\beta$ 40, nous avons choisi ce peptide car il est très sensible aux conditions expérimentales et s'agrège très facilement. Or le but de cette expérience est de montrer que l'agrégation n'a pas lieu dans la partie gradient mais dans la zone d'observation

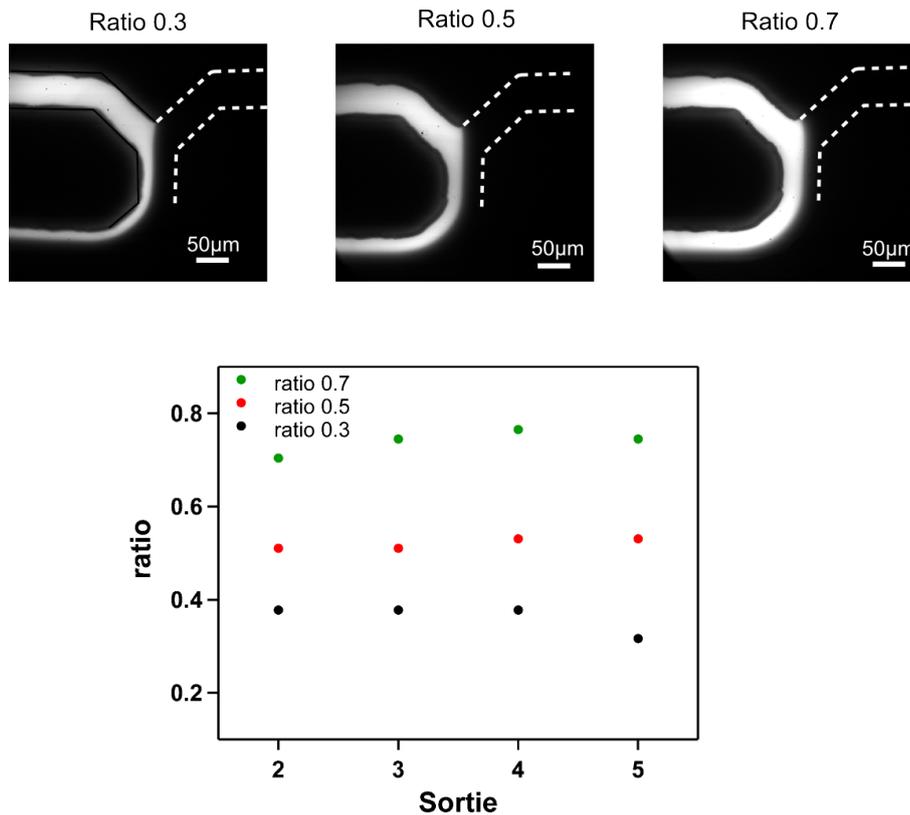


FIGURE 4.27 – En haut, images représentant l'intersection entre la partie gradient et déclencheur pour trois valeur du ratio  $\alpha$ , ces images servent à déterminer expérimentalement  $\alpha$ . En bas, graphique représentant l'évolution du ratio  $\alpha$  en fonction du numéro de sortie

et de valider cette nouvelle approche. Pour cela, nous nous sommes placés dans les conditions décrites sur la figure 4.30, la concentration en peptide est fixé à  $100\mu\text{M}$ . Le couple de pressions d'entrées choisies est ( $300\text{mbar}$  ;  $300\text{mbar}$ ), nous réalisons donc un gradient de concentration en  $A\beta 40$  échantillonné de 0 à  $50\mu\text{M}$ . Le déclenchement de l'agrégation se fait par le pH, en effet à pH basique le peptide est stable, lorsque nous passons à un pH d'environ 6 l'agrégation se déclenche. La solution d'entrée du déclencheur est choisie pour avoir dans la zone d'observation un pH d'environ 6.

Nous observons que nous n'avons pas d'agrégats dans la zone de gradient, en revanche nous observons des agrégats amorphes dans les sorties 3, 4 et 5 (figure 4.30). Cela nous donne déjà une information qualitative sur les conditions favorables à l'agrégation. Mais cela nous permet surtout de valider notre système avec un peptide difficile à manipuler car peu stable et dont l'utilisation dans des systèmes microfluidiques est difficile sans le déclenchement sur puce. Au vu de ces résultats, il nous est apparu que notre système est adapté à l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ .

#### 4.2.2.3 Conclusion

Ces différentes expériences ont permis de montrer le bon fonctionnement de notre système. En effet, à l'aide de la fluorescéine, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des gradients de concentration linéaires pour une gamme de  $\alpha$  (rapport entre gradient et déclencheur) comprise entre 0.2 et 0.9. Cela nous permet donc de cribler rapidement une large gamme de concentration avec un bon niveau d'échantillonnage. De plus, à l'aide du peptide complet ( $A\beta 40$ ), nous

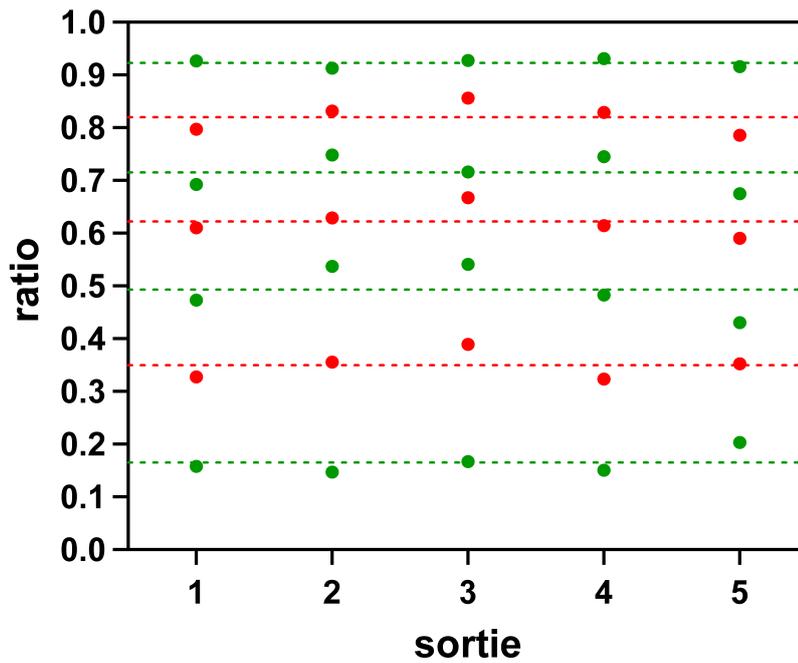


FIGURE 4.28 – Graphique représentant les ratios  $\alpha$  expérimentaux obtenus lors de la seconde caractérisation (de haut en bas les valeurs souhaitées sont 0.9,0.8,0.7,0.6,0.5,0.4,0.2), les lignes en pointillé représentent les valeurs moyennes d'un ratio.

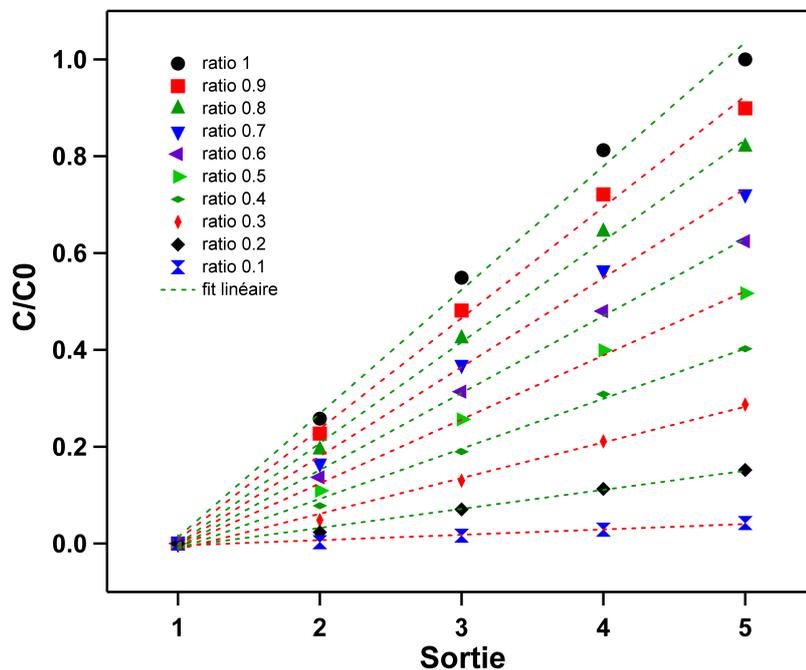


FIGURE 4.29 – Graphique représentant le rapport  $C_{exp}/C_0$  en fonction du numéro de sortie pour des ratio allant de 0.1 à 1. Les lignes en pointillés représentent les régressions linéaires faites à partir des différentes séries.

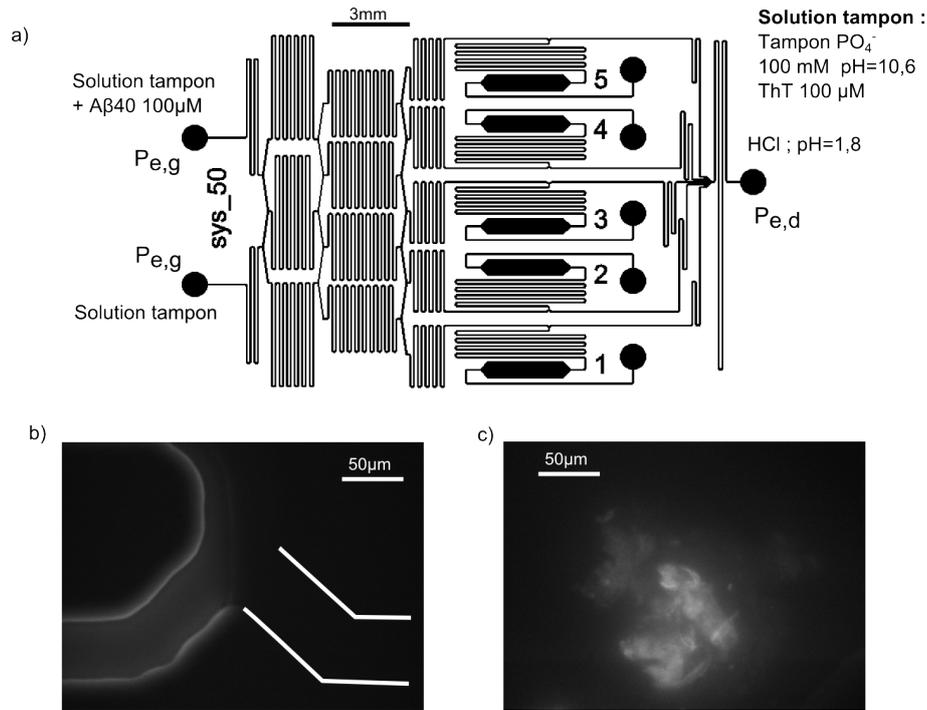


FIGURE 4.30 – Figure présentant les résultats obtenus pour le premier test du système avec l' $A\beta_{40}$ . a) Schéma du système avec les conditions expérimentales choisies. b) Photographie d'une intersection entre la partie gradient et déclencheur montrant l'absence d'agrégats c) Photographie d'un agrégat dans un réservoir.

avons démontré le principe de fonctionnement de notre système c'est à dire distinguer la partie préparation des échantillons et observation de l'agrégation. Cependant, nous avons obtenu dans les différentes sorties des agrégats macroscopiques qui ne correspondent pas à la voie d'agrégation que nous souhaitons étudier, nous utiliserons donc par la suite des peptides modèles que nous présenterons dans la partie suivante.

### 4.2.3 Expérimentation avec l'amyloïde- $\beta$

Pour notre étude, nous nous concentrons d'abord sur un gradient linéaire réalisé avec un  $\alpha$  de 0.5. Cette configuration permet de réaliser un mélange "équivolument" entre le peptide et le déclencheur.

#### 4.2.3.1 Choix du peptide

Nous avons vu sur le système à gradient simple et sur les premiers essais avec l' $A\beta_{40}$  que l'agrégation conduit à des agrégats fibrillaires s'agrégeant de manière amorphe. Ils ne correspondent pas à la voie d'agrégation que nous souhaitons étudier (voie d'agrégation purement fibrillaire conduisant à la formation de plaques amyloïdes constituées d'agrégats purement fibrillaires). De plus la manipulation de ces peptides est délicate car très sensible aux éléments extérieurs. Nous faisons donc le choix de travailler avec un peptide modèle, préparé par synthèses. Pour la préparation des échantillons, nous travaillons en collaboration avec l'équipe "chimie biologique" du LCC (P.Faller, C. Hureau, B. Alias). Pour nos expériences, nous utilisons un peptide modèle, l' $A\beta_{14-23}$  dont le déclencheur d'agrégation est le  $Zn^{2+}$ , et qui a une cinétique d'agrégation rapide (agrégation

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

"instantanée", temps typique inférieur à la seconde). Ce peptide est composé de 10 acides aminés, ils correspondent à ceux se trouvant entre la position 14 et 23 du peptide complet ( $A\beta_{40}$ ). L'étude de son agrégation va donc nous apporter des informations sur les seuils de concentration limites d'agrégation.

L' $A\beta_{14-23}$  suit un protocole de préparation proche de celui de l' $A\beta_{40}$ . Le peptide se présente sous forme de poudre, il est dilué dans de l'eau déionisée, il se trouve alors à un faible pH ce qui permet d'assurer sa stabilité. Pour le doser, la solution mère est diluée dans du tampon Hépès à pH=7.4, ces échantillons sont passés sur un spectromètre UV-Visible. Sur le spectre, nous relevons l'absorbance des raies caractéristiques de ce peptide, et nous en déduisons la concentration. Tout comme pour l' $A\beta_{40}$ , le suivi de l'agrégation se fait en utilisant la thioflavine T.

### 4.2.3.2 Expérimentation avec des puces en PDMS

Nous avons réalisé nos premières expériences à l'aide de puces réalisées en PDMS (partie 3.2), elles sont connectées à l'aide de réservoirs directement placés sur la puce (figure 4.24) et l'injection des fluides se fait par contrôle en pression. Avant l'injection des peptides, nous prenons soin de calibrer nos puces (détermination du ratio) comme nous l'avons présenté dans la partie caractérisation.

**Protocole expérimental :** Tout d'abord, nous vérifions le bon fonctionnement de nos puces en les remplissant de fluorescéine à 1mM pour avoir une intensité de référence, puis en réalisant un gradient de concentration en fluorescéine avec  $\alpha = 0.5$ . Nous connaissons ainsi précisément la concentration que nous aurons en peptide, en effet selon les puces les valeurs de  $\alpha$  sont de  $0.5 \pm 0.03$ . Puis nous rinçons les puces avec de l'eau dé-ionisée afin d'éliminer totalement la fluorescéine, enfin nous séchons nos puces en faisant couler un flux d'azote. Puis nous les mettons sous vide pendant 20 minutes, et nous les remplissons à l'aide de la solution tampon utilisée pour les expériences avec l'amyloïde- $\beta$ . Enfin nous remplaçons les solutions tampons par les différentes solutions que nous allons utiliser lors de l'agrégation. La configuration classique utilisée pour l'étude de l'agrégation est présentée sur la figure 4.31. Nous allons réaliser un gradient de concentration en peptide, nous l'injectons par l'une des entrées du gradient, il est solubilisé dans une solution tampon Hepes à pH=7.4 avec de la ThT. Dans l'autre entrée du gradient nous mettons de la même solution tampon avec de la ThT à la même concentration. La présence de ThT dans la partie gradient permet de contrôler que l'agrégation n'a pas eu lieu avant le déclenchement par le  $Zn^{2+}$ . Enfin dans la partie déclencheur, nous mettons une solution de tampon Hepes contenant du zinc et de la ThT. Nous mettons de la ThT à la même concentration dans toutes nos entrées afin de pouvoir être sûr qu'il n'y ait pas de problèmes lors du fonctionnement de la puce (remontée d'amyloïde- $\beta$  dans la partie déclencheur et inversement avec le zinc) et aussi pour éviter que la concentration en ThT varie pour les différentes zones d'observation ce qui pourrait induire un biais lors des mesures d'intensité. Nous laissons couler ces solutions dans la puce pendant cinq minutes, puis nous arrêtons l'écoulement en coupant la pression sur les entrées et en pinçant les tubes de sorties. Ce temps avant l'arrêt de l'écoulement permet d'être sûr que nous sommes bien en présence des solutions souhaitées dans les différentes sorties et que le fonctionnement du système est stable. Ensuite nous procédons aux mesures permettant d'avoir des informations sur l'agrégation. La principale mesure consiste à mesurer l'intensité de fluorescence en ThT dans les différentes zones d'observation à intervalle régulier. Pour cela, nous utilisons un objectif 20x nous permettant d'avoir toute la zone d'observation dans le champ de la caméra. Ensuite nous observons à l'aide d'un objectif 100x à immersion les différentes sorties afin de voir s'il y a des structures caractéristiques de l'agrégation en solution ou qui se serait collées sur les parois des canalisations.

**Résultats expérimentaux :** Les conditions expérimentales sont rappelées sur la figure 4.31, nous travaillons avec  $\alpha = 0.5$ , nous avons donc différentes conditions expérimentales pour chaque sortie qui sont résumées dans le tableau 4.5. Les observations à l'aide de l'objectif 100x ont permis de mettre en évidence à la surface du PDMS des structures fibrillaires dans l'ensemble des sorties (figure 4.32). Nous nous sommes interrogés sur l'origine de ces fibrilles en surface du PDMS, il nous a semblé qu'elles étaient organisées, de tailles suffisamment petites pour être des fibrilles d'amyloïde- $\beta$ . En revanche, leur présence dans les zones d'observation dépourvues d'amyloïde- $\beta$  restait inexpliquée. Nous avons alors songé à une possible interaction entre le PDMS et la ThT, en effet la ThT a la particularité de se fixer sur des sites hydrophobes des agrégats. Or le PDMS étant hydrophobe, une interaction peut être alors envisagée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons injecté à l'intérieur de nos puces, des solutions d'Hépés (100mM) contenant de la ThT ( $30\mu M$ ), nous avons alors observé en surface le même type de structure, il s'agit donc d'artefact de mesure. En observant les moules servant à la fabrication, nous retrouvons exactement les mêmes motifs qu'avec la ThT.

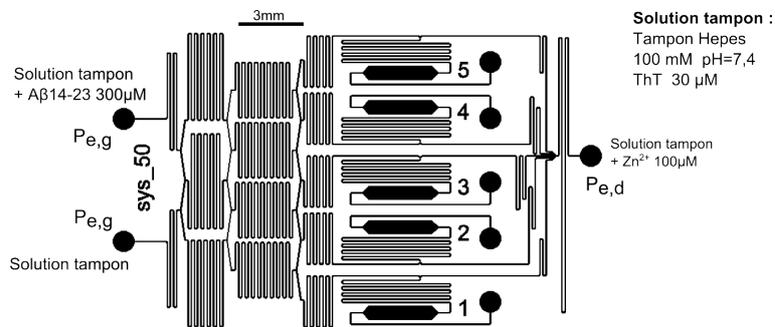


FIGURE 4.31 – Schéma présentant les conditions expérimentales choisies pour l'étude de de l'agrégation de l' $A\beta_{14-23}$ .

sortie	1	2	3	4	5
$C_{A\beta}(\mu M)$	0	37.5	75	112.5	150
$C_{ThT}(\mu M)$	30	30	30	30	30
$C_{Zn^{2+}}(\mu M)$	50	50	50	50	50

TABLE 4.5 – Récapitulatif des conditions expérimentales pour les différentes sorties

**Conclusion :** Il semble donc que la présence de ces artefacts de mesure soit due à la fabrication des puces. La principale cause de ces défauts est liée à la fabrication du moule en SU8, elle a deux origines : la première est la présence de contraintes lors des différentes étapes de recuit de la résine, la seconde lors du traitement par un silane (OTS, OctadecylTrichloroSilane) qui peut provoquer le dépôt de petits grains créant ainsi de la rugosité. Il paraît difficile de s'affranchir de ce problème. Une des solutions envisagée est le recours à des traitements de surfaces. Deux technologies étaient envisageables soit la fonctionnalisation des surfaces mais sa réalisation dans des canaux fermés est délicate et difficilement contrôlable ; soit en utilisant un coating dynamique (ajout de molécules en solution qui limitent les interactions des peptides avec les surfaces) mais cela risquait d'influencer la réaction. Pour ces différentes raisons, il nous a semblé pertinent pour éviter l'adsorption de la ThT de passer à des puces en verre-silicium.

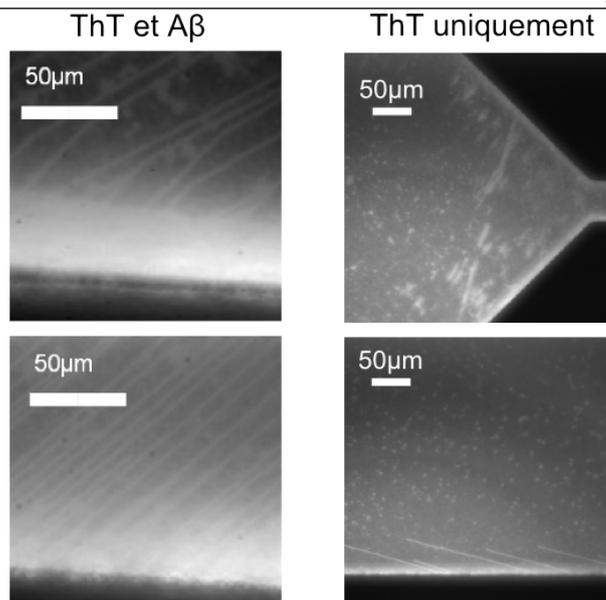


FIGURE 4.32 – Photographie de structure fibrillaire sur le PDMS en présence de ThT avec et sans  $A\beta_{14-23}$ .

#### 4.2.3.3 Expérimentation avec des puces en verre-silicium

Avant de faire les premières expériences sur l'amyloïde- $\beta$  avec les puces en verre-silicium, nous les avons testées afin de vérifier le bon fonctionnement des puces et de la connexion fluïdique. Pour cela nous avons utilisé le même protocole expérimental que pour les puces en PDMS. Les résultats obtenus sont comparables avec celui des puces en PDMS (figure 4.33). Le protocole expérimental diffère de celui utilisé pour les puces en PDMS de part la connexion des puces et leur remplissage. Pour simplifier l'utilisation des puces en silicium, nous avons usiné un support dont le principe de fonctionnement est développé dans la partie 3.3. Il permet de réaliser rapidement des connexions fluïdiques et aussi d'avoir les réservoirs au plus près de la puce afin de limiter les volumes (figure 4.24). Il permet aussi d'éviter toute étape de préparation avant la manipulation. Pour le remplissage, nous injectons tout d'abord une solution d'isopropanol afin d'éviter la présence de bulles d'air dans les puces car cette solution mouille totalement les murs. Ensuite nous remplaçons l'isopropanol par les solutions tampons afin de rincer nos puces. Puis nous remplaçons les solutions tampons par les solutions que nous souhaitons injecter pour étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ .

**Résultats expérimentaux :** Tout comme pour les puces en PDMS, nous réalisons un gradient d' $A\beta_{14-23}$  avec  $\alpha = 0.5$ . Nous préparons nos puces comme décrit dans le paragraphe précédent puis nous injectons les solutions nécessaires à l'étude de l'agrégation (configuration résumée sur la figure 4.34), nous les laissons couler pendant cinq minutes afin d'être sûr d'être dans les bonnes conditions expérimentales, ce temps correspond à la durée nécessaire pour changer les solutions et permet d'être dans des conditions de fonctionnement stables du système microfluidique. Puis nous stoppons les écoulements en mettant les pressions d'entrée à pression atmosphérique et en pinçant les tubes de sortie à l'aide d'un support. Nous mesurons alors l'intensité de fluorescence en ThT des différentes zones d'observation, cette mesure de fluorescence nous permet de savoir si nous sommes en présence d'agrégation. Nous obtenons les résultats présentés sur la figure 4.34. Il semblerait qu'il y ait un seuil d'agrégation en deçà duquel l'agrégation n'a pas lieu ou faiblement. Il est compris entre  $37.5$  et  $75 \mu M$  pour une concentration en zinc de  $50 \mu M$ . Nous avons observé

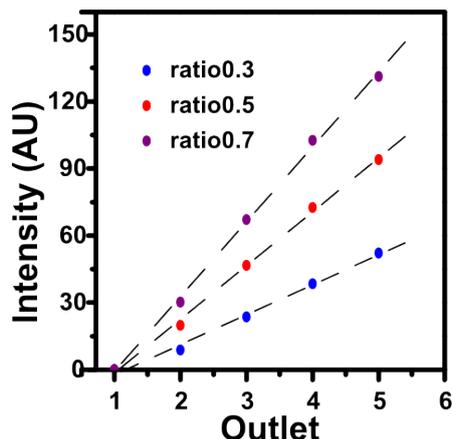


FIGURE 4.33 – Graphique présentant les intensités de fluorescence mesurées (ie. les concentrations) en fonction du numéro de sortie du système de gradient pour différentes valeurs de  $\alpha$

à fort grossissement la présence d'agrégats de forme fibrillaire dans les zones d'observation (figure 4.34), en revanche nous n'avons observé aucun agrégat amorphe, il semblerait donc que la voie d'agrégation soit fibrillaire.

Nous avons refait cette expérience à plusieurs reprises afin de vérifier les résultats que nous avons obtenu précédemment. Nous avons observé que la courbe n'a pas la même allure pour les sortie 2 à 5 (figure 4.34). Nous pouvons expliquer cette variabilité par la présence d'une bande fluorescente, au niveau de la jonction entre la partie gradient et la partie déclencheur. Cette bande se trouve sur l'ensemble des sorties contenant de l' $A\beta_{14-23}$ , de plus, nous observons qu'elle s'élargit le long de la canalisation (figure 4.35). Nous nous sommes donc intéressés à cette bande. Une fois l'expérience terminée, nous avons essayé de rincer la puce avec différents solvants (eau, isopropanol, DMSO, soude) pour l'éliminer, mais sans résultat. Nous sommes donc arrivé à la conclusion qu'il s'agissait d'un dépôt d'amyloïde- $\beta$  qui se sont fixés sur les parois. Nous avons donc refait une expérience en maintenant l'écoulement pour connaître l'évolution de l'élargissement du dépôt le long de la canalisation. Pour la mettre en œuvre, nous avons mesuré le profil transverse à la canalisation en différents points. Ce profil a une forme de pic que nous comparons à une gaussienne afin de connaître la largeur de la bande  $w$ . Nous pouvons alors tracer  $w$  en fonction de la position le long de la canalisation. Nous observons que pour l'ensemble des jonctions entre le gradient et le déclencheur, la largeur de la bande a le même comportement et suit une loi en puissance  $1/2$  (figure 4.35). Nous ne sommes pas allés plus loin dans cette étude à l'aide de ces dispositifs, car ils ne sont pas adaptés. Nous avons conçu d'autres dispositifs ainsi que d'autres méthodes de suivi qui seront développées dans le chapitre 5.

#### 4.2.4 Conclusion : Système de gradient avec déclencheur

Dans cette partie, nous avons conçu un système original composé de deux parties, l'une permettant la réalisation d'un gradient de concentration, l'autre permettant l'apport du déclencheur nécessaire à l'agrégation. De par sa conception, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des gradients linéaires pour des ratios entre les débits venant du gradient et du déclencheur ( $\alpha$ ) compris entre 0.2 et 0.9. Cela fait donc de ces puces un outil intéressant pour cribler un grand nombre de conditions expérimentales.

Avec les puces en PDMS, les expériences sur l'amyloïde- $\beta$  ont permis de mettre en avant le bon fonctionnement du système, c'est à dire l'absence d'agrégation dans la partie gradient et l'obser-

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

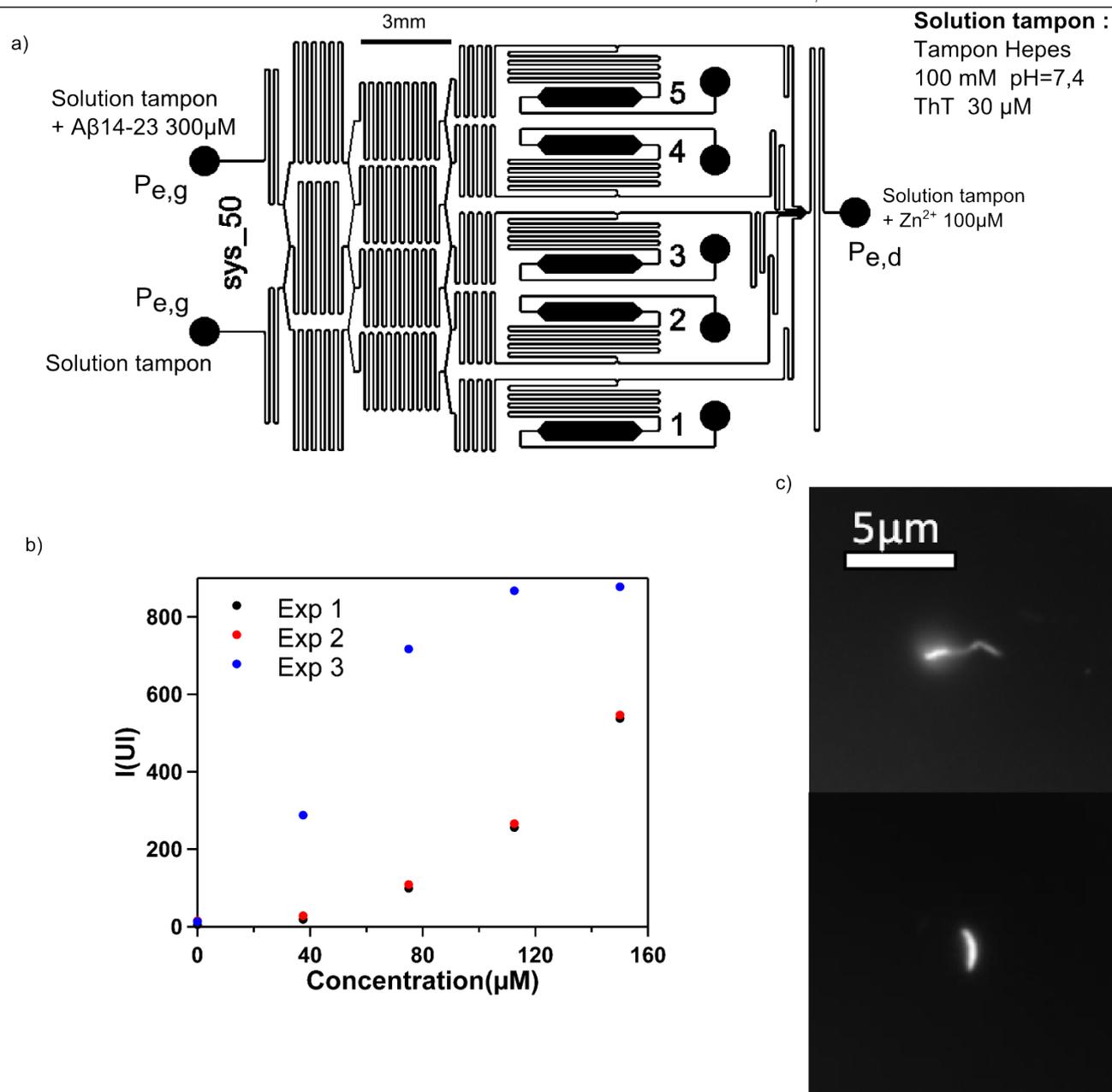


FIGURE 4.34 – a) Schéma présentant les conditions expérimentales utilisées pour étudier l'agrégation de l' $A\beta_{14-23}$  dans le cas des puces en verre-silicium ; b) Graphique présentant l'intensité de fluorescence en ThT en fonction de la concentration en peptide. c) Photographie de fibrilles à l'intérieur des réservoirs de sorties.

vation d'agrégats dans les réservoirs de sortie. Cela nous a aussi permis de montrer qu'il existait une adsorption de la ThT sur les parois en PDMS. Pour résoudre ce problème, nous avons décidé de changer de matériau et de passer à des puces en verre-silicium car l'ajout d'un coating dynamique est susceptible de perturber l'agrégation, et la fonctionnalisation des canaux est difficilement contrôlable.

Avec ces dernières, nous avons pu observer un seuil de concentration au delà duquel l'agrégation a lieu, mais il ne peut être clairement défini car nous avons mis en évidence au niveau des jonctions entre la partie gradient et la partie déclencheur une accumulation de peptides sur les murs. Pour

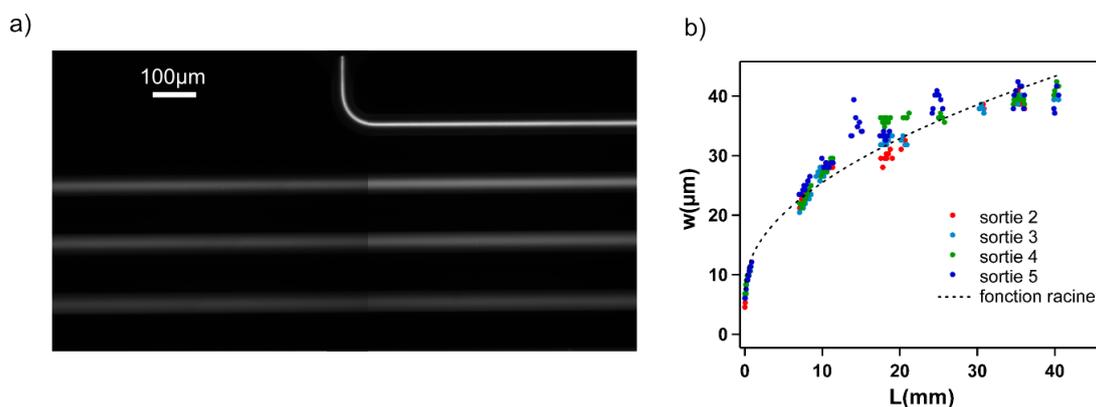


FIGURE 4.35 – a) Photographie montrant l’adsorption des peptides le long de canalisation permettant le mélange entre les solutions venant de la partie gradient et de la partie déclencheur. c) Graphique présentant l’évolution de la largeur de la bande en fonction de la longueur de la canalisation.

l’étude de cette adsorption, nous avons conçu d’autres puces et méthodes d’observation pour obtenir de nouvelles informations sur ces phénomènes, en effet les puces à gradient/déclencheur ne sont pas adaptées à cette étude.

Nous avons donc montré qu’il était possible de réaliser des puces permettant la génération de gradient linéaire avec l’apport de déclencheur. Mais, ces puces ne sont pas adaptées à l’étude de l’agrégation de l’amyloïde- $\beta$  en raison des différents problèmes d’adsorption au niveau des surfaces. En revanche, elles pourraient avoir des applications pour le criblage en génie chimique, car elle permettent d’échantillonner précisément et rapidement un grand nombre de conditions expérimentales.

### 4.3 Conclusion : gradients pour le criblage

Dans ce chapitre, nous avons montré la conception de puces permettant la réalisation de gradient linéaire de concentration linéaire. Nous les avons utilisées pour faire des gradients en amyloïde- $\beta$ . Nous avons alors observé des agrégats diffus qui venaient colmater les canaux et ainsi perturber le fonctionnement des puces. Afin de résoudre ce problème, il nous a paru important de dissocier la préparation des solutions d’amyloïde- $\beta$  et l’observation de l’agrégation. Pour cela, nous avons conçu des puces en deux parties, la première permet la génération d’un gradient de concentration linéaire et la seconde permet l’apport d’une solution contenant un élément déclencheur de l’agrégation (saut de pH, ions métalliques...). Ces puces grâce à leur géométrie permettent de tester un grand nombre de conditions expérimentales en faisant varier l’apport relatif de chaque partie, cela en fait donc un outil de criblage intéressant. Nous les avons testées en générant des gradients de concentration en amyloïde- $\beta$ , nous avons montré qu’il n’y avait pas d’agrégation dans la partie gradient, donc leur principe de fonctionnement est validé. Ensuite, nous les avons testées avec un peptide modèle, l’A $\beta$ 14 – 23, nous avons montré qu’il existait un seuil de concentration. Cependant nous n’avons pas pu déterminer précisément ce seuil à cause de problème de dépôt de peptide sur les parois. Cette accumulation se manifeste par l’apparition d’une bande fluorescente au niveau de la jonction entre la partie gradient et la partie déclencheur. L’étude de cette bande est développée dans le chapitre 5.

Nous avons donc réalisé un système microfluidique permettant le criblage d’un grand nombre de

## CHAPITRE 4. CONCEPTION DE PUCES À "MULTI"-CONCENTRATION POUR L'ÉTUDE DE L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

---

conditions expérimentales mais peu adapté à l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , en revanche il pourrait s'avérer pertinent pour des criblages dans le domaine du génie chimique en l'absence de formation de gros objets, susceptibles de se coller sur les parois.

# Références bibliographiques

- [1] JEON N.L., DERTINGER S., CHIU D., CHOI I., STROOCK A., AND WHITESIDES G. *Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems*. Langmuir **16**(22), 8311–8316 (2000). 40, 43, 71, 72
- [2] DERTINGER S., CHIU D., JEON N. L., AND WHITESIDES G. *Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks*. Analytical Chemistry **73**(6), 1240–1246 (2001). 44, 73, 76
- [3] VIERO YANNICK. *Développement de systèmes fluidiques dédiés à la manipulation d'ADN dans des réseaux de nanoplots : étude à l'échelle de la molécule unique et application à la séparation*. Thèse de Doctorat, école doctorale GEET (2011). 77, 78
- [4] Spectre de fluorescence de la fluorescéine, (consulté en Juillet 2012). [https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us\\_en/spektral-info.php?i=Objekt-0000-142](https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us_en/spektral-info.php?i=Objekt-0000-142). 78
- [5] Spectre du cube de fluorescence adapté à la fluorescéine(filter set 38HE), (consulté en Juillet 2012). [https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us\\_en/spektral-info.php?i=489038-9901-000](https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us_en/spektral-info.php?i=489038-9901-000). 78
- [6] BAN T., YAMAGUCHI K., AND GOTO Y. *Direct observation of amyloid fibril growth, propagation, and adaptation*. Accounts of Chemical Research **39**(9), 663–670 (2006). 85
- [7] LEVINE H. *Thioflavine t interaction with synthetic alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides : Detection of amyloid aggregation in solution*. Protein science **2**(3), 404–410 (1993). 85



# Chapitre 5

## La mesure du coefficient de diffusion : une information sur l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

### 5.1 Notre approche et réalisation des systèmes

#### 5.1.1 Notre approche : mesure de la diffusion en présence d'agrégation

Dans le chapitre 4, nous avons mis en évidence l'apparition d'une bande d'agrégats sur les murs des canalisations lorsque les peptides sont dans des conditions favorables à l'agrégation. Afin de mieux appréhender ce phénomène, nous avons décidé de nous intéresser plus précisément au comportement du peptide à l'interface entre la solution d'amyloïde- $\beta$  et le déclencheur. Pour cela, nous allons nous placer dans des conditions douces (diminution des concentrations en déclencheur et peptide) afin d'éviter les problèmes d'adsorption. De plus, la ThT ne permet pas d'avoir d'information sur les petits agrégats, nous choisissons donc de changer notre méthode de suivi. Nous allons marquer les peptides à l'aide d'une molécule fluorescente, la TRITC (partie 5.3.2). Puis nous étudierons l'évolution du front de diffusion sans agrégation (en l'absence de zinc), nous mesurons alors le coefficient de diffusion. Pour cela nous relevons en différents points de la canalisation le profil d'intensité perpendiculairement à la direction de l'écoulement. A partir de ces profils, nous obtenons la largeur de diffusion en les faisant correspondre à la fonction  $f(y) = I_0 \operatorname{erf}(\frac{y}{2\sqrt{Dt}})$  avec  $w = \sqrt{Dt}$  où  $t = \frac{x}{v_{moy}}$   $x$  sera la position où le profil a été relevé et  $v_{moy}$  la vitesse moyenne de l'écoulement (chapitre 2, partie 2.2.2). A partir de ces données, nous pouvons tracer  $w^2$  en fonction de temps, nous obtenons une droite, dont la pente est le coefficient de diffusion. Ensuite, nous nous plaçons dans des conditions où l'agrégation est lente et où le risque d'adsorption sera faible. Nous faisons la même expérience, à la place de la solution tampon, nous mettons une solution de zinc. Ceci doit provoquer l'agrégation des peptides. Nous aurons donc en solution des agrégats qui sont plus gros que les monomères, ils diffusent donc moins vite. En effet, la loi de Stokes-Einstein ( $D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$ ) montre que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon hydrodynamique donc si un objet grossit, son coefficient de diffusion diminue. En faisant le même travail sur les profils d'intensité nous devrions observer une inflexion de la courbe  $w^2$  en fonction du temps et ainsi obtenir la taille moyenne des agrégats pour un temps donné et des informations sur la cinétique d'agrégation (figure 5.1). De plus, nous pourrions obtenir des informations sur les premières étapes de l'agrégation qui sont les moins bien connues [1].

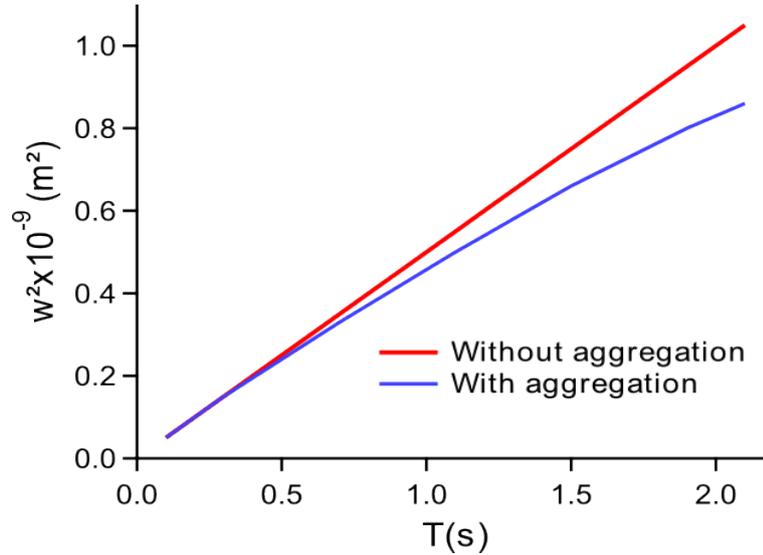


FIGURE 5.1 – Schéma présentant le principe de notre mesure. La ligne rouge représente l'évolution de  $w^2$  en absence d'agrégation tandis que la ligne bleue avec de l'agrégation

### 5.1.2 Modèles permettant la mesure du coefficient de diffusion

La mesure du coefficient de diffusion se donc fait en mesurant l'élargissement du profil de concentration perpendiculairement à l'écoulement. Cette mesure nécessite donc l'utilisation de modèle de diffusion. Dans les puces que nous allons utiliser par la suite nous pouvons distinguer deux configurations. La première est le cas de diffusion simple dans des microcanaux : deux solutions coulent côte à côte, l'une contient l'espèce dont nous devons mesurer le coefficient de diffusion ( $D$ ), l'autre est une solution tampon (figure 5.2 ; puce en Y). La seconde est plus complexe, la solution d'espèce dont on cherche  $D$  se trouve entre deux flux de solutions tampons (figure 5.4 ; puce en  $\Psi$ ). Par la suite, nous allons présenter les modèles que nous allons utiliser pour extraire les largeurs de diffusion. Ces derniers correspondent aux solutions analytiques présentées dans le chapitre 2 dans la partie traitant de la diffusion. Nous verrons par la suite comment nous les avons adaptés au cas où nous sommes en présence d'un écoulement.

#### 5.1.2.1 Modèle pour les puces en Y

Ce cas correspond à celui développé dans la partie 2.2.2, deux solutions coulent côte à côte dans une canalisation microfluidique, l'une d'elle contient une espèce qui va diffuser dans la direction transverse à l'écoulement. Nous pouvons rapprocher cette configuration du cas sans écoulement d'une espèce contenue dans un demi-espace et se diffusant selon une direction (figure 5.2). Cette analogie est d'autant plus valable si nous nous plaçons à une distance suffisante pour que les effets 3D soient négligeables. L'évolution du profil au cours du temps s'écrit :

$$C(y, t) = \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{y}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (5.1)$$

Cette solution de l'équation de diffusion dans le cas statique peut être adaptée à notre configuration : le temps  $t$  est remplacé par l'expression  $t = x/v_{moy}$  où  $x$  est la distance entre le début de la canalisation et le lieu de mesure du profil et  $v_{moy}$  est la vitesse moyenne de l'écoulement. Le profil de concentration dans la canalisation s'écrit alors :

$$C(x, y) = \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{y}{2\sqrt{\frac{xD}{v_{\text{moy}}}}}\right) \quad (5.2)$$

Lors de l'utilisation de ce modèle lors des expériences, nous mesurons la largeur du profil  $w$  qui est égale à  $\sqrt{\frac{xD}{v_{\text{moy}}}}$ . Afin de mesurer le coefficient de diffusion à partir des données expérimentales, nous traçons  $w^2$  en fonction de  $x/v_{\text{moy}}$  (ie de  $t$ ), nous devons obtenir une droite dont la pente est la valeur de  $D$ . Son domaine de validité est limité par deux aspects : les effets 3D dû à la forme de l'écoulement, et la présence des murs (cf. partie 2.2.2). Les effets 3D peuvent être négligés dès que l'espèce a diffusé dans la profondeur de la canalisation. Pour les murs, le modèle est valable tant que les murs latéraux n'apparaissent pas sur le profil de diffusion mesuré. Dès leurs apparitions, nous pouvons considérer que les conditions aux limites ne correspondent plus au cas de diffusion simple car ils rajoutent des conditions de réflectivité.

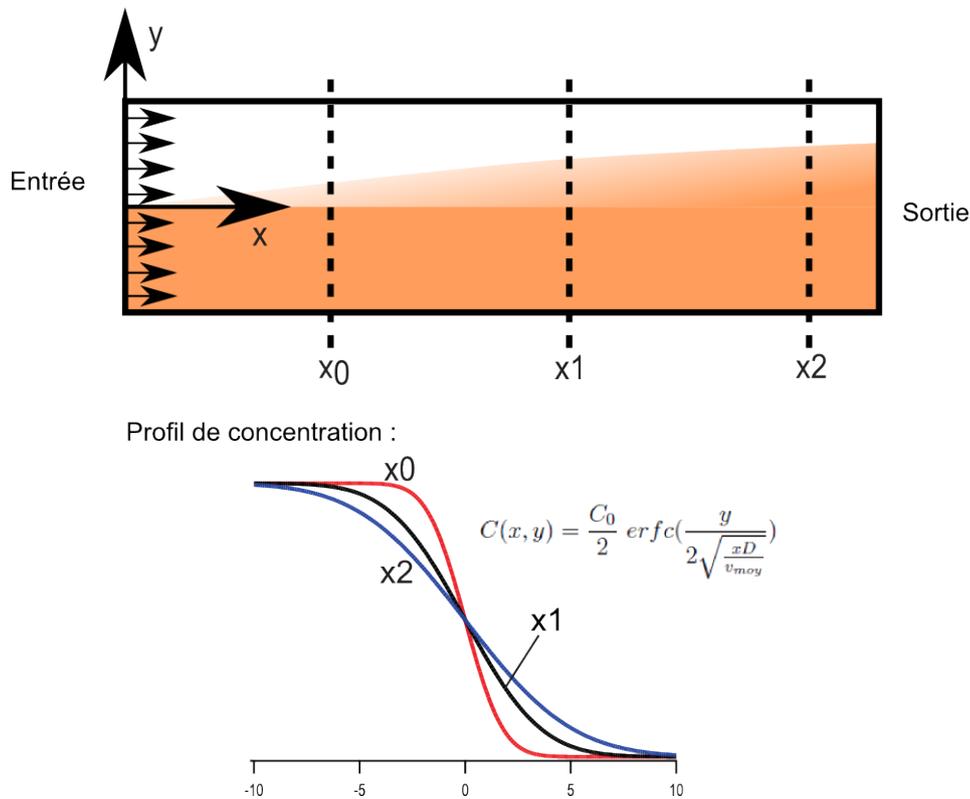


FIGURE 5.2 – Schémas présentant le modèle simple. L'image du haut présente la diffusion le long de la canalisation tandis que le graphique du bas montre l'évolution du profil avec la distance.

### 5.1.2.2 Mesures préliminaires

Nous avons réalisé des puces en T en verre-silicium (figure 5.3) permettant le mélange de deux solutions dans des canalisation de section  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ . Afin de valider notre modèle, nous avons fait des mesures du coefficient de diffusion à l'aide de ces système. Pour cela, nous injectons par l'une des entrées de la fluorescéine (1mM) et par l'autre de l'eau déionisée. Puis nous relevons les profils en différents points de la canalisation. L'injection se fait par contrôle de pression à l'intérieur d'un réservoir intégré sur un support adapté. Pour remonter au débit et à la vitesse

## CHAPITRE 5. LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION : UNE INFORMATION SUR L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

moyenne de l'écoulement, nous utilisons la relation liant le débit, la pression et la résistance hydrodynamique :  $\Delta P = R_h Q$ . En traçant l'évolution de  $w^2$  en fonction du temps nous observons que nous obtenons une droite de coefficient directeur  $5 \times 10^{-10} m^2/s$ , cette valeur est proche du coefficient de diffusion de la fluorescéine trouvé dans la littérature. En revanche, lors de nos mesures nous voyons apparaître rapidement les bord des canalisations sur les profils d'intensité ( $w = 50 \mu m$  pour  $t = 5s$ ). Cela rend difficile la corrélation du profil avec le modèle. De plus, l'injection en pression ne permet pas de connaître précisément la vitesse moyenne à l'intérieur des canalisations. Pour toutes ces raisons, nous décidons donc de concevoir de nouvelles puces ayant des canalisations du mélangeur plus larges et moins épaisses et d'utiliser un support permettant l'utilisation d'un pousse-seringue c'est à dire permettant un contrôle en débit.

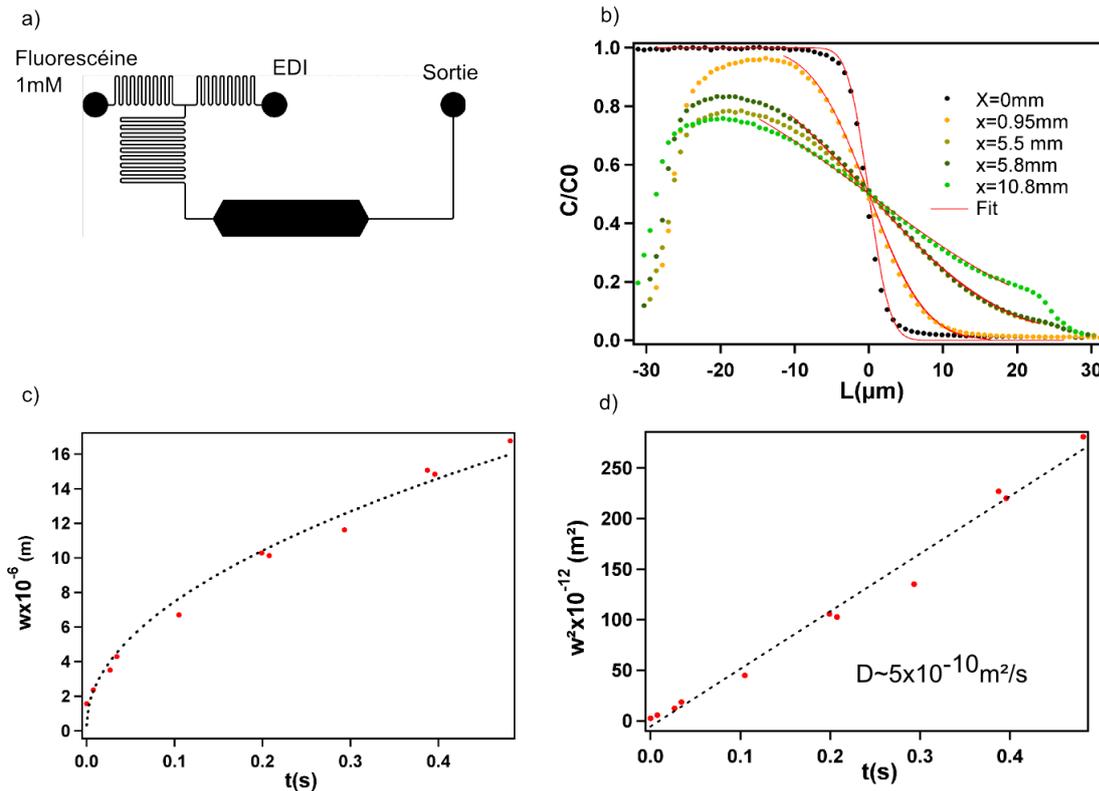


FIGURE 5.3 – a) Schéma du système ayant servi à faire les mesures préliminaires. b) Graphique montrant l'évolution du profil selon la distance. c) Graphique représentant  $w$  en fonction du temps, l'équation de la courbe en pointillés est de la forme  $A\sqrt{t} + y_0$ . d) Graphique présentant  $w^2$  en fonction du temps.

### 5.1.2.3 Modèle pour les puces $\Psi$

De la même manière que pour le modèle simple, nous utiliserons pour modéliser notre problème le cas de la diffusion dans un espace 1D (figure 5.4). Pour cela, nous utiliserons la diffusion d'un plug centré en 0 et de largeur  $2a$  dans un espace infini, le profil de concentration en fonction de  $(y,t)$  s'écrit :

$$C(y,t) = \frac{C_0}{2} \left\{ \operatorname{erfc}\left(\frac{a-y}{2\sqrt{Dt}}\right) + \operatorname{erfc}\left(\frac{a+y}{2\sqrt{Dt}}\right) \right\} \quad (5.3)$$

De la même manière que précédemment nous remplaçons le temps par l'espace en utilisant la relation  $t = x/v_{moy}$ . Lors des expériences, nous mesurons  $w$  la largeur de diffusion du plug que

nous pouvons relier aux grandeurs physiques du système par la relation  $w = \sqrt{\frac{x D}{v_{moy}}}$ . Le domaine de validité du modèle est limité par deux aspects : les effets 3D et la présence des murs. Ces aspects ont été décrits pour le modèle en Y.

Ce modèle peut être encore simplifié si nous nous plaçons dans le cas d'un plug très fin, nous pouvons faire l'approximation qu'il s'agit d'un "Dirac", le profil de concentration le long de la canalisation suivra alors une gaussienne dont l'équation est :

$$C(x, y) = \frac{M}{2\sqrt{\pi D t}} \exp\left(-\frac{x^2}{\frac{4 D x}{v_{moy}}}\right) \text{ où } M \text{ est la quantité de matière} \quad (5.4)$$

Nous utiliserons cette géométrie en plaçant la solution d'amyloïde- $\beta$  au centre de la canalisation et le déclencheur sur les côtés. Dans le cas de plug fin, l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  sera soumise à un gradient de concentration de déclencheur sur une courte distance devant les longueurs de mesure, il sera donc plus facile de comprendre la cinétique d'agrégation car nous serons à une concentration constante en déclencheur sur la majeure partie de la plage d'observation contrairement aux puces en Y où l'agrégation se produit dans une zone d'interdiffusion entre le peptide et le déclencheur.

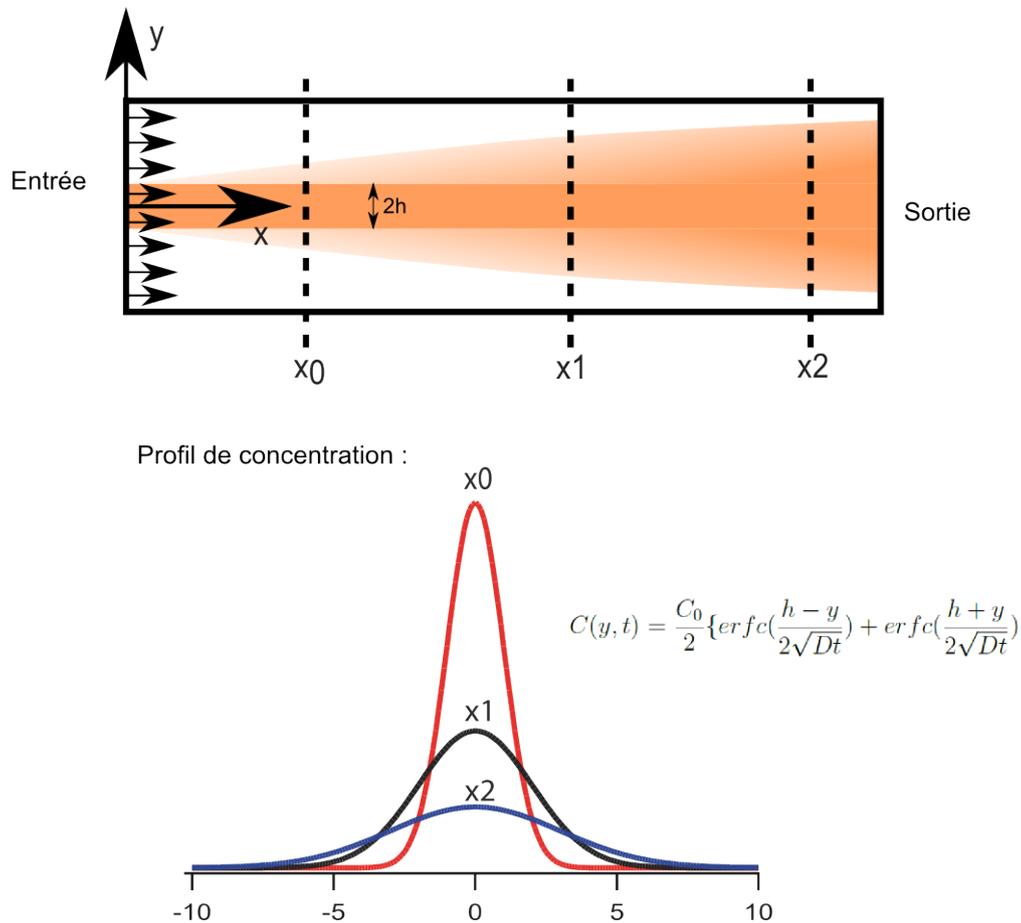


FIGURE 5.4 – Schémas présentant le modèle pour les puces en  $\Psi$ . L'image du haut présente la diffusion le long de la canalisation tandis que le graphique du bas montre l'évolution du profil avec la distance.

### 5.1.3 Conception des puces microfluidiques

#### 5.1.3.1 Dessin des puces

Deux types de puces ont été conçus afin de correspondre aux modèles de diffusion présentés dans le paragraphe précédent. Ces puces ont des caractéristiques communes comme la largeur, la profondeur des canalisations et la zone de mesure de la diffusion. La zone de mesure est d'une longueur de  $167\mu\text{m}$ , de largeur  $200\mu\text{m}$  et de profondeur  $10\mu\text{m}$ . Cette zone permet l'observation de la diffusion sur un temps de 20 secondes pour un débit total de  $1\mu\text{L}/\text{min}$ . Les canalisations d'entrée permettant l'injection dans la zone de mesure ont une largeur de  $50\mu\text{m}$ , de profondeur  $10\mu\text{m}$ .

Les deux types de puces se distinguent par la géométrie à l'entrée de la zone de mesure. Pour réaliser le cas du modèle en Y, nous avons réalisé une entrée avec une géométrie où les deux fluides se rencontrent avec un angle qui permet d'éviter des zones de vitesse nulle par rapport à la géométrie en T au niveau du point de rencontre des deux fluides (figure 5.5). Dans le cas du modèle en  $\Psi$ , la zone d'entrée est composée de trois canaux, un canal central où est injectée l'espèce dont on souhaite mesurer le coefficient de diffusion et deux entrées latérales d'où vient le solvant, ces deux canalisations sont reliées à la même entrée fluïdique (figure 5.5). Pour rappel, ce système a été dessiné pour permettre d'obtenir plus rapidement une concentration homogène en zinc à l'intérieur de la canalisation. En effet, tout comme l'amyloïde- $\beta$ , le zinc diffuse dans la canalisation pour homogénéiser sa concentration, or la zone de gradient de concentration en zinc va correspondre à la largeur du plug. Donc plus le plug est petit, plus cette zone est réduite plus le temps d'homogénéisation diminue. Nous pouvons donc arriver à des cas où la concentration en zinc pourra être considérée comme constante sur la largeur de la canalisation, ce qui rend l'étude de l'agrégation plus simple.

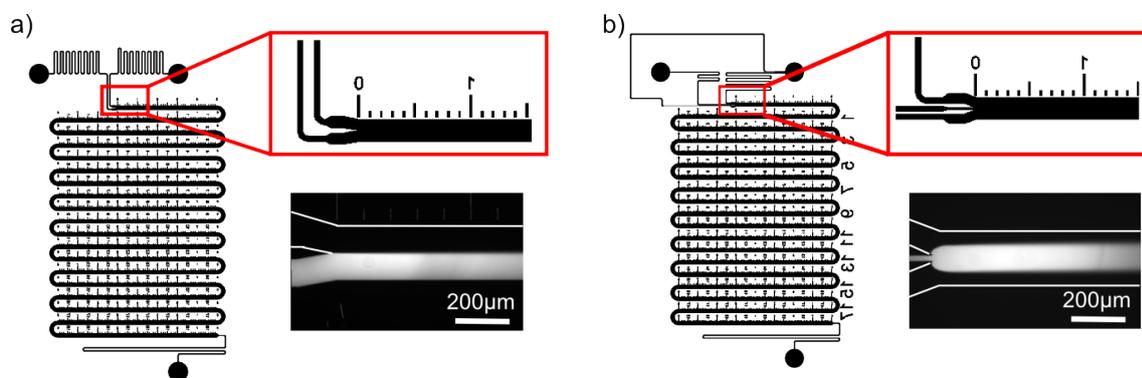


FIGURE 5.5 – a) Dessin présentant la géométrie des puces en Y, notamment la géométrie d'entrée (droite). La photographie a été prise avec de la fluorescéine, les deux débits d'entrée sont égaux. b) Dessin présentant la géométrie des puces en  $\Psi$ , notamment la géométrie d'entrée (droite). La photographie a été prise avec de la fluorescéine, les deux débits d'entrée sont égaux.

#### 5.1.3.2 Réalisation et connexion des puces

Pour la réalisation de nos puces, nous avons tout d'abord utilisé la technologie PDMS (cf. partie 3.2). Nous scellons nos puces par activation plasma sur des lamelles de verre de dimensions  $24 \times 60\text{mm}^2$  et d'épaisseur  $170\mu\text{m}$ . Nous avons fait ce choix technologique afin de pouvoir valider rapidement nos modèles sur des fluorophores bien connus tels que la fluorescéine, la rhodamine B.

## 5.5.2 Validation de la mesure du coefficient de diffusion sur des molécules modèles

L'emploi de ce matériau pour l'observation de l'agrégation ne nous semble pas gênante car nous n'allons pas utiliser de Thioflavine T (qui s'adsorbe sur les parois en PDMS, chapitre 4), nous suivrons cette réaction à l'aide du marquage du peptide en fluorescence à l'aide de la TRITC (partie 5.3.2). Pour connecter notre système au pousse-seringue, nous utilisons des tubes en Téflon ( $\varnothing_{ext} = 1.6mm$ ;  $\varnothing_{int} = 0.3mm$ ) que nous insérons en force dans les entrées du système microfluidique. Les faibles dimensions du tube ont été choisies afin de limiter les volumes morts ( $\sim 20\mu L$ ) et une consommation trop importante de réactifs lors des expériences avec le peptide. Malheureusement nous avons dû arrêter d'utiliser ce matériau car les résultats obtenus lors de la mesure du coefficient de diffusion des molécules modèles ne correspondent pas aux valeurs de la littérature et présentent une grande variabilité ( $\sim 100\%$ ), l'une des hypothèses pour l'expliquer est la déformation du PDMS sous l'action d'une pression à l'intérieur de la canalisation. Nous reviendrons en détails sur ce point dans la partie suivante.

Nous sommes alors passés à une technologie verre-silicium afin de résoudre ce problème. Les mesures avec ces systèmes nous ont permis de confirmer l'hypothèse sur le mauvais fonctionnement des puces en PDMS. Les puces en silicium sont scellées par collage anodique avec des lamelles de verre d'épaisseur  $170\mu m$ . Pour connecter, nous utiliserons des supports usinés permettant l'injection des fluides par un pousse-seringue (figure 5.6). Nous avons utilisé les mêmes tubes qu'avec les systèmes en PDMS.

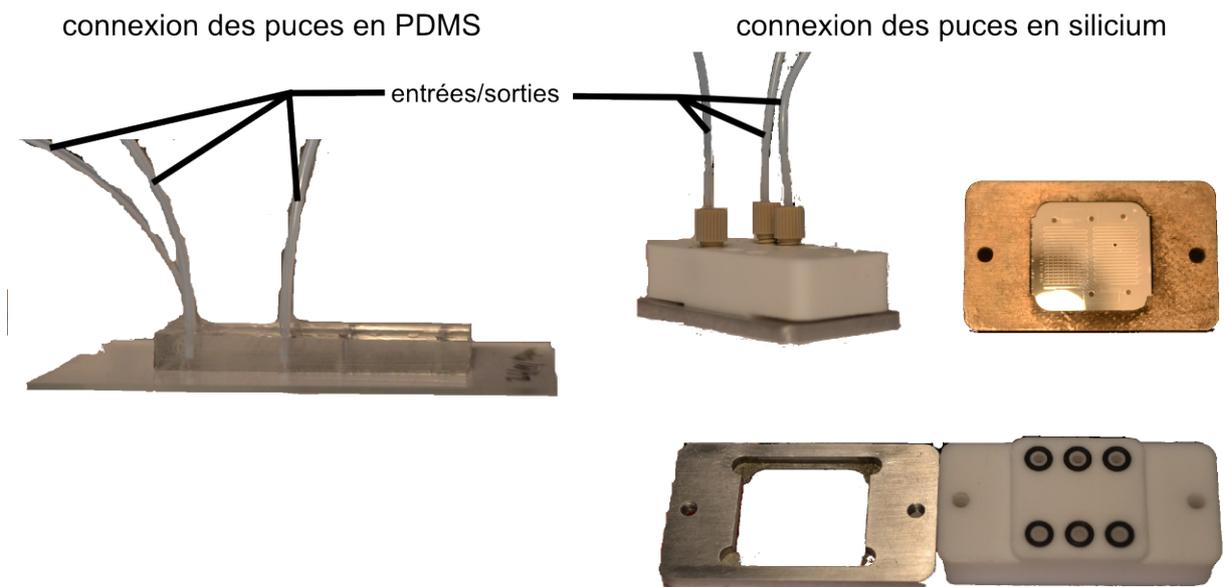


FIGURE 5.6 – Photographie présentant la connexion des puces en PDMS et en silicium.

## 5.2 Validation de la mesure du coefficient de diffusion sur des molécules modèles

Avant d'étudier l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , il nous a semblé pertinent de calibrer la mesure du coefficient de diffusion sur des molécules fluorescentes bien connues et caractérisées. Nous avons donc choisi d'utiliser la fluorescéine et la rhodamineB dont les coefficients de diffusion sont respectivement de l'ordre de  $6 \times 10^{-10} m^2/s$  [2] [3] et de  $3.6 \times 10^{-10} m^2/s$  [4]. Nous avons fait nos premières observations avec des puces en PDMS, puis nous avons observé des limitations qui nous

ont amenés à utiliser des puces en verre-silicium.

### 5.2.1 Mesure avec les puces en PDMS

Afin de valider nos modèles, nous avons tout d'abord testé avec de la fluorescéine les puces en Y, puis nous avons effectué les mêmes mesures avec les systèmes  $\Psi$ . Pour cela, nous plaçons nos puces sous vide pendant 20 minutes avant d'injecter à l'aide d'un pousse seringue par une entrée une solution de fluorescéine à 1mM et par l'autre de l'eau déionisée.

#### 5.2.1.1 Résultats avec les puces en Y

Les débits des deux entrées sont choisis égaux afin que le front de diffusion soit au centre de la zone de mesure. Le débit total varie entre 0.2 et 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Pour l'ensemble de ces débits, nous relevons les profils d'intensité transverses à l'écoulement en différents points de la canalisation puis nous les comparons avec le modèle simple afin de pouvoir tracer la courbe  $w$  en fonction de la distance de la canalisation, puis nous passons nos courbes en temporel dans le but de rendre possible la comparaison de toutes les expériences. Nous observons qu'avec ces puces pour tous les débits d'entrée utilisés, la courbe  $w^2$  en fonction du temps est bien une droite (figure 5.7). En revanche, nous remarquons que d'une expérience à l'autre la pente varie, donc pour une même molécule, nous mesurons plusieurs coefficients de diffusion différents. Deux explications peuvent être avancées pour expliquer la variabilité d'une expérience à l'autre. La première cause est la présence de fuites à l'entrée du système, quand le débit devient trop important, cela implique que la vitesse à l'intérieur de la canalisation est différente de celle souhaitée, cela induit une modification du coefficient directeur de la droite  $w^2$  en fonction de  $t$  car  $t$  est directement relié à la vitesse par la relation  $t = x/v$ . La seconde explication est liée à l'utilisation du PDMS, en effet lorsque nous appliquons un débit à l'intérieur d'une canalisation, nous induisons un champ de pression linéaire décroissant entre l'entrée et la sortie du canal. Sous l'action de ce champ, le PDMS se déforme (figure 5.8), cela provoque une modification du profil des vitesses dans la canalisation, la vitesse maximale au centre de la canalisation est plus faible que celle du profil non déformé. De plus la déformation dépend du débit. En effet, plus le débit sera grand plus la pression sera grande, plus la déformation importante, le gain de hauteur  $\Delta h_{max}$  au centre de la canalisation s'écrit :  $\Delta h_{max} = k \frac{Pw}{E}$  où  $P$  est la pression,  $w$  la largeur de la canalisation,  $E$  le module de Young et  $k$  une constante [5] [6]. Ce phénomène permet d'expliquer en partie la variabilité entre les différentes expériences. Nous retrouvons ces mêmes phénomènes avec les puces  $\Psi$  en PDMS que nous présentons juste après.

#### 5.2.1.2 Résultats avec les puces en $\Psi$

Avant l'étude de la diffusion dans ces puces, nous nous sommes intéressés à la largeur initiale de la bande fluorescente en fonction des débits. Pour déterminer théoriquement cette valeur, nous définissons tout d'abord  $w_f$ , la largeur de la bande fluorescente et  $w_h$  la largeur de la bande non fluorescente, liée par la relation  $w = w_f + w_h$  où  $w$  est la largeur de la canalisation (ici 200 $\mu\text{m}$ ).  $Q_f$ ,  $Q_h$  et  $Q_{tot}$  sont respectivement le débit de la solution fluorescente, du solvant et le débit total tel que  $Q_{tot} = Q_f + Q_h$ . Nous écrivons alors la conservation de la matière aux entrées du système et dans le canal de mesure, nous obtenons alors les relations suivantes :

$$\begin{cases} dV_f = Q_f S dt = w_f Q_{tot} h dt \\ dV_h = Q_h S dt = w_h Q_{tot} h dt \end{cases} \quad (5.5)$$

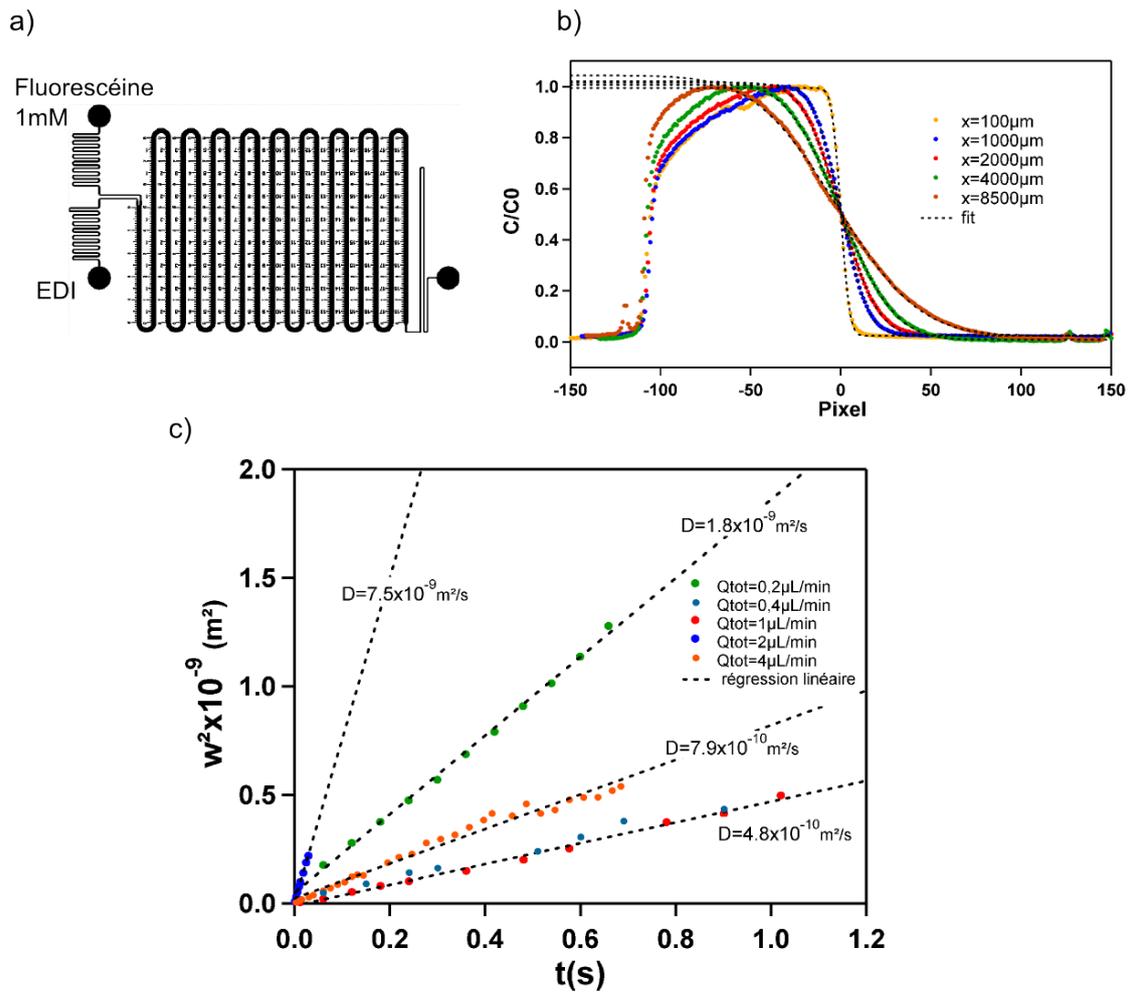


FIGURE 5.7 – a) Schéma de la puce utilisée et des liquides injectés. b) Graphique des profils d'intensité pour différentes localisations dans la canalisation. c) Graphique présentant  $w^2$  en fonction du temps pour les différentes expériences.

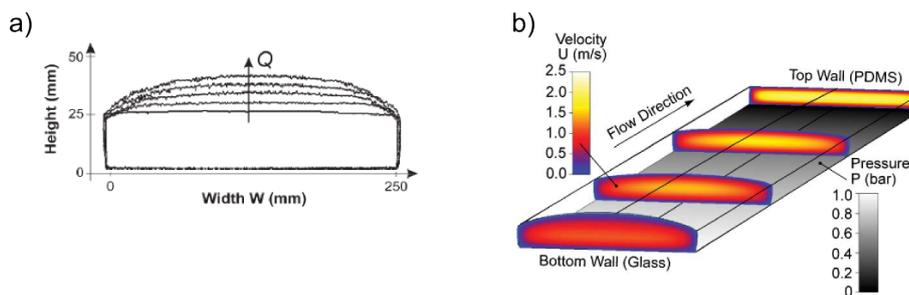


FIGURE 5.8 – a) Graphique présentant la mesure de la section d'un canal en PDMS en fonction du débit. Le canal présenté ici à une section de  $26 \times 250 \mu\text{m}^2$ , une longueur de 1cm, la mesure à été effectué à un 1 mm de l'entrée du canal pour des débits de 1,100,300,500,700  $\mu\text{L}/\text{min}$  [5] b) Simulation numérique présentant l'évolution de la vitesse le long d'une canalisation déformée par le passage d'un débit. Nous observons que plus la pression est importante, plus la section de la canalisation est déformée, moins la vitesse de l'écoulement est importante [5].

# CHAPITRE 5. LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION : UNE INFORMATION SUR L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

En écrivant le rapport  $\frac{dV_f}{dV_h}$ , nous arrivons alors à l'équation suivante :

$$\frac{Q_h}{Q_f} = \frac{w_h}{w_f} \Rightarrow w_f = \frac{w}{r+1} \text{ avec } \frac{Q_h}{Q_f} = r \tag{5.6}$$

Pour vérifier cette loi expérimentalement, nous injectons de la fluorescéine à 1mM par l'une des entrées à un débit de  $0.5\mu\text{L}/\text{min}$ , puis par l'autre entrée de l'eau dé-ionisée avec un débit variant de  $0.5$  à  $11\mu\text{L}/\text{min}$  ce qui donne un rapport des débits,  $r$ , compris entre 1 et 22. Pour chaque couple de débits, nous mesurons la largeur de la bande de fluorescéine,  $w_f$ , en traçant le profil d'intensité perpendiculairement à l'écoulement et en mesurant la largeur à mi hauteur. Nous obtenons alors la courbe de  $w_f$  en fonction de  $r$  (figure 5.9). Nous observons que les résultats théoriques et expérimentaux sont en accord. Dans l'optique de l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , ce système est intéressant car il nous permet de réaliser facilement plusieurs configurations d'injections, donc de pouvoir tester plusieurs conditions de réaction (établissement rapide ou plus lent d'une concentration constante en déclencheur).

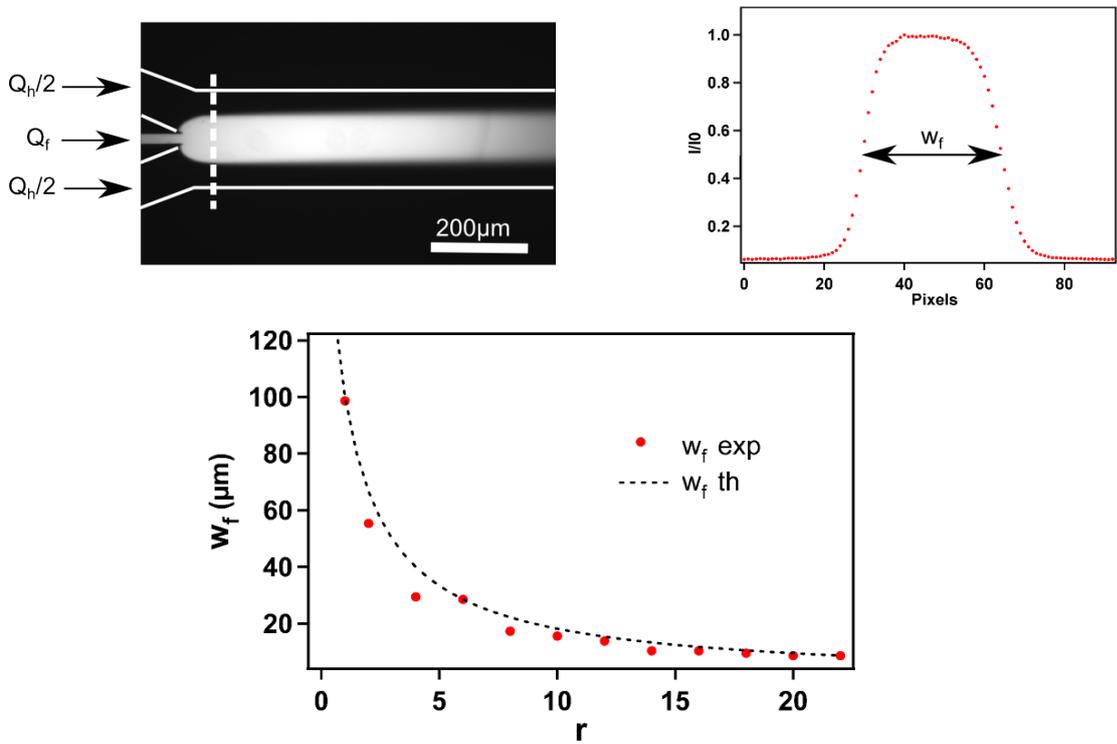


FIGURE 5.9 – Figure présentant la méthode de mesure de la largeur initiale. La photographie précise le point de mesure au niveau de la canalisation. Le graphique en haut à gauche représente la largeur sur le profil mesuré (largeur à mi-hauteur). Le graphique du bas représente l'évolution de la largeur théorique (pointillés) et expérimentale (ronds rouges) en fonction du ratio  $r$

Nous nous intéressons ensuite à la diffusion de la fluorescéine dans la zone de mesure. Pour cela, nous injectons par l'une des entrées de la fluorescéine à 1mM dont le débit est fixé à  $0.5\mu\text{L}/\text{min}$ , par l'autre entrée nous injectons de l'eau dé-ionisée dont le débit varie entre  $3$  et  $7\mu\text{L}/\text{min}$ . Les largeurs initiales seront donc comprises entre  $13$  et  $28\mu\text{m}$ , nous comparerons les profils avec une gaussienne et la fonction présentée dans l'équation 5.3. Cela a pour but de valider l'approximation de la diffusion d'un créneau par une gaussienne quand la largeur de ce dernier devient petite. Nous observons sur les courbes expérimentales que les résultats obtenus avec les deux fonctions sont très

## 5.5.2 Validation de la mesure du coefficient de diffusion sur des molécules modèles

proches. Au vu des ces observations, nous pouvons donc valider notre approximation. En revanche, pour les différents débits utilisés, nous observons que l'élargissement du front de diffusion est peu sensible à cette variable. Par contre, le coefficient de diffusion mesuré ( $D=1 \times 10^{-9}m^2/s$ ) est supérieur à la valeur de la littérature ( $D \sim 6 \times 10^{-10}m^2/s$ ), ce qui implique que la diffusion est plus rapide que les données de la littérature. La principale explication à ce phénomène se trouve dans la déformation du PDMS que nous avons déjà explicité dans le paragraphe traitant des puces en Y (figure 5.8).

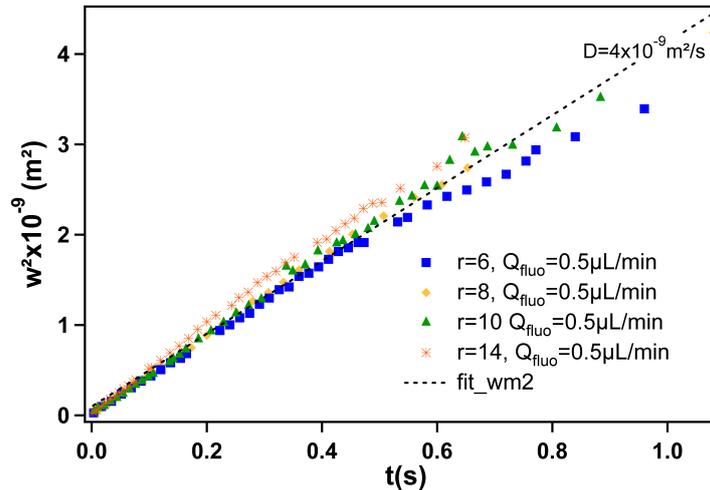


FIGURE 5.10 – Graphique représentant  $w^2$  en fonction du temps pour différentes configurations d'injection pour des puces en  $\Psi$  en PDMS.

### 5.2.1.3 Conclusion

L'utilisation des puces en PDMS nous a permis de montrer que les modèles utilisés sont corrects. En effet, nous observons que dans toutes les expériences  $w^2$  en fonction du temps suit bien une loi linéaire. Cette observation est conforme à ce que nous attendions. En revanche, les coefficients de diffusion mesurés ne correspondent pas avec ceux de la littérature et ne sont pas identiques d'une expérience à l'autre. Nous pouvons expliquer ces disparités par deux phénomènes qui modifient la vitesse à l'intérieur de la canalisation : le premier est la présence de fuites à l'entrée du système dues à une trop forte pression ( $Q_{tot}=1\mu L/min, P_{entrée}=3bar$ ), le second est la déformation du PDMS sous l'action du champ de pression. Ces problèmes nous ont poussés à passer à des puces en verre-silicium.

## 5.2.2 Mesure avec les puces en verre-silicium

Avec les puces en PDMS, nous avons vu que les méthodes de mesure du coefficient de diffusion sont correctes mais perturbées par des modifications de la vitesse des écoulements dues à la déformation du PDMS ou à des fuites aux entrées. Le but des expériences avec les puces en verre-silicium est de valider la méthode de mesure du coefficient de diffusion et de montrer qu'elle est indépendante du débit d'entrée et de la géométrie des puces (Y ou  $\Psi$ ). La validation se fait à l'aide des deux mêmes fluorophores que précédemment : la fluorescéine et la rhodamine B. Les dimensions de ces puces sont les mêmes que celles en PDMS, elles ont été réalisées par gravure plasma et scellées par collage anodique avec du verre de  $170\mu m$  (chapitre 3).

### 5.2.2.1 Mesure du coefficient de diffusion de la fluorescéine

Dans cette optique, nous avons effectué deux séries de mesures. Pour ces expériences, nous utilisons de la fluorescéine à une concentration de  $40\mu M$  et de l'eau déionisée. Le remplissage des puces se fait en injectant tout d'abord de l'isopropanol afin d'éviter les bulles d'air. Nous changeons alors de solution pour mettre celles utiles à l'expérience. La première série de mesure est effectuée avec des puces en Y, les deux débits d'entrée sont égaux et le débit total varie entre 1 et  $2\mu L/min$ . Pour les puces en  $\Psi$ , nous travaillons avec un ratio entre les débits d'entrée  $r$  de 1 et de 0.5, le débit d'entrée en eau déionisée est fixé à  $1\mu L/min$ , les débits de fluorescéine sont respectivement de 0.5 et  $1\mu L/min$ . Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés sur la figure 5.11. Nous mesurons un coefficient de diffusion de  $5.23(\pm 0.17) \times 10^{-10} m^2/s$ . Ce résultat est cohérent avec la littérature. De plus, nous observons que la variabilité de notre mesure est similaire à ce que nous pouvons trouver avec les autres méthodes de mesure, ce qui nous permet de confirmer que nous avons un système pertinent pour la mesure des coefficient de diffusion d'espèce fluorescente ou colorée.

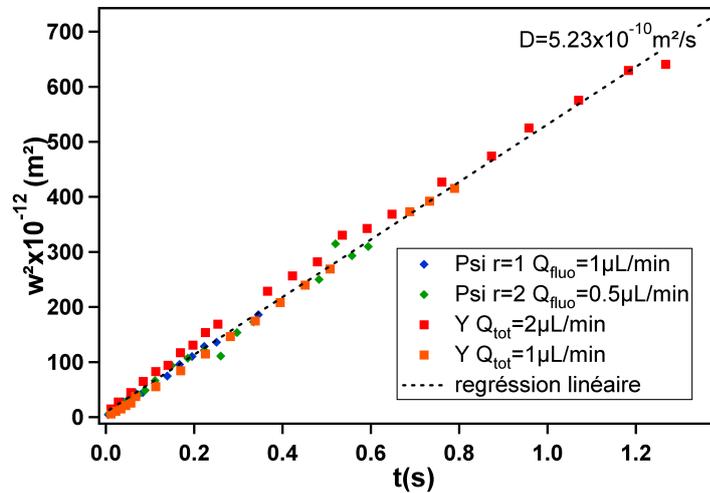


FIGURE 5.11 – Graphique représentant  $w^2$  en fonction du temps pour différentes configurations d'injection (puce en  $\Psi$  ou Y, débits d'entrée) dans le cas de la fluorescéine.

### 5.2.2.2 Mesure du coefficient de diffusion de la rhodamine B

L'utilisation de la rhodamine B nous permet de confirmer la validité de la méthode de mesure. Pour cela nous utilisons le même protocole que pour la fluorescéine. Nous testerons tout de même une gamme de débits beaucoup plus importante que pour la fluorescéine. Les conditions expérimentales et les résultats obtenus sont résumés sur la figure 5.12. Nous mesurons un coefficient de diffusion de  $3.6(\pm 0.5) \times 10^{-10} m^2/s$  ce qui est cohérent par rapport à la littérature. Ces résultats nous permettent de valider notre méthode de mesure.

### 5.2.3 Conclusion

A l'aide des puces en PDMS, nous avons montré que les fonctions utilisées pour modéliser les profils de concentration le long de la canalisation sont valables. En revanche, nous observons d'importants écarts d'une mesure à l'autre pour la détermination du coefficient de diffusion. Nous

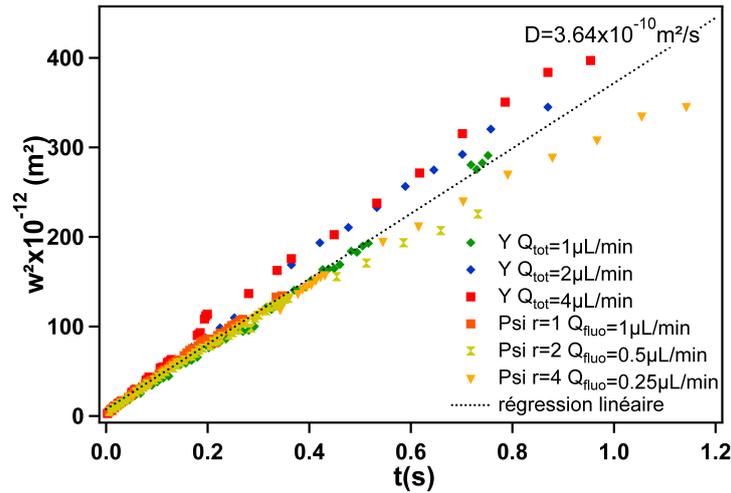


FIGURE 5.12 – Graphique représentant  $w^2$  en fonction du temps pour différentes configurations d'injection (puce en  $\Psi$  ou  $Y$ , débits d'entrée) dans le cas de la Rhodamine.

pouvons expliquer ces écarts par la déformation que subit le PDMS lors d'un écoulement. Le passage à des puces en verre-silicium nous a permis de montrer que ce phénomène était bien à l'origine des disparités observées avec le PDMS. De plus les coefficients de diffusion mesurés sont en accord avec la littérature. Cette partie nous a donc permis de valider notre méthode de mesure du coefficient de diffusion sur des molécules fluorescentes bien connues. Nous allons maintenant nous intéresser à l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ .

## 5.3 Étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

### 5.3.1 Choix des peptides

Dans les parties précédentes, nous avons essentiellement utilisé deux peptides, l' $A\beta_{40}$  et l' $A\beta_{14-23}$ . Nous avons vu que la manipulation du premier est délicate, nous ne l'utiliserons donc pas pour cette étude. En revanche le second dont la préparation est simple et la cinétique d'agrégation est rapide (temps caractéristique inférieur à la seconde) donc adapté à nos systèmes dont le temps typique d'observation est de l'ordre de quelques secondes. Afin d'obtenir des informations plus précises sur la cinétique des premiers instants d'agrégation, nous utilisons un autre peptide modèle l' $A\beta_{1-28}$ , qui déclenche aussi son agrégation avec du zinc et dont la cinétique est plus longue, de l'ordre de la vingtaine de minutes. Ces peptides ne sont pas fluorescents, ni colorés, il est donc impossible de relever directement les profils de concentration le long de la canalisation. Pour remédier à ce problème, nous avons décidé de les marquer à l'aide d'un dérivé de la rhodamine. Le protocole de marquage est développé dans la partie suivante.

### 5.3.2 Marquage des peptides

Le but de cette étape est de rendre les peptides fluorescents afin de pouvoir suivre leur diffusion perpendiculairement à l'écoulement. Des fournisseurs proposent des peptides marqués, il s'agit la plupart du temps de peptides complets ( $A\beta_{40}$  ou  $A\beta_{42}$ ), or nous avons vu précédemment que ces peptides sont difficiles à manipuler [7]. Dans la littérature, des protocoles expérimentaux ont été développés, ils sont basés sur la même chimie que celui que nous présentons par la suite [8].

## CHAPITRE 5. LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION : UNE INFORMATION SUR L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

Pour cela, nous avons utilisé une molécule fluorescente dérivée de la rhodamine, la TRITC (Tetra-methylRhodamineIsoThioCyanate, figure 5.13) qui est habituellement utilisée pour marquer de grosses protéines ou des anticorps. La partie active, l'isothiocyanate, réagit sur différents types de fonctions présentes sur les protéines : amine, sulfhydryle, imidazoyle, tyrosine ou carbonyle. Pour que cette réaction soit favorisée, il est nécessaire de se placer dans un tampon ne contenant pas d'amine, que le pH soit compris entre 8-9, et que le fluorophore soit en excès ( $n_{TRITC} = 2 n_{A\beta}$ ). Comme nous l'avons dit précédemment, ce marquage est adapté aux anticorps et aux grosses protéines, or les peptides ont des masses moléculaires faibles par rapports à ces entités il nous a donc fallu adapter le protocole standard pour avoir un marquage efficace. Dans un premier temps, nous décrirons les différentes étapes du marquages, puis nous détaillerons les différentes conditions expérimentales utilisées et les résultats obtenus.

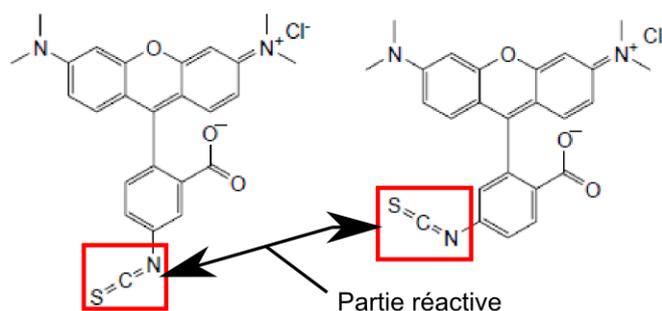


FIGURE 5.13 – Formule du TRITC

### 5.3.2.1 Protocole de marquage

Pour les deux peptides, le protocole de marquage est le même. La première étape consiste à dissoudre le peptide dans de l'eau, les concentrations sont de l'ordre du millimolaire. Ces solutions sont dosées par spectroscopie UV, la mesure de l'absorbance de pic caractéristique du peptide permet de connaître la concentration en utilisant la relation de Beer-Lambert,  $A = \varepsilon LC$  où  $A$  est l'absorbance,  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire, et  $L$  la largeur de la cuve. Puis, nous préparons la solution de TRITC en diluant 10 mg de TRITC avec 2mL de DMSO (DiMéthylSulfOxyde) deutéré, nous obtenons alors une solution de concentration de 10.4 mM. Nous utilisons le DMSO car il permet une bonne solubilisation du fluorophore, la réalisation d'une analyse RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pour mesurer les coefficients de diffusion nécessite l'usage de solvant deutéré afin de ne pas être perturbé par le solvant. En effet, la validation de nos mesures du coefficient de diffusion se fait par RMN, le DMSO non deutéré est caractérisé par une importante bande sur le spectre RMN qui rend impossible l'interprétation des autres signaux et nous empêche d'obtenir les informations souhaitées. En parallèle, nous préparons un tampon carbonate à 500mM et à un pH $\sim$ 8-9. Ces trois solutions sont mélangées afin d'être dans les conditions suivantes :  $n_{TRITC} = 2n_{A\beta}$ , et une concentration en tampon carbonate de 100mM. Nous laissons incuber ce mélange pendant au moins deux heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Avant de pouvoir utiliser nos échantillons, nous devons effectuer une étape de séparation permettant d'éliminer la TRITC libre n'ayant pas réagi avec les peptides. Pour cela les solutions sont passées sur un bâti de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Le principe est de pousser l'échantillon avec une phase liquide à travers une colonne contenant une phase stationnaire à faible granulométrie, il existe différents types de colonnes selon le mode de séparation utilisé :

adsorption, par échange d'ions, à exclusion stérique. Dans notre cas, nous utilisons une colonne à exclusion stérique : lors du passage de l'échantillon dans le milieu composé de grains, les petits éléments vont avoir tendance à se mettre dans les pores des grains et progressent donc moins vite que les plus gros éléments qui n'entrent pas dans les pores et passent entre les grains. En sortie de colonne, les éléments sont donc triés par ordre de taille décroissante. Dans notre cas, nous récupérons en premier les peptides marqués puis les protéines sans fluorophore et enfin le TRITC libre. L'équipement utilisé est équipé d'un spectromètre UV-visible qui nous permet de suivre l'absorbance de deux longueurs d'onde, nous suivons donc celle caractéristique du peptide et celle de la TRITC. En observant ces absorbances, nous récupérons seulement les solutions d'intérêt que nous passons à nouveau sur un spectromètre UV-visible afin d'avoir les spectres complets et de garder seulement les aliquotes les plus concentrés en peptide marqués. Nous récupérons alors ces solutions que nous passons à la centrifugeuse sous vide (speedvac) afin de les reconcentrer. Lors de cette étape, les échantillons sont centrifugés et passés sous vide. Le vide permet d'évaporer une partie du solvant et ainsi obtenir un échantillon plus concentré que celui initial et la centrifugation permet de garder tout le volume dans le fond du tube sans formation de gouttelettes. Cette étape dure entre deux et trois heures selon la concentration et le volume initial.

### 5.3.2.2 Réalisation du marquage

Le protocole de marquage a été réalisé à trois reprises dans des conditions expérimentales différentes afin d'arriver à des échantillons possédant un taux de marquage suffisant pour réaliser des mesures de coefficient de diffusion dans nos systèmes microfluidiques. Ils ont été fait au Laboratoire de Chimie et de Coordination (LCC) en collaboration avec l'équipe de P. Faller. La principale difficulté est d'obtenir un échantillon suffisamment concentré et en assez grande quantité pour faire un grand nombre d'expériences. Avant de réaliser un marquage sur plusieurs peptides, nous nous sommes concentrés sur l' $A\beta_{14-23}$  car c'est celui que nous avons le plus l'habitude d'utiliser. Afin de caractériser les marquages, nous réalisons une mesure par spectroscopie UV-visible, puis nous testons les échantillons récupérés avec nos puces microfluidiques. Dans ce paragraphe, nous décrirons les différentes conditions de marquage et les résultats obtenus. Les tests sur les mesures des coefficients seront développés par la suite.

**Réalisation du premier marquage des peptides :** Ce premier marquage avait été réalisé dans l'optique d'utiliser ces solutions avec les puces à gradients /déclencheur, dans l'optique de pouvoir observer des petits agrégats. Il a été réalisé au LCC par Bruno ALIES. Ce marquage a été fait sur de l' $A\beta_{14-23}$  et nous a permis d'obtenir une solution à une concentration de  $520\mu M$  de peptide dont le taux de marquage est faible (de l'ordre de 10%)(figure 5.14). Nous avons tout de même réussi à mesurer le coefficient de diffusion du peptide mais le rapport signal sur bruit n'est pas assez bon pour obtenir une mesure précise (figure 5.19). Ces expériences nous ont permis de montrer que le protocole de marquage a fonctionné correctement sur l'amyloïde- $\beta$ , en revanche, le taux de marquage de notre échantillon est trop faible pour avoir une mesure propre du coefficient de diffusion de l' $A\beta_{14-23}$ . Pour ce premier marquage, nous avons une faible quantité de solution marquée donc à la suite de ces expériences encourageantes nous avons décidé de modifier les conditions de marquages dans le but d'augmenter le taux de marquage et les quantités de solution récupérées.

**Réalisation du deuxième marquage des peptides :** Nous avons suivi les étapes de marquage précédemment décrites. Nous avons essayé de marquer les deux peptides ( $A\beta_{14-23}$  et  $A\beta_{1-28}$ ). Afin d'augmenter la quantité de produit récupéré, nous avons décidé de travailler lors

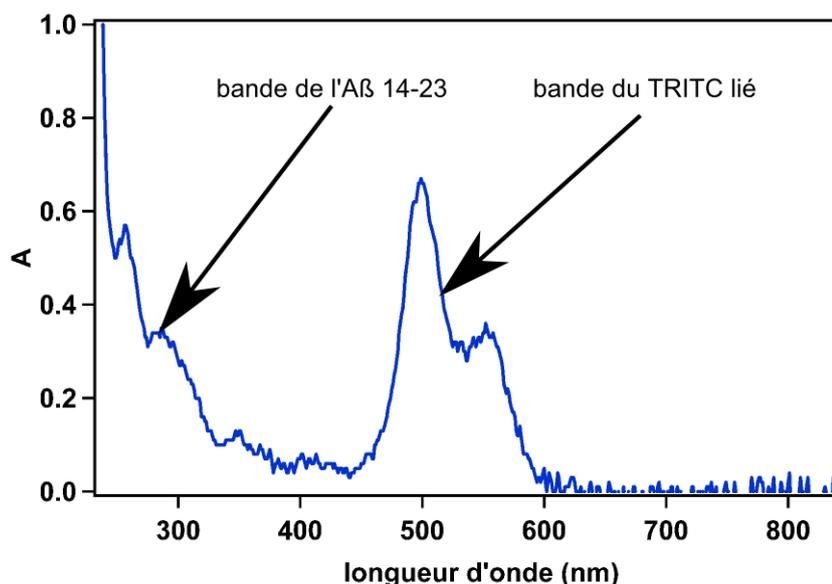


FIGURE 5.14 – Spectre UV-visible d'une solution contenant  $300\mu M$  d' $A\beta_{14-23}$  dont  $90\mu M$  provenant de la solution contenant du peptide marqué.

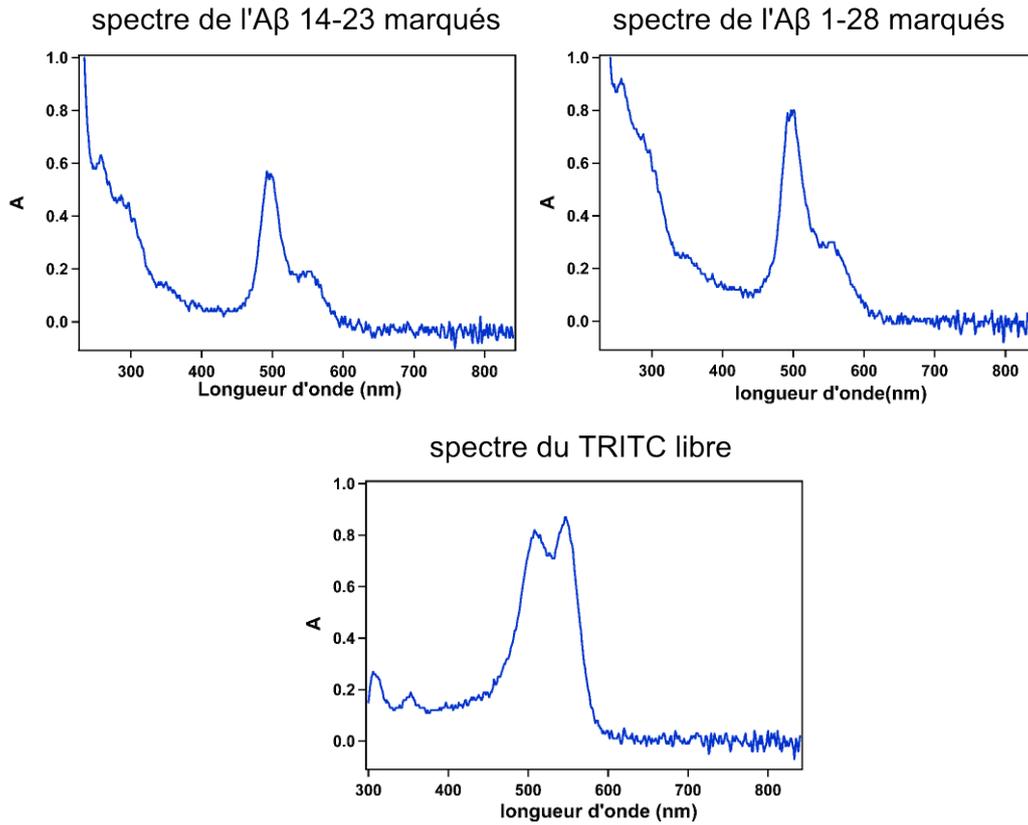
de l'incubation à des concentrations en peptides plus élevées,  $C_{A\beta} = 0.8mM$  ce qui implique de mettre une concentration de TRITC de  $1.6mM$  afin de garder la même stœchiométrie que dans le protocole standard. Une fois nos échantillons purifiés, nous les avons analysés à l'aide d'un spectromètre UV-Visible. La bande caractéristique de la TRITC est trop importante, elle ne permet pas l'analyse de bandes caractéristiques des peptides ce qui rend impossible le dosage de nos solutions et la détermination du taux de marquage (figure 5.15).

Avec ces échantillons, nous avons procédé à des mesures de coefficient de diffusion sur l' $A\beta_{14-23}$  afin de voir si nous obtenions des résultats cohérents par rapport à ceux obtenus précédemment. Nous avons injecté un mélange de peptides marqués et non marqués dont la concentration en peptides marqués est inconnue (car le taux de marquage n'est pas connue) dans une puce en Y dans les conditions suivantes :

- Entrée 1 :  $C_{A\beta_{14-23}} = 410\mu M$  dans du tampon Hépès à  $100mM$  et  $pH=7.4$
- Entrée 2 : Tampon Hépès à  $100mM$  et  $pH=7.4$

La concentration en peptide a été déterminée à l'aide d'un dosage par une mesure d'absorbance. Avant d'injecter nos solutions, nous remplissons préalablement la puce avec de l'isopropanol, puis nous la rinçons avec la solution tampon et enfin nous injectons nos solution d'intérêt. Pour mesurer le coefficient de diffusion nous avons choisis deux débits d'entrée :  $1$  et  $2\mu L/min$ . Comme présenté précédemment nous relevons les profils d'intensité le long de la canalisation et nous mesurons la largeur de diffusion. Puis, nous traçons la courbe  $w^2$  en fonction du temps, nous obtenons une droite de coefficient directeur  $3.6 \times 10^{-10}m^2/s$  (figure 5.16). Cette valeur ne correspond pas aux valeurs que nous avons mesurées lors du premier marquage. Nous observons que ce coefficient est proche de celui de la rhodamineB, or le TRITC est un dérivé de cette molécule. Il nous a donc semblé pertinent de mesurer le coefficient de diffusion de ce marqueur et de le comparer à celui mesuré pour le peptide marqué.

Pour cela, nous avons suivi le même protocole expérimental que pour le peptide hormis que nous l'avons remplacé par du TRITC à une concentration de  $100\mu M$  dans de l'Hépès à  $100mM$ .

FIGURE 5.15 – Spectres UV-visible de l' $A\beta_{14-23}$ , de l' $A\beta_{1-28}$  et la TRITC

Cette expérience a permis de mesurer le coefficient de diffusion du TRITC, nous avons obtenu  $D_{TRITC} = 3.6 \times 10^{-10} m^2/s$ . Lorsque nous superposons les deux séries de données, nous observons que les courbes de  $w^2$  en fonction du temps pour les deux molécules se superposent, nous pouvons donc en déduire que dans la solution d' $A\beta_{14-23}$  marqués il y a une part importante de TRITC libre qui suffit à masquer le signal des peptides marqués. Cette solution ne permet donc pas la mesure du coefficient de diffusion, nous sommes donc amenés à réaliser un nouveau marquage.

Nous pouvons probablement expliquer ce résultat par un phénomène de "stacking" de la TRITC lors de l'incubation. En effet, à une concentration trop élevée les molécules stabilisent leurs cycles hexagonal en s'empilant les unes sur les autres, elles forment donc de gros objets. Ce phénomène implique deux conséquences, tout d'abord cela rend leur site réactionnel moins accessible ce qui rend le marquage du peptide plus difficile. Ensuite, comme nous avons des objets plus gros, ils sont plus difficiles à séparer des peptides marqués lors du passage sur la colonne de HPLC.

**Troisième marquage des peptides :** Nous avons testé plusieurs conditions de marquage pour les peptides  $A\beta_{14-23}$  et d' $A\beta_{1-28}$ . Nous avons choisi des concentrations en peptide de 150 et  $300 \mu M$  ce qui implique des concentrations en TRITC de 300 et  $600 \mu M$ . Nous avons gardé cette stœchiométrie car c'est celle indiquée par le fabricant et qu'elle avait bien fonctionné lors du premier marquage [7]. Le choix de ces concentrations a pour but d'éviter le phénomène de stacking observé précédemment. Nous avons choisi de faire varier le temps d'incubation afin de savoir s'il y avait un impact sur le marquage, nous prendrons comme temps 2 et 3 heures. L'ensemble des conditions de marquage sont résumées dans le tableau 5.1.

Après passage sur la colonne de HPLC, nous faisons des spectres UV-visible pour chaque échan-

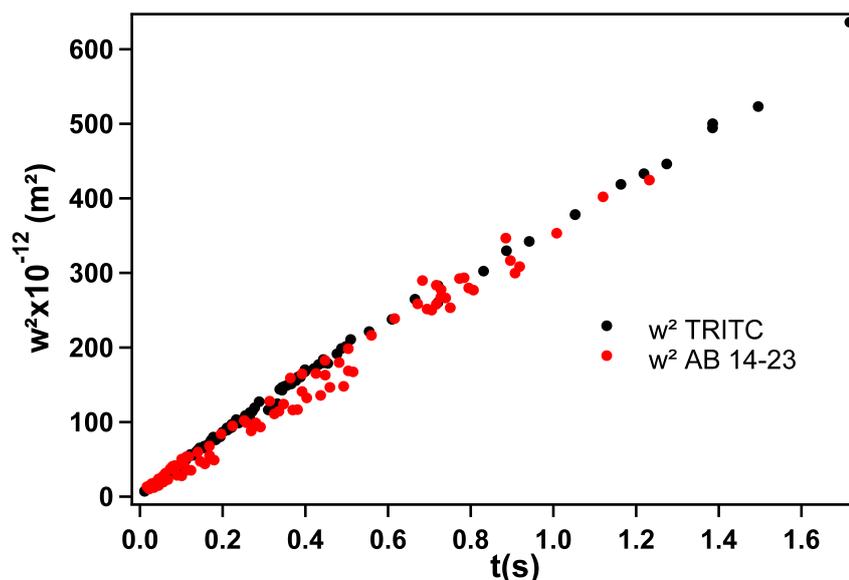


FIGURE 5.16 – Graphique représentant  $w^2$  en fonction du temps pour la TRITC et l' $A\beta_{14-23}$  marqué lors du deuxième protocole.

numéro	peptide	$C_{A\beta}(\mu M)$	$C_{TRITC}(\mu M)$	$T_{incubation}$
1	$A\beta_{14-23}$	300	600	2h
2	$A\beta_{14-23}$	300	600	3h
3	$A\beta_{14-23}$	150	300	2h
4	$A\beta_{14-23}$	150	300	3h
5	$A\beta_{1-28}$	300	600	2h
6	$A\beta_{1-28}$	300	600	3h
7	$A\beta_{1-28}$	150	300	2h
8	$A\beta_{1-28}$	150	300	3h

TABLE 5.1 – Récapitulatif des conditions expérimentales pour le marquage

tillons et nous observons qu'il y a peu de différence entre les différentes conditions expérimentales au niveau des taux de marquage. Nous passons ensuite les échantillons à la centrifugeuse sous vide afin de les reconcentrer. Les échantillons sont ensuite regroupés par concentration initiale en  $A\beta$ . Nous les passons au spectromètre UV-visible pour mesurer le taux de marquage et la concentration en peptide. Nous obtenons des taux de marquage de 30% pour les deux peptides. Pour le déterminer, nous mesurons, à l'aide des spectres UV-visible, l'absorbance du pic caractéristique du peptide duquel nous en déduisons la concentration en peptide (loi de Beer-Lambert ;  $A = \epsilon LC$ ). Nous faisons de la même manière avec le pic de la TRITC, ainsi nous connaissons la concentration en peptide et la concentration en TRITC, en supposant qu'il n'y a qu'un fluorophore par peptide, le taux de marquage est le rapport entre la concentration en TRITC et la concentration en peptide. Il en va de même pour l' $A\beta_{1-28}$ , nous approchons d'un taux de marquage de 30%. Ces expériences de marquage nous ont permis de trouver des conditions satisfaisantes. Nous obtenons ainsi des solutions adaptées à nos expériences.

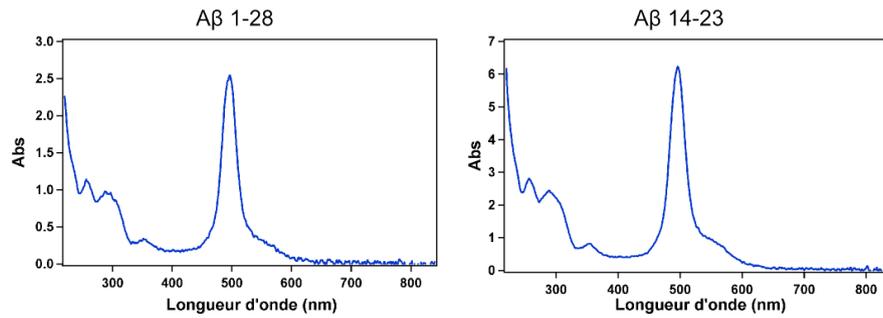


FIGURE 5.17 – Spectres UV-visible de l' $A\beta_{14-23}$  et de l' $A\beta_{1-28}$  dont nous tirons les valeurs des pics caractéristiques de la TRITC et du peptide

**Conclusion :** Dans cette partie, nous avons vu que les conditions de marquage influencent les mesures du coefficient de diffusion. Dans le cas où le taux de marquage est faible, nous avons pu mettre en évidence que nos mesures sont bruitées et qu'il est nécessaire de travailler avec une concentration plus importante en peptides marqués. Pour cela, nous avons tenté de faire le marquage avec une concentration en peptide plus grande. A cause du "stacking" de la TRITC, nous obtenons des solutions contenant une quantité importante de TRITC libre, donc lors de la mesure du coefficient de diffusion, nous mesurons celui de TRITC car la quantité de peptides est trop faible par rapport à la quantité de TRITC. Enfin, le dernier protocole a permis de mettre en avant des conditions satisfaisantes pour le marquage des peptides (taux de marquage de l'ordre de 30%).

### 5.3.3 Mesure du coefficient de diffusion des peptides marqués

#### 5.3.3.1 Mesure du coefficient de diffusion par RMN

Dans le but d'avoir une référence pour les mesures que nous faisons avec nos systèmes microfluidiques, nous avons effectué des mesures de coefficient de diffusion par RMN de différents peptides modèles non marqués. Nous avons utilisé : l' $A\beta_{14-23}$ , l' $A\beta_{1-28}$ , l' $A\beta_{1-16}$ , l' $A\beta_{11-28}$  ainsi que le GHK et le DAHK qui sont des peptides composés respectivement de 3 et 4 acides aminés. La préparation de ces peptides se fait en les solubilisant dans une solution d'eau déionisée à une concentration élevée puis nous les diluons afin d'avoir une concentration en peptides de 1mM et un pourcentage d'eau lourde (deutérée) de 25%. La présence d'eau deutérée permet d'améliorer la qualité du signal RMN, en revanche la viscosité de l'eau deutérée est plus importante que celle de l'eau (de 25%), elle modifie donc la valeur du coefficient de diffusion, il est plus faible que si nous étions dans de l'eau déionisée. Il convient donc de le corriger pour pouvoir le comparer à nos expériences ou de calculer le rayon hydrodynamique correspondant. Pour cela, nous utilisons la relation de Stokes-Einstein qui permet de relier le rayon hydrodynamique et le coefficient de diffusion par la relation  $D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$  où  $\eta$  est la viscosité dynamique,  $k$  la constante de Boltzman et  $T$  la température. Nous utilisons cette expression pour obtenir le rayon hydrodynamique des différents peptides. Les valeurs mesurées sont résumées dans le tableau 5.2. En traçant la courbe représentant le coefficient de diffusion en fonction de la masse moléculaire (figure 5.18), nous observons que les mesures sont en accord avec une loi qui lie le coefficient de diffusion et le masse moléculaire ( $\log D = k \log MW - A$ ) [9]. Nous pouvons donc utiliser ces mesures pour les comparer aux valeurs mesurées à l'aide des puces microfluidiques. Dans l'hypothèse où une molécule de TRITC est liée avec un peptide, nous pouvons donc calculer le poids moléculaire de l'ensemble ( $A\beta_{14-23}$   $MW = 1712\text{g/mol}$ ,  $A\beta_{1-28}$   $MW = 3725\text{g/mol}$ ), d'où nous déduisons

## CHAPITRE 5. LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION : UNE INFORMATION SUR L'AGRÉGATION DE L'AMYLOÏDE- $\beta$

un coefficient de diffusion à partir de la courbe obtenue par RMN, nous obtenons respectivement pour l' $A\beta_{14-23}$  et  $A\beta_{1-28}$  un coefficient de diffusion de  $1.77 \times 10^{-10} m^2/s$  et  $1.26 \times 10^{-10} m^2/s$ . Les rayons hydrodynamiques sont alors respectivement de 1.14nm et 1.60nm.

Peptide	D( $\times 10^{-10} m^2/s$ )	MW g/mol	$R_{hydro}(\times 10^{-10} m)$
$A\beta_{14-23}$	2.09	1233	9.66
$A\beta_{1-28}$	1.29	3246	15.66
GHK pH=7.5	3.50	339	5.77
GHK pH=11.9	3.79	339	5.33
DAHK	4.00	468	5.05
$A\beta_{1-16}$	1.70	1939	11.88
$A\beta_{11-28}$	1.60	2084	12.62

TABLE 5.2 – Tableau récapitulant les mesures RMN faites sur les peptides modèles non marqués. Les coefficients de diffusion donnés sont ceux avec 25% d'eau lourde.

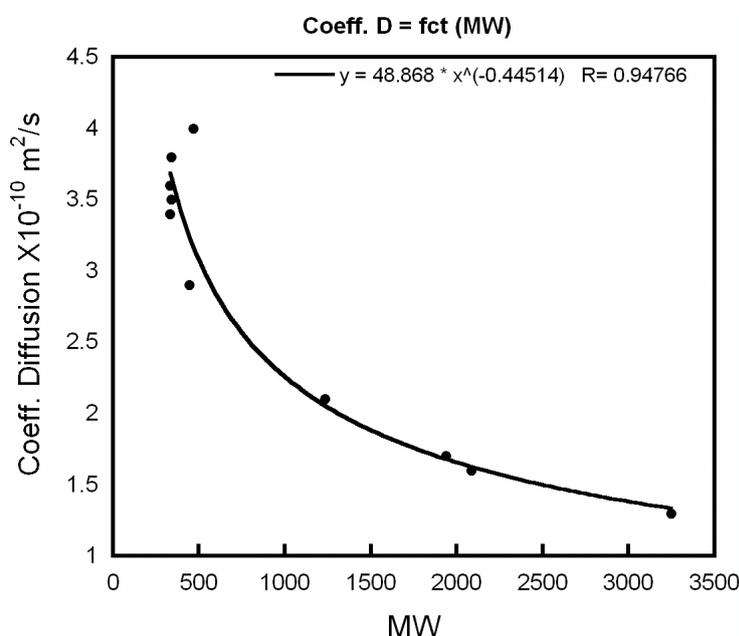


FIGURE 5.18 – Graphique représentant le coefficient de diffusion en fonction du poids moléculaire obtenu par RMN

### 5.3.3.2 Mesure du coefficient de diffusion à l'aide des puces microfluidiques

#### Protocole expérimental

Les puces utilisées sont réalisées en verre-silicium, nous n'avons utilisé que des puces de type Y. L'injection des fluides se fait de la même manière que pour la fluorescéine et la rhodamine B. La concentration totale en peptides ( $C_{tot} = C_{marqués} + C_{non\ marqués}$ ) de cette solution est fixée pour l'ensemble des expériences à  $300 \mu M$ .

Une fois les solutions désirées mises dans les seringues, nous attendons que le débit à l'intérieur des puces se stabilise. Puis nous mesurons les profils transverses à l'écoulement en différents points de la canalisation. Pour chacun des profils, nous déterminons la largeur de diffusion ( $w$ ) en utilisant

les modèles présentés au début de ce chapitre. Nous traçons ensuite  $w^2$  en fonction du temps, la pente va correspondre à la valeur du coefficient de diffusion.

Nous présenterons d'abord les résultats obtenus pour l' $A\beta_{14-23}$  puis ceux pour l' $A\beta_{1-28}$ . Nous discuterons ensuite de la reproductibilité des expériences et des problèmes rencontrés.

### Mesure du coefficient de diffusion pour l' $A\beta_{14-23}$

Pour le premier marquage, nous avons réalisé les mesures de profil à différents débits ( $Q_{tot} = 1; 2; 4\mu l/min$ ), les débits des deux entrées sont égaux. La concentration en peptide marqué est de  $9\mu M$ . Lors des mesures de profil, cette concentration s'est avérée trop faible pour avoir un bon rapport signal sur bruit. Après avoir relevé les profils pour l'ensemble des conditions et traité les données, nous obtenons la courbe  $w^2$  en fonction du temps (figure 5.19). Nous observons que pour ces trois débits les courbes se superposent mais il y a une dispersion assez importante. Nous pouvons expliquer ces disparités par deux phénomènes, d'une part l'inhomogénéité de l'éclairage qui déforme les profils et d'autre part le faible rapport signal/bruit qui rend difficile la détermination de la largeur de diffusion pour les longues distances (figure 5.19). Ce deuxième effet est d'autant plus amplifié par l'inhomogénéité de l'éclairage.

En revanche, nous mesurons un coefficient de diffusion de  $2.7 \times 10^{-10} m^2/s$  ce qui nous donne un rayon hydrodynamique de  $0.79 nm$  que nous pouvons comparer à nos mesure RMN dont la valeur est de  $0.97 nm$ . Les rayons mesurés par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur, nous pouvons expliquer ces différences par le fait que les conditions de mesures des deux méthodes ne sont pas les mêmes. Dans un cas, nous travaillons dans du tampon Hépès tandis que dans l'autre de l'eau déionisée et du  $D_2O$ . De plus, la mesure du coefficient par la méthode microfluidique mériterait un plus grande nombre d'expériences afin d'affiner le résultat. Afin d'améliorer le rapport signal/bruit de nos mesures, nous avons procédé à la préparation d'une nouvelle solution de peptides marqués en prenant soin d'augmenter le taux de marquage.

Pour le troisième marquage, nous avons procédé de la même manière que précédemment. Avec cette nouvelle solution de peptides, nous avons injecté dans nos puces une solution contenant  $300\mu M$  d' $A\beta_{14-23}$  dont  $30\mu M$  de marqués dans du tampon Hépès à  $100mM$  et à un pH de  $7.4$ . Nous avons fait une série de 6 expériences dans lesquelles, nous faisons varier les débit d'entrées. En raison de problèmes expérimentaux que nous développerons plus tard seulement trois se sont avérées exploitables. Ces trois expériences ont été faites dans des puces en Y, les deux débits d'entrée ont été pris égaux, nous avons utilisé comme débit total  $1\mu L/min$ . Nous avons mesuré trois coefficients de diffusion qui se rapprochent des mesures faites en RMN et avec le précédent marquage (figure 5.20). Les valeurs obtenues sont :  $2.91 \times 10^{-10} m^2/s$ ,  $2.44 \times 10^{-10} m^2/s$  et  $2.77 \times 10^{-10} m^2/s$  ce qui donne respectivement des rayons hydrodynamiques de  $0.74$ ,  $0.88$  et  $0.78 nm$ .

Au vu des différents résultats obtenus, nous pouvons dire que la reproductibilité de nos mesures est de  $\pm 8\%$ , ce qui est important et pourrait s'avérer gênant pour l'étude de la cinétique d'agrégation. Une explication à cette variabilité peut être à chercher du côté des paramètres physiques tel que la température lors de la mesure, le pH et la viscosité des solutions. En effet, une augmentation de la température induit une baisse de viscosité, si nous faisons l'hypothèse que le rayon hydrodynamique est inchangé, d'après la relation de Stokes-Einstein, nous devons observer une augmentation du coefficient de diffusion (pour l'eau la viscosité varie d'environ  $2\%$  pour un passage de  $20^\circ$  à  $21^\circ$ ). Le pH influe sur le coefficient de diffusion en modifiant le repliement des molécules, le rayon hydrodynamique est alors modifié.

### Mesure du coefficient de diffusion de l' $A\beta_{1-28}$

De la même manière que pour l' $A\beta_{14-23}$ , nous avons mesuré le coefficient de diffusion de

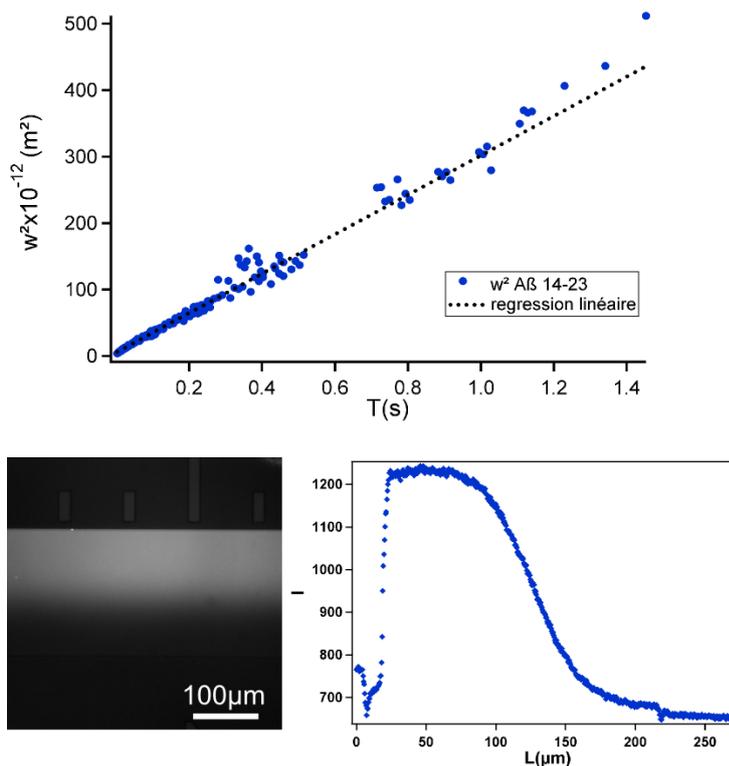


FIGURE 5.19 – Mesure du coefficient de l'A $\beta$ 14-23. Le graphique du haut représente  $w^2$  en fonction du temps. La photographie et le graphique illustrent le faible rapport signal sur bruit.

l'A $\beta$ 1 – 28 en utilisant un protocole expérimental similaire (concentration en peptide fixé à  $300 \mu\text{M}$  dont  $30 \mu\text{M}$  de marqués). En raison de problèmes expérimentaux, sur une série de 4 expériences une seule a été exploitable. Nous avons mesuré un coefficient de diffusion (figure 5.21) de  $1.97 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  ce qui correspond à un rayon hydrodynamique de 1.1nm. Cette valeur est à comparer avec celle que nous avons obtenu par mesure RMN : 1.56nm. Nous mesurons des coefficients de diffusion qui sont du bon ordre grandeur. Mais en raison du faible nombre de données, nous ne pouvons pas exploiter pleinement ce résultat.

### Problèmes expérimentaux

Sur les deux séries de mesures effectuées sur l'A $\beta$ 14 – 23 et l'A $\beta$ 1 – 28, peu d'expériences ont permis de mesurer les coefficients de diffusion des protéines. Nous avons été confronté à divers problèmes expérimentaux tels que un mauvais signal/bruit, l'agrégation non souhaitée du peptide ou des fuites au niveau des connexions fluidiques.

Le problème lié au faible rapport signal/bruit a pu être résolu grâce à l'amélioration du protocole de marquage, ainsi nous avons pu augmenter la fraction de peptides marqués dans les échantillons injectés et par là même améliorer le signal.

L'agrégation non souhaitée des peptides est un problème récurrent lors de ces expérimentations. En effet, nous pouvons discerner plusieurs causes. En premier lieu, une mauvaise manipulation (introduction d'un germe de nucléation, mauvais pH...) lors de la préparation de l'échantillon qui provoque un début d'agrégation. En raison de la prépondérance des surfaces dans les microsystèmes, une bulle d'air se stabilise en utilisant des surfactants. Or les peptides ont des parties hydrophiles et hydrophobes, ils se comportent comme un surfactant, se mettent à l'interface air/eau et commencent à s'agréger. Ce phénomène n'apparaît pas dans le cas d'une interface air/eau dans

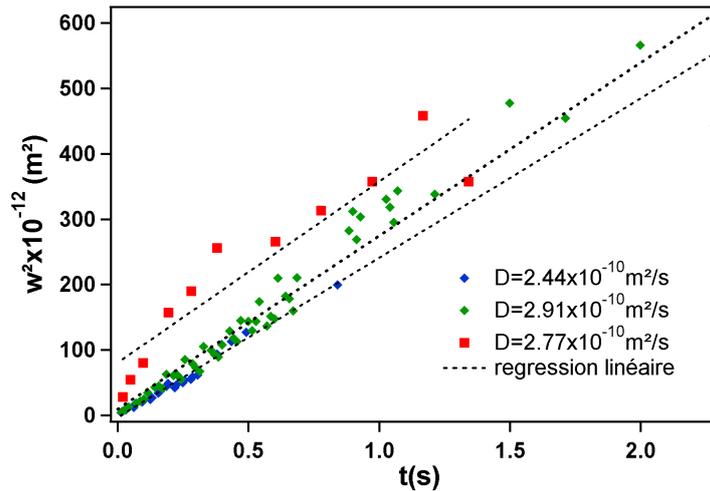


FIGURE 5.20 – Graphique présentant  $w^2$  en fonction du temps pour l'A $\beta$ 14-23 (troisième marquage).

un tube à essai.

Nous avons été confronté à des fuites au niveau des connexions fluidiques. Elles peuvent se manifester de plusieurs façons. Pour une puce en Y et des débits d'entrée égaux, nous observons une dissymétrie au niveau du front de diffusion, cela implique qu'il y a une fuite sur une des entrées. Cette dernière rend impossible une détermination précise de la vitesse moyenne de l'écoulement donc la détermination du coefficient de diffusion. Nous avons aussi eu des expériences où le front de diffusion semblait normal, mais lors du traitement des données, il est apparu que le D mesuré était très grand par rapport à celui attendu. Cette observation implique que la vitesse de l'écoulement est plus faible que celle que nous devons avoir théoriquement. Une méthode pour corriger ce problème aurait été d'ajouter à nos solutions des marqueurs fluorescents (billes) afin de pouvoir vérifier la vitesse moyenne de l'écoulement.

## Conclusion

Les coefficients de diffusion mesurés à l'aide de nos systèmes sont proches de ceux trouvés par RMN. Les différences observées entre les deux méthodes peuvent avoir pour origines différents facteurs, tels que la température de mesure (mal contrôlée dans le cas de nos systèmes), les différences de pH, la différence de composition des solutions (Eau deutérée dans le cas de la RMN, et tampon Hépès pour les mesures microfluidiques). En revanche, nous avons été confronté à de nombreux problèmes expérimentaux qui ne nous ont pas permis d'obtenir des mesures reproductibles comme ce fut le cas pour les molécules modèles (fluorescéine et rhodamine B).

## 5.3.4 Etude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$

Après avoir mesuré les coefficients de diffusion de ces deux peptides ( $A\beta$ 14 – 23,  $A\beta$ 1 – 28), nous avons essayé d'étudier leur agrégation. Nous avons choisi d'utiliser ces deux peptides car le déclencheur de l'agrégation est le même (le zinc) et leurs temps typiques d'agrégation sont très différents : inférieur à la seconde pour l'A $\beta$ 14 – 23 et de l'ordre d'une vingtaine de minute pour l'A $\beta$ 1 – 28.

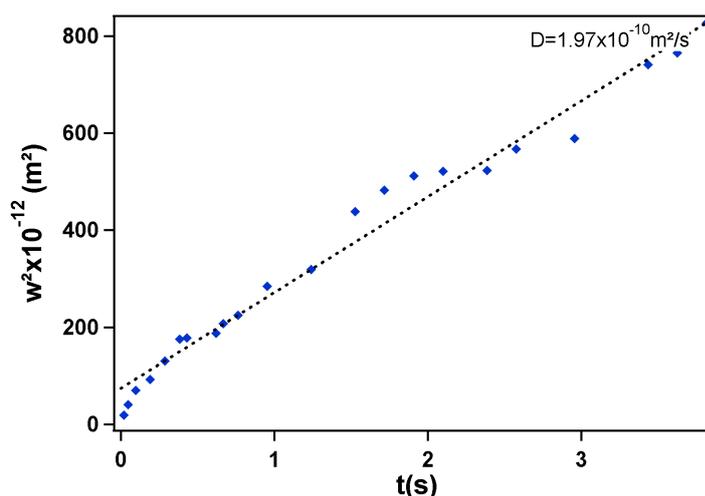


FIGURE 5.21 – Graphique présentant  $w^2$  en fonction du temps pour l'A $\beta$ 1-28 (troisième marquage).

### 5.3.4.1 Protocole expérimental

Pour les deux peptides, le protocole expérimental est le même. Nous mettons dans l'une des seringues, le peptide à une concentration de  $300\mu\text{M}$  dont  $30\mu\text{M}$  de marqués dans une solution de tampon Hépès à  $100\text{mM}$  et à  $\text{pH}=7.4$ . Nous mettons que 10% de peptides marqués afin de ne pas trop modifier les processus d'agrégation. Dans l'autre seringue, nous mettons une solution contenant l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  (dont le contre ion est le  $\text{SO}_4^{2-}$ ) dont la concentration varie de 10 à  $50\mu\text{M}$  selon les expériences. L'ion se trouve dans une solution tampon Hépès à  $100\text{mM}$  et  $\text{pH}=7.4$ . Nous plaçons à un débit fixe et nous relevons les profils tout au long de la canalisation.

### 5.3.4.2 Agrégation de l'A $\beta$ 14 – 23

Dans un premier temps, nous avons testé l'agrégation avec les puces en Y. Nous avons fait deux expériences où les concentrations en ions  $\text{Zn}^{2+}$  ont été respectivement de 25 et  $50\mu\text{M}$ , le débit total de  $1\mu\text{L}/\text{min}$ . Dans les deux cas, nous avons vu apparaître à l'interface entre les deux solutions (solution de peptides et de  $\text{Zn}^{2+}$ ) une bande fluorescente. De la même manière, nous avons fait une expérience similaire avec une puce en  $\Psi$  où la concentration en  $\text{Zn}^{2+}$  est de  $25\mu\text{M}$  et le débit de  $1\mu\text{L}/\text{min}$ . Ici aussi nous avons observé l'apparition de bande fluorescente dans les deux zones d'interdiffusion (figure 5.22).

Nous pouvons rapprocher de l'apparition de cette bande au phénomène que nous avons observé sur les puces à gradients. Ces observations nous avaient amenés à étudier ce qui se passait à l'interface. Pour cela nous avons dessiné des motifs en T (figure 5.23). Nous avons réalisé ces puces en verre-silicium et avons injecté par l'une des entrées de l'A $\beta$ 14 – 23 non marqué à une concentration de  $300\mu\text{M}$  dans une solution de tampon Hépès à  $100\text{mM}$  à  $\text{pH}=7.4$ , et par l'autre la même solution tampon avec des ions  $\text{Zn}^{2+}$  à une concentration de  $50\mu\text{M}$ . Nous suivons l'agrégation à l'aide de la Thioflavine T (ThT). L'injection se fait à l'aide d'un générateur de pression fluigent à l'aide d'un support adapté. Afin de regarder l'impact du débit sur l'évolution de la bande fluorescente, nous avons fait deux expériences dans les mêmes conditions, le seul paramètre qui varie est la pression d'entrée. Les deux pressions de travail sont 65 mbar et 110 mbar ce qui correspond respectivement à des débits de 1.5 et  $2.5\mu\text{L}/\text{min}$ . Pour les deux expériences, nous nous plaçons au début du mélangeur et nous regardons l'évolution de l'intensité maximale de la bande

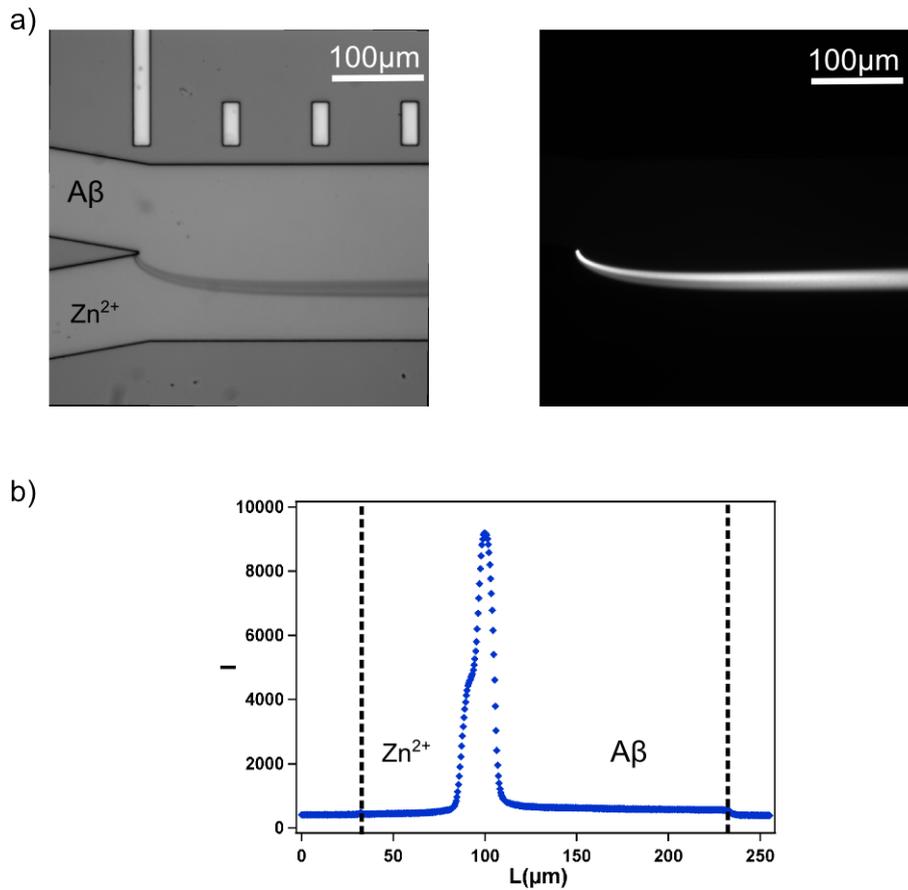


FIGURE 5.22 – a) Photographies en visible et fluorescence montrant la présence d'une adsorption des peptides au niveau de l'interface. b) Profil extrait de la photographie en fluorescence, plusieurs informations peuvent être obtenues comme la largeur, le maximum d'intensité.

fluorescente. Les paramètres d'acquisition (éclairage, temps d'exposition...) sont inchangés afin de pouvoir comparer les deux expériences. Lorsque nous regardons l'évolution de l'intensité maximale en fluorescence de ThT en fonction du temps, nous observons que pour les deux pressions nous avons deux droites, dont les pentes sont distinctes (figure 5.24), les coefficients directeurs sont de 35 (65mbar) et 78 (110mbar). En comparant le rapport des pressions et des coefficients directeurs dont les valeurs sont respectivement de 0.6 et 0.45, la différence entre ces deux rapports peut s'expliquer par une différence de cinétique d'absorption dû à une contrainte de cisaillement qui varie d'une expérience à l'autre.

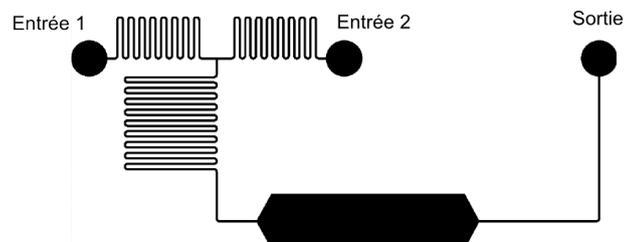


FIGURE 5.23 – Schéma d'une puce en T

Ces résultats laissent à penser que nous sommes en présence d'une accumulation de peptides

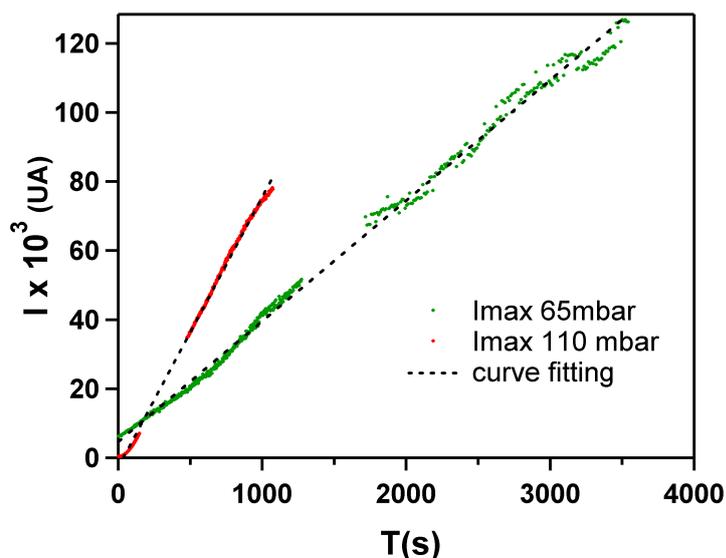


FIGURE 5.24 – Graphique représentant l'intensité maximale de la bande d'agrégation en fonction du temps pour deux pressions d'entrée différentes.

sur la surface en verre, ce qui rend la compréhension du problème beaucoup plus complexe (analyse de la cinétique d'agrégation et de l'adsorption des agrégats en surface : deux problèmes difficiles à appréhender). Pour confirmer cette hypothèse, nous avons rincé nos puces à l'aide de diverses solutions : isopropanol, soude à 1M, DMSO. Après chaque rinçage nous observons aussi bien en visible qu'en fluorescence la présence de la bande au niveau de l'interface. Cette observation confirme que nous sommes bien en présence d'agrégats collés sur la surface.

Lors de la mesure des coefficients de diffusion, nous n'avons observé aucun phénomène d'adsorption. Cela a nous a amené à nous interroger sur le rôle du zinc dans ce processus. En effet, les puces utilisées sont en verre-silicium, donc des fonctions "Si-OH" se trouvent à la surface des murs. En présence de solutions aqueuse (pH neutre ou basique), elles se déprotonent ce qui implique que la surface est chargée négativement et peut créer des interactions électrostatiques avec le zinc. Or, ce dernier est coordonné par l' $A\beta_{14-23}$  lors de l'agrégation, donc l'adsorption du zinc pourrait favoriser l'adsorption des peptides en surface.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons injecté dans une puce en  $\Psi$  les solutions suivantes :

- Entrée 1 :
  - solution tampon Hépès à 100mM à pH=7.4
  - $A\beta_{14-23}$  : 300 $\mu$ M dont 30 $\mu$ M de marqués
  - 10mM de  $Ca^{2+}$  et 10mM de  $Mg^{2+}$
- Entrée 2 :
  - solution tampon Hépès à 100mM à pH=7.4
  - 10mM de  $Ca^{2+}$  et 10mM de  $Mg^{2+}$

Les ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  n'entrent pas en jeu dans le mécanisme d'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Nous avons donc choisi de mettre une forte concentration en ces ions afin de saturer les charges de surface avec ces ions. Si lors de cette expérience nous n'observions pas la formation d'agrégats nous aurions pu utiliser ces ions comme "coating" afin d'empêcher l'interaction du  $Zn^{2+}$  avec les surfaces. Lors des expérience, nous avons observé l'apparition d'agrégats fixes sur l'ensemble de la canalisation (figure 5.25). Cette observation permet de dire que l'adsorption des peptides en

surface n'est pas spécifique à l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  et peut intervenir avec d'autres ions. Des expériences restent à mener pour connaître l'impact de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . En effet, nous ne nous attendions pas à voir des effets des ces ions sur l'agrégation, nous souhaitions juste saturer les sites de la surface.

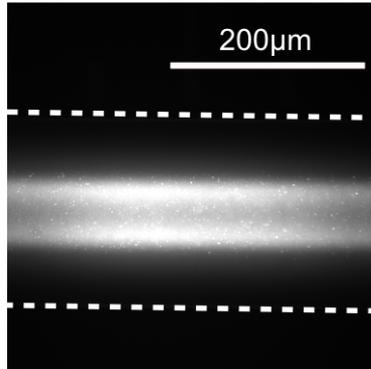


FIGURE 5.25 – Photographie montrant la présence d'agrégats lors de l'injection des peptides avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 5.3.4.3 Agrégation de l' $A\beta_{1-28}$

L' $A\beta_{1-28}$  contrairement à l' $A\beta_{14-23}$  a une cinétique d'agrégation lente (Temps caractéristique de l'ordre de la vingtaine de minutes). Nous espérons ne pas être confrontés au même problème d'adsorption qu'avec l' $A\beta_{14-23}$ , et rendre possible l'observation indirecte des premiers intermédiaires de l'agrégation. Nous avons réalisé une expérience à l'aide d'une puce en Y en se plaçant dans les conditions décrites dans le protocole expérimental ( $300\mu\text{M}$  d' $A\beta_{1-28}$  dont  $30\mu\text{M}$  de marqués,  $50\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $Q_{tot} = 1\mu\text{L}/\text{min}$ ). Comme pour l' $A\beta_{14-23}$ , nous avons observé l'apparition d'une bande fluorescente à l'interface des deux solutions (figure 5.26). Pour un temps donné, la bande a tendance à s'élargir. Pour les premiers instants (figure 5.26.a), nous observons la présence d'une diminution de l'intensité de fluorescence à proximité de la bande, cela peut se traduire par une consommation importante à proximité de cette zone provoquant la génération d'un gradient de concentration. L'évolution de l'intensité de la bande de fluorescente dans le temps est lié à une accumulation des peptides. Ces résultats nous permettent de dire que ce peptide a un comportement très différent de celui à l'échelle macro, cette différence peut être provoquée par la prépondérance des surfaces par rapport au volume lors de la miniaturisation.

#### 5.3.4.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons essayé d'étudier la cinétique d'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  en utilisant deux peptides modèles, l' $A\beta_{14-23}$  et l' $A\beta_{1-28}$ , dont les cinétiques sont pour la première rapide (de l'ordre de la seconde) et lente pour la seconde (de l'ordre de vingt minutes). Tout d'abord, avec l' $A\beta_{14-23}$ , nous avons observé une bande fluorescente due à un phénomène d'adsorption et d'agrégation des peptides en surface. Nous avons montré que ce n'était pas spécifique au déclencheur utilisé, en effet nous avons obtenu une bande d'agrégation en présence d'ions calcium et magnésium. Nous avons fait le même type d'expérience avec l' $A\beta_{1-28}$  en espérant que ce phénomène n'apparaisse pas grâce à sa cinétique plus lente. Malheureusement, nous avons été confronté au même phénomène. Nous avons montré que l'évolution de la bande fluorescente pouvait apporter des informations sur les cinétiques d'agrégation (forme du pic dans les premiers

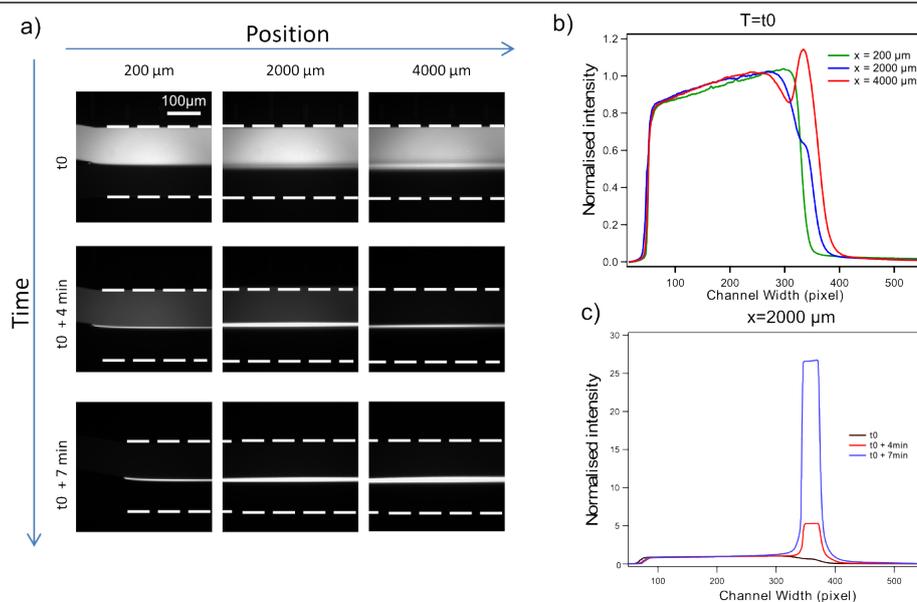


FIGURE 5.26 – a) Photographies présentant l'évolution de l'interface entre l' $A\beta 1 - 28$  et la solution de  $Zn^{2+}$ . b) Graphique présentant l'évolution de profil d'intensité pour un temps fixé  $t_0$ . c) Graphique présentant l'évolution du profil d'intensité en fonction du temps pour une place fixe dans la canalisation ( $x=200\mu m$ ).

instants, évolution de la largeur de la bande au cours du temps). L'observation de ce phénomène nous amène à penser que les surfaces jouent un rôle important dans l'agrégation et que pour améliorer notre système il pourrait être intéressant de les fonctionnaliser ou d'ajouter aux solutions une molécule permettant un coating dynamique de murs et ainsi obtenir des informations sur la cinétique d'agrégation. Une autre option serait de faire des expériences durant lesquelles nous étudierions la forme du profil et son évolution afin d'en extraire les constantes cinétiques intéressantes.

## 5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré la conception de puces microfluidiques permettant la mesure de coefficients de diffusion. Nous les avons d'abord réalisées en PDMS et nous avons montré que la déformation du PDMS ainsi que les fuites au niveau des entrées ne permettait pas d'obtenir des mesures correctes des coefficients de diffusion de molécules modèles. Nous avons alors utilisé des puces en verre-silicium, et nous avons montré que pour des molécules modèles (fluorescéine et rhodamineB) nous obtenions la même valeur du coefficient de diffusion quel que soit le débit ou la configuration choisis (puce en Y, puce en  $\Psi$ ). Cela nous a permis de valider le bon fonctionnement de notre méthode de mesure. Nous nous sommes intéressés à deux peptides modèles l' $A\beta 14 - 23$  et l' $A\beta 1 - 28$  dont les cinétiques d'agrégation sont différentes : la première est rapide et la seconde lente. Pour mesurer leur coefficient de diffusion, nous les avons marqués à l'aide d'un dérivé de la rhodamineB, la TRITC. Après avoir testé différents protocoles de marquage, nous avons mesuré le coefficient de diffusion des deux peptides, nous avons trouvé des valeurs proches de celles mesurées en RMN. Les différences peuvent s'expliquer par la différence de conditions entre les deux méthodes de mesure. En revanche, nous avons eu des problèmes de reproductibilité dans nos mesures à cause de problèmes expérimentaux récurrents. Nous avons tout de même

essayé d'étudier l'agrégation, nous avons alors observé l'apparition d'une bande fluorescente à l'interface entre la solution de peptide (aussi bien pour l' $A\beta_{14-23}$  que pour l' $A\beta_{1-28}$ ) et la solution de déclencheur. Nous avons montré que cette adsorption n'était pas spécifique à l'ion  $Zn^{2+}$ . Afin d'obtenir des informations trois solutions sont envisageables. La première consisterait à fonctionnaliser les surfaces afin d'éviter tout risque d'adsorption des peptides en surface. Mais ce process est difficile à mettre en œuvre et à caractériser. La seconde possibilité est de réaliser un coating dynamique en rajoutant une molécule aux solutions injectées qui va se déposer sur les surfaces et ainsi éviter l'adsorption des peptides mais cette deuxième voie modifie les conditions en solution. La dernière solution consisterait à faire des expériences et d'étudier l'évolution de la morphologie du pic (intensité et forme dans le temps) afin de pouvoir en tirer des informations sur la cinétique d'adsorption et d'agrégation des peptides. De plus, en changeant le déclencheur, nous pourrions connaître les ions favorisant ou inhibant l'agrégation.



# Références bibliographiques

- [1] R. ROYCHAUDHURI, M. YANG, M. HOSHI, AND D. TEPLow. *Amyloid  $\beta$ -protein assembly and alzheimer disease*. J. Biol. Chem. **284**, 4749–4753 (2009). 12, 13, 109
- [2] CULBERTSON C., JACOBSON S., AND RAMSEY M. *Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices*. Talanta **56**(2), 365–373 (2002). 46, 47, 115
- [3] GALAMBOS P. AND FORSTER F.K. *Microfluidic diffusion coefficient measurement*. MicroTAS (1998). 115
- [4] GENDRON P.O., AVALTRONI F., AND WILKINSON K. *Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Fluorescence **18**, 1093–1101 (2008). 115
- [5] GERVAIS T., EL-ALI J., GUNTHER A., AND JENSEN K. *Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels*. Lab Chip **6**, 500–507 (2006). 116, 117
- [6] HARDY B., UECHI K., ZHEN J., AND PIROUZ K. *The deformation of flexible pdms microchannels under a pressure driven flow*. Lab Chip **9**, 935–938 (2009). 116
- [7] Beta-amyloid (1-42), fam-labeled, (consulté en octobre 2012). <http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=49195>. 121, 125
- [8] VERPILLOT R., ESSELMANN H., MOHAMADI M.R., H. KLAFKI, POIRIER F., LEHNERT S., OTTO M., WILTFANG J., VIOVY J-L., AND TAVERNA M. *Analysis of amyloid- $\beta$  peptides in cerebrospinal fluid samples by capillary electrophoresis coupled with lif detection*. Analytical Chemistry **83**(5), 1696–1703 (2011). 9, 18, 121
- [9] HOSOYA O., CHONO S., SASO Y., JUNI K., MORIMOTO K., AND SEKI T. *Determination of diffusion coefficients of peptides and prediction of permeability through a porous membran*. Journal of Pharmacy and Pharmacology **56**, 1501–1507 (2004). 127



# Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé des dispositifs microfluidiques permettant l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ . Cette réaction tient une place importante dans le développement de la maladie d'Alzheimer, la compréhension des mécanismes réactionnels en fait un sujet de recherche important dans le domaine de la biochimie. L'étude de ces mécanismes a montré qu'ils mettent en jeu de nombreux facteurs (pH, ions métalliques, surface. . .) et que les premiers intermédiaires de réaction sont mal connus car ils sont difficilement caractérisables par les méthodes classiques. Face à ce constat, nous nous sommes attachés à développer un premier type de systèmes permettant la réalisation d'un criblage des conditions expérimentales, pour cela nous nous sommes basés sur la réalisation de gradient de concentration (chapitre 2). Les autres systèmes consistent à étudier la diffusion d'une solution d'amyloïde- $\beta$ , le but de ces puces est d'obtenir des informations sur les premiers instants de l'agrégation.

Dans l'optique de réaliser un criblage de concentration, nous avons tout d'abord conçu des puces réalisant un gradient de concentration linéaire permettant d'échantillonner neuf conditions expérimentales. Nous avons réalisé ces puces à l'aide d'une technologie PDMS (chapitre 3). Nous avons ensuite testé leur bon fonctionnement à l'aide de la fluorescéine. Nous avons montré que nous obtenions les formes de gradient souhaitées, et ce même pour des pressions supérieures à la pression maximale de fonctionnement attendue. A l'aide de ces systèmes, nous avons tenté de réaliser un gradient de concentration en A $\beta$ 40. Lors de l'injection des peptides, nous avons observé l'apparition d'agrégats diffus à l'intérieur de nos puces qui venaient colmater les canalisations et perturber le fonctionnement du gradient de concentration. Face à ce constat, nous avons décidé de changer l'architecture de notre système afin de séparer la partie préparation des échantillons et l'observation de l'agrégation. Pour cela, nous avons conçu des puces en deux parties, la première permet la génération d'un gradient de concentration linéaire et la seconde permet l'apport d'une solution contenant un élément déclencheur de l'agrégation (saut de pH, ions métalliques...). En modifiant les pressions d'entrée, nous pouvons contrôler précisément l'apport en solution de chaque partie, cela nous permet de faire varier les conditions expérimentales. Nous avons donc un outil de criblage permettant de tester un grand nombre de conditions expérimentales. Nous avons testé le fonctionnement de ces dispositifs et nous avons montré à l'aide de la fluorescéine qu'il est possible d'obtenir des gradients de concentration linéaires quel que soit l'apport de chaque partie du système. Le bon fonctionnement de la puce avec le peptide complet nous a permis de valider le principe du système, en effet, nous n'avons pas observé d'agrégat dans la partie gradient. Ensuite, nous avons effectué des expériences sur un peptide modèle, l'A $\beta$ 14–23, et avons montré l'existence d'un seuil de concentration, que nous n'avons cependant pas pu déterminer avec précision. En effet, nous avons observé une bande d'agrégation à la jonction entre la partie gradient et déclencheur, ce qui induit un biais dans la valeur de la concentration au niveau des zones d'observation. Nous avons donc réalisé un système permettant de générer un grand nombre de conditions réactionnelles différentes ce qui pourrait en fait un outil de choix pour l'étude des réactions chimiques. En revanche, l'approche s'est finalement avérée peu adaptée à l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$  en raison des problèmes d'adsorption observés.

L'observation de cette accumulation nous a mené à nous interroger sur les processus se déroulant à l'interface. Nous avons alors conçu des puces permettant de mesurer le coefficient de diffusion de molécules fluorescentes dans l'optique de mesurer le coefficient de diffusion de peptides marqués sans puis avec agrégation pour obtenir des informations sur les premières étapes de la réaction. Nous avons validé leur fonctionnement à l'aide de deux molécules modèles, la fluorescéine et la rhodamine B. Puis nous avons procédé au marquage de deux peptides modèles, l' $A\beta_{14-23}$  et l' $A\beta_{1-28}$  dont l'agrégation est déclenchée par l'ion  $Zn^{2+}$ . Ces deux protéines se distinguent par leurs cinétiques d'agrégation : le premier est rapide (de l'ordre de la milliseconde) et le second plus lent (de l'ordre de la minute). Dans des conditions non-agrégeantes, nous avons réalisé des mesures de coefficient de diffusion sur ces deux protéines, nous trouvons des résultats cohérents avec la littérature et les mesures RMN effectuées. Ensuite nous avons placé les peptides dans des conditions d'agrégation, nous avons observé à l'interface l'apparition d'une bande fluorescente caractéristique de l'adsorption des peptides en surface et ce avec les deux peptides. Trois solutions peuvent être envisageables pour résoudre ce problème : (i) la fonctionnalisation des surfaces, (ii) l'utilisation d'un « coating » dynamique et (iii) faire des mesures permettant d'étudier l'évolution de la morphologie du pic (intensité et forme dans le temps et selon la position) afin de pouvoir en tirer des informations sur la cinétique d'adsorption et d'agrégation des peptides.

A travers les expériences menées sur les deux types de systèmes, il est apparu que le phénomène limitant leur bon fonctionnement est l'adsorption des peptides sur les surfaces. En effet leur adsorption rend plus difficile la compréhension du mécanisme d'agrégation et l'obtention de données sur les conditions d'agrégation. Pour que ces systèmes soit fonctionnels pour l'étude de l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , il est impératif de résoudre ce problème en faisant appel à des traitements de surface (fonctionnalisation, « coating dynamique » des surfaces). Une autre option serait de changer d'approche et d'utiliser la génération de gouttes à l'aide de dispositifs microfluidiques. L'interface entre la phase aqueuse et d'huile peut être parfaitement contrôlé en utilisant des surfactants adaptés à cette étude. Au-delà de ces problèmes d'adsorption, cette thèse a permis de développer des systèmes microfluidiques permettant de réaliser des criblages de conditions réactionnelles tout en séparant la préparation des échantillons et le déclenchement de la réaction. De plus ces systèmes sont complétés par les puces permettant d'étudier la diffusion. En effet ces dispositifs permettent d'obtenir des informations sur les cinétiques de réactions. La combinaison de ces deux approches permet d'étudier précisément tous les aspects d'une réaction chimique. Concernant l'agrégation de l'amyloïde- $\beta$ , la connaissance de la taille moyenne des agrégats pour un temps donné nous permettrait de pouvoir extraire les différentes populations et d'étudier avec précision leurs compositions. Après cette étude, il pourrait être intéressant de mettre en contact les différents échantillons sur des neurones afin de connaître leurs toxicités. Des études ont montré qu'il était possible de faire pousser des neurones dans des puces microfluidiques. Il est donc envisageable de combiner ces deux aspects dans un système microfluidique intégrant toutes ces fonctionnalités (sélection de population puis injection sur les neurones).