



**HAL**  
open science

# Etude des interactions vibro-acoustiques avec les gouttes Application à un micromélangeur pour le greffage moléculaire

Faten Kardous

► **To cite this version:**

Faten Kardous. Etude des interactions vibro-acoustiques avec les gouttes Application à un micromélangeur pour le greffage moléculaire. Autre. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA2034 . tel-01062544

**HAL Id: tel-01062544**

**<https://theses.hal.science/tel-01062544>**

Submitted on 10 Sep 2014

**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.

# THÈSE

présentée à

L'UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

pour obtenir le

**GRADE DE DOCTEUR  
DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ  
Spécialité Sciences Pour l'Ingénieur**

**Etude des interactions vibro-acoustiques avec les gouttes  
Application à un micromélangeur pour le greffage moléculaire**

par

**Faten KARDOUS**

**Soutenance le 16 février 2011**

**Président**

C. BERGAUD      Directeur de Recherche CNRS, LAAS-CNRS, Toulouse

**Rapporteurs**

J.-F. ROUCHON      Professeur, Institut National Polytechnique de Toulouse, INPT

D. GRENIER      Professeur, École Normale Supérieure de Cachan , ENS, Cachan

**Examineurs**

J.-P. CLOAREC      Maître de conférence HDR, Ecole Centrale de Lyon

J.-F. MANCEAU      Professeur, Université de Franche Comté

R. YAHIAOUI      Maître de conférences, Université de Franche Comté



*A mes parents et mon frère,  
A ma famille et mes amis,  
A mes enseignants à  
(Khaznadar, Khairdine Pecha, Hammouda Pecha, IPEIT, Enit, Enseeiht),  
A moi, mon cadeau d'anniversaire sans doute le précieux,*

*" Les filles se souviennent du jour de leur naissance et en oublient l'année. "*



ChapitreChapter



# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>1</b>
<b>Table des figures</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre 1 Introduction générale</b>	<b>9</b>
1.1 Principes physiques pour l'activation de mélange . . . . .	12
1.1.1 Actionnement par électrochimie . . . . .	13
1.1.2 Actionnement par faisceau laser . . . . .	14
1.1.3 Actionnement électrostatique . . . . .	15
1.1.4 Actionnement par champ magnétique . . . . .	20
1.1.5 Actionnement par des ondes acoustiques de surface . . . . .	23
1.1.6 Actionnement par vibration de structure . . . . .	24
1.2 $\mu$ Systèmes dédiés au greffage moléculaire . . . . .	25
1.2.1 Immobilisation de biomolécules à travers des $\mu$ canaux . . . . .	25
1.2.2 Immobilisation d'ADN par EWOD . . . . .	27
1.2.3 Transport et guidage de biomolécules à travers un microcanal par EOF et EKF . . . . .	27
1.2.4 Couplage de l'actionnement par ondes acoustiques de surface avec la détection SPR <sub>i</sub> . . . . .	28
1.2.5 Elimination de l'immobilisation non spécifique des protéines par QCR. . . . .	29
1.2.6 Elimination de l'immobilisation non spécifique des protéines par SAW . . . . .	30
1.3 Présentation de la thèse . . . . .	31
<b>Chapitre 2 Microdispositifs fluidiques : modélisations, réalisations et caractérisations</b>	<b>35</b>
2.1 Dispositifs Basse Fréquence réalisés au laboratoire . . . . .	37
2.2 Transducteur d'activation de mélange . . . . .	39
2.2.1 Transducteur pour une goutte . . . . .	39
2.2.2 Transducteur matriciel . . . . .	53



2.2.3	Traitement "individuel" de gouttes . . . . .	71
<b>Chapitre 3</b>	<b>Modélisation des écoulements induits par excitation acoustique dans un fluide</b>	<b>75</b>
<b>Nomenclature</b>		<b>77</b>
3.1	Position du problème physique . . . . .	79
3.2	Modélisation mathématique du problème . . . . .	80
3.2.1	Equations de Base . . . . .	80
3.2.2	Streaming acoustique . . . . .	81
3.3	Modélisation numérique . . . . .	85
3.4	Applications numériques . . . . .	86
3.4.1	Application 1 : Couche infinie d'air . . . . .	86
3.4.2	Application 2 : Section de liquide entourée d'air . . . . .	87
3.4.3	Application 3 : Couche infinie de liquide . . . . .	90
<b>Chapitre 4</b>	<b>Application au domaine biologique</b>	<b>97</b>
4.1	Principaux types de biocapteurs . . . . .	100
4.2	Principe de la biorecognition . . . . .	102
4.3	Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur(chimique) . . . . .	102
4.4	Optimisation du greffage par agitation acoustique . . . . .	104
4.4.1	Principe de la mesure SPR . . . . .	104
4.4.2	Sensibilité du greffage à divers paramètres . . . . .	106
4.4.3	Etape d'immobilisation, conditions expérimentales . . . . .	111
4.4.4	Caractérisation SPRi de l'apport acoustique au greffage. . . . .	113
4.4.5	Caractérisation en temps réel du greffage par un biocapteur à onde de Love . . . . .	118
4.4.6	Modélisation de l'apport de l'agitation sur le greffage : diffusion ou transport . . . . .	127
4.4.7	Caractérisation XPS . . . . .	132
<b>Conclusions et perspectives</b>		<b>137</b>
<b>Annexe A</b>	<b>La piézoélectricité</b>	<b>141</b>
A.1	Quelques notions sur la piézoélectricité . . . . .	141
A.1.1	Piézoélectricité naturelle . . . . .	141
A.1.2	Piézo-électricité artificielle . . . . .	142
A.2	Différents matériaux piézoélectrique . . . . .	142
<b>Annexe B</b>	<b>Viscosité des solutions aqueuses en glycérol</b>	<b>147</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>149</b>

# Remerciements

Ce chapitre est sans doute le plus difficile à rédiger étant donnée l'anxiété d'être ingrate par l'oublie d'une aide dissimulée dans ces trois années de thèse qui à son temps était certainement précieuse. Je tiens avant tout à m'excuser en cas d'oublie involontaire... Cette liste de noms n'est sans doute pas exhaustive.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le fruit de trois années de recherche au sein de l'institut FEMTO-ST et plus particulièrement au département **Micro Nano Sciences et Systèmes (MN2S)** à Besançon. Je voudrais tout d'abord remercier le directeur de cet institut Monsieur Michel de Labachellerie et les directeurs successifs du département, Monsieur Vincent Laude, et Monsieur Frédéric Chérioux pour m'avoir accueillie dans leurs locaux, veiller sur le bon déroulement de la thèse et me faire profiter de leurs précieux conseils.

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur Jean-François Rouchon, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Toulouse et Monsieur Damien Grenier, Professeur des universités à l'ENS de Cachan, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et de faire partie du jury. J'adresse mes remerciements à Monsieur Christian Bergaud, Directeur de Recherche CNRS au LAAS de Toulouse et Monsieur Jean-Pierre Cloarec, Maître de conférences HDR à l'Ecole Centrale de Lyon pour avoir accepté de faire partie du jury et examiner ce manuscrit. J'exprime mes remerciements à Monsieur Jean-François Manceau, Professeur, et Monsieur Réda Yahiaoui, Maître de conférences, à l'Université de Franche Comté à Besançon pour avoir dirigé ces travaux de recherche. Je ne remerciais jamais assez Réda pour m'avoir encouragée, soutenue et remontée la morale tout au long des trois années de thèse. Sans lui, cette thèse n'aurait probablement pas abouti.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Boujema Aoubiza, Maître de conférences à l'Université de Franche Comté pour m'avoir formée aux calculs scientifiques et à la modélisation par éléments finis. Je ne vous remerciais jamais assez d'avoir accepté de m'encadrer sur la partie théorique. Grâce à vous, un modèle des interactions vibro-acoustique avec les liquides est mis en place et commence à apporter ses fruits ; sans parler des connaissances précieuses avec lesquelles vous avez sans doute augmenté mes capacités intellectuelles et enrichie mon curriculum vitae.

J'adresse mes sincères reconnaissances à Monsieur Wilfrid Boireau, Chercheur CNRS qui a su me faire profiter de ses connaissances et expériences en encadrant mon travail dans le domaine biologique. Il n'a

pas hésité à financer mes expériences au delà de la manipulation biologique ; sans parler du financement d'une de mes conférences internationales. Merci Wilfrid d'avoir cru en moi. J'ai également été ravie de pouvoir travailler avec l'équipe biologique, en particulier Alain Rouleau (pour toutes nos manipulations foireuses et celles qui ont abouti, et pour son précieux soutien. Garde le secret de notre méthode de spotting automatique !) et Benoît Simon (pour PEG-mPEG mais aussi pour toutes les fois où il m'a cassé le morale sans parler de sa blague inoubliable en prétendant le refus de notre premier article).

Je remercie profondément Mademoiselle Lamia El Fissi, Docteur de l'Université de Franche Comté, Monsieur Jean-Michel Friedt, Ingénieur de recherche HDR de SENSEOR, et Monsieur Sylvain Ballandras, Directeur de Recherche CNRS à l'institut Femto-ST avec qui j'ai eu le grand plaisir de coopérer. Ils ont su partager avec moi leurs expériences et connaissances pour mener à bien cette partie de ma thèse. Avec eux, je me devais d'avoir toutes mes neurones pour une discussion scientifique rapide !

J'adresse ma gratitude à Monsieur Bernard Cretin, Monsieur Pascal Verac, Madame Thérèse Leblois, Monsieur Franck Chollet, Monsieur Michel Bernier, Monsieur Jean-Yves Rauch, Monsieur Emile Carry et Monsieur Vincent Walter qui m'ont permis d'acquérir une expérience d'enseignement à travers les vacances qu'ils m'ont généreusement accordé.

Je voudrais témoigner de ma gratitude envers Monsieur Vincent Laude qui a financé ma première conférence internationale, Monsieur Wilfrid Boireau pour avoir financé ma seconde conférence, mon très cher père pour avoir financé ma toute dernière, et toute l'équipe MIMU qui a financé mon séjour à Besançon pour ma soutenance.

La réalisation de mes micro-dispositifs n'aurait JAMAIS abouti sans le soutien sans faille de la grande famille de la centrale technologique MIMENTO. Merci donc à Jean-Claude pour m'y avoir accueillie ; Valérie (la gentillesse incarnée) ; Jean-Yves (notre chanteur d'Opéra) ; Pascal (qui m'a jamais refusé un travail en urgence) ; Denis (faut pas toucher à la partie réservée à Denis) ; Blandine (la découpe est un moment de détente) ; etc. Merci pour votre disponibilité, vos bons conseils et votre bonne humeur.

Une pensée de reconnaissance vers toutes les personnes qui m'ont aidée à bien préparer ma présentation orale dans un intervalle de temps assez court, qui n'ont pas hésité à assister doublement à ma présentation (Fred, Jean-Michel, Boujema, Sarah, Franck, Khaled, Younes, Rabah, Julien, Alain, Benoît, etc.). Merci à tous !

Une thèse ne pourrait se faire sans l'aide d'un grand nombre de personnes. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de FEMTO-ST et plus particulièrement : Joëlle et Myriam pour leur gentillesse, leur soutien et leur bonne humeur, Fatiha et Sarah Djaouti (grâce à vous, partir en mission est d'une simplicité incroyable).

---

Merci à tous ceux qui ont contribué par leur bonne humeur à l'ambiance agréable que j'ai apprécié pendant trois ans. La liste n'est pas exhaustive : Sofiane (Sidi 5ouya) et Lamia (Dr. Fakkoussa), Najla (petite soeur) qui m'ont aidée à surmonter les différentes épreuves de ma thèse (Jazakom Allahou 3anni khayran), mon cher Julien (t.a.j.f.l.m.a.), mes deux adorables thésardes : Aurélie (Okhti) et Cécile, Thomas (Dabdoub, akoul), Seb (UNO), Jonathan (toujours avec nous malgré la distance), Khaled (KOCHARI), Alex (Bien aimé), Fabien ( le bleu), Nathalie (Il suffit d'y croire), Mohamed (Rabbi Ytamem 3ala 5ire), Yakoub, Younes, Kamel ( Qui a gagné le match ?)...C'est aussi grâce à eux que je vais garder un bon souvenir de mon passage à Besançon.

Je ne remercierai jamais assez mes parents sans eux rien n'aurait été possible, mon jeune frère Hamed qui restera jeune à mes yeux même s'il a été le premier rapporteur de mon manuscrit de thèse et aussi celui qui apporté le plus de modifications (Je t'ai détesté sur le coup), ma famille (Je ne commencerai pas à citer des noms, sinon j'en aurais pour un chapitre à part) et mes proches Chahrazed, Khaled(x2), Amina (x2), Soad, Rajaa, Khadija, Abd El Malek et toute l'équipe du centre. Henda, Khoulood, Abdou, Ranime, Elyes, Safsaf, 3antar (etc = On sait jamais), et tous mes jeunes enfants du centre, c'est à vous de porter le flambeau maintenant !

Et enfin une forte pensée de gratitude à mes compatriotes tunisiens qui ont su nous rendre LIBRE le 14 Janvier 2011 par leurs remarquables courage et intelligence.

**Vive la TUNISIE libre et " démocratique " !**

**Faten Kardous**



# Table des figures

1.1	Circulation de deux liquides côte à côte dans un microcanal sans observation de mélange naturel - Extraits de [1] . . . . .	12
1.2	Schéma du principe de déplacement par électrochimie. . . . .	13
1.3	Superposition de 6 images montrant le déplacement d'une goutte sur une durée de 35 s - Extrait de [2]. . . . .	14
1.4	Une goutte <i>G</i> , posée sur un support solide <i>S</i> , est exposée à un gradient d'intensité lumineuse grâce à un coin absorbant <i>A</i> [3]. . . . .	14
1.5	Schéma de principe de l'electrowetting. . . . .	16
1.6	Schéma de principe de l'electrowetting on dielectric (EWOD). . . . .	17
1.7	Schéma de principe de déplacement par EWOD dans une structure fermée [4]. . . . .	17
1.8	Puce EWOD développée au LETI/CEA [5]. . . . .	17
1.9	Vues de face et de dessus du mélangeur par EWOD - Extrait de [6]. . . . .	18
1.10	Vue de dessus du mélange observé à un interval de 1,2 secondes sous excitation - Extrait de [6] . . . . .	18
1.11	Principe de déplacement d'une microgoutte sous l'action d'une différence de potentiel. . . . .	19
1.12	Photos montrant le déplacement d'une goutte d'un plot à un autre [7]. . . . .	19
1.13	Principe de la manipulation diélectrophorétique liquide/liquide [8]. . . . .	20
1.14	Schéma du système de manipulation de gouttes par champ magnétique. . . . .	21
1.15	Schéma du canal magnétique créé par imbrication de deux niveaux de microbobines [9]. . . . .	21
1.16	Déplacement d'une goutte de 3 $\mu$ l autour d'une microbobine. Le diamètre des particules est de 250 nm [9]. . . . .	22
1.17	(a) et (b) Simulation de la dispersion de traceurs dans le mélangeur MHD [10] . . . . .	22
1.18	Platedorme de déplacements et de mélanges de gouttes par MHD [11]. . . . .	23
1.19	Mélange induit dans une goutte de 50 nm de volume. La poudre fluorescente déposée sur la surface active est rapidement dissolue dans la goutte . . . . .	24
1.20	Plateforme de déplacements et de mélanges de microgouttes par SAW- Extrait de [12] . . . . .	24
1.21	Illustration d'un cycle de déplacement d'une goutte par vibration de structure - Extrait de [13]. . . . .	25

1.22	Présentation d'une matrice de microcanaux avec 96 zones d'intersection adaptée à l'instrumentation SPR : (a) présentation des niveaux (b) photographie du dispositif réalisé. - Extrait de [14] . . . . .	26
1.23	(a) Schéma de principe (b) Photographie, d'un Microspotteur à Flux Continu - Extrait de [15] . . . . .	27
1.24	Présentation schématique de la plateforme EWOD adaptée à une biopuce $SPR_i$ (a) en coupe verticale, (b) en vue 3D, (c) montrant la disposition des électrodes et des réservoirs, (d) vue de la biopuce inversée montrant les zones immobilisées en ADN, et (e) biopuce assemblée avec le prisme pour la détection $SPR_i$ - Extrait de [16] . . . . .	28
1.25	Plateforme EOF pour guidage de molécules à travers un canal fluïdique - Extrait de [17]	28
1.26	Schéma de principe montrant l'intégration de la surface sensible à l'SPR et des peignes interdigités du dispositif SAW sur un même substrat $LiNbO_3$ - Extrait de [18] . . . . .	29
1.27	Cellule fluïdique QCR avec les connexions fluïdiques et électriques intégrées - Extrait de [19] . . . . .	29
1.28	Mesure 3D par fluorescence avant (a) et après (b) l'opération QCR : élimination des agrégats - Extrait de [19] . . . . .	30
1.29	Images d'une matrice de spots immobilisés en anticorps (a) avant et (b) après le rinçage acoustique. Matrice de spots d'antigène (c) immobilisés de façons spécifique et non spécifique (d) après le rinçage acoustique - Extrait de [20] . . . . .	31
2.1	a) Couche d'eau au repos, b) Couche d'eau déformée par la vibration de la surface. . . . .	37
2.2	Structure bouclée pour le déplacement acoustique de liquide - Extrait de [21] . . . . .	38
2.3	Excitation d'un mode décalé dans l'espace. . . . .	38
2.4	Dispositif pour le déplacement de liquides par vibrations basses fréquences - Extrait de [22]	39
2.5	Photographies d'une goutte soumise à différents niveaux de vibration ; (a) goutte au repos, (b) apparition de l'onde capillaire, (c) nébulisation. . . . .	39
2.6	Apparition d'écoulements hydrodynamiques dus au champ acoustique . . . . .	40
2.7	Schéma de principe d'un transducteur acoustique en coupe et son modèle simplifié . . . . .	40
2.8	Maillage retenu pour la simulation en utilisant ANSYS multiphysiques ; le pas de maillage est $250 \mu m$ . . . . .	41
2.9	Mode de vibration retenu du transducteur . . . . .	41
2.10	Etapes du procédé de fabrication de la structure Si relative au transducteur . . . . .	44
2.11	Face arrière du transducteur pour une goutte. . . . .	44
2.12	La structure Si reportée sur un connecteur PCB . . . . .	45
2.13	Structurations des électrodes de la piézocéramique . . . . .	46
2.14	Schéma fonctionnel du montage . . . . .	46
2.15	Dispositif expérimental utilisé pour mesurer l'angle de contact . . . . .	47
2.16	Les angles de contact (a) en absence et (b) en présence de champ acoustique . . . . .	47

2.17 (a) Variation de la température en fonction du temps pour différentes tensions d'excitations (b) Augmentation de la température $\Delta T$ en fonction de la tension d'excitation . . . . .	49
2.18 (a) Points de mesures, (b) et (c) Evolution de la température de surface de l'élément piézoélectrique en fonction du temps . . . . .	50
2.19 (a) Variation de la température en fonction du temps pour différentes viscosités (b) Augmentation de la température $\Delta T$ en fonction de la viscosité. . . . .	51
2.20 (a) Température en fonction du temps pour différents volumes (b) Augmentation de la température $\Delta T$ en fonction du volume. . . . .	52
2.21 (a) Activation du mélange interne aux gouttes d'une matrice de (2,2) (b) Schéma de la face avant du transducteur acoustique . . . . .	53
2.22 Angle de contact d'une goutte d'eau de 400 nL posée sur une lamelle en Si oxydée . . . . .	54
2.23 Modélisation de la structure globale : membrane Si collée à un élément piézoélectrique . . . . .	55
2.24 Etapes du procédé de fabrication pour la réalisation des puits . . . . .	56
2.25 Caractérisations MEB de la structure Si . . . . .	56
2.26 Transducteur matriciel, activateur de mélanges internes aux gouttes . . . . .	56
2.27 Amplitude et phase du transducteur matriciel (b) Phase du transducteur entre 0 et 26 kHz. . . . .	57
2.28 Image du mode dégénéré n° 5 par une sonde interférométrique . . . . .	57
2.29 Etapes de fonctionnement de la microscopie à fluorescence . . . . .	58
2.30 Enregistrement du mélange des réactifs A et B : $t < 0$ sans excitation acoustique, $t > 0$ avec excitation acoustique. Réactif-A : une goutte de 200 nL d'eau à 40% de glycérol, Réactif-B : une goutte de 200 nL d'eau contenant des anticorps fluorescents. . . . .	58
2.31 Enregistrement du mélange des réactifs A et B : $t < 0$ sans excitation acoustique, $t > 0$ avec excitation acoustique. Réactif-A : une goutte d'eau contenant de la rhodamine, Réactif B : une goutte d'eau à 40% de glycérol . . . . .	59
2.32 Deux images prises avec un intervalle de 8 s : Solution à 20 % de glycérol sous une tension d'excitation de 90 V. . . . .	60
2.33 Vitesse moyenne des particules en fonction de ((a) et (b)) la tension d'excitation, (c) du pourcentage de glycérol dans la goutte . . . . .	61
2.34 (a) Une goutte de 400 nL d'eau posée à l'intérieur d'un puits puis (b) écrasée par une lame en verre. . . . .	62
2.35 Phénomène d'évaporation s'intensifiant en fonction de l'amplitude d'excitation . . . . .	62
2.36 Evolution de la fréquence de résonance du transducteur en fonction de l'amplitude d'excitation . . . . .	63
2.37 Disposition de la matrice de gouttes sur la surface du transducteur . . . . .	64
2.38 Evolution de la température en fonction du temps sous excitation acoustique pour différentes gouttes. . . . .	64
2.39 Evolution de la température sous excitation acoustique en fonction du temps dans un intervalle de [0 2 mn], pour différentes gouttes . . . . .	64
2.40 Intégration de la mesure de la température $T_f$ sur la surface S . . . . .	65



2.41	Variation de la température en fonction du temps en présence d'agitation acoustique ; une mesure ponctuelle par goutte . . . . .	67
2.42	Un point de mesure par goutte . . . . .	68
2.43	évolution de la température de gouttes 400nl en absence du champ acoustique . . . . .	68
2.44	(a) Image IR de l'élément piézoélectrique, (b) Cycle de variation de la température moyenne des électrodes . . . . .	69
2.45	Matrice de 5 gouttes piégée entre le transducteur et une lame de verre . . . . .	69
2.46	Variation de la température en fonction du temps sous agitation acoustique en configuration confinée . . . . .	70
2.47	Variation de la température en fonction du temps pour différentes tensions d'excitations.	71
2.48	Augmentation de la température maximale en fonction de la tension d'excitation . . . . .	72
2.49	Simulation du mode de vibration, ANSYS Multiphysiques . . . . .	72
2.50	(a) Répartition de la colle sur la membrane (b) Des piézocéramiques miniatures collées sur la membrane en silisium . . . . .	73
3.1	Représentation de la disposition de la goutte . . . . .	79
3.2	Schéma synoptique d'une section de liquide entourée d'air . . . . .	80
3.3	Schéma synoptique d'une couche de fluide infinie soumis à une vibration locale . . . . .	85
3.4	Schéma énumérant les différents domaines considérés pour la modélisation . . . . .	85
3.5	Isobares de la pression de streaming $p_s$ . . . . .	87
3.6	Les isolignes de la source de masse $\dot{m}$ . . . . .	88
3.7	Les isolignes des composantes horizontale $f_x$ et verticale $f_y$ de la force $\vec{f}$ . . . . .	88
3.8	Isolignes de la composante horizontale $f_x$ de la force $\vec{f}$ . . . . .	89
3.9	Isobares de la pression de streaming $p_s$ . . . . .	89
3.10	Champ des vitesses de streaming $\vec{v}_s$ . . . . .	90
3.11	Norme de la vitesse de streaming $ \vec{v}_s $ . . . . .	90
3.12	Cas 2 : couche infinie de liquide . . . . .	94
4.1	Principe de fonctionnement d'un biocapteur . . . . .	99
4.2	Représentation d'une cartouche microfluidique d'un système de mesure SPR (Biacore) .	99
4.3	Méthodes d'immobilisation d'une enzyme - Extrait de [23] . . . . .	102
4.4	De la fonctionnalisation chimique à l'immobilisation des anticorps, l'anticorps est symbolisé par la lettre 'Y' . . . . .	103
4.5	Principe de la SPR - Extrait de [24] . . . . .	105
4.6	Explication du sensorgramme de la réaction Ac-Ag (source Biacore AB) . . . . .	106
4.7	Sensorgramme des réactions antigéniques de spots immobilisés avec des solutions tampons de pH différents . . . . .	107
4.8	Variation de reflectivité pour différentes concentrations en anticorps en fonction du temps.	108
4.9	Niveau de réponse des spots immobilisés en fonction de la concentration des gouttes mères.	108

4.10	Sensorgramme : Réponses antigéniques des spots immobilisés pour différentes concentrations en glycérol de la solution porteuse d'anticorps. . . . .	109
4.11	Variation de réflectivité pour différentes valeurs de la température en fonction du temps..	109
4.12	Sensorgramme des réponses antigéniques de spots immobilisés avec différents temps d'incubation . . . . .	110
4.13	Activation du mélange interne à la microgoutte par le biais du transducteur acoustique. .	111
4.14	Système de mise en contact et d'alignement de la biopuce avec le transducteur acoustique. (a) Système global (b) zoom sur le contact biopuce-transducteur. . . . .	112
4.15	Analyse d'impédance du transducteur acoustique autour de la fréquence de fonctionnement, $f_{res} = 18.74kHz$ . . . . .	113
4.16	Tension d'excitation du transducteur et la tension de réponse de l'électrode témoin . . .	113
4.17	Sensorgramme de la réaction antigénique, points de mesure pour l'estimation de la densité de surface . . . . .	114
4.18	Positions des gouttes sur la membrane du transducteur. . . . .	115
4.19	Image SPRi en contraste de phase de la biopuce activement immobilisée, inversion des nuances Noir/Blanc pour faciliter l'impression . . . . .	115
4.20	Réponse d'un ROI immobilisée acoustiquement à différentes solutions antigéniques (100 nM, 100 nM puis 250 nM). . . . .	116
4.21	Réponses de deux spots (courbes continues) immobilisés sans agitation acoustique (A) et avec agitation acoustique (B) et de leurs références respectives (courbes discontinues) à l'injection d'une solution antigénique (250 nM). . . . .	117
4.22	Topographie de la variation de réflectivité ( $\Delta R$ ) de deux biopuces passivement (a et c) et activement (b et d) immobilisées en réponse à une solution antigénique de 250 nM. Le pourcentage de réflectivité suivant l'axe des z, les coordonnées des spots suivant les axes x et y. . . . .	118
4.23	Variation maximale de réflectivité par spot, en réponse à des solutions antigéniques de 100 nM et 250 nM d'une biopuce standard (Activation OFF) et une biopuce acoustiquement immobilisée (Activation ON). Un gain moyen enregistré de 2.6 à 2.8. . . . .	119
4.24	Schéma d'un capteur à ondes de Love . . . . .	119
4.25	(a) Photographie des capteurs acoustique à onde de Love duals collés sur un circuit imprimé (26x26 mm <sup>2</sup> )x e. (b) Réponse typique du capteur à onde de Love. . . . .	120
4.26	Schéma du banc expérimental. . . . .	121
4.27	Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur	122
4.28	Réponse temporelle typique du capteur à onde de Love à un greffage sur sa zone sensible	124
4.29	Variation de la phase du capteur en fonction du temps en réponse au greffage d'anticorps sur la zone sensible, comparaison entre les modes passif et actif. . . . .	124
4.30	Réponse du capteur à onde de surface en réponse à la formation de complexes Ac-Ag sur sa zone sensible . . . . .	126
4.31	Réponse du capteur à onde de Love à une réaction antigénique suivie d'une régénération.	127

4.32	Diffusion des molécules biologiques du liquide sur la surface du transducteur . . . . .	128
4.33	Evolution des profils de concentration avec la durée de diffusion pour trois valeurs du temps . . . . .	129
4.34	Evolution des profils de concentration avec la durée de diffusion pour trois valeurs du temps . . . . .	130
4.35	Variation de la phase du capteur en fonction du greffage moléculaire en absence d'excitation acoustique en comparaison avec la loi théorique . . . . .	131
4.36	Variation de la phase du capteur sous excitation acoustique en fonction du greffage moléculaire en comparaison avec la loi théorique . . . . .	133
4.37	Principe de la spectrométrie photoélectronique par rayons X. . . . .	133
4.38	Contributions des différentes espèces chimiques en fonction de l'étape de fonctionnalisation ; mesure par technique XPS . . . . .	134
4.39	Séquences de spectres du C1s pour chaque étape de fonctionnalisation . . . . .	135
A.1	Comportement d'une maille de cristal de quartz en réponse à l'application d'une force .	141
A.2	Représentation schématique d'un matériaux polycristallin, avant et après la polarisation .	142

# Liste des tableaux

2.1	Constantes relatives au calcul de la fréquence de résonance d'une membrane carrée . . .	42
2.2	Caractéristiques du substrat Silicium . . . . .	43
2.3	Caractéristiques de la caméra IR . . . . .	48
2.4	Paramètres d'excitation (tension variable) . . . . .	49
2.5	Paramètres d'excitation . . . . .	63
2.6	Constantes thermiques . . . . .	65
2.7	Paramètres d'excitation (cadre de manipulation biologique) . . . . .	70
2.8	Constantes thermiques . . . . .	71
2.9	Paramètres d'excitation(tension variable). . . . .	71
3.1	Constantes numériques relatives au type du fluide . . . . .	86
3.2	Variabes géométriques . . . . .	86
3.3	Constantes utilisées pour la simulation . . . . .	89
4.1	Paramères d'excitation du transducteur acoustique . . . . .	121
4.2	Ordre de grandeur de la diffusivité [ $m^2/s$ ] . . . . .	132
4.3	Données numériques . . . . .	132
A.1	Propriété du matériau piézoélectrique PSI-5A . . . . .	145
B.1	Viscosité de des solutions aqueuses de glycérol en Centipoises/mPa s . . . . .	148



# **Chapitre 1**

## **Introduction générale**



---

## Introduction

Dans les années soixante-dix, des travaux pionniers [25] proposent d'utiliser les microtechnologies développées dans le domaine des microsystèmes ou MEMS (acronyme anglais pour **Micro-Electro-Mechanical Systems**) pour intégrer des protocoles chimiques. Cependant, la notion de **Laboratoire sur puce (Labopuce)** plus connu sous la nomination anglaise 'Lab On Chip' , ou encore 'Micro Total Analysis System' ( $\mu$ TAS) ne fut véritablement introduite par Manz qu'à la fin des années quatre-vingt [26]. Idéalement, un  $\mu$ TAS peut être décrit comme étant un système d'analyse chimique ou biologique complètement miniaturisé et intégré dans un seul composant.

Depuis les années quatre-vingt-dix, nous assistons à un accroissement quasi-exponentiel de publications et d'études dans ce domaine. De la génomique, en passant par la protéomique jusqu'à l'étude de la cellule, de nombreux domaines de la biologie sont concernés par la mise en place de microsystèmes d'analyse fondés sur des technologies et des principes physiques très variés. Il faudra cependant attendre le début des années deux milles pour voir apparaître le premier système commercial (Caliper, Bioanalyzer...). Malgré quelques succès économiques qui ont suivi, le nombre de réussites reste encore négligeable comparé aux nombreuses tentatives. Il est en effet reconnu qu'il existe encore un certain nombre de blocages.

En microfluidique, par exemple, une des approches les plus répandues pour déplacer les fluides, d'un point à un autre d'un labopuce, est de les faire circuler à travers un réseau de canaux micro-usinés ; cette approche est communément appelée "microfluidique continue". Pour répondre au besoin de contrôle de flux dans ce milieu, une grande variété de micro-pompes et de vannes ont été conçues. Elles reposent sur divers principes physiques comme la piézoélectricité, l'électrostatique, la thermique, le magnétisme, *etc.* [27].

Nombreux sont ces microsystèmes qui utilisent ou véhiculent des fluides ; certains sont appelés à effectuer des opérations élémentaires, comme le transport ou le dosage du fluide, mais on demande à d'autres de réaliser des fonctions plus élaborées, telles que le mélange, l'analyse, voir la synthèse de fluides plus ou moins complexes. Les applications sont extrêmement nombreuses et touchent des secteurs variés.

Une autre approche plus récente et moins répandue, concerne la "microfluidique discrète" [28]. Cette méthode consiste dans la réalisation des protocoles biologiques au sein de gouttes de fluides biologiques ou de réactifs que l'on souhaiterait manipuler (c'est-à-dire, injecter, prélever, déplacer, fusionner, récupérer, mélanger *etc.*) à volonté. Ces opérations doivent être assurées indépendamment sur chaque goutte présente dans les composants qui peuvent être alors assimilées à des micro-robots.

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons à l'opération élémentaire de mélange plus précisément à créer un écoulement interne au sein de la goutte. Les principes physiques proposés pour réaliser une telle opération sont multiples. Parmi ces principes, nous avons les ondes acoustiques de surface, la thermocapillarité, la micro-structuration de surface asymétrique, l'ElectroHydroDynamique, la MagnétoHydroDynamique...

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps présenter un certain nombre de principes physiques qui permettraient la réalisation d'un micro-mélangeur. Ensuite, nous allons introduire des dispositifs



préalablement testés dans le domaine biologique et précisément dans le cadre de l'optimisation du greffage moléculaire.

## 1.1 Principes physiques pour l'activation de mélange

Le mélange de micro voir nano-volumes de liquides se présente comme une opération difficile en raison du faible nombre de Reynolds  $R_e$  mis en jeu :

$$R_e = \frac{\rho_0 v L}{\mu} \quad (1.1)$$

Où  $\rho$  est la masse volumique,  $v$  est la vitesse caractéristique,  $L$  est la longueur caractéristique et  $\mu$  est la viscosité dynamique du liquide.

La viscosité dynamique  $\mu$  et la masse volumique  $\rho$  sont supposées indépendantes du changement d'échelle. Sous le double effet de la réduction de la vitesse  $v$  et de la longueur  $L$  caractéristiques, le nombre de Reynolds est ainsi fortement diminué dans les microsystèmes. Les écoulements sont donc très majoritairement laminaires, ce qui fait disparaître toute éventualité de turbulence limitant ainsi l'efficacité du mélange. La figure 1.1 montre un exemple de circulation côte à côte (coflow en notation anglaise) de deux liquides en microfluidique continue (l'un est incolore et l'autre est fluorescent) sans observation de mélange. Notons toutefois que cette difficulté pourrait être surmontée par l'augmentation de l'effet de surface. En effet, le temps de diffusion visqueuse a l'avantage d'être proportionnel au carré de la longueur  $L$ . Cette propriété fait l'objet des systèmes passifs d'activation de mélange (en utilisant des microcanaux).

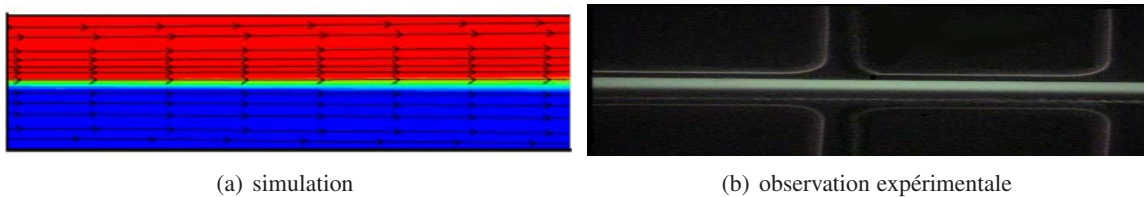


FIGURE 1.1: Circulation de deux liquides côte à côte dans un microcanal sans observation de mélange naturel - Extraits de [1]

D'une façon générale, on est amené à introduire une énergie supplémentaire dans le fluide afin d'activer le mélange. Divers principes physiques peuvent être exploités dans l'objectif de créer des mélanges dans de faibles volumes de liquide. Ils peuvent être classés suivant deux grandes familles :

La première exploite le déplacement contrôlé des gouttes. En effet, il est établi qu'une goutte, quand elle se déplace, avance dans un mouvement en "chenille" [29]. Dans le repère de la goutte, un mouvement de recirculation apparaît, un peu comme une chenille. Le déplacement de la goutte et ainsi accompagné d'un flux interne à celle-ci.

La seconde famille repose sur des effets internes à la goutte pour créer un écoulement à l'intérieur de celle-ci ; ce que nous appellerons dans la suite un mélange intra-goutte. Ce type d'écoulement interne

peut être provoqué par le déplacement de particules introduites volontairement ou déjà présentes naturellement dans le liquide.

Dans ce qui suit, nous dressons une liste non exhaustive des principes actifs pour la création de mélange dans les gouttes.

### 1.1.1 Actionnement par électrochimie

Une manière de mettre en mouvement une goutte liquide placée sur une surface est de "jouer" sur le gradient de propriétés énergétiques de la surface exposée au liquide. La modification de l'état de surface peut être faite chimiquement. Il faut pour cela réaliser une fonctionnalisation de la surface par dépôt d'une monocouche qui sera active. Le but recherché est de contrôler les valeurs de l'angle de contact liquide/solide afin qu'elles soient différentes entre l'avant et l'arrière de la goutte, ce qui l'induit en mouvement.

Yamada *et al.* [2] ont réalisé un dispositif (figure 1.2) permettant de déplacer, dans une solution aqueuse, des gouttes de nitrobenzène (non miscible à l'eau) déposées sur une monocouche auto assemblée qui a été fonctionnalisée par des groupements ferrocènes.

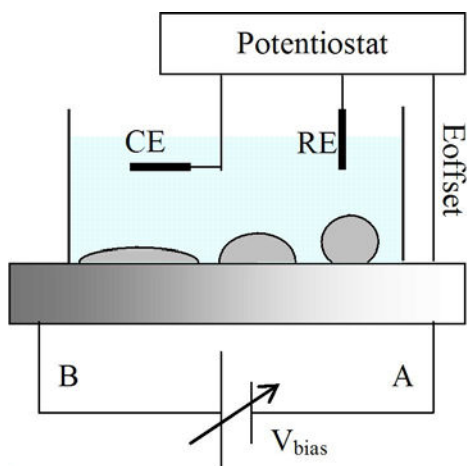


FIGURE 1.2: Schéma du principe de déplacement par électrochimie.

Tout d'abord, la monocouche terminée par des groupements ferrocènes est déposée sur une électrode d'or. Ensuite, un gradient de tension est réalisé dans l'électrode par l'utilisation d'une source de tension continue variable ( $V_{bias}$ ). L'oxydation réversible du ferrocène est réalisée par l'intermédiaire de deux électrodes (CE et RE) réglée par  $E_{offset}$ . Ce dispositif permet de contrôler le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface car le ferrocène sous sa forme réduite est hydrophobe alors que le cation ferrocenium [*i.e.* forme oxydée] est hydrophile. Par conséquent, le gradient de mouillabilité dépend du réglage des deux paramètres  $V_{bias}$  et  $E_{offset}$ . En fonction du réglage de ces deux paramètres, il est possible de déplacer la goutte (figure 1.3).

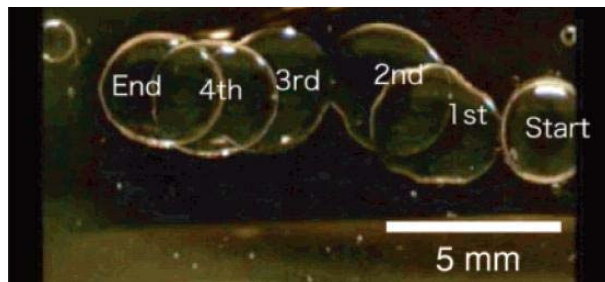


FIGURE 1.3: Superposition de 6 images montrant le déplacement d'une goutte sur une durée de 35 s - Extrait de [2].

### 1.1.2 Actionnement par faisceau laser

On peut forcer l'étalement d'une goutte par gravitation et par effet Marangoni thermique. La gravitation force l'écoulement du liquide vers le bas. L'effet Marangoni thermique force l'écoulement du côté où le liquide est le plus froid. Si on met une goutte sur une plaque dont la température n'est pas uniforme (chauffée d'un côté et refroidie de l'autre) elle s'étale du côté le plus froid. L'actionnement de gouttes par faisceau laser utilise ce principe physique.

Une goutte de liquide  $G$  est exposée à une tâche lumineuse médiocrement focalisée (figure 1.4), le diamètre de la tache est  $r_l$ . Par un dispositif optique approprié  $A$ , l'intensité lumineuse n'est pas uniforme sur toute la goutte, mais à un gradient selon  $x$ . La goutte va alors s'échauffer, et son élévation de température  $\Delta T$  aura, elle aussi, un gradient dans la direction  $x$ . Ceci engendre un gradient de la tension superficielle  $\nabla\gamma$ , et donc un effet Marangoni, qui entraîne la goutte du côté froid.

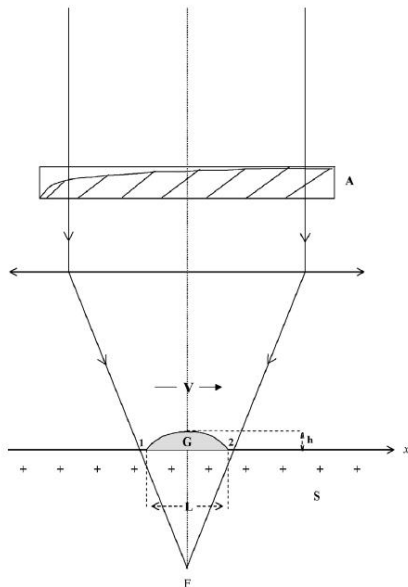


FIGURE 1.4: Une goutte  $G$ , posée sur un support solide  $S$ , est exposée à un gradient d'intensité lumineuse grâce à un coin absorbant  $A$  [3].

D'après Pierre Gilles de Gennes [3], la variation de tension superficielle s'écrit :

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta T}{T}\gamma \quad (1.2)$$

avec  $\gamma$  la tension superficielle au repos,  $T$  la température sans échauffement, et :

$$\Delta T = \frac{W h^2}{\kappa s} \quad (1.3)$$

où,  $W$  est la puissance par  $\text{cm}^2$  fournie par la tache,  $h$  l'épaisseur de la goutte,  $\kappa$  la conductivité thermique et  $s$  la longueur caractéristique d'absorption du liquide.

Grâce à ce principe d'actionnement, il paraît possible de déplacer des gouttes dont la taille est de l'ordre des dizaines de microns par un faisceau laser de puissance inférieur au watt. L'utilisation de dispositifs optiques simples, permettrait de changer la direction du gradient, donc de changer la direction du mouvement de la goutte.

L'un des principales difficultés de cette méthode d'actionnement est l'uniformisation de la température dans la goutte par convection. Ceci engendre un gradient de température nul qui se traduit par l'immobilisation. Un second point plus sensible mais pas rédhibitoire est celui de l'asservissement des positions, du dispositif optique et de la source laser, qui est impératif pour contrôler le déplacement de la goutte.

### 1.1.3 Actionnement électrostatique

#### 1.1.3.1 Electromouillage - ElectroWetting (EW)

Historiquement, la première observation d'un effet électrocapillaire a été obtenue par Lippmann en 1875 [30], dans un système mercure-solution d'électrolyte. Le terme électrocapillarité a été employé à l'époque car Lippmann étudiait ce problème sous l'approche de la variation de surface sous l'effet du potentiel électrique.

L'expérience de Lippmann utilise un capillaire rempli de mercure en contact avec une solution d'eau acidifiée. La position d'équilibre du ménisque (mercure - solution eau/acide) est repérée grâce à un microscope. Lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre le mercure et la solution, la pression nécessaire pour revenir à la position initiale est mesurée et donne la variation de tension de surface. Sous l'effet du potentiel, la tension de surface entre le mercure et la solution d'électrolyte est réduite. Lippmann énonce cette relation sous la forme suivante :

$$\frac{\partial\gamma}{\partial V} = -q_m \quad (1.4)$$

avec  $V$  et  $q_m$  sont respectivement la différence de potentiel appliquée et la charge par unité de surface du mercure.

L'explication du phénomène est basée sur la théorie des **Double Couche Electrique** (DCE) de Helmholtz et Stern qui se forment à l'interface entre le liquide conducteur et l'électrode (une couche d'épaisseur de 1 à 10 nm). Quand une différence de potentiel est appliquée, l'équilibre de cette couche est modifié, faisant varier l'énergie de surface entre le solide et le liquide. L'angle de contact se voit ainsi

modifié en fonction de la tension appliquée (figure 1.5). La variation de l'angle de contact  $\theta$  en fonction de la tension d'excitation  $V$  est donnée par :

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{cV^2}{2\gamma_{LV}} \quad (1.5)$$

où,  $\theta_0$  est l'angle de contact en l'absence de tension,  $\gamma_{LV}$  l'énergie de surface du liquide et  $c$  la capacité par unité de surface de la DCE.

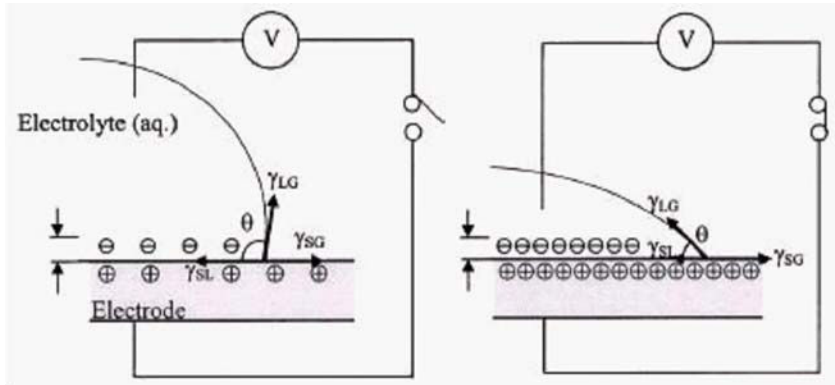


FIGURE 1.5: Schéma de principe de l'electrowetting.

Le phénomène d'électromouillage (ou en notation anglaise **ElectroWetting 'EW'**) se produit uniquement tant que la différence de potentiel est maintenue entre la goutte et la contre-électrode, afin que la quantité de charges sur l'interface liquide/solide reste constante. Si le courant établi dans le circuit est assez important pour que les charges fuient est établi dans le circuit, la goutte cesse de s'étaler.

### 1.1.3.2 Electromouillage sur Diélectrique - Electrowetting On Dielectric (EWOD)

L'utilisation de l'électromouillage pour créer des mélanges de gouttes ou encore de les déplacer se voit limiter par électrolyse. En effet, quand la goutte est soumise à un potentiel, un dépôt s'effectue sur l'électrode par phénomène d'électrolyse, limitant ainsi le fonctionnement du transducteur.

Pour remédier à ce problème, les électrodes peuvent être recouvertes d'un film mince d'isolant qui empêche l'électrolyse et augmente la capacité. Ce diélectrique bloque le transfert des électrons tout en maintenant un champ électrique suffisant à l'interface pour assurer une redistribution des charges lors de l'application du potentiel. On parle alors d'électromouillage sur diélectrique **EWOD** (acronyme anglais pour **ElectroWetting On Dielectric**) [31]. Le choix d'un isolant de critère hydrophobe permettrait une variation d'angle de contact plus importante.

La couche diélectrique est le plus souvent du Téflon. Elle peut être composée d'une couche supplémentaire d'oxyde ou nitrure de silicium. Il est important d'obtenir une capacité élevée pour avoir une importante variation de l'angle de contact pour une faible tension afin d'éviter les problèmes de claquage de l'isolant. Le champ électrique  $E$  imposé au diélectrique doit être inférieur au champ électrique maximum  $E_{max}$  qu'il peut supporter. Il faut donc :

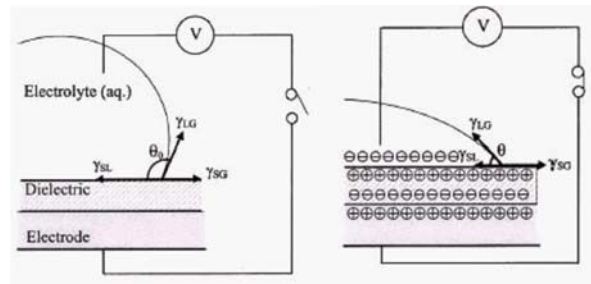


FIGURE 1.6: Schéma de principe de l'electrowetting on dielectric (EWOD).

$$E = \frac{V}{d} < E_{max} \quad (1.6)$$

La manipulation de goutte en utilisant l'EWOD, peut aussi être réalisée avec un dispositif ayant une architecture fermée ou semi-fermée (figure 1.7). La plupart du temps, les électrodes sont déposées sur des substrats de silicium ou de verre [4]. En effet, sur une surface ouverte, il est plus difficile d'appliquer le potentiel sur la goutte lorsque celle-ci est en mouvement.

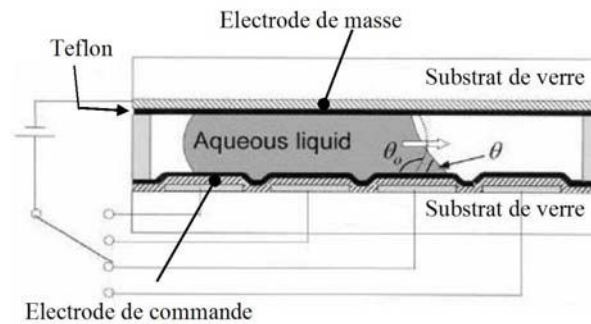


FIGURE 1.7: Schéma de principe de déplacement par EWOD dans une structure fermée [4].

Comme le montre la Figure 1.8, un système de "caténaïres" a donc été développé pour que la goutte puisse continuellement être en "contact" avec les électrodes [5]. Une bonne stratégie de commande permet alors d'alimenter les électrodes désirées pour pouvoir déplacer la goutte.

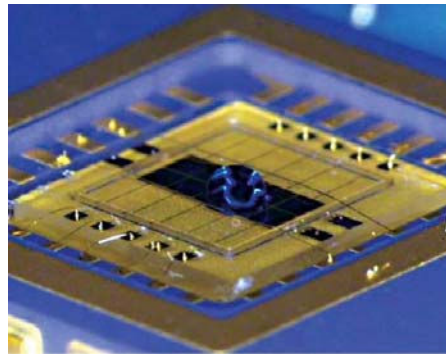


FIGURE 1.8: Puce EWOD développée au LETI/CEA [5].

L'EWOD a été récemment utilisé pour créer un mélange entre microgouttes conductrice et polarisable (de  $1,75 \mu\text{L}$  de volume) [6]. En effet, l'une des deux gouttes (référée dans la figure 1.9 par F Drop) est déplacée vers son homologue (référée par NF Drop). Ainsi, les deux gouttes fusionnent et donnent naissance à un mélange relativement homogène (figure 1.10).

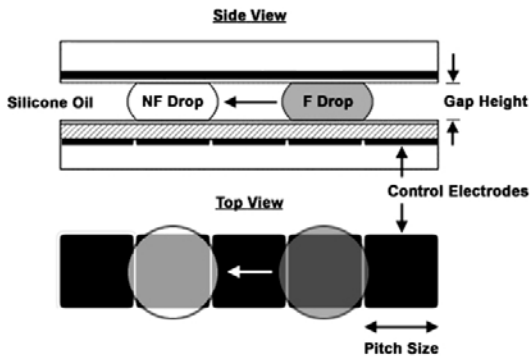


FIGURE 1.9: Vues de face et de dessus du mélangeur par EWOD - Extrait de [6].

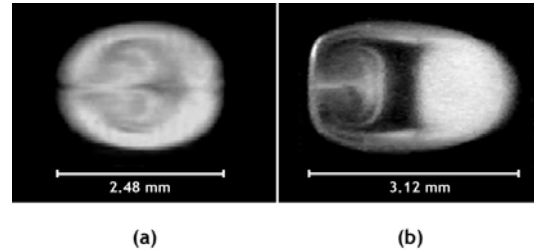


FIGURE 1.10: Vue de dessus du mélange observé à un intervalle de 1,2 secondes sous excitation - Extrait de [6]

L'EW et l'EWOD permettent donc la manipulation de liquides conducteurs. Les tensions nécessaires sont comprises entre 20 V et 200 V selon le type et le volume du liquide employé à des fréquences allant du continu jusqu'à quelques Hertz. A ces faibles fréquences, le champ électrique est quasiment nul dans le liquide qui se comporte comme un conducteur. L'échauffement par effet Joule est alors très faible ce qui limite l'évaporation du liquide.

### 1.1.3.3 DiElectroPhorèse (DEP)

Les forces électrostatiques peuvent également être utilisées pour le déplacement de liquides isolants. Ce principe d'actionnement est appelé **DiElectroPhorèse (DEP)**. La diélectrophorèse consiste à créer un mouvement sur une particule diélectrique à l'aide d'un champ électrique non uniforme. Elle se définit comme le déplacement de particules polarisables dans des champs non uniformes [2] [33]. L'eau comme n'importe quelle structure polarisable répond à l'effet d'un champ électrique en se regroupant dans les régions où le champ est à son maximum. Le champ électrique est créé par des électrodes coplanaires déposées sur un substrat isolant et recouvertes par un diélectrique. Contrairement à l'EW (ou EWOD) dont le fonctionnement est à basses fréquences, la DEP nécessite des fréquences de travail élevées (typiquement entre 10 et 200 kHz). Pour des fréquences inférieures à une fréquence critique  $f_c$ , le liquide a un comportement conducteur (EW ou EWOD). Au-delà de cette fréquence limite, le liquide a un comportement isolant et on parle alors de DEP. La fréquence critique  $f_c$  dépend de la géométrie des électrodes, du diélectrique et du liquide [34].

Le volume de la goutte est fixé par la géométrie des électrodes, et le déplacement peut être réversible. Dans la première phase (figure 1.11-a), la paire d'électrodes 1 est portée à un potentiel +V est la goutte est confinée entre cette paire d'électrodes. Dans la deuxième phase (figure 1.11-b), les tensions  $V_1$  et  $V_2$  sont annulées, la goutte relaxe et est très légèrement engagée dans la paire d'électrodes 2. La goutte est donc amorcée pour la troisième et dernière phase qui est de porter à un potentiel non nul la paire

d'électrodes 2. Ceci crée une force diélectrophorétique, entraînant la goutte de la paire d'électrodes 1 vers la paire d'électrodes 2 (figure 1.11-c).

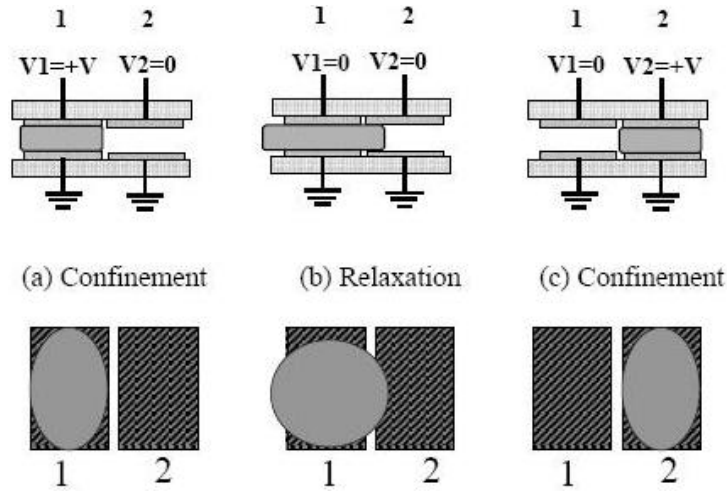


FIGURE 1.11: Principe de déplacement d'une microgoutte sous l'action d'une différence de potentiel.

La Figure 1.12 présente une géométrie particulière d'électrode qui permet d'augmenter la surface commune entre la goutte relaxée et l'électrode [35] [7].

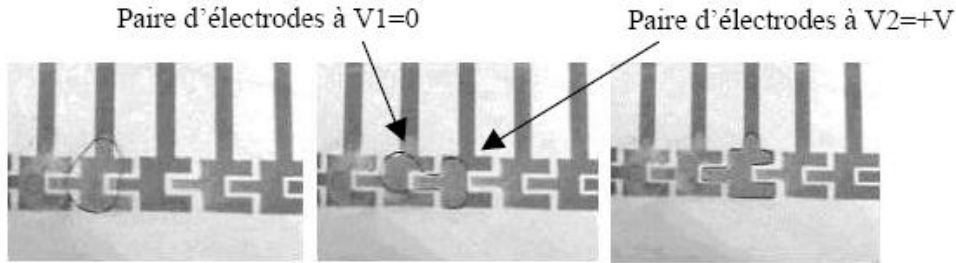


FIGURE 1.12: Photos montrant le déplacement d'une goutte d'un plot à un autre [7].

La densité volumique de force diélectrique s'écrit [36] :

$$\vec{f} = -\frac{E^2}{2} \text{grad} \epsilon \quad (1.7)$$

avec  $E$ , champ électrique appliqué, et  $\epsilon$  la permittivité locale du milieu. Cette expression indique que la force se développe à l'interface liquide-air et tend à amener le liquide dans la zone de champ inter-électrodes.

D'autres systèmes emploient la force diélectrophorétique pour extraire des gouttes de quelques dizaines de nanolitres à partir d'un volume plus important [37]. Les gouttes extraites sont confinées entre les deux bandes d'électrodes espacées de quelques dizaines de microns déposées sur le substrat. Lors de l'application de la tension alternative, un filet de liquide se détache de la large goutte et forme une goutte de faible volume lorsque la tension est coupée.



Le principe de diélectrophorèse peut aussi s'appliquer pour déplacer des liquides dans un liquide. Il y a pour cela, deux conditions principales. La première est que les deux liquides ne soient pas miscibles et la deuxième étant que la densité de la goutte à déplacer soit plus faible que celle du liquide dit "porteur". Ceci, pour que la goutte ne reste pas "collée" au fond et qu'elle puisse se déplacer librement en surface (figure 1.13). La goutte sera alors maintenue ou déplacée par l'application d'une tension alternative sur les électrodes situées en dessous du liquide "porteur". Millman *et al.* [8] ont utilisé comme liquide "porteur" une huile perfluorée présentant une densité supérieure à celle des gouttes d'eau ou de dodécane ( $C_{12}H_{26}$ ) déplacées.

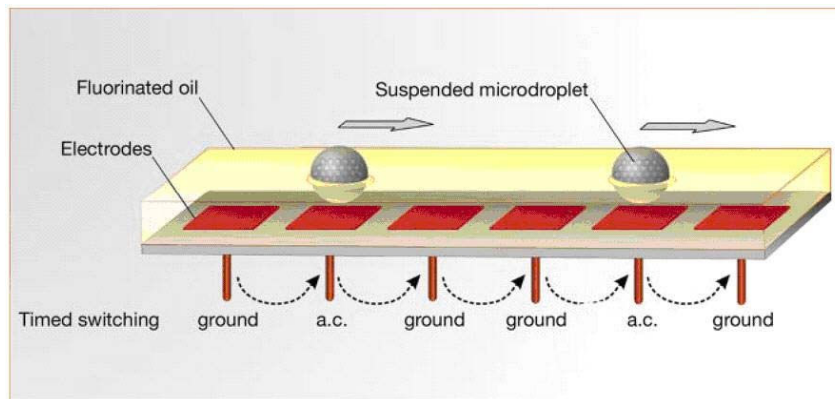


FIGURE 1.13: Principe de la manipulation diélectrophorétique liquide/liquide [8].

Selon la stratégie de commande adoptée, la goutte pourra être "piégée" à deux positions distinctes. Ces deux positions d'équilibre (des forces), adoptées par la goutte, peuvent être interprétées comme effet de la force diélectrophorétique, due à la faible permittivité diélectrique de l'huile perfluorée ( $\epsilon \approx 2$ ). Les gouttes (éléments polarisables) se regroupent dans les régions où le champ électrique est à son maximum. Ce travail a montré que des gouttes ayant un volume de 500 – 2000 nl, peuvent être manipulées avec des tensions alternatives de 200 – 700 V et une fréquence de 50 – 5000 Hz.

## 1.1.4 Actionnement par champ magnétique

### 1.1.4.1 mélange grâce à des particules magnétiques

L'insertion de microparticules magnétiques dans une ou plusieurs gouttes peut permettre, sous l'action d'un champ magnétique, de les déplacer (en deux dimensions), de les mélanger ou de les fractionner [8]. Des microbobines (disposées en matrice), réalisées sur une plaque de circuit imprimé (**Printed Circuit Board**) et pilotées individuellement, vont permettre de réaliser les opérations fluidiques citées ci-dessus. Le déplacement se fait dans un autre fluide et la goutte sera suspendue dans celui-ci. Pour réaliser cette opération, un champ magnétique constant (aimant permanent) est appliqué. L'objectif étant que la goutte ne touche pas l'interface solide/liquide ayant pour effet une force de friction quasi-nulle (figure 1.14).

U. Lehmann *et al.* [9] ont étudié l'effet de la taille des particules magnétiques injectées sur le déplacement de la goutte. Pour cela, ils ont testé trois tailles différentes de particules de silice magnétite : 250 nm,

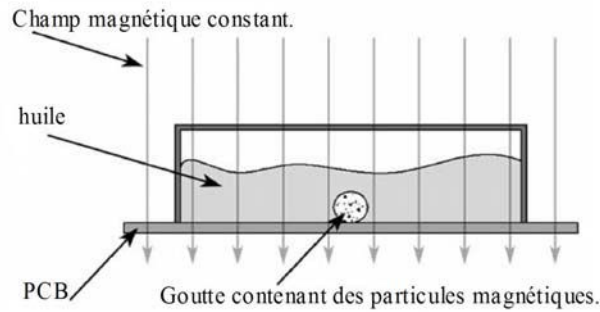


FIGURE 1.14: Schéma du système de manipulation de gouttes par champ magnétique.

500 nm et 6  $\mu\text{m}$ . Le matériau étant de la silice magnétite. La force magnétique agissant sur une seule particule peut s'écrire :

$$F_m = m\nabla H \quad (1.8)$$

avec  $m$  est le moment magnétique de la particule et  $H$  l'intensité du champ. Le moment magnétique  $m$  dépend de la susceptibilité  $\chi$ , du volume de la particule  $V$  et de l'intensité du champ  $H$ . Il s'écrit :

$$m = V\chi H \quad (1.9)$$

Le champ magnétique constant appliqué à la goutte (figure 1.15) dispose les particules en forme de piliers. Sous l'action du champ créé par les bobines, les particules se mettent à bouger et vont transférer la force d'actionnement au sein de la goutte et aux parois.

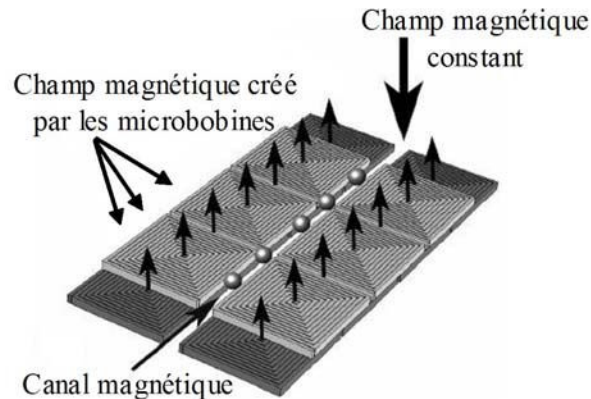


FIGURE 1.15: Schéma du canal magnétique créé par imbrication de deux niveaux de microbobines [9].

Selon la taille et la quantité de particules injectées dans la goutte, la vitesse de déplacement de la goutte peut varier de 1  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  à 2,5  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . La Figure 1.16 présente un déplacement bidimensionnel d'une goutte de volume 3  $\mu\text{l}$  contenant des particules de 250 nm de diamètre.

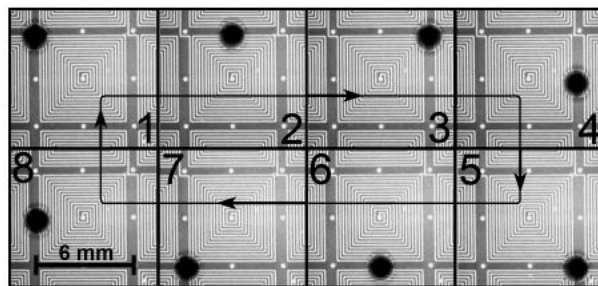


FIGURE 1.16: Déplacement d'une goutte de  $3 \mu\text{l}$  autour d'une microbobine. Le diamètre des particules est de  $250 \text{ nm}$  [9].

### 1.1.4.2 Mélangeur par Magnéto-Hydro-Dynamique MHD

Dans ce type de dispositif, l'écoulement est obtenu en appliquant sur un liquide conducteur un champ magnétique adéquat créé par des inducteurs extérieurs au domaine d'écoulement. En effet, si dans un fluide sont créés un champ magnétique  $\vec{B}$ , et un courant électrique  $\vec{I}$ , qui lui est perpendiculaire, alors le fluide subit une force de Laplace dont la direction est donnée par la règle des trois doigts. L'excitation séquentielle des différentes micropompes MHD permettrait de créer un écoulement dans le liquide en question ou encore son déplacement.

Leprévost et al. [10] ont analysé l'efficacité du mélange dans un écoulement de fluide conducteur placé dans un creuset (figure 1.17 (a)). L'écoulement présente quatre cellules de recirculation, générées par les forces de Laplace produites par deux inducteurs placés à l'extérieur du creuset. Le déplacement périodique de ces inducteurs dans le temps (ou leur déformation périodique dans l'espace) permet de rendre l'écoulement chaotique au sens Lagrangien : deux traceurs initialement très proches dans cet écoulement vont se séparer exponentiellement au cours du temps, et une tâche de colorant sera rapidement dispersée dans le domaine (figure 1.17 (b)).

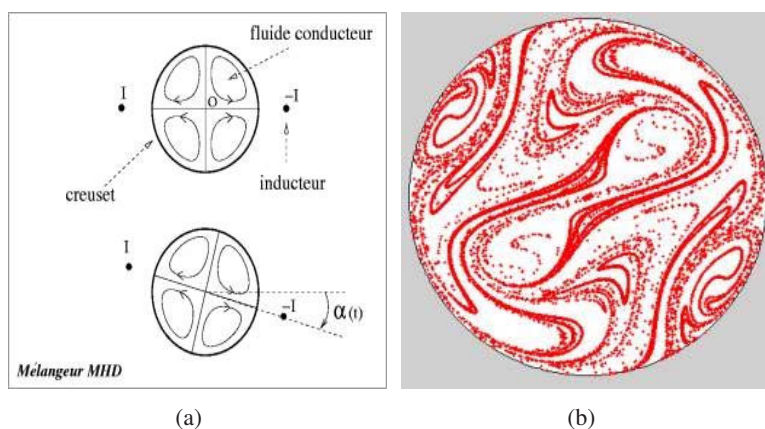


FIGURE 1.17: (a) et (b) Simulation de la dispersion de traceurs dans le mélangeur MHD [10]

La figure 1.18 présente une schématique du mélangeur MHD breveté par [11] qui permettrait de déplacer deux gouttes (référées par 11 et 12) vers une zone commune (référée par 13) impliquant ainsi leurs fusionnement. Le déplacement des gouttes s'effectue pas à pas grâce à l'excitation séquentielle des

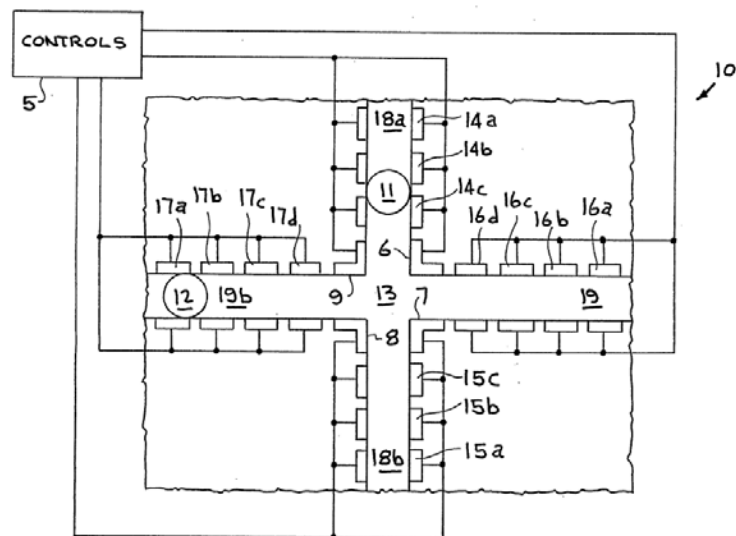


FIGURE 1.18: Platedorme de déplacements et de mélanges de gouttes par MHD [11].

micropompes MHD. Les micropompes MHD de 6 à 9 permettent d'exciter un écoulement interne à la goutte résultante pour la homogénéiser.

### 1.1.5 Actionnement par des ondes acoustiques de surface

Plusieurs études récentes se sont intéressées à manipuler des gouttes de quelques nanolitres à quelques microlitres déposées sur la surface d'un substrat, en les soumettant à la pression induite par le passage d'une **Onde Acoustique de Surface (SAW en acronyme anglais)**. Cette onde à la surface du substrat piézoélectrique est générée par des peignes interdigités. Le positionnement des peignes détermine la direction de propagation de l'onde. Lorsque l'onde acoustique atteint la goutte, son énergie est dissipée dans le liquide, ce qui génère une pression locale. Cette dernière induit, à son tour, une circulation dans la goutte, jusqu'alors immobile. En effet, à faible puissance le liquide subit un mouvement interne généré par l'effet «acoustic streaming» [39]. Le contrôle de la différence de potentiel aux bornes des peignes permet de contrôler la puissance véhiculée par l'onde. Lorsque cette puissance devient élevée, les recirculations dans la goutte induisent la déformation de l'interface liquide/air, puis son déplacement grâce à un phénomène de «pression de radiation» [40]. Tirant profit de ces observations, Wixforth et al. [12] ont développé un dispositif SAW qui permet de créer un écoulement interne dans une microgoutte (figure 1.19) et éventuellement de la déplacer suivant une trajectoire prédéfinie. La figure 1.20 présente une séquence d'images illustrant le déplacement d'une goutte jusque là incolore (en bas au centre de la première image de la séquence) vers une position déjà occupée par une seconde goutte également transparente. Une fois rencontrées, les deux gouttes fusionnent et prennent une couleur rouge (troisième image de la séquence). Ainsi, ce dispositif haute fréquence permet à la fois de créer des déplacements et des mélanges de gouttes.

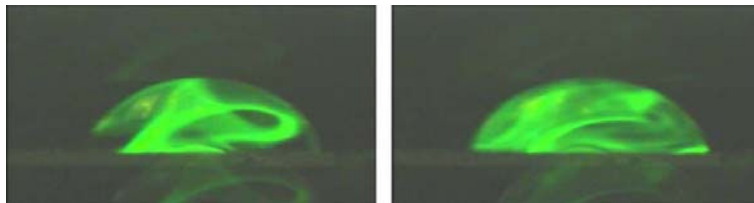


FIGURE 1.19: Mélange induit dans une goutte de 50 nm de volume. La poudre fluorescente déposée sur la surface active est rapidement dissolue dans la goutte

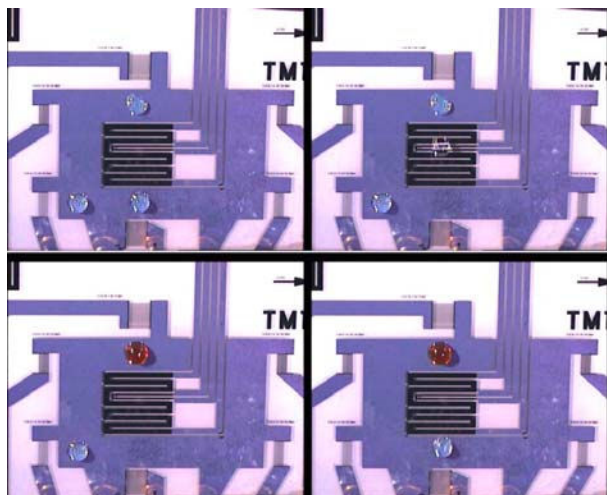


FIGURE 1.20: Plateforme de déplacements et de mélanges de microgouttes par SAW- Extrait de [12]

### 1.1.6 Actionnement par vibration de structure

La mise en vibration de structures (macrométriques) peut permettre de manipuler des petits volumes de liquide. En effet, la vibration du dispositif sur un mode forcé correspondant à la fréquence de résonance de la goutte entraîne l'oscillation de celle-ci. Cette oscillation, dépend de la tension superficielle, de la densité et de la taille de la goutte en question [41].

Lorsqu'une goutte déposée sur une surface non mouillante est soumise à une vibration latérale, une force d'inertie se crée entraînant son déplacement. La direction et la vitesse de la goutte sont directement liées à la forme, la fréquence, à l'amplitude de vibration, ainsi qu'aux oscillations naturelles de la goutte [41]. Daniel *et al.* [13] ont étudié un dispositif permettant, par l'application d'une vibration mécanique asymétrique, de manipuler en deux dimensions des gouttes ayant un volume allant de  $1 \mu\text{L}$  à  $10 \mu\text{L}$  avec une vitesse, mesurée expérimentalement, de l'ordre de  $10 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Le dispositif réalisé se compose d'un substrat en verre (lame de microscope) sur lequel est déposée une couche de polymère (PDMS). Le dépôt de cette couche rend la surface hydrophobe et augmente, par conséquent, l'angle de contact de la goutte. En diminuant, ainsi, la surface de contact liquide/solide, la goutte est plus aisément entraînée en mouvement ce qui facilite son guidage. D'autre part, la facilité de structuration de la couche de PDMS en réseau fluide (réservoir, microcanaux, *etc.*) permet de faire transiter la goutte d'une localisation précise à une autre afin qu'elle subisse différentes opérations (mélange, séparation, élévation de température, *etc.*). La Figure 1.21 montre un déplacement en deux

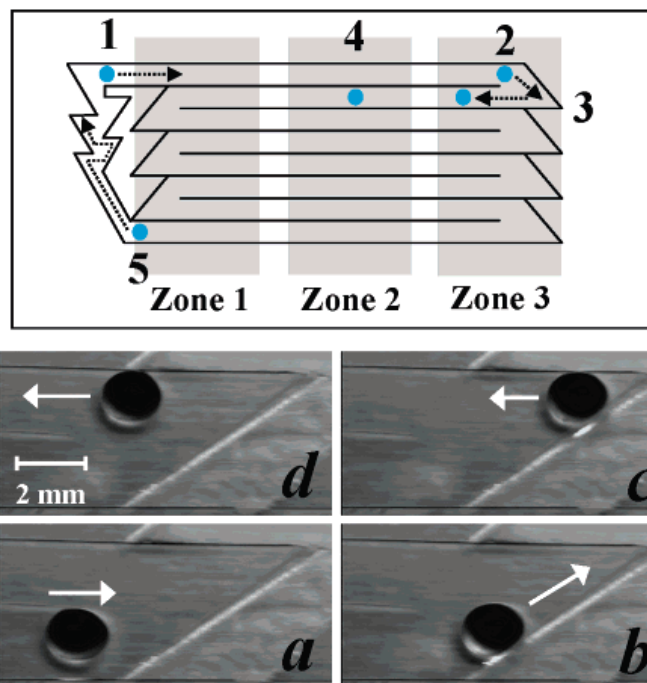


FIGURE 1.21: Illustration d'un cycle de déplacement d'une goutte par vibration de structure - Extrait de [13].

dimensions d'une goutte de  $2 \mu\text{L}$  de volume. La vibration latérale s'effectue suivant l'axe  $x$  comme illustrée sur l'image *a*. Pour les séquences *a* et *b*, la vibration est asymétrique avec une amplitude plus importante lorsque le substrat se déplace vers la droite. La goutte se déplace ainsi parallèlement à l'axe  $x$  dans le sens positif, jusqu'à ce qu'elle rencontre une paroi délimitée par un des microcanaux réalisés dans la structure. La force d'inertie entraîne la goutte le long de cette paroi. Un déplacement transverse à l'axe  $x$  est donc réalisé. Pour les séquences *c* et *d*, la forme du signal d'excitation est inversée. L'amplitude de déplacement est plus importante lorsque le substrat se déplace vers la gauche. Un déplacement dans le sens contraire (sens négatif de l'axe des  $x$ ) est alors réalisé.

## 1.2 $\mu$ Systemes dédiés au greffage moléculaire

La plupart des principes d'activation de mélange ou de déplacement de gouttes, décrits précédemment, ont été testés dans les domaines chimique, biologique, biomédical, *etc.* Nous ne ferons pas le point sur leurs différents domaines d'application. Nous nous limitons, dans ce paragraphe, aux dispositifs utilisés dans l'objectif d'optimiser le greffage moléculaire qui constitue notre objectif final. Le greffage moléculaire consiste dans la fixation d'entités chimiques ou biologiques sur une surface solide.

### 1.2.1 Immobilisation de biomolécules à travers des $\mu$ canaux

Les systèmes microfluidiques, qui permettent la circulation en continu d'un fluide dans des structures comportant des microcanaux, apportent une solution adaptée à la manipulation de biomolécules, en particulier dans le champ de l'analyse protéomique par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) [42].

D'ailleurs, la plus part des systèmes de caractérisation SPR commercialisés emploient cette méthode. Cependant, jusqu'à une date récente, l'utilisation de la microfluidique continue pour le greffage moléculaire était essentiellement limité par le nombre de canaux réalisables : le dispositif microfluidique contient usuellement un, voir quelques canaux parallèles. Depuis l'essor des microtechnologies, cette limite se voit de plus en plus repoussée.

Luo et al. [14] ont proposé un dispositif microfluidique comportant deux niveaux (figure 1.22). Le niveau inférieur est composée de 8 microcanaux horizontaux (représentés en vert foncé) et de 12 microcanaux verticaux (représentés en vert clair). Ainsi, se créent 96 zones d'intersection : zones réactionnelles. Cette disposition multiplie par 4 les zones réactionnelles différentes (comptées 6 dans le cas de l'emploi des microcanaux verticaux uniquement). Le niveau supérieur contient les micro-valves qui contrôlent l'ouverture et la fermeture des microcanaux. Ce dispositif microfluidique a été couplé à la technique de caractérisation des réactions biologiques par imagerie SPR.

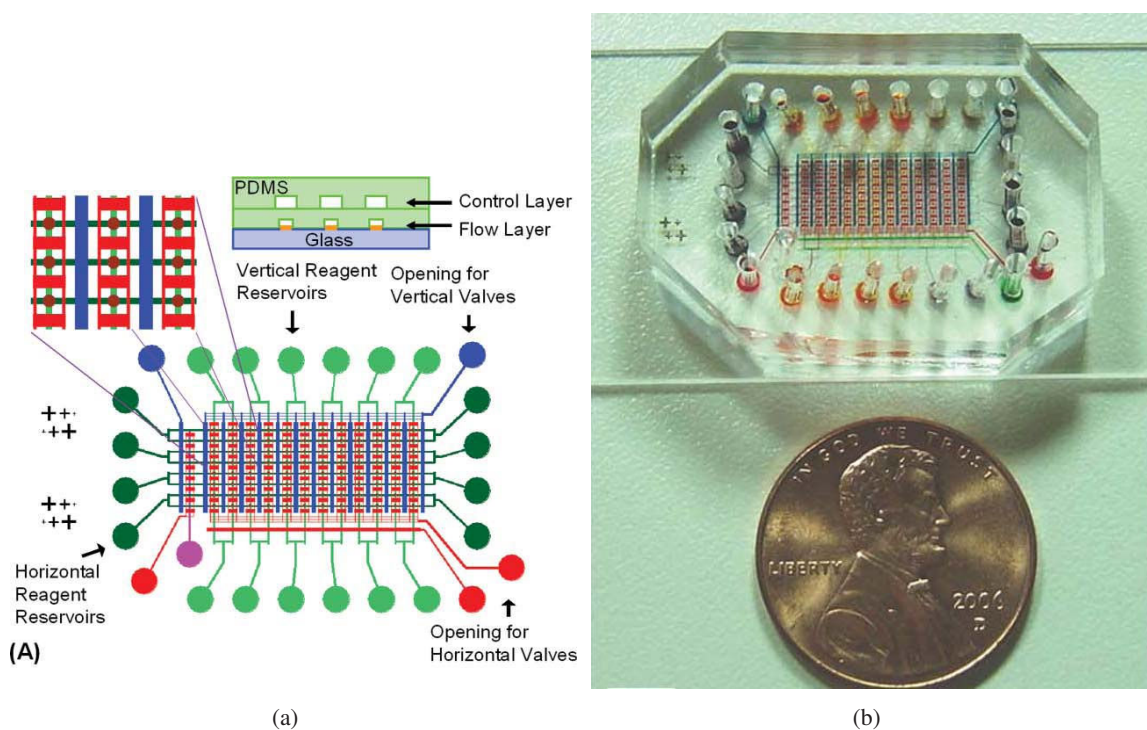


FIGURE 1.22: Présentation d'une matrice de microcanaux avec 96 zones d'intersection adaptée à l'instrumentation SPR : (a) présentation des niveaux (b) photographie du dispositif réalisé. - Extrait de [14]

Une réalisation différente des microcanaux de façon qu'ils soient perpendiculaires aux zones réactionnelles [15, 43] permet de créer 48 zones indépendantes. A l'opposé du système précédent proposant des canaux suivant les axes x et y, ce nouveau dispositif appelé **Microspotteur à Flux Continu (CFM)** repose sur l'utilisation de canaux suivant l'axe z (figure 1.23). Natarajan et al. ont réalisé ce dispositif microfluidique et l'ont introduit dans l'instrumentation SPR. Ils ont ainsi testé ce système sur l'immobilisation de protéines.

La possibilité de miniaturisation des microcanaux, accessibles grâce aux progrès technologiques, permettent d'engendrer des changements profonds dans le domaine de la biologie. Le principal avantage est

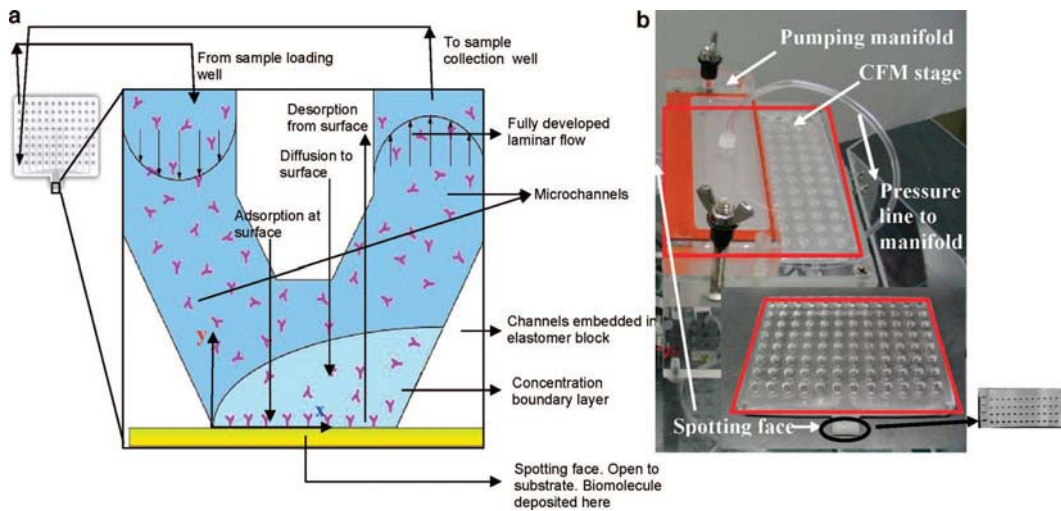


FIGURE 1.23: (a) Schéma de principe (b) Photographie, d'un Microspotteur à Flux Continu - Extrait de [15]

l'exploitation de plus faibles quantités de liquides biologiques (quelques  $\mu\text{L}$ ). Pour réduire d'avantage les volumes mis en jeu et augmenter les zones réactionnelles, il est possible de passer à l'utilisation de la microfluidique discrète. Cependant, l'emploi de micropompes pour créer une certaine dynamique dans le milieu liquide n'est plus possible dans ce contexte. Ainsi, certains principes physiques introduits dans le paragraphe 1.1 trouve application dans le greffage moléculaire.

### 1.2.2 Immobilisation d'ADN par EWOD

Malic et al. [16] ont démontré qu'un dispositif EWOD peut bien trouver application dans le domaine de l'immobilisation d'ADN<sup>1</sup>. En effet, ce laboratoire sur puce permet *via* la technologie EWOD d'extraire des gouttes contenant l'ADN à partir des réservoirs puis de les déplacer vers les zones d'intérêt. Ainsi, chaque goutte porteuse d'ADN se trouve piégée entre le spot de détection sur la puce du dessus et l'électrode de contrôle de la surface de dessous (figure 1.24(b)). L'immobilisation d'ADN sur un des spots de la puce s'effectue par conséquent, suivant que l'électrode de contrôle en question est excitée ou non, c'est-à-dire en présence (de façon dynamique) ou en absence (de façon statique) de champ électrique (figure 1.24(d)).

Une fois l'immobilisation finie, la puce immobilisée en ADN est caractérisée par la technique *SPR* qui sera détaillée dans le chapitre 4.

### 1.2.3 Transport et guidage de biomolécules à travers un microcanal par EOF et EKF

Krishnamoorthy et al. [17] ont développé une plateforme fluide, adaptée au système de caractérisation *SPR<sub>i</sub>*, qui permettrait de transporter et de guider les anticorps ou les antigènes à travers un canal fluide vers des localisations précises (représentées par une matrice sur la figure 1.25(a)). Le contrôle de ce système s'effectue par 'Electro-Osmotic Flow (EOF)' pour le transport d'échantillons et par électrocinétique (EKF, acronyme anglais de ElectroKinetic Focusing) pour le guidage des molécules.

1. ADN :Acide désoxyribonucléique



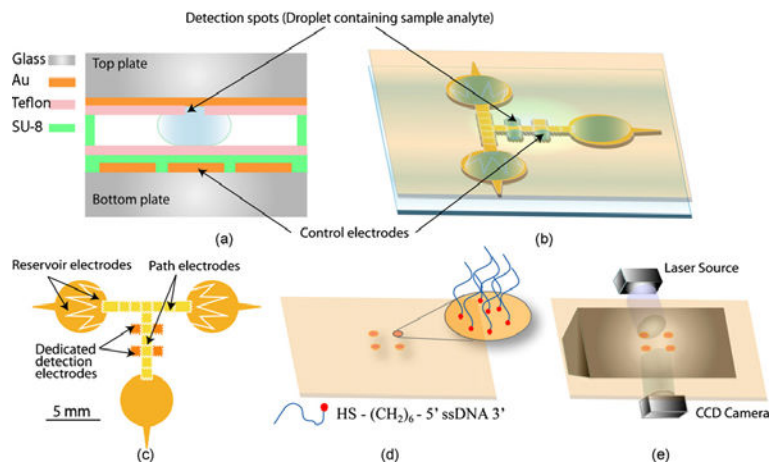


FIGURE 1.24: Présentation schématique de la plateforme EWOD adaptée à une biopuce  $SPR_i$  (a) en coupe verticale, (b) en vue 3D, (c) montrant la disposition des électrodes et des réservoirs, (d) vue de la biopuce inversée montrant les zones immobilisées en ADN, et (e) biopuce assemblée avec le prisme pour la détection SPR; - Extrait de [16]

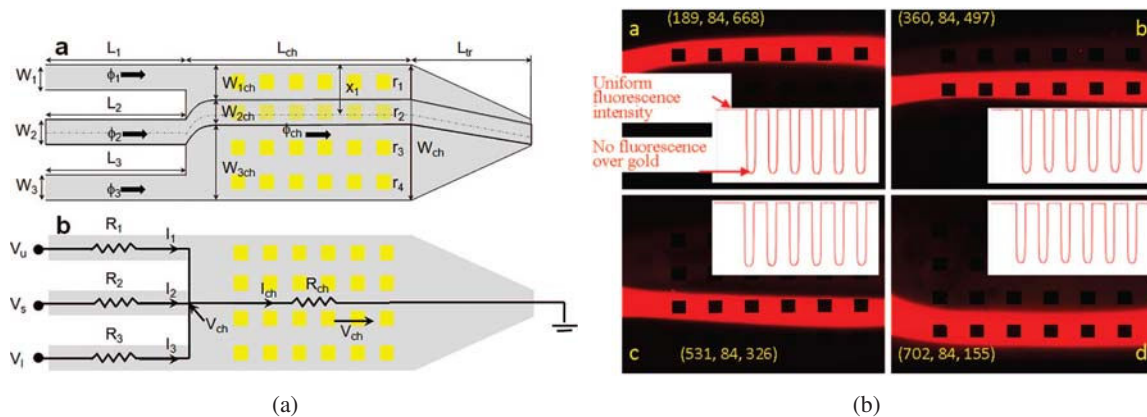


FIGURE 1.25: Plateforme EOF pour guidage de molécules à travers un canal fluïdique - Extrait de [17]

Pour valider le bon fonctionnement du système, des particules fluorescentes ont été introduites dans le liquide afin de visualiser leur comportement dans le canal. La figure 1.25(b) montre que les molécules sont guidées au choix suivant l'une des quatre lignes.

### 1.2.4 Couplage de l'actionnement par ondes acoustiques de surface avec la détection $SPR_i$

Le greffage moléculaire ainsi que la réaction antigénique sont classiquement caractérisés par biocapteurs SPR. Dans ce type de dispositif, les molécules d'intérêt sont ramenées vers la zone sensible de détection par des microcanaux commandés par des micropompes. Cette méthode met en jeu des quantités non négligeables de liquide et par conséquent de molécules. Une alternative à la commande par micropompes a été proposée par Renaudin [18] consistant en l'intégration d'un dispositif à onde de surface SAW dans la chambre fluïdique SPR (figure 1.26(a)). Ce dispositif permet de créer un flux dans la cellule fluïdique induisant une réalisation dynamique de l'événement biologique en question. L'étude de l'intensité du

signal temporel mesuré par SPR, image du greffage moléculaire sur la surface sensible, en fonction de la puissance d'excitation mise en jeu prouve une accélération de la dynamique de l'événement biologique caractérisé grâce à l'agitation acoustique (figure 1.26(b)). Cependant, une perturbation de la mesure SPR est clairement visible due à la présence d'un phénomène d'échauffement thermique induit par la propagation de l'onde acoustique.

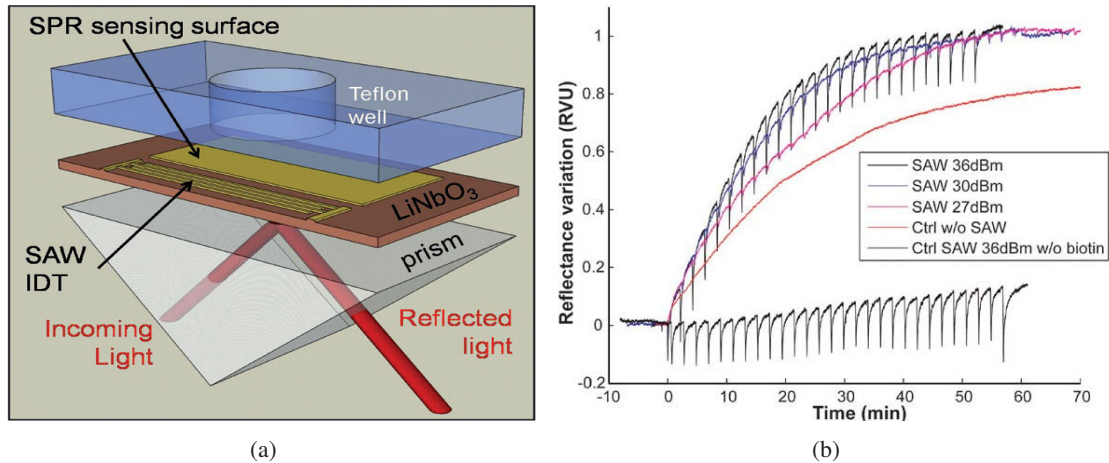


FIGURE 1.26: Schéma de principe montrant l'intégration de la surface sensible à l'SPR et des peignes interdigités du dispositif SAW sur un même substrat LiNbO<sub>3</sub> - Extrait de [18]

### 1.2.5 Élimination de l'immobilisation non spécifique des protéines par QCR

Meyer et Al. [19] ont introduit un Résonateur Quartz Commerciale (QCR) dans une chambre fluide afin de créer un mélange dans celle-ci. La figure 1.27 présente la cellule fluide obtenue. Ce dispositif, résonnant à 5 MHz, est ensuite testé non pas sur l'étape de l'immobilisation en elle-même mais en aval de cette dernière. En effet, l'agitation créée par le dispositif QCR permettrait d'enlever les molécules immobilisées d'une façon non spécifique ou, plus simplement décrites, les molécules non désirées.

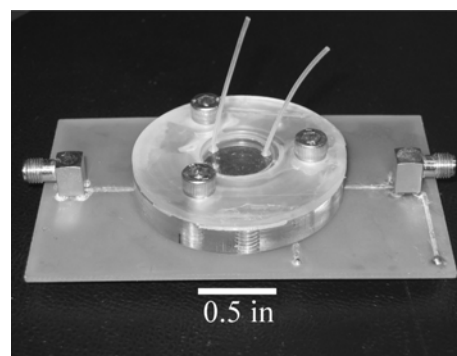


FIGURE 1.27: Cellule fluide QCR avec les connexions fluidiques et électriques intégrées - Extrait de [19]

Pour démontrer l'influence du dispositif QCR sur les couches immobilisées, Meyer a eu recours à la méthode de caractérisation par fluorescence. La figure 1.28 présente l'intensité de fluorescence des quatre

zones immobilisées avant (a) et après l'opération QCR. Ainsi, elle démontre l'élimination des pics dus à l'immobilisation non spécifique. Ce dispositif améliore la spécificité et l'uniformité des couches immobilisées.

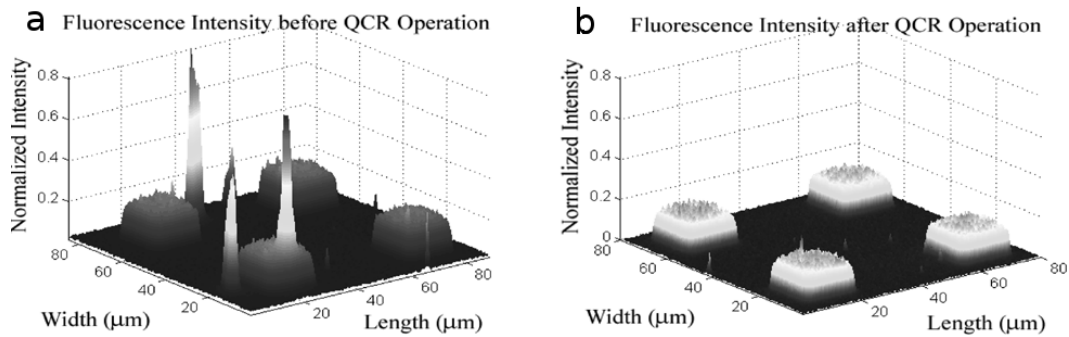


FIGURE 1.28: Mesure 3D par fluorescence avant (a) et après (b) l'opération QCR : élimination des agrégats - Extrait de [19]

### 1.2.6 Elimination de l'immobilisation non spécifique des protéines par SAW

Tout comme le résonateur quartz QCR, le transducteur Acoustique à Ondes de Surfaces (SAW) a été utilisé en aval de l'immobilisation moléculaire dans l'objectif d'éliminer l'immobilisation non spécifique [20]. Pour cela, l'anticorps est tout d'abord immobilisé en liaison covalente sous la forme d'une matrice de spot sur la surface active du transducteur SAW (figure 1.29 (a)). Ensuite, ce dernier est associé à une cellule fluide afin d'être interrogé par méthode optique en parallèle de l'excitation acoustique. Le transducteur excité crée un écoulement dans la chambre (streaming) qui permettrait de continuellement rincer la surface active du transducteur. Après un rinçage de 15 mn, la figure 1.29 (b) montre que l'agitation acoustique n'affecte pas les liaisons covalentes. Une solution antigénique est ensuite introduite afin d'investiguer l'influence acoustique sur la réaction anticorps-antigène. Les images (c) et (d) de la même figure sont prises avant et après le rinçage acoustique. Elles démontrent que l'agitation a bien diminué l'immobilisation non spécifique des antigènes (c'est-à-dire l'immobilisation sur les zones en dehors des spots d'anticorps).

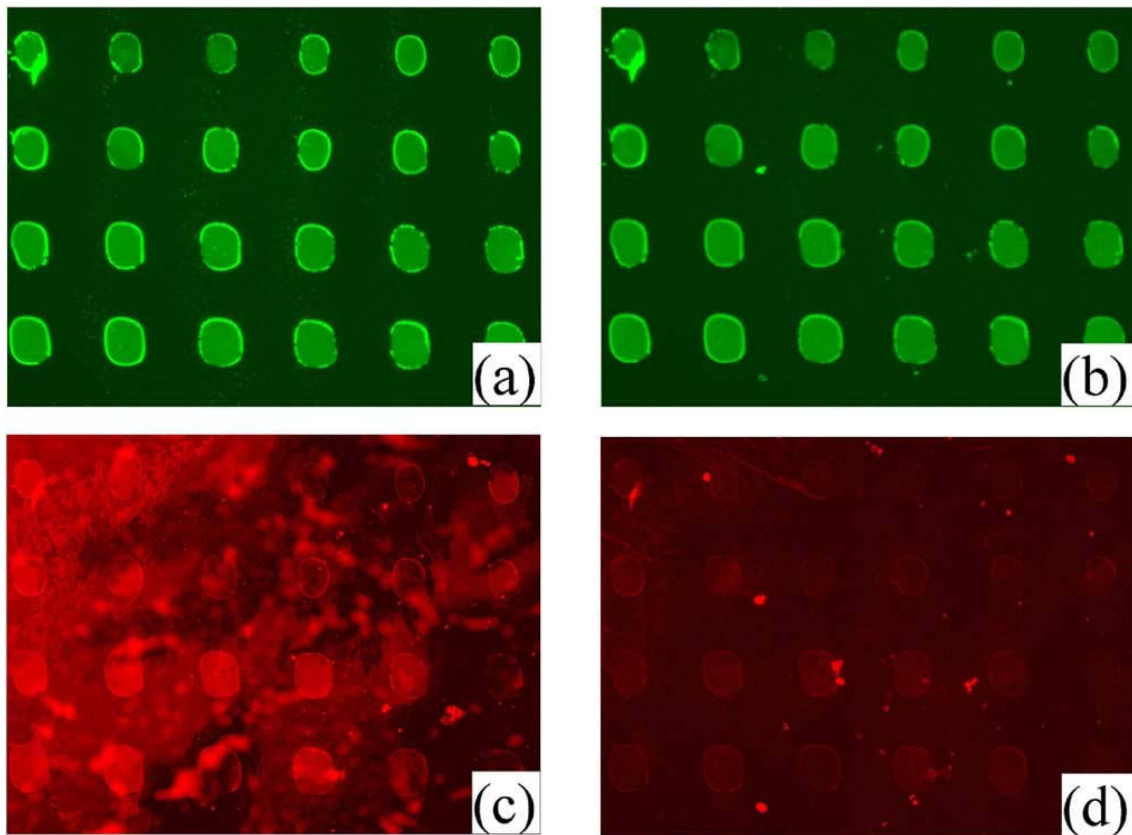


FIGURE 1.29: Images d'une matrice de spots immobilisés en anticorps (a) avant et (b) après le rinçage acoustique. Matrice de spots d'antigène (c) immobilisés de façon spécifique et non spécifique (d) après le rinçage acoustique - Extrait de [20]

### 1.3 Présentation de la thèse

Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe " **Microsystèmes Multiphysiques (MIMU)** " du département Micro Nano Sciences et Systèmes (MN2S) de l'Institut FEMTO-ST (Besançon). Comme son intitulé le résume, notre équipe développe des microsystèmes multiphysiques complexes et innovants, intégrant des fonctions avancées en optique, mécanique, acoustiques, thermiques et biochimiques. Ces travaux sont est à cheval entre les deux activités : "microsystèmes pour le biomédical ", plus particulièrement concernant le greffage moléculaire et "microcomposants fluidiques", dans le cadre des interactions vibro-acoustique avec les fluides.

Pour fixer en parallèle des milliers de biomolécules (ADN, ARN, protéines, *etc.*) à la surface des puces à ADN (biopuces) ou à protéines, plusieurs techniques sont possibles, selon la biomolécule à fixer et la nature du support, elle-même conditionnée par la méthode de détection utilisée. L'immobilisation de biomolécules sur une puce en utilisant la microfluidique continue (*via* des microcanaux) présente l'avantage d'un greffage en mode dynamique. Dans ce mode, les biomolécules sont continuellement transportées avec un débit constant à proximité de la puce à travers les microcanaux.

La volonté continue d'augmenter le nombre des zones immobilisées est adaptée au domaine de la microfluidique discrète pour cette fonction biologique. En effet, en mode spotting (simple dépôt de gouttes

contenant les biomolécules) le nombre de zones immobilisées est uniquement limité par le volume de liquide minimum pouvant être déposé. Cependant, en choisissant cette méthode fluide discrète, on doit souvent renoncer à l'aspect dynamique de la réaction : le greffage s'effectue ainsi en mode passif.

L'objectif de ce travail est de créer une dynamique à l'intérieur d'un ensemble de gouttes porteuses des biomolécules durant l'opération de greffage moléculaire. Pour cela, nous avons choisi d'employer un microdispositif d'activation du mélange (ou micromélangeur) basé sur un générateur de vibrations de basse fréquence permettant de créer simultanément des écoulements dans plusieurs gouttes.

Le générateur de vibration utilise l'effet piézoélectrique pour imposer la vibration d'une membrane autour d'un mode de résonance bien défini. Il se différencie par rapport aux dispositifs à ondes de surface (utilisant également l'effet piézoélectrique) par l'emploi des basses fréquences, la simplicité de sa réalisation, son moindre coût, et surtout la possibilité de structuration de sa surface active (sa membrane en vibration).

Ce mémoire présente les travaux de recherche concernant la conception, la réalisation et la caractérisation de générateurs de vibration dans le but d'introduire des écoulements dans les liquides et plus particulièrement dans des microgouttes. Pour cela, un modèle de l'interaction vibro-acoustique avec le liquide est proposé afin de retrouver les formes et estimer les vitesses d'écoulement. Ensuite, un micromélangeur est conçu en adéquation avec l'application biologique en vue et a été testé dans le domaine du greffage moléculaire.

Le chapitre 1 situe la technique de génération d'écoulement dans le liquide *via* une vibration de basse fréquence par rapport à différents principes physiques pouvant créer des flux dans les gouttes ou encore de les mélanger. Nous donnons ensuite quelques exemples des mélangeurs ayant trouvé application dans le domaine du greffage moléculaire. Ceci nous a permis d'estimer la faisabilité de l'application souhaitée, de mettre en avant l'originalité de l'utilisation du transducteur dans ce domaine et de cerner les différentes difficultés pouvant surgir lors de l'expérimentation, comme à titre d'exemple la variation de la température du liquide.

Le chapitre 2 s'attache plus particulièrement à la conception, la fabrication, et la caractérisation des générateurs de vibrations développés. Notre conception des transducteurs se base sur une modélisation ANSYS du couplage de l'élément piézoélectrique massif avec une membrane. Ceci permet la détermination des modes et des fréquences de vibration pour une géométrie donnée. Nous avons utilisé ces modélisations pour déterminer la structuration adéquate de la membrane qui répondrait au mieux au cahier des charges sans augmenter excessivement les fréquences de vibration mises en jeu. Nous présentons les étapes micro-technologiques que nous avons développés pour la fabrication du transducteur en mettant en avant les difficultés et les raisons de nos différents choix. Nous avons, par la suite, caractérisé le dispositif quant à son mode de vibration, sa capacité de mélange et la variation de température qu'il induit dans le liquide étant donnée la sensibilité, des applications biologiques à cette variable. Pour une telle caractérisation, nous avons été amenés à collaborer avec le Département de Mécanique Appliquée de l'institut FEMTO-ST, pour réaliser des mesures de température dans le liquide par thermographie

infrarouge IR.

Le chapitre 3 est dédié à la modélisation de l'interaction d'une vibration de basse fréquence avec le liquide. Nous nous intéressons au cas d'un liquide confiné entre deux surfaces solides dont une est animée d'une vibration sinusoïdale de basse fréquence. Pour décrire mathématiquement le problème physique, nous nous sommes appuyés sur les développements asymptotiques au second ordre des variables des équations de Navier-Stokes. Puis, nous avons développé une modélisation numérique avec une méthode de type éléments finis que nous avons implémentée en utilisant le logiciel Comsol. Notre modélisation numérique décrit trois cas de figures. Dans un premier temps, nous avons simulé le cas d'une couche "infinie" d'air et nous avons comparé nos résultats à une étude similaire établie par Wan [44]. Ensuite, nous nous sommes intéressés au cas d'une section de liquide entourée d'air qui approche au mieux les conditions expérimentales de la manipulation biologique. Nous avons également modélisé le cas d'une couche infinie de liquide pour établir une comparaison avec les résultats analytiques annoncés dans les travaux précédents effectués au sein de notre laboratoire [45–47].

L'application du micromélangeur au greffage moléculaire fait l'objet du chapitre 5. Pour activer le mélange dans une matrice de gouttes durant l'opération de greffage moléculaire, nous positionnons la puce à immobiliser en contact avec la surface supérieure de la matrice des gouttes qui sont préalablement positionnées sur le générateur de vibration. La puce immobilisée obtenue est ensuite caractérisée avec l'instrument SPR. Ainsi, nous avons montré que l'agitation acoustique durant le greffage multiplie par trois la réponse antigénique des puces. Cette caractérisation postérieure à l'opération du greffage ne donne pas d'information sur l'influence de l'agitation sur la dynamique de la réaction. Nous avons ainsi été amené à collaborer avec le département temps/fréquence de l'institut FEMTO-ST qui développe des biocapteurs à ondes de Love. L'association de notre mélangeur avec ce biocapteur a permis une observation temps-réel du greffage moléculaire. Nous présentons les effets de l'agitation acoustique sur le taux de greffage mais aussi sur la dynamique de la réaction. Pour identifier les courbes expérimentales, nous nous sommes appuyés sur la loi de diffusion moléculaire, modifiée pour prendre en compte le transport des particules induit par l'agitation.

Ce dernier chapitre vise à montrer que l'utilisation de notre micromélangeur pour le greffage moléculaire garantit une méthode simple, économique, qui peut se faire à l'air libre ou en milieu confiné, qui augmente le taux de molécules immobilisées, et qui réduit le temps de réaction à quelques dizaines de minutes au lieu d'un temps beaucoup plus long pour les autres méthodes, souvent complexes, en atmosphère contrôlée et avec des appareils spécifiques ou coûteux.



## **Chapitre 2**

# **Microdispositifs fluidiques : modélisations, réalisations et caractérisations**





Dans ce chapitre, nous présentons deux modèles d'activateurs acoustiques de mélange. Le premier traite le cas d'une goutte unique alors que le second active un mélange dans chaque goutte d'une matrice 5x5. Le transducteur pour une goutte unique met en jeu des volumes variant du microlitre à quelques dizaines de microlitres, tandis que le transducteur matriciel permet la manipulation de volumes inférieure à  $0,5 \mu\text{L}$ . Dans chaque cas, nous détaillons les différentes étapes de réalisation du transducteur : de la modélisation à la caractérisation. Nous validons également la capacité des transducteurs en tant qu'activateurs de mélange. Pour introduire la notion de dispositif de basse fréquence dédié aux mélanges des gouttes, nous présentons tout d'abord un certain nombre de dispositifs réalisés au sein de notre équipe et dont l'observation est à l'origine de l'idée d'une activation de mélange par des vibration de basse fréquence.

## 2.1 Dispositifs Basse Fréquence réalisés au laboratoire

Les études menées au sein de l'équipe MIMU sur les micro-moteurs piézoélectriques [48] ont mis en évidence des observations fortes intéressantes sur l'influence d'une structure vibrante sur des éléments liquides et non plus solides [21, 22, 49].

En effet lorsqu' une couche de liquide de faible épaisseur est déposée sur la surface d'une structure en vibration, nous observons sous certaines conditions d'excitation une déformation permanente de la surface du liquide (Figure 2.1).

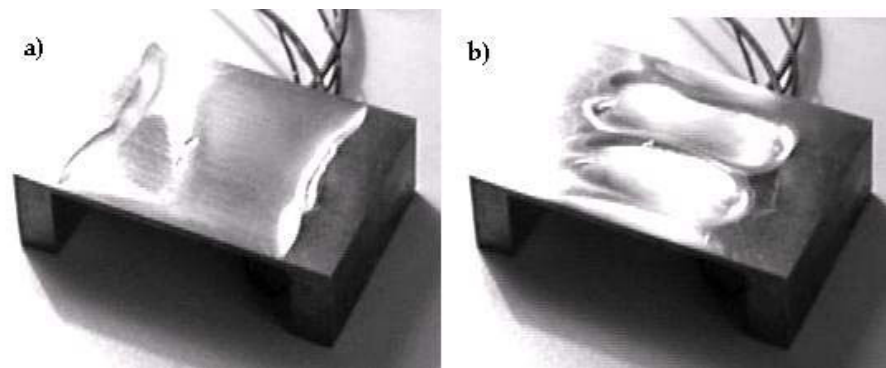


FIGURE 2.1: a) Couche d'eau au repos, b) Couche d'eau déformée par la vibration de la surface.

Les travaux de Biwersi [49, 50] montrent que les bosses de la couche de liquide coïncide avec les ventres de vibration de la structure. Pareillement, les creux de la la couche coïncide avec les nœuds de vibration. Ce phénomène s'expliquerait par l'existence d'un champ de pression généré par la vibration et qui dépend de la position par rapport la structure vibrante.

Dans la cas de la disposition d'une goutte sur la surface en vibration et à une amplitude de vibration suffisante, la goutte se positionne sur le ventre de vibration le plus proche. Une modification de la position du ventre de vibration entraîne le déplacement de la goutte vers celui-ci. Ce principe a été utilisé par Biwersi en vue d'obtenir un déplacement maîtrisé de la goutte. Pour cela, il a montré qu' il faut que son diamètre soit de l'ordre du quart de la longueur d'onde de la vibration.

Cependant, à cause des conditions aux limites, une poutre ne peut avoir qu'une seule disposition donnée pour ses lignes de nœuds. Pour dépasser cette limitation, S. Biwersi a pensé à exciter une structure

bouclée sur elle même (Figure 2.2) qui peut être assimilée à une poutre infinie. Une idée qui a été reprise et approfondie par J. Scottesse [21].

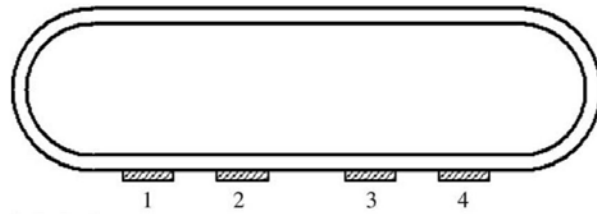


FIGURE 2.2: Structure bouclée pour le déplacement acoustique de liquide - Extrait de [21]

Il est alors théoriquement possible d'exciter le nième mode de flexion avec des lignes nodales décalées en appliquant une commande adaptée (Figure 2.3).

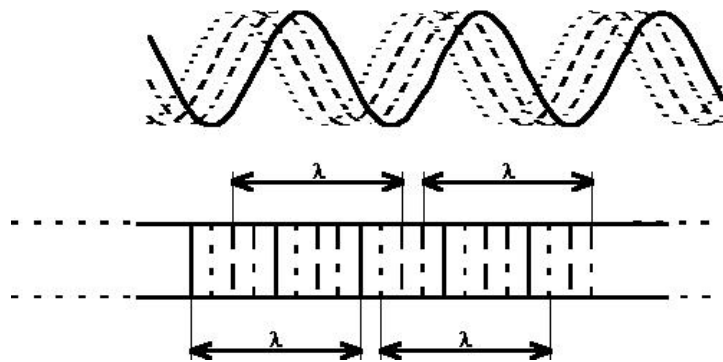


FIGURE 2.3: Excitation d'un mode décalé dans l'espace.

L'étude expérimentale du dispositif n'a pas permis une validation du déplacement de gouttes et s'est limitée au déplacement des bulles d'air contenues dans une couche de liquide. Il semblerait que des difficultés d'ordre technique comme le maintien de la structure et le collage des éléments piézoélectriques sont à l'origine de ce dysfonctionnement.

Une seconde approche du problème proposée par Alzuaga [22] repose sur l'utilisation d'une poutre non bouclée (*i.e.* de dimension finie) et aux conditions aux limites bien déterminées. Pour chaque mode, il existe un certain nombre de ventres dont la position est dictée par les conditions aux limites. En choisissant des modes de rang élevé, la longueur d'onde varie peu tandis que l'on dispose d'un nombre de positions d'équilibre suffisant pour établir le déplacement de la goutte de proche en proche. Une difficulté majeure rencontrée est la perturbation des modes de flexion par des modes parasites (modes de torsion par exemple) qui nuisent au déplacement de la goutte.

Pour surmonter cette difficulté, la géométrie de la poutre a été modifiée afin de la rigidifier d'avantage suivant la largeur (Figure 2.4). En effet, des nervures ont été ajoutées périodiquement sous la poutre dans le sens de la largeur. L'objectif étant d'augmenter les fréquences de résonances des modes parasites en perturbant le moins possible les modes de flexion pure. Un saut de fréquence est ainsi créé pour séparer les deux types de modes. Cinq modes de flexion sont utilisés pour commander le déplacement de proche en proche de la goutte.

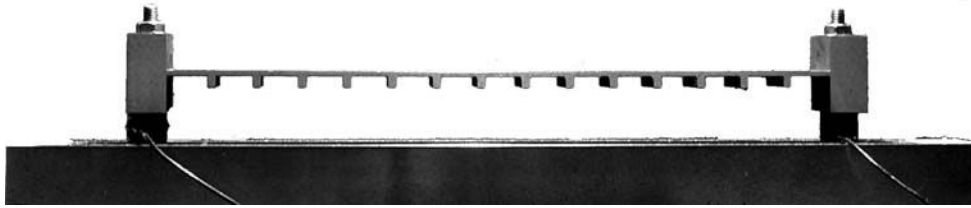


FIGURE 2.4: Dispositif pour le déplacement de liquides par vibrations basses fréquences - Extrait de [22]

### *Du déplacement à la nébulisation des liquides.*

Quelquefois, lors des différentes expérimentations concernant le déplacement des gouttes, un phénomène de nébulisation du liquide apparaît. En effet, quand l'amplitude de vibration de la structure devient assez importante [51], de fines franges apparaissent à la surface de la goutte, puis des gouttelettes sont éjectées de cette dernière (Figure 2.5). Ce phénomène est pénalisant pour le déplacement de liquide mais pourrait faire objet d'une application différente.

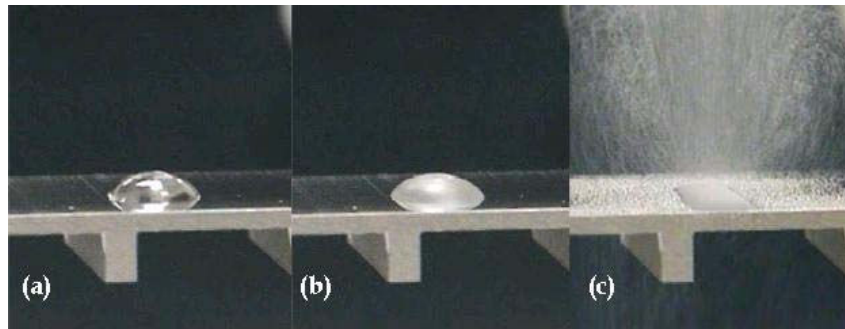


FIGURE 2.5: Photographies d'une goutte soumise à différents niveaux de vibration ; (a) goutte au repos, (b) apparition de l'onde capillaire, (c) nébulisation.

La viscosité du liquide tend à augmenter l'amplitude de nébulisation tandis qu'elle influe peu sur l'amplitude nécessaire au déplacement.

## 2.2 Transducteur d'activation de mélange

### 2.2.1 Transducteur pour une goutte

Le comportement d'une goutte en présence d'une vibration de basse fréquence a été longuement observé dans notre laboratoire [45–47]. En effet, en fonction de l'intensité de ce dernier plusieurs phénomènes physiques sont observés. Tout d'abord, un phénomène d'écoulements hydrodynamiques apparaît au sein de la goutte (figure 2.6). Pour une amplitude de vibration supérieure, la forme de la goutte, initialement sphérique, se trouve modifiée ainsi que son angle de contact avec la surface du transducteur. Dans certaines conditions, cela induit un regroupement d'éventuelles particules au centre de la goutte. Pour répondre aux exigences de notre cahier de charges, détaillé dans l'introduction, nous avons pensé à utiliser

le phénomène d'écoulement hydrodynamique pour déclencher un mélange interne continu au sein de la goutte.

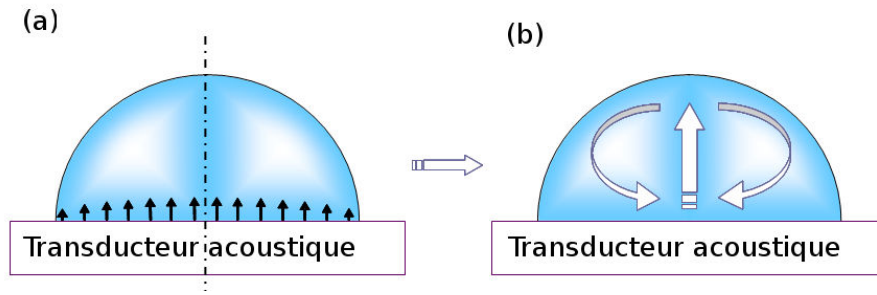


FIGURE 2.6: Apparition d'écoulements hydrodynamiques dus au champ acoustique

### 2.2.1.1 Présentation du transducteur

D'une manière générale, les principaux éléments constitutifs d'un transducteur acoustique sont présentés dans le schéma suivant (figure 2.7 -a). Il est globalement constitué d'une structure vibrante (membrane encastrée) associée à un élément piézoélectrique décrit également par élément actif.

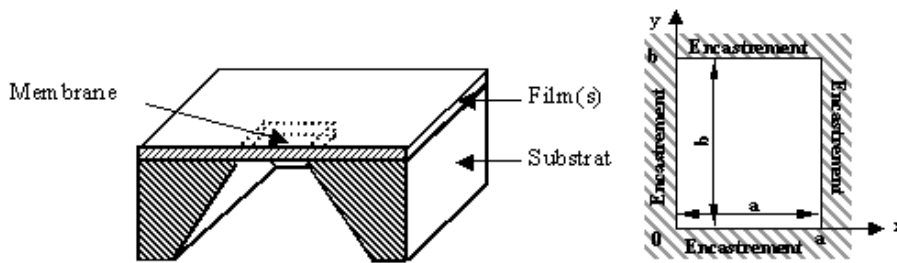


FIGURE 2.7: Schéma de principe d'un transducteur acoustique en coupe et son modèle simplifié

Le rôle de l'élément piézoélectrique est de générer des vibrations dans une membrane : portion amincie de forme carrée, rectangulaire, circulaire ou autres de la structure. Dans le cadre de notre étude, nous considérons uniquement le cas d'une membrane carrée. Cette décision est justifiée par des raisons technologiques de fabrication étant donné le choix de la gravure KOH pour la réalisation<sup>2</sup>.

Plus le substrat entourant la membrane est épais plus l'énergie de vibration est localisée dans la membrane. Dans le cas contraire, une dispersion de l'énergie dans le substrat limite les performances du transducteur. L'élément actif peut être réalisé par dépôt d'une couche piézoélectrique ayant une épaisseur suffisante pour exciter la membrane. Cependant, la réalisation de cette couche rajoute des contraintes technologiques à la fabrication du transducteur. Il est également possible d'utiliser des piézo-céramiques massives. Dans notre cas, nous retenons ce dernier choix afin de garantir une relative souplesse dans la réalisation du transducteur et au moindre coût. L'assemblage de l'élément actif et de la structure silicium se fait par simple collage. Nous nous imposons dès les premières réalisations de dimensionner la

2. Les détails de la fabrication sont donnés dans la section 2.2.1.2

structure afin qu'elle soit adaptée à l'application biologique en vue. Nous rappelons que la biopuce à utiliser admet une zone sensible de  $12 \times 12 \text{ mm}^2$ . Afin d'avoir la possibilité d'activer un mélange dans un liquide couvrant la totalité de cette surface nous adoptons les mêmes dimensions pour la membrane ( $12 \times 12 \text{ mm}^2$ ).

Nous avons utilisé le logiciel de simulation par éléments finis ANSYS Multiphysiques afin de déterminer les fréquences de vibration du transducteur. En première approximation, l'influence du substrat sur la fréquence de résonance est négligée [52]. Cette fréquence est principalement déterminée par les dimensions et les propriétés de la membrane. Par conséquent, nous avons modélisé l'ensemble d'un élément piézo-électrique collé à la membrane. En seconde approximation, la membrane étant solidaire au substrat nous la considérons entièrement encadrée à ses bords (figure 2.7-b). Une analyse structurale nous permet de déterminer les modes de vibration correspondant aux fréquences de résonance. Les modes sont usuellement classés suivant le nombre de nœuds ou de ventres selon les axes x et y. Ainsi, une vibration avec 5 ventres selon x et 2 ventres selon y est notée : Mode (5,2). La figure 2.8 présente le maillage adopté pour les simulations. Notons que le maillage retenu est un maillage régulier et non pas aléatoire ; le pas de maillage est de  $250 \mu\text{m}$ . Nous nous intéressons à un mode dégénéré apparaissant à une fréquence de résonance de 17,6 kHz (figure 2.9).

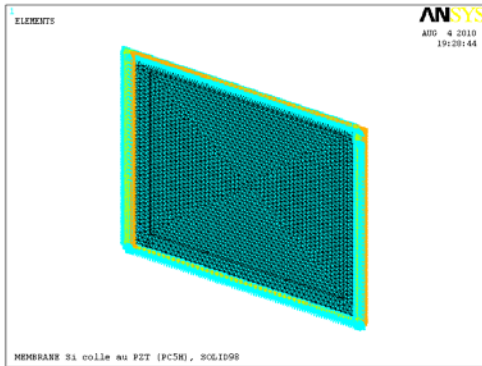


FIGURE 2.8: Maillage retenu pour la simulation en utilisant ANSYS multiphysiques ; le pas de maillage est  $250 \mu\text{m}$ .

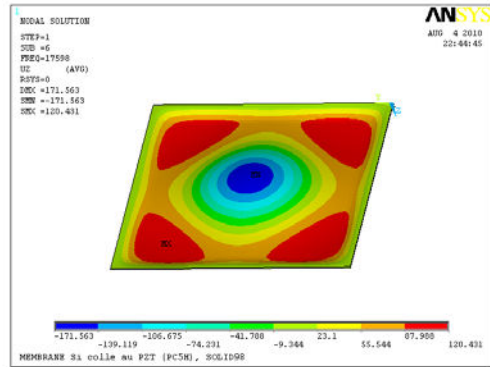


FIGURE 2.9: Mode de vibration retenu du transducteur

Pour valider les résultats obtenus par l'outil de simulation ANSYS, nous comparons la fréquence de résonance obtenue dans le cas de la membrane précédemment décrite à celle analytiquement calculée. Les fréquences de résonance d'une membrane carrée sont données d'après les travaux de Jonsmann [53] par l'équation suivante :

$$f_{mn}^2 = C_{9mn}^2 \frac{E}{\rho(1-\nu^2)} \frac{h^2}{a^4} (1 + C_{10mn}(1+\nu)\epsilon_0 \left(\frac{a}{h}\right)^2 + c_{11mn} \left(\frac{W}{h}\right)^2) \quad (2.1)$$

Où  $f_{mn}$  est la fréquence de résonance du mode (m,n) considéré,  $\epsilon_0$  la déformation équi-biaxiale initiale,  $W$  l'amplitude de vibration maximum,  $C_{imn}$  (i =1 à 8) des constantes données dans le tableau A.1 pour quelques modes,  $\rho$  masse volumique du matériau,  $E$  module de Young,  $\nu$  coefficient de Poisson,  $a$  côté de la membrane et  $h$  son hauteur.

TABLE 2.1: Constantes relatives au calcul de la fréquence de résonance d'une membrane carrée

Mode m n	(1,1)	(1,3)+(3,1)
$C_{9mn}$	1,65327	6,07552
$C_{10mn}$	0,22270	0,07514
$C_{11mn}$	0,35291	1,37232

Pour une membrane en silicium, nous adoptons les valeurs numériques suivantes :

- $\rho = 2300 \text{ Kg/m}^3$
- $E = 1,9 \cdot 10^{11} \text{ Pa}$
- $\nu = 0,25$

### 2.2.1.2 Fabrication

Les performances de l'activateur acoustique s'estiment principalement à partir de son amplitude vibratoire et la localisation de cette vibration au niveau de la membrane. Diverses raisons sont causes d'une limitation de ces performances, empêchant d'atteindre les conditions requises :

- La qualité d'adhésion de la céramique piézoélectrique sur la structure silicium joue un rôle critique. En effet, l'augmentation de la température de la céramique en raison des pertes limite les performances.
- Un niveau d'excitation trop important fait entrer dans certains cas le matériau de la membrane dans un domaine plastique non linéaire, ce qui introduit des phénomènes d'hystérésis sur le niveau de vibration.
- Les propriétés des céramiques piézoélectriques conditionnent l'amplitude vibratoire maximale disponible.

Ainsi, nous tiendrons compte de ces considérations dans le dimensionnement et la fabrication des transducteurs. Les choix technologiques pour la conception du microsystème ont hérité de l'expérience du staff technique du Laboratoire Femto-st et de nos acquis issus des développements antérieurs dans le domaine. Ainsi, nous avons choisi le Silicium pour la fabrication de la membrane en raison de l'importante expérience acquise concernant son usinage. Dans un souci de miniaturisation du transducteur, nous nous proposons d'intégrer les électrodes directement sur le substrat. Cela permettra également un accès facile aux électrodes de la piézocéramique. Pour cela, nous considérons trois propositions qui ont été testées dans le cadre de la conception de moteurs piézoélectriques [54] :

- Utiliser la métallisation en vue d'obtenir des plots de connexions déposés sur le substrat silicium à travers une couche d'oxyde isolante. Néanmoins, le résultat n'était pas satisfaisant du fait de la faible résistivité entre les plots témoignant d'une isolation insuffisante.
- Employer un circuit imprimé sur un film souple en capton qui sera, par la suite, rendu solidaire au substrat. Cette méthode a remédié au défaut observé dans la première proposition.
- Utiliser un circuit imprimé rigide solidarisé par collage au substrat, qui assurera d'une part la connexion électrique mais aussi rigidifiera par l'occasion le substrat (pour limiter la perte d'énergie vibratoire sur le cadre).

TABLE 2.2: Caractéristiques du substrat Silicium

Diamètre	4"
Épaisseur ( $\mu\text{m}$ )	506
Orientation	(100) $\pm$ 0,05°
Précision	3 $\mu\text{m}$ max
Type de dopage	Intr
process	CZ
Résistivité ( $\Omega$ cm )	>200

Finalement, nous avons tout de même retenu une réalisation des électrodes directement sur le substrat (première proposition). En effet, compte tenu de l'application biologique du transducteur, ce dernier devrait résister à des étapes de nettoyage aux solvants acétone et éthanol. Le circuit imprimé rigide est assez sensible à ces liquides. En plus, son collage au substrat ainsi que celui de la feuille de capton fait appel à des colles aussi sensibles à ce type de liquides. Afin de reporter les électrodes directement sur la substrat, nous devons remédier à la faible résistivité notée. Pour cela, nous choisissons d'employer du silicium résistif comme matériaux (table 2.2). Nous prendrons des précautions supplémentaires qui seront détaillées dans les étapes technologiques de réalisation.

Pour réaliser la membrane, nous faisons appel à une technique classique de gravure humide en utilisant des solutions aqueuses d'hydroxyde de potassium (KOH) permettant une réalisation aisée de membranes carrées. Pour cela, une première étape dans le procédé de réalisation (voir figure 2.10) est l'oxydation du wafer. L'oxyde, de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, constitue un masque pour la gravure humide. Une étape de photolithographie suivie d'une étape de révélation permet la réalisation du motif de la membrane : un carré de 12x12 mm<sup>2</sup> centré sur un substrat de 30x25 mm<sup>2</sup>, en résine photosensible positive S1813. Une étape de dissolution de l'oxyde permet de reproduire les motifs du masque en résine sur la couche d'oxyde. Le silicium perçu par la solution KOH est alors gravé avec une vitesse de l'ordre de 0.2 à 0.25  $\mu\text{m}/\text{min}$  sur une profondeur de 450  $\mu\text{m}$ . Une membrane de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est ainsi obtenue.

Scortesse [54] a reporté les électrodes sur le substrat à ce niveau du procédé, comptant ainsi sur la couche d'oxyde restante après gravure KOH pour faire office de film isolant entre les électrodes. Cependant, cette couche étant relativement consommée par la gravure, présente nécessairement des hétérogénéités et probablement des zones silicium dépourvues d'oxyde. Cette observation pourrait expliquer la faible impédance déduite par Scortesse. Pour résoudre cette problématique, nous avons désoxydé complètement la structure. Puis, nous avons procédé à une seconde étape d'oxydation double face qui assure par son homogénéité une isolation inter-électrodes suffisante et une biocompatibilité de la face avant.

Le report des électrodes s'effectue par dépôt d'une couche de 0.5  $\mu\text{m}$  d'aluminium suivi par une étape de photolithographie puis d'une gravure humide de ce métal permettant d'usiner les électrodes sur la face arrière (figure 2.11-a). L'électrode centrale, s'étalant sur la totalité de la membrane, est la masse. Elle admet deux zones d'accès dans l'objectif de minimiser le risque d'une discontinuité entre l'aluminium déposé sur la membrane et celui déposé sur le substrat. Dix électrodes indépendantes supplémentaires figurent sur le substrat.



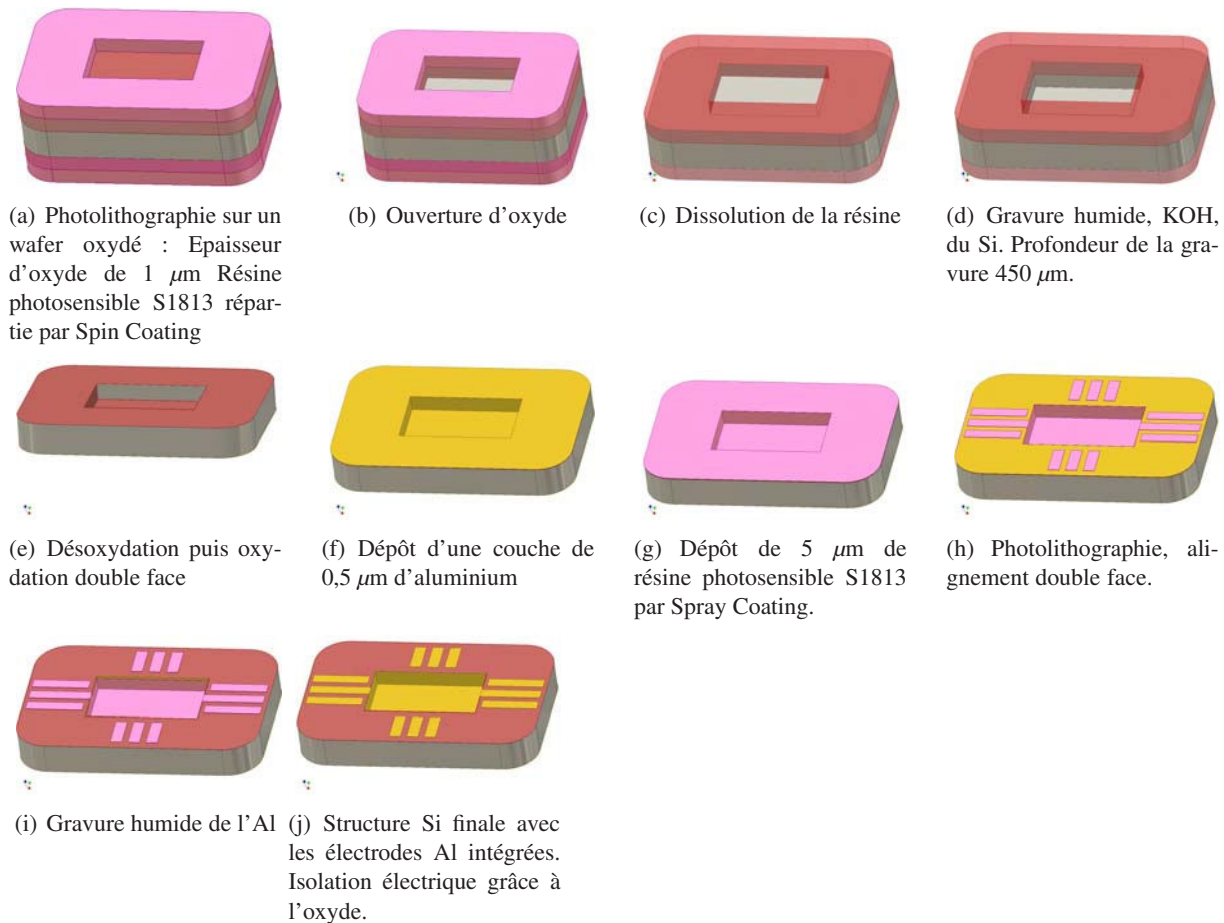


FIGURE 2.10: Etapes du procédé de fabrication de la structure Si relative au transducteur

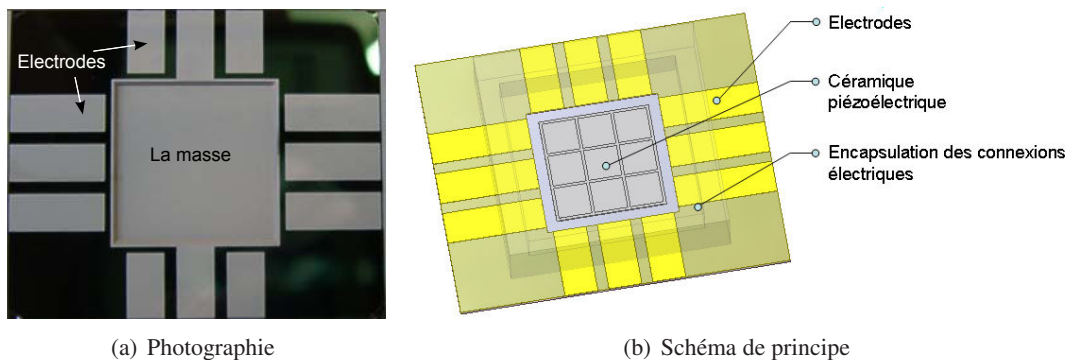


FIGURE 2.11: Face arrière du transducteur pour une goutte.

Une fois la structure Si réalisée, nous procédons au collage de la céramique piézoélectrique sur la face arrière de la membrane (c.à.d. coté gravée, figure 2.11-b). Pour cela, nous utilisons la résine Epoxy conductrice E205. Cette résine assure la conductivité entre la masse déposée sur le substrat et celle de l'élément piézoélectrique. Cette étape est déterminante dans le bon fonctionnement du transducteur. Classiquement, le collage s'effectue d'une façon manuelle impliquant un centrage et un alignement moyennement

précis de la piézocéramique par rapport à la membrane. De plus, l'épaisseur de la couche de colle est moyennement maîtrisée.

Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser l'instrument d'assemblage Flip Chip pour automatiser cette étape. En effet, la piézocéramique est rendu solidaire à un bras robot qui permettrait de récupérer une fine couche de colle sur la surface de l'élément piézoélectrique par sérigraphie puis le positionner avec précision par rapport à la structure silicium. Le bras applique ensuite une force calibrée homogène sur la totalité de la céramique assurant ainsi l'homogénéité de la couche de colle et sa faible épaisseur. L'instrument permet aussi de varier la température des deux parties à assembler pour polymériser la colle. Nous n'avons pas utilisé cette option pour des raisons de contraintes de temps car dans ce cas il est nécessaire de procéder à plusieurs expériences pour déterminer le cycle de température adéquat ; un résultat qui est déjà établie dans le cas d'une polymérisation dans l'étuve. Une masse calibrée est posée sur l'ensemble piézocéramique-membrane durant le recuit afin de garantir une répartition homogène de la colle. L'ensemble est introduit dans l'étuve sous une température de 80°C pendant 90 mn.

Une soudure par ball bounding clôture le procédé de fabrication permettant ainsi de relier les électrodes déposées sur le substrat à celles de la céramique piézoélectrique.

D'autre part, nous avons réalisé un circuit imprimé PCB (acronyme anglais de **Printed Circuit Board**) adapté pour recevoir la structure silicium. L'idée est de coïncider les électrodes de la structure 'Si' avec celles du PCB afin d'établir des connexions électriques par contact. Deux câbles viennent appliquer une force sur les bords de la structure 'Si' pour garantir le contact entre les plots homologues. Dans cette configuration, la structure 'Si' est facilement démontable et par conséquent lavable.

Cette méthode n'a pas aboutit du fait que l'excitation électrique ne parvient pas à la piézocéramique. Ainsi, nous étions obligé de renoncer à l'idée d'une connexion électrique par contact et de coller la structure sur un connecteur PCB (figure 2.12). Le nettoyage du transducteur devient une opération fastidieuse. Les connexions électriques entre la structure 'Si' et le PCB sont réalisées par Ball Bonding après une étape nécessaire de dorure de ce connecteur.

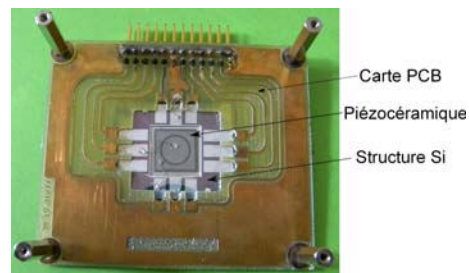


FIGURE 2.12: La structure Si reportée sur un connecteur PCB

**Structuration de l'élément piézoélectrique** Les éléments piézoélectriques utilisés dans cette étude sont des céramiques massives PSI-5A4E-602 achetées chez 'Piezo Systems'. Elles sont initialement sous une forme carrée de 80 mm de côté et de 127  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ce type de piézocéramique admet deux électrodes en nickel. Pour exciter le mode de vibration fondamental de la membrane, il est conseillé de donner une forme circulaire aux électrodes d'excitation de la piézocéramique. En plus, afin de contrôler

l'état du transducteur une seconde électrode est nécessaire. La figure 2.13 présente la disposition des électrodes d'excitation et de contrôle. Pour réaliser de telles formes, nous pouvons procéder à une gravure chimique de la couche de nickel. Cependant, nos premiers essais de bonding pour relier les électrodes de la piézocéramique à celles de la structure silicium ont présenté une mauvaise qualité de liaison entre le filament en aluminium et ce type de couche. Pour surmonter cette difficulté, nous rajoutons une étape dans le procédé de la structuration des électrodes. En effet, nous commençons par déposer une couche d'aluminium sur les deux faces de la piézocéramique. Puis, une étape de photolithographie nous permet de reporter les formes désirées sur l'électrode d'intérêt. Ensuite, nous réalisons deux gravures chimiques : de l'aluminium puis du nickel. La résine est par la suite dissoute. Une découpe à la scie permet d'obtenir des piézocéramiques de 10x10 mm<sup>2</sup> adaptées à la membrane de la structure silicium (12x12 mm<sup>2</sup>).

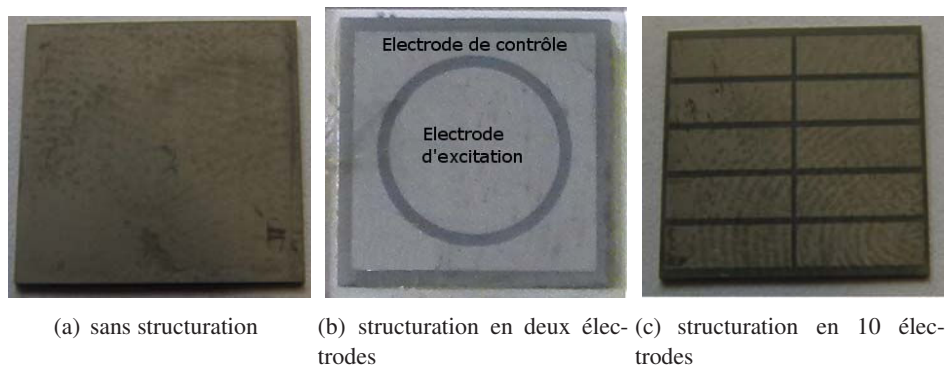


FIGURE 2.13: Structurations des électrodes de la piézocéramique

### 2.2.1.3 Caractérisation

#### Dispositif expérimental

La figure 2.14 montre le schéma fonctionnel de mise en œuvre du micromélangeur. Le générateur de signaux (AFG3220) est associé à un amplificateur conçu et monté en interne à l'institut Femto-st permettant d'appliquer des tensions jusqu'à 200 V pour des fréquences jusqu'à 100 kHz. Un oscilloscope permet de contrôler l'état vibratoire de la membrane et mesurer la tension réellement appliquée.

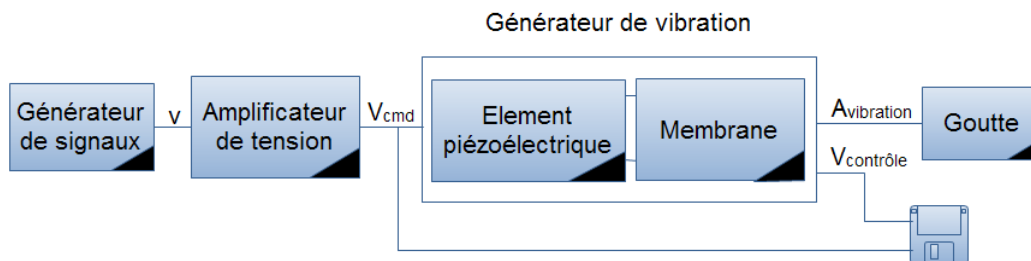


FIGURE 2.14: Schéma fonctionnel du montage

#### Déformation et étalement de la goutte

Nous allons tout d'abord nous intéresser au comportement global de la goutte sous activation acous-

tique. En effet, pour une tension d'excitation de 70 V à la fréquence de résonance 11,16 kHz, l'onde exerce des pressions sur la surface libre de la goutte qui commence à vibrer. Lorsque la pression augmente, la goutte se déforme de manière permanente et change d'angle de contact avec la membrane. Pour mesurer cet angle, nous utilisons un 'Tracker' commercialisé par 'ITconcept', disponible à l'ENSM<sup>3</sup>. Il comporte une caméra CCD avec une optique spécifique, un système d'injection, un système d'éclairage et un logiciel de traitement de donnée 'Windrop'(voir figure 2.15).

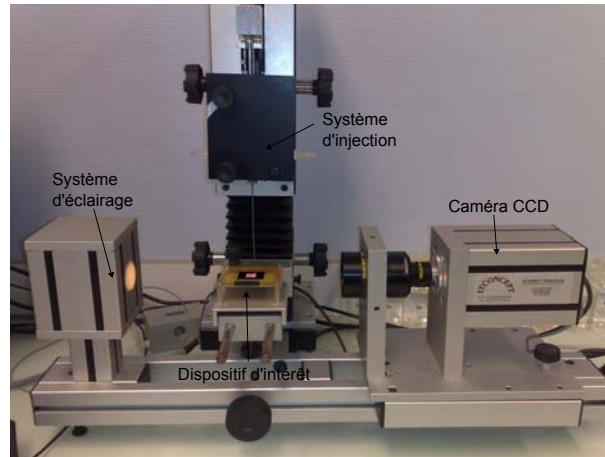


FIGURE 2.15: Dispositif expérimental utilisé pour mesurer l'angle de contact

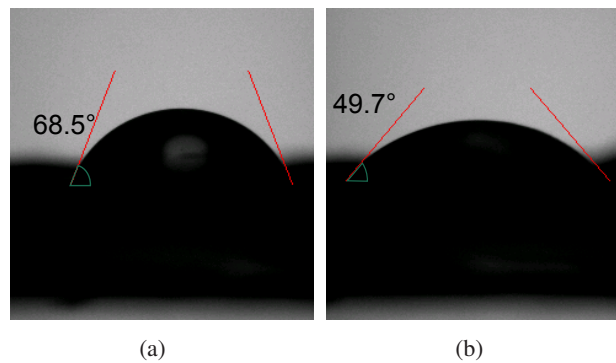


FIGURE 2.16: Les angles de contact (a) en absence et (b) en présence de champ acoustique

La figure 2.16 présente des photographies d'une goutte d'eau de  $10 \mu\text{L}$  en absence (a) et en présence (b) de champ acoustique. Son angle de contact initialement à  $68,5^\circ$ , se voit diminuer à  $49,7^\circ$  sous l'effet acoustique.

### Comportement thermique de la goutte

Afin de quantifier les variations thermiques de la goutte sujette à la vibration, nous avons été amené à collaborer avec Monsieur Vincent PLACET, ingénieur de recherche du Département de Mécanique Appliquée (FEMTO-ST), qui nous a apporté son soutien dans le domaine de la thermographie InfraRouge

3. Ecole Nationale Supérieure de Mécanique et des Microtechniques (Besançon)

TABLE 2.3: Caractéristiques de la caméra IR

Gamme de température	5°C - 250°C
Résolution thermique	<20 mK @ 25°C
Matériaux de détection	InSb 320x240 éléments (30mm x 30mm pitches)
Réponse spectrale	3 mm - 5 mm
Fréquence d'acquisition	1 Hz - 170 Hz Digitale
Vidéo	14 bits
Résolution spatiale	31 mm
Logiciel	Altair

(IR). Il a mis à notre disposition une caméra IR CEDIP JADE dont les caractéristiques sont résumées dans la table 2.3.

Ce type de caméra permet d'enregistrer les différents rayonnements infrarouges (ondes de chaleur) émis par les corps et qui varient en fonction de leur température. On introduit alors le concept d'émissivité permettant de comparer la luminance d'un corps réel à celle d'un corps noir. L'émissivité traduit la capacité des matériaux à absorber ou émettre l'énergie infrarouge. Plus cette valeur est élevée, meilleure est la précision de mesure. L'émissivité est comprise entre 0 (cas d'un miroir) et 1 (cas d'un corps noir). Si nous réglons une valeur trop élevée, la température affichée est inférieure à la valeur effective sous réserve que celle-ci soit supérieure à la température ambiante. Dans notre cas, nous nous intéressons à l'étude de la variation thermique d'une goutte d'eau (émissivité = 0,99) ou de mélange eau-glycérol (émissivité proche de 1). Nous considérons, sauf indication contraire, un volume de gouttes de 10  $\mu\text{L}$ .

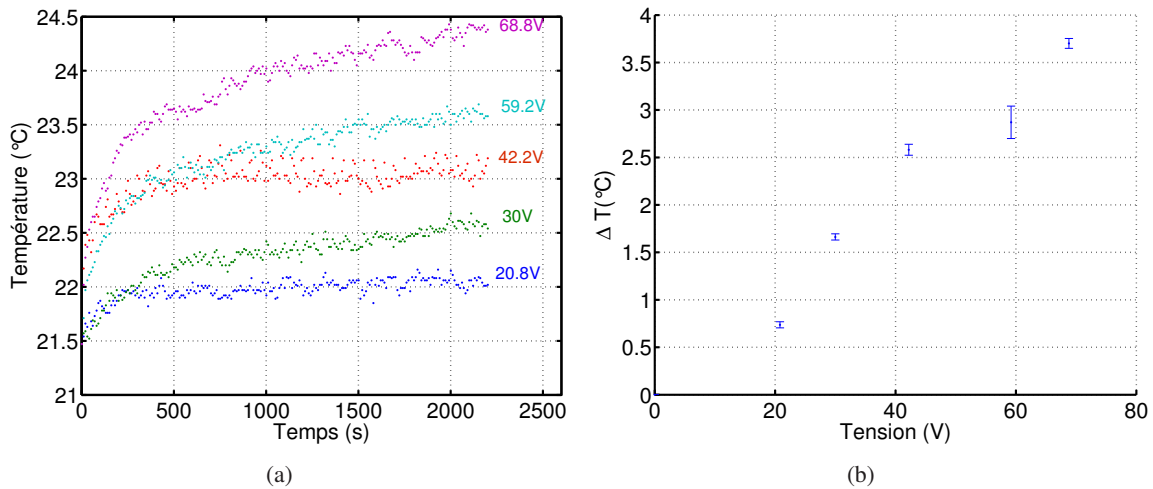
Ce choix de volume est motivé par l'intérêt de comparer nos résultats avec un travail expérimental sur la variation thermique induite dans une goutte de 10  $\mu\text{L}$  par un transducteur à onde de Rayleigh réalisé dans le cadre de la thèse de Monsieur Denis BEYSSEN [55].

**Influence de la tension d'excitation** Pour étudier l'influence de la tension d'excitation, nous devons exciter la membrane autour de sa fréquence de résonance. Or, la fréquence de résonance d'une structure est inversement proportionnelle à la racine carrée de sa masse. Cette dépendance implique que la présence du liquide sur la surface de la membrane décale légèrement la fréquence de résonance. Par ailleurs, l'évaporation de la goutte au fur du temps implique la variation de la fréquence de résonance. Par conséquent, une alimentation à une fréquence constante risque d'exciter la membrane en dehors de la résonance. Pour cette raison, nous considérons une alimentation en balayage autour de la fréquence de résonance de l'ensemble membrane-goutte initiale. Les paramètres d'excitation sont résumés dans la table 2.4.

A une tension constante, la température de la goutte suit une loi d'allure exponentielle (figure 2.17-a). Nous nous intéressons à la variation de la température  $\Delta T$  déterminée par la différence entre la température au régime permanent et la température initiale. La figure 2.17-b montre que la variation de température augmente avec la tension d'excitation. La croissance de la variation de température en fonction de la tension semble linéaire. Notons que l'écart type sur les différents points de mesures pris par goutte est assez faible témoignant d'une homogénéité de la température sur la goutte.

TABLE 2.4: Paramètres d'excitation (tension variable)

Fréquence minimale	18,6 kHz
Fréquence maximale	19 kHz
Sweep	10 ms
Hold	0 ms
Return	1 ms
Type de balayage	Linéaire
intervalle	1 ms

FIGURE 2.17: (a) Variation de la température en fonction du temps pour différentes tensions d'excitations (b) Augmentation de la température  $\Delta T$  en fonction de la tension d'excitation

Deux mécanismes peuvent expliquer l'élévation de la température au sein du liquide. Le premier consiste à une élévation de la température de la membrane induisant ainsi une propagation thermique dans la goutte par conduction. La seconde explication est que les écoulements hydrodynamiques induits par la vibration de la membrane créent un phénomène d'échauffement au sein de la goutte. L'hypothèse la plus probable est que ces deux phénomènes coexistent. La question devient alors : Quel est le phénomène prépondérant ?

Afin de répondre à cette question, il est nécessaire de quantifier l'élévation de la température relative à la membrane. Cependant, étant oxydé thermiquement, notre transducteur est assez réfléchissant ; il n'est donc pas visible par la caméra IR. Pour contourner cet obstacle, nous mesurons la température de la surface de la piézocéramique (face arrière du transducteur). L'objectif par cette mesure est d'estimer, en une seconde étape, la température de la membrane silicium compte tenu de sa conductivité thermique.

La figure 2.18-a présente une image thermique de la piézocéramique à un instant donné. Les points de mesures de 1 à 5 sont affectés à l'électrode d'excitation (disque central) tandis que les points de mesures de 8 à 11 sont affectés à l'électrode de contrôle. La figure 2.18-b trace l'évolution en fonction du temps des températures moyennes sur les deux zones. Nous observons des courbes d'une allure exponentielle identique à celle observée pour l'évolution thermique du liquide. Les deux électrodes voient leurs températures évoluer d'une façon identique. Pour une tension d'excitation de 64 V crête à crête,

nous enregistrons une variation de la température de  $0,3^{\circ}\text{C}$  pour les électrodes. Cette valeur est nettement inférieure à la variation enregistrée dans le liquide sous la même tension qui est de l'ordre de  $3^{\circ}\text{C}$ . Nous en déduisons que la propagation de l'onde acoustique dans le liquide crée une variation thermique dans celui-ci et que ce phénomène domine la conduction thermique.

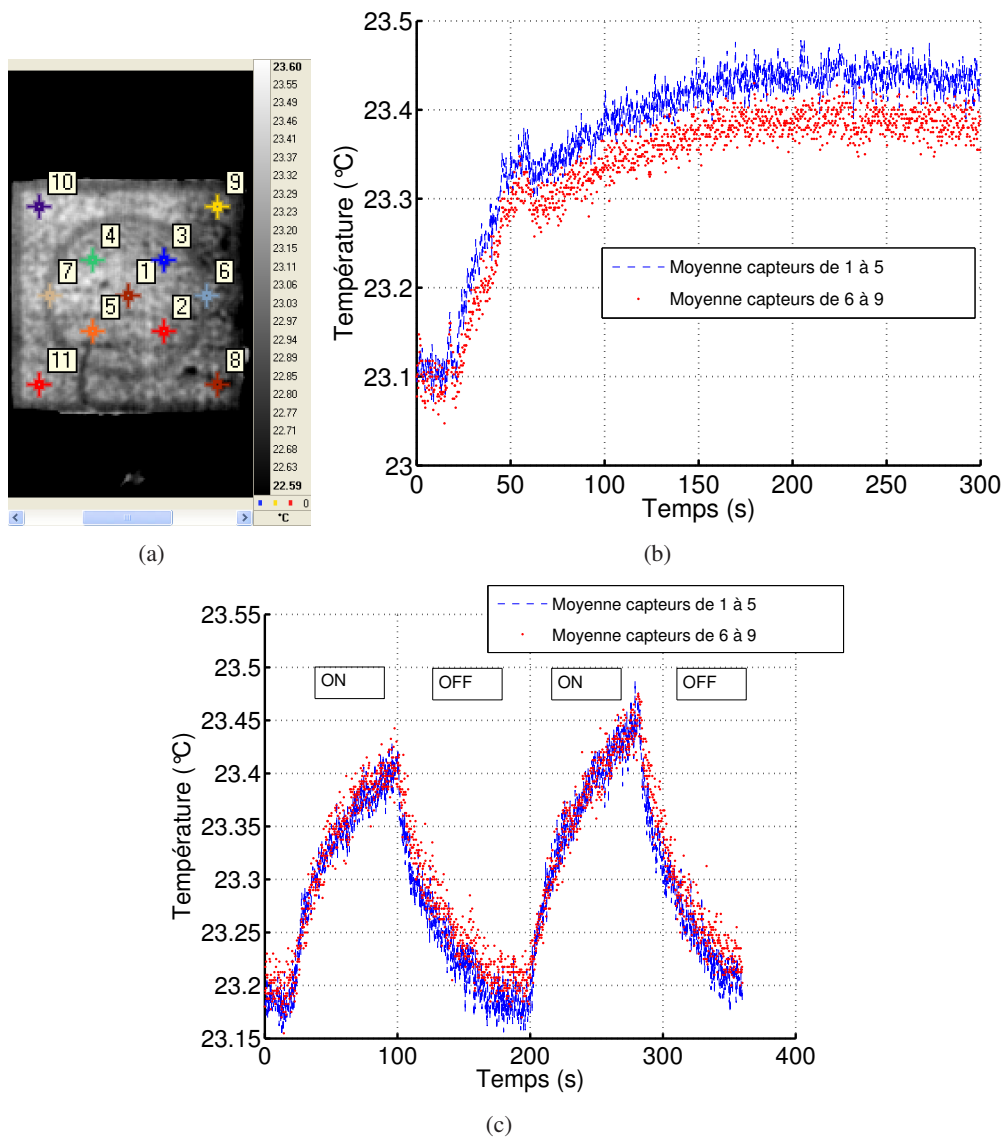


FIGURE 2.18: (a) Points de mesures, (b) et (c) Evolution de la température de surface de l'élément piézoélectrique en fonction du temps

La température de la face supérieure de la membrane Si peut être déduite à partir des mesures présentées en considérant la répartition de chaleur par conduction.

**Influence de la viscosité du liquide** Dans l'objectif d'analyser l'influence de la viscosité du liquide sur l'évolution de sa température en fonction de l'excitation acoustique, nous utilisons des mélanges Eau-Glycérol à des concentrations différentes. La viscosité du mélange pourrait être déduite de la table

en annexe 1. Les mêmes paramètres d'excitations précédemment utilisés (table 2.4) sont adoptés. La figure 2.19 présente la variation de température enregistrée pour différentes concentrations en glycérol. Cependant, nous ne pouvons pas en déduire une monotonie de cette dépendance (figure 2.19-b). Ce phénomène pourrait être dû à une inhomogénéité de la température au sein de la goutte due à l'introduction du glycérol. Rappelons que les mesures présentées sont toujours prises aux centres des gouttes considérées.

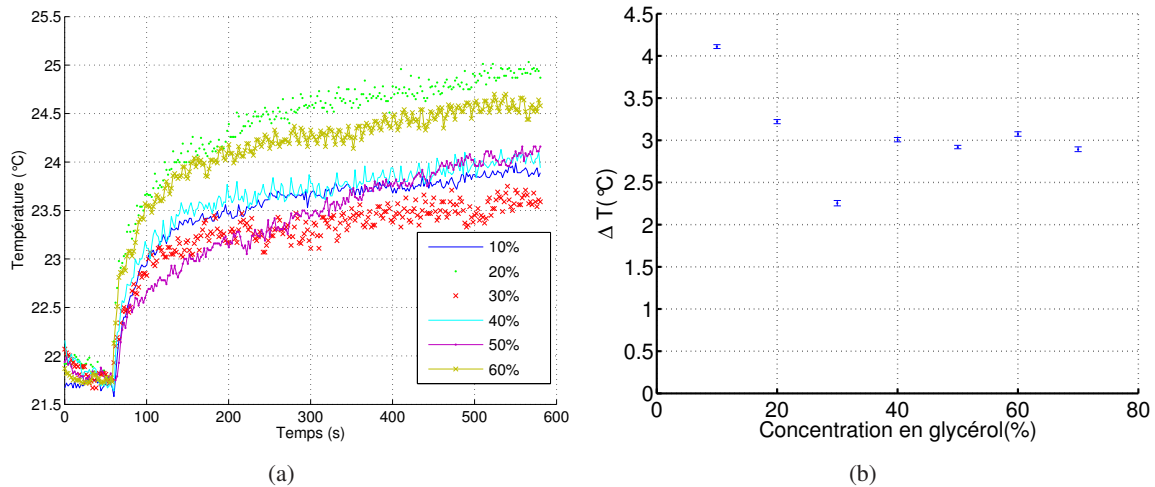


FIGURE 2.19: (a) Variation de la température en fonction du temps pour différentes viscosités (b) Augmentation de la température  $\Delta T$  en fonction de la viscosité.

**Influence du volume du liquide** Nous nous intéressons dans cette partie à l'influence du volume sur l'échauffement de la goutte. La courbe obtenue (figure 2.20-b) à une viscosité et une puissance d'excitation constantes montre que la variation de température est d'autant importante que le volume est petit. Ce résultat est attendu étant donné que le chauffage d'un volume supérieur nécessite plus d'énergie. A puissances égales, la goutte la plus volumineuse est alors la moins chauffée.

**Comparaison avec l'effet thermique induit par un dispositif SAW** Beyssen, dans le cadre de sa thèse, a caractérisé le comportement thermique de gouttes de  $10 \mu\text{L}$  de volume sous excitation acoustique générée par un transducteur à onde de surface SAW. Ce dispositif, tel que le notre, permet de créer un flux interne à la goutte. Beyssen a étudié l'influence de différents paramètres tels que la puissance, la viscosité et le volume. Comme dans le cadre de notre étude, il a mesuré une évolution temporelle de la température d'allure exponentielle au sein de la goutte. Cependant, la constante de temps de montée en température de son dispositif est comprise entre 10 à 20 secondes. Notre transducteur basse fréquence induit une constante de temps de montée de l'ordre de 200 voir 250 secondes. En variant la puissance d'excitation du transducteur à onde de surface, il a noté une variation de température moyenne dans la goutte allant de  $5$  à  $45^\circ \text{C}$ . Rappelons, que nous avons observé une variation comprise entre  $0.5$  à  $4^\circ \text{C}$  pour une plage de la tension d'excitation allant de 20 à 70 V. Dans les deux cas, la variation de la température en fonction de la puissance semble linéaire. Nous n'avons pas pu conclure sur l'influence



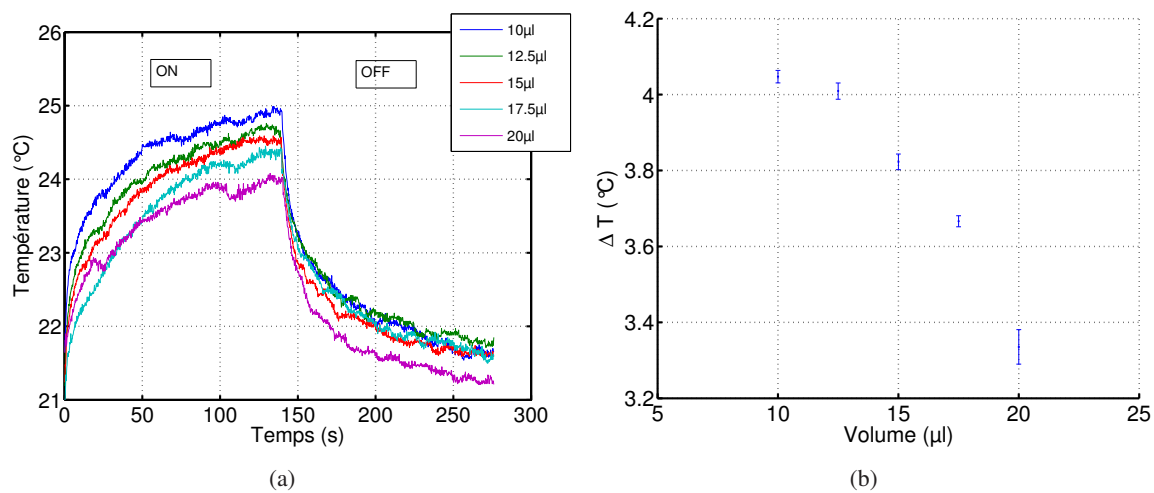


FIGURE 2.20: (a) Température en fonction du temps pour différents volumes (b) Augmentation de la température  $\Delta T$  en fonction du volume.

de la viscosité. Beyssen quant lui a du faire des mesures de rhéologie pour caractériser la dépendance en viscosité sachant que ce paramètre est fort dépendant de la température. Alors que nous avons montré une dépendance de la température moyenne de la goutte de son volume à puissance d'excitation constante dans un intervalle d'étude de  $[10 \mu\text{L} \ 20 \mu\text{L}]$ , Beyssen n'a pas trouvé de variation notable. Pour conclure, le transducteur acoustique basse fréquence semble être plus adapté aux applications de mélange dans les domaines chimique ou biologique sensibles à la température à moins qu'une augmentation de la température du milieu soit préférable. Le transducteur à onde de surface pourrait trouver une application supplémentaire en tant que mécanisme de chauffage pour des réactions de type **PCR (Polymerase Chain Reaction)** dans lesquelles la température est périodiquement contrôlée.

#### 2.2.1.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons conçu, réalisé, caractérisé et validé un transducteur acoustique permettant d'activer le mélange interne dans une goutte dont le volume peut varier entre quelques microlitres à quelques dizaines de microlitres. Nous avons validé la présence de flux dans la goutte en présence de vibration. Nous avons également montré l'existence d'un phénomène d'échauffement thermique du principalement à la propagation de l'onde acoustique dans la goutte. Un phénomène qui dépend étroitement de la tension d'excitation et des volume et viscosité du liquide.

Cependant, un besoin grandissant dans différents domaines (chimique, biologique, médicale ou autre...) consiste à créer le mélange dans des faibles volumes, de l'ordre des nanolitres à quelques centaines de nanolitres, et à manipuler plusieurs gouttes simultanément. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'étude d'un transducteur matriciel.

## 2.2.2 Transducteur matriciel

### 2.2.2.1 Présentation de la structure

La fonction du transducteur matriciel est l'activation du mélange interne à chaque microgoutte d'une matrice sans pour autant déclencher un mélange globale entre les différents échantillons ( figure 2.21-a).

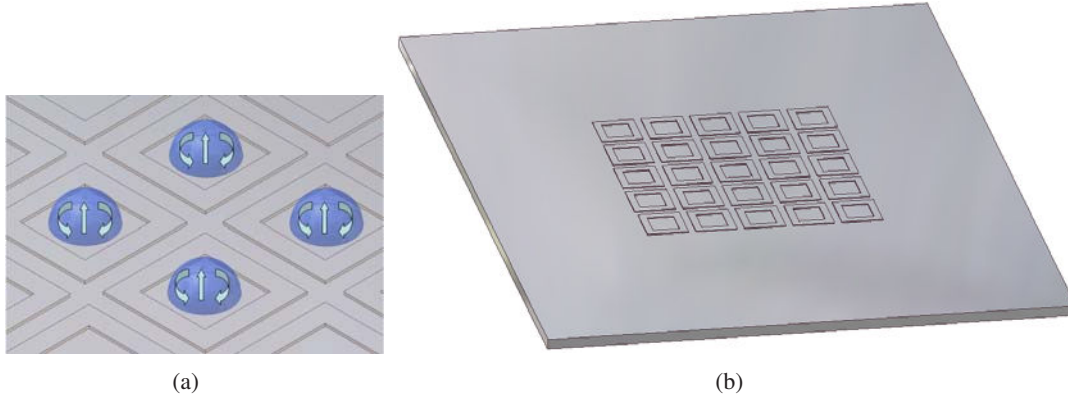


FIGURE 2.21: (a) Activation du mélange interne aux gouttes d'une matrice de (2,2) (b) Schéma de la face avant du transducteur acoustique

Le transducteur matriciel est semblable au transducteur pour une goutte présenté dans le paragraphe 2.2.1.1 de part sa constitution (substrat-membrane-piezocéramique). Cependant, la membrane du transducteur matriciel doit être adaptée afin de recevoir la matrice des microgouttes. Cette dernière doit être facilement positionnée sur la surface du transducteur. Pour se faire, une exigence primordiale à satisfaire dès le dimensionnement de la structure silicium est d'éviter toute contamination possible entre les différentes microgouttes. Rappelons que sous excitation acoustique l'angle de contact d'une goutte avec le transducteur diminue témoignant de l'étalement de la goutte et que pour une intensité importante du champ acoustique un mélange inter-gouttes est favorisé ce qui constitue une menace pour la qualité de séparation entre les gouttes. Afin d'éviter l'effet non désiré de ces phénomènes, nous avons structuré la membrane en matrice de 25 puits (un puits est une forme carrée creuse) pour piéger et séparer les microgouttes (figure 2.21-b).

La taille de la membrane, le nombre des gouttes et la quantité de liquide mis en jeu dictent les dimensions d'un puits. Comme dans le cas du transducteur pour une goutte nous considérons une membrane de  $12 \times 12 \text{ mm}^2$  pour répondre à une exigence de l'application biologique. Nous avons choisi de travailler sur des volumes inférieurs ou égales à 400 nL. Afin de déterminer les dimensions d'une goutte d'un tel volume, nous devons mesurer son angle de contact avec une surface de même qualité que la membrane matricielle à réaliser (oxydée thermiquement). La figure 2.22 montre l'angle de contact d'une goutte d'eau de 400 nL posée sur la surface d'une lamelle de Si oxydée thermiquement. Ainsi, nous avons mesuré un angle de contact de  $\theta=58.8^\circ$  et un diamètre  $D$  de 1,343 mm. Nous en déduisons la hauteur de la

goutte  $h = \frac{\tan(\frac{\theta}{2}) \cdot D}{2} = 378 \mu\text{m}$ . L'objectif de l'introduction du puits est de délimiter la goutte sur la surface du transducteur. Il n'est donc pas considéré comme récipient. Par conséquent, son hauteur n'est pas

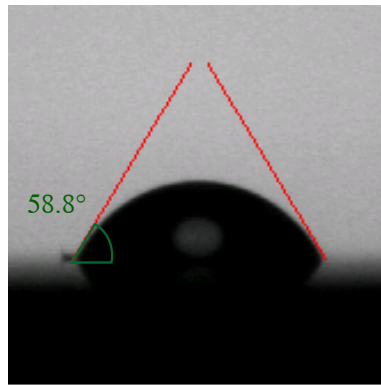


FIGURE 2.22: Angle de contact d'une goutte d'eau de 400 nL posée sur une lamelle en Si oxydée

déterminée par le volume de la goutte. Compte tenu du diamètre du liquide et de la taille de la membrane, le choix d'une matrice de 5x5 puits semble judicieux. Ainsi, soient des puits de côte intérieure 1,15 mm, de côte extérieure 1,95 mm et de hauteur de 50  $\mu\text{m}$ .

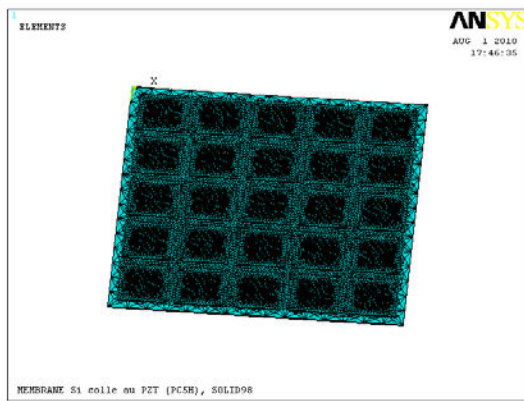
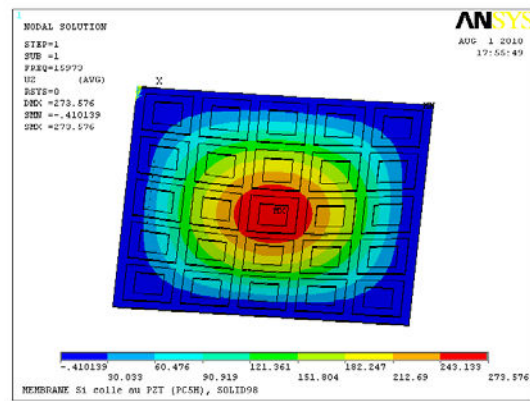
### Modélisation de la structure globale

Une fois encore, en utilisant ANSYS Multiphysique nous simulons l'ensemble piézocéramique-membrane. Cette fois-ci, nous considérons la structuration de la membrane en puits comme le montre la figure 2.23(a). Un pas de maillage de 200  $\mu\text{m}$  est adopté. Afin de faire vibrer uniformément les microgouttes, un choix optimal est d'exciter le mode (5,5). Ce dernier maximisera les vibrations aux niveaux des centres des différents puits (figure 2.23(d)). Le but des simulations est alors de minimiser la fréquence de résonance correspondant au mode (5,5) tout en garantissant son découplage des autres modes. En effet, si deux modes ont des fréquences de résonance proches, cela implique leur présence simultanée et donne lieu à un mode dégénéré. Nos résultats de simulations nous ont mené à considérer une hauteur de puits de 50  $\mu\text{m}$ . La membrane est obtenue par amincissement d'une structure silicium plus épaisse, 500  $\mu\text{m}$ . Ainsi, la membrane est centrée au milieu d'une structure globale de 25x30 mm<sup>2</sup> sur laquelle est gravée une matrice de 5x5 puits.

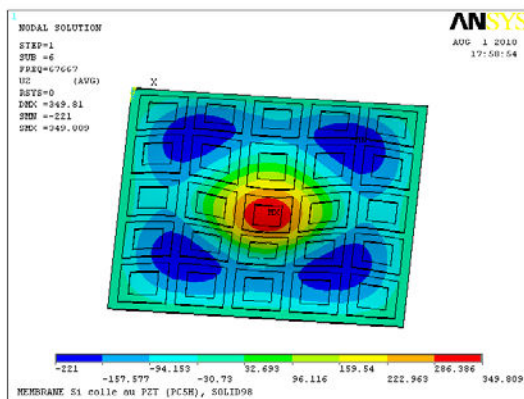
La figure 2.23 montre les trois modes retenus dans le cadre de cette étude.

#### 2.2.2.2 Fabrication du transducteur matriciel

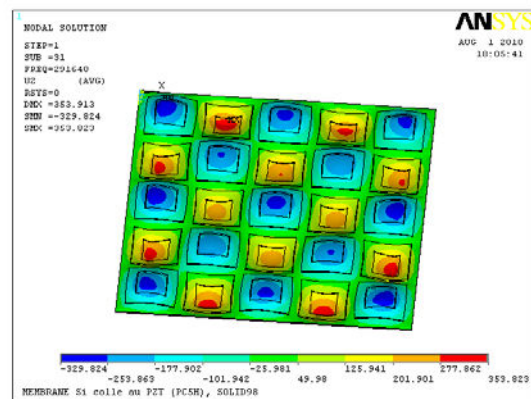
Le procédé de réalisation de la structure Si structurée en matrice est légèrement différent de celui du transducteur pour une goutte. Il fait intervenir une gravure chimique KOH en deux temps 2.24. La première gravure permet d'amincir le substrat, initialement d'épaisseur 500  $\mu\text{m}$ , jusqu'à l'obtention d'une membrane de 150  $\mu\text{m}$ . Puis, une deuxième gravure double face d'une profondeur de 50  $\mu\text{m}$  (de part et d'autre de la membrane) permet d'usiner les puits sur la face avant et d'amincir d'avantage la membrane pour obtenir une épaisseur finale de membrane de 50  $\mu\text{m}$ . La suite du procédé de fabrication est identique à celui du dispositif pour une goutte. Nous validons les dimensions de la structuration réalisée par des mesures optiques (figure 2.25(a) et (b)). Une mesure par MEB (figure 2.25(c)) permet de déterminer l'épaisseur finale de la couche de colle assemblant membrane et piézocéramique ( $e=15 \mu\text{m}$ ).

(a) Maillage retenu avec un pas de  $200 \mu\text{m}$ 

(b) Mode fondamentale à une fréquence de résonance de 15,973 kHz



(c) Mode dégénéré n°5 à une fréquence de résonance de 67,667 kHz



(d) Mode (5,5) à une fréquence de résonance de 291,64 kHz

FIGURE 2.23: Modélisation de la structure globale : membrane Si collée à un élément piézoélectrique

La figure 2.26 présente le transducteur matriciel obtenu.

### 2.2.2.3 Caractérisation du transducteur matriciel

#### Modes de vibration

Pour comparer les fréquences de résonances de la membrane par rapport à celles déterminées par modélisation ANSYS, nous relevons tout d'abord la fonction de transfert du transducteur correspondant à l'électrode de réponse sur l'ensemble des électrodes d'excitation. La figure 2.27-a présente le spectre des fréquences comprises entre 10 kHz et 300 kHz. Notons que le mode fondamentale apparaît à une fréquence de 9,85 kHz ( $f_{simulation}=15,973$  kHz) et que le mode 5 est susceptible d'être à la fréquence 69,4 kHz ( $f_{simulation}=67,667$  kHz). Pour confirmer ce dernier résultat, nous faisons appel à une technique optique en utilisant une sonde interférométrique (sonde BMI) permettant de donner une image précise de la membrane en vibration. Des images de l'amplitude et de la phase de la membrane à une fréquence

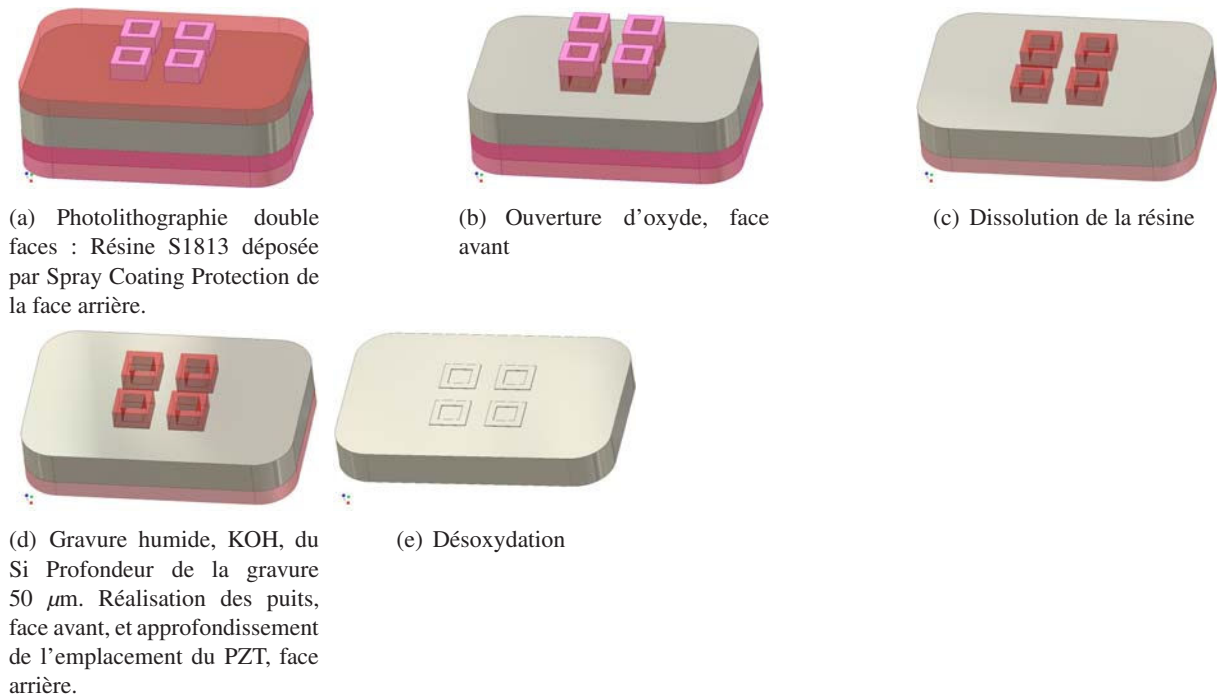


FIGURE 2.24: Etapes du procédé de fabrication pour la réalisation des puits

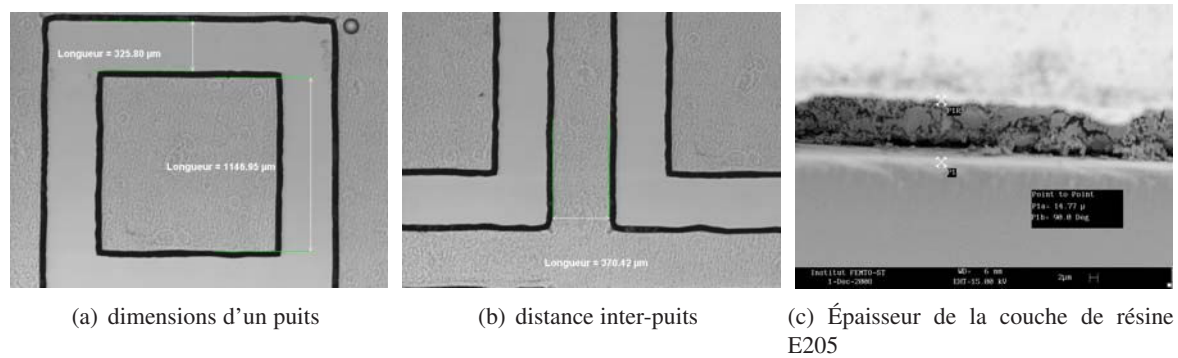


FIGURE 2.25: Caractérisations MEB de la structure Si

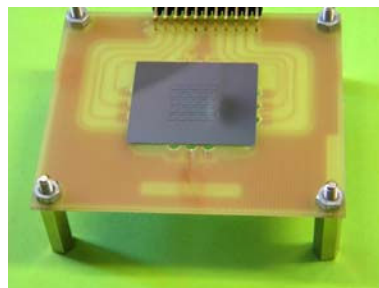


FIGURE 2.26: Transducteur matriciel, activateur de mélanges internes aux gouttes

de  $69,5 \text{ kHz}$  sont données par la figure 2.28. Ces derniers correspondent bien au mode dégénéré n° 5. L'erreur entre la simulation et la réalisation est alors de l'ordre de  $2,64 \%$ .

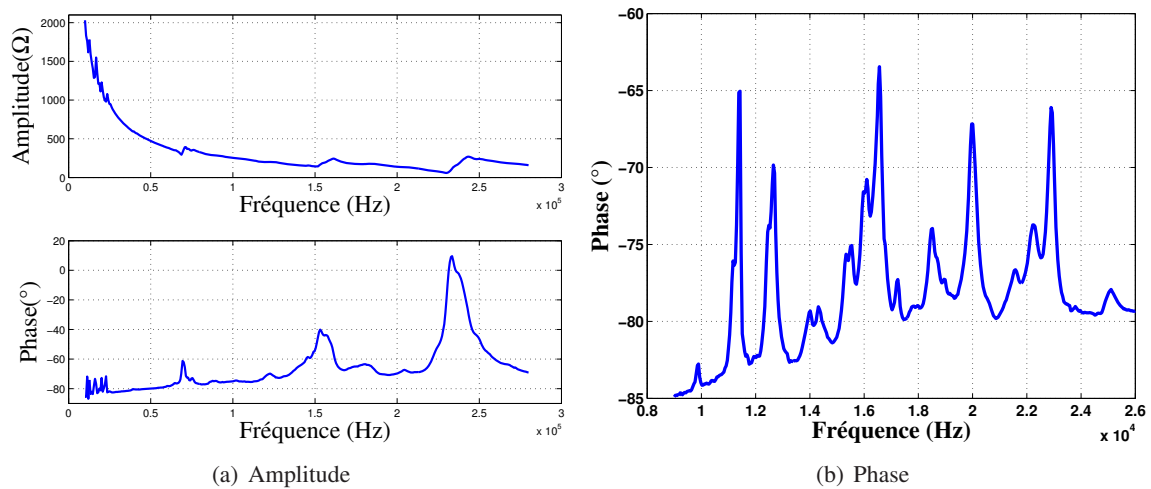


FIGURE 2.27: Amplitude et phase du transducteur matriciel (b) Phase du transducteur entre 0 et 26 kHz.

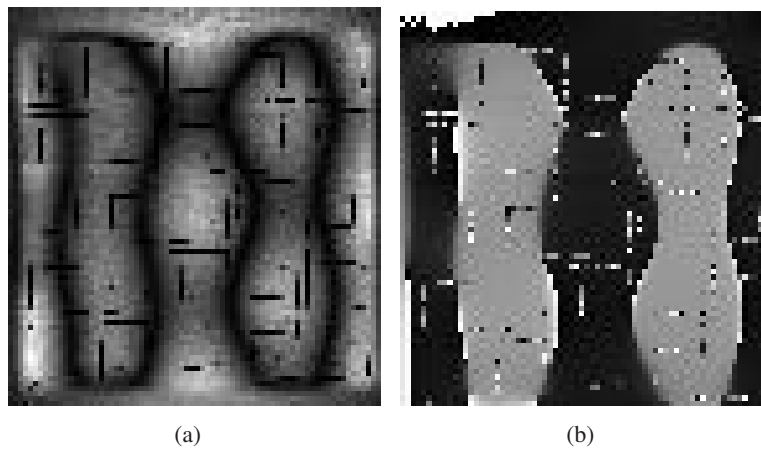


FIGURE 2.28: Image du mode dégénéré n° 5 par une sonde interférométrique

### Validation de l'activation du mélange interne

Pour évaluer la capacité du transducteur matriciel à créer un mélange interne dans une goutte, nous faisons appel à des colorants traçeurs fluorescents autrement appelé fluorochromes. Ces molécules ont été exclusivement utilisées ici pour permettre la visualisation du mélange. En effet, un fluorochrome a la capacité d'absorber la lumière à une certaine longueur d'ondes (dans notre cas de l'ordre du 541 nm correspondant à une radiation verte) et de réémettre une lumière à une longueur d'onde différente (dans notre cas de l'ordre de 572 nm correspondant à une radiation rouge). Pour exciter et visualiser cette molécule, nous utilisons une microscopie à fluorescence. Elle consiste globalement en sept composants (figure 2.29) :

1. une lampe à arc
2. un filtre d'excitation
3. un miroir dichroïque
4. un objectif

5. l'échantillon à caractériser
6. un filtre d'émission
7. et un oculaire

Le filtre d'excitation sélectionne les radiations spécifiques au fluorochrome (figure 2.29-a) qui sont réfléchies par le miroir et éclairent ainsi l'échantillon contenant le traçeur (figure 2.29-b). Ce dernier émet des radiations qui seules atteignent l'oculaire grâce à la sélectivité du miroir dichroïque (figure 2.29-c).

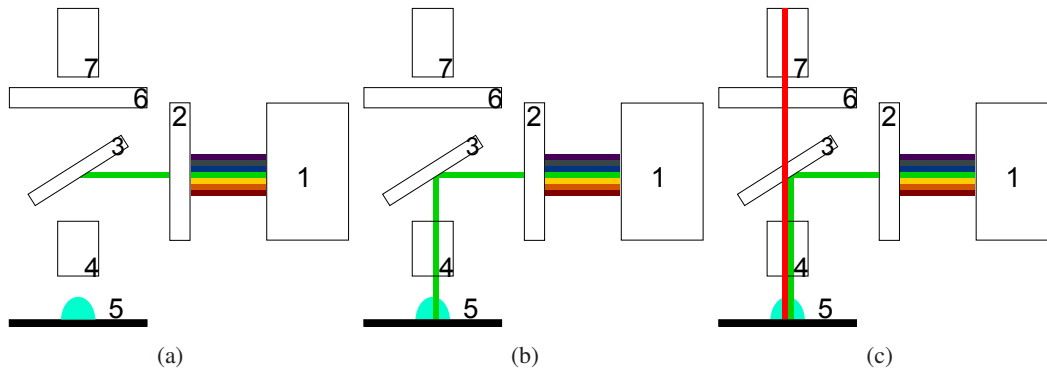


FIGURE 2.29: Etapes de fonctionnement de la microscopie à fluorescence

La figure 2.30 illustre le mélange de deux réactifs 'A' et 'B' :

- Réactif-A : une microgoutte de 200 nL d'eau à une concentration en glycérol de 40 %
- Réactif-B : une microgoutte de 200 nL d'eau contenant des anticorps fluorescents.

Nous avons introduit du glycérol dans le réactif A dans le seul objectif de bloquer le mélange spontané entre les deux microgouttes. Durant les dix premières secondes, le transducteur acoustique n'est pas excité (mode passif). Pendant cette durée, aucun mélange n'est observé. Une fois l'excitation établie, un mélange progressif des deux microgouttes apparaît. Au bout de 40 s sous excitation acoustique, une différence notable sur l'état de mélange des gouttes est enregistrée. Cependant, le mélange n'atteint pas un état d'homogénéisation satisfaisant. En effet, le réactif 'B' ne contenant pas de glycérol s'évapore rapidement et limite ainsi notre temps de manipulation. C'est pourquoi, le temps d'expérience total est fixé à 50 s.

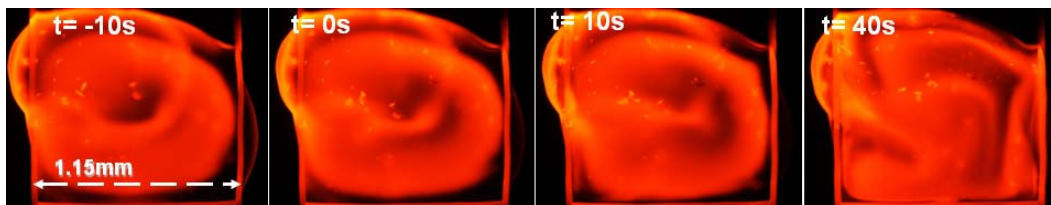


FIGURE 2.30: Enregistrement du mélange des réactifs A et B :  $t < 0$  sans excitation acoustique,  $t > 0$  avec excitation acoustique. Réactif-A : une goutte de 200 nL d'eau à 40% de glycérol, Réactif-B : une goutte de 200 nL d'eau contenant des anticorps fluorescents.

Nous refaisons la même expérience précédente en utilisant cette fois-ci la rhodamine comme fluorochrome. Le réactif-B est alors dans ce cas une goutte de 200 nL d'eau contenant de la rhodamine à une

concentration de 20% en glycérol. La présence du glycérol dans les deux réactifs permet de prolonger le temps de l'expérience.

La figure 2.31 présente les étapes du mélange obtenu. Durant les 47 premières secondes suivant le dépôt des gouttes, le transducteur n'est pas excité. Aucun mélange entre les microgouttes n'est perçu en mode passif. En effet, la haute viscosité du réactif 'B' a bloqué le processus de mélange avec le réactif 'A'. Cette immiscibilité est surmontée par le biais de l'activation acoustique. Dès que le transducteur est excité, nous observons l'accélération progressive du mélange. Au bout de 60 secondes, la plupart du volume est homogénéisé. Notons que le mélange observé est plus lent en comparaison avec l'expérience précédente utilisant les anticorps fluorescent. Ceci est dû au fait que les réactifs dans le présent cas sont plus visqueux. Nous étudierons l'influence de la viscosité dans le paragraphe suivant.

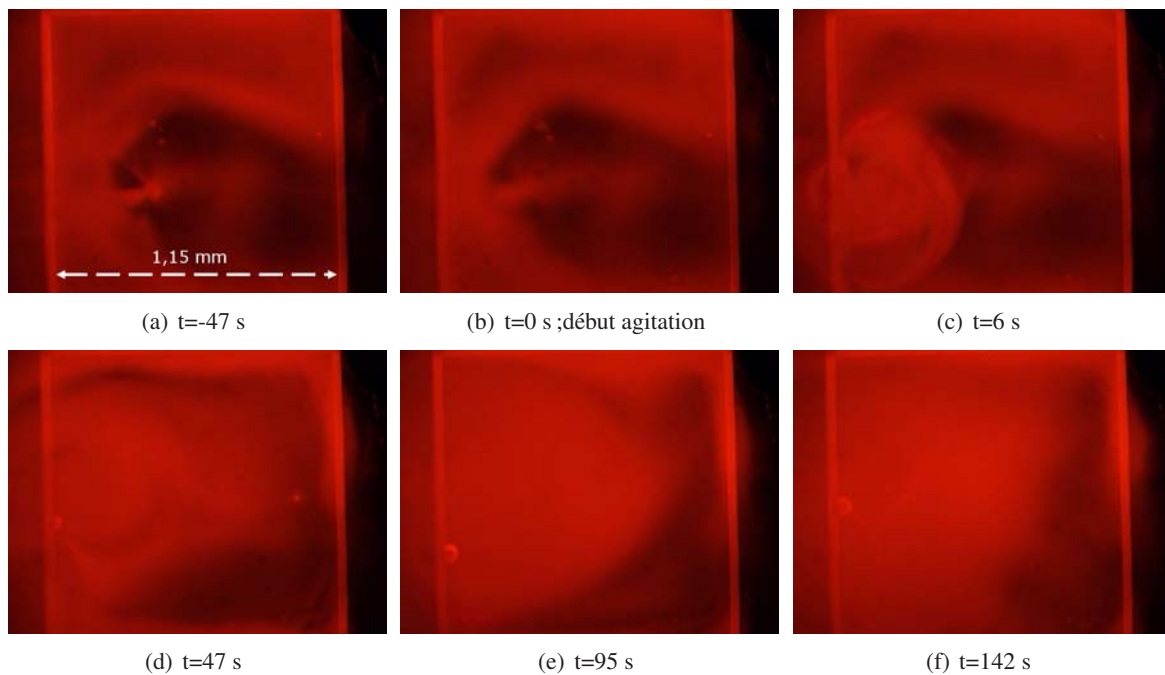


FIGURE 2.31: Enregistrement du mélange des réactifs A et B :  $t < 0$  sans excitation acoustique,  $t > 0$  avec excitation acoustique. Réactif-A : une goutte d'eau contenant de la rhodamine, Réactif B : une goutte d'eau à 40% de glycérol

### Comportement de particules sous excitation acoustique

Afin d'étudier l'influence de divers paramètres sur la vitesse d'écoulement dans le liquide, nous avons intégré des particules de silicone dont la taille varie de 5 et 15 nm à l'intérieur d'une goutte. À l'aide d'une caméra CCD couplée à un microscope, nous avons visualisé le comportement de ces particules en présence de champ acoustique.

Une première difficulté relevée au cours de cette manipulation est la présence d'agglomération de particules. Ce phénomène est prévisible étant donnée la faible taille des particules considérées. Pour minimiser le taux d'agglomération, nous avons pris la précaution de soniquer les solutions immédiatement avant toute manipulation. Nous excitions, pour ce type d'expérience, le transducteur autour du mode dégénéré



n° 5, à la fréquence de résonance de 68,4 kHz, qui maximise la vibration au niveau du puits central de la matrice.

Les vidéos enregistrées sont numérisées en 25 images par seconde. Pour le calcul de vitesse, nous comparons deux images (figure 2.32) : la première est une image référence correspondant à l'état initial tandis que la seconde correspond à la position finale des particules. Cette comparaison permet d'évaluer les distances de déplacement et, par conséquent, les vitesses mises en jeu.

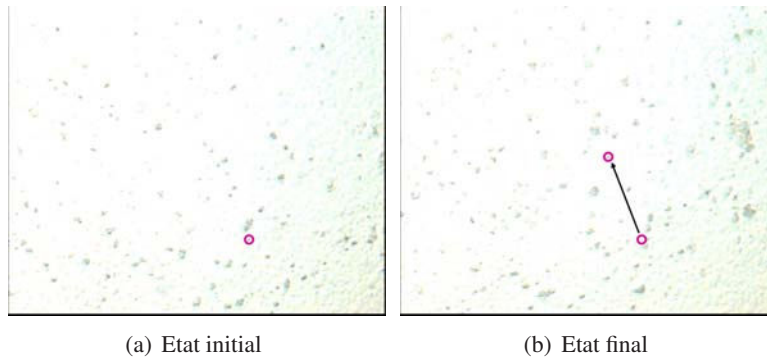


FIGURE 2.32: Deux images prises avec un intervalle de 8 s : Solution à 20 % de glycérol sous une tension d'excitation de 90 V.

Nous commençons par investiguer l'influence de la tension d'excitation sur les vitesses d'écoulement. Nous avons tout d'abord fait varier la tension par palier en excitant une même goutte de 400 nl et dont la concentration en glycérol est de 20 %. La figure 2.33-a illustre la variation de la vitesse enregistrée. Cette courbe ne présente pas la tendance attendue qui consiste en l'augmentation de la vitesse avec la tension. Un second phénomène interfère nécessairement avec l'influence acoustique et fausse ainsi nos résultats. Nous suspectons l'évaporation rapide du liquide d'être la cause des perturbations observées. Afin d'éclaircir ce point, nous refaisons la même étude mais cette fois-ci nous considérons une nouvelle goutte pour chaque point de mesure à une tension donnée. Le transducteur est nettoyé entre deux expériences successives (entre deux points de mesures) en utilisant une solution d'acide sulfurique pour éviter de changer la qualité de surface de la membrane. La figure 2.33-b présente le résultat obtenu et montre une croissance de la vitesse en fonction de la tension d'excitation.

Néanmoins, notons que la caractéristique est donnée pour une excitation allant de 20 à 80 V crête à crête. En effet, au delà de cette valeur les déplacements enregistrés sont trop rapide pour être analysés avec le système de mesure employé. Une Vélocimétrie par Image de Particules communément appelée PIV devrait être utilisée pour une étude exhaustive.

Pour caractériser la dépendance de la vitesse d'écoulement à la viscosité du liquide, nous considérons des solutions à des concentrations en glycérol allant jusqu'à 50%. Une fois encore, chaque point de mesure correspond à une nouvelle goutte. La même procédure de nettoyage que l'expérience précédente est employée. La caractéristique présentée en figure 2.33-c est établie sous une tension d'excitation constante de l'ordre de 24 V<sub>cc</sub>. Nous observons une vitesse d'autant plus faible que la viscosité est croissante.

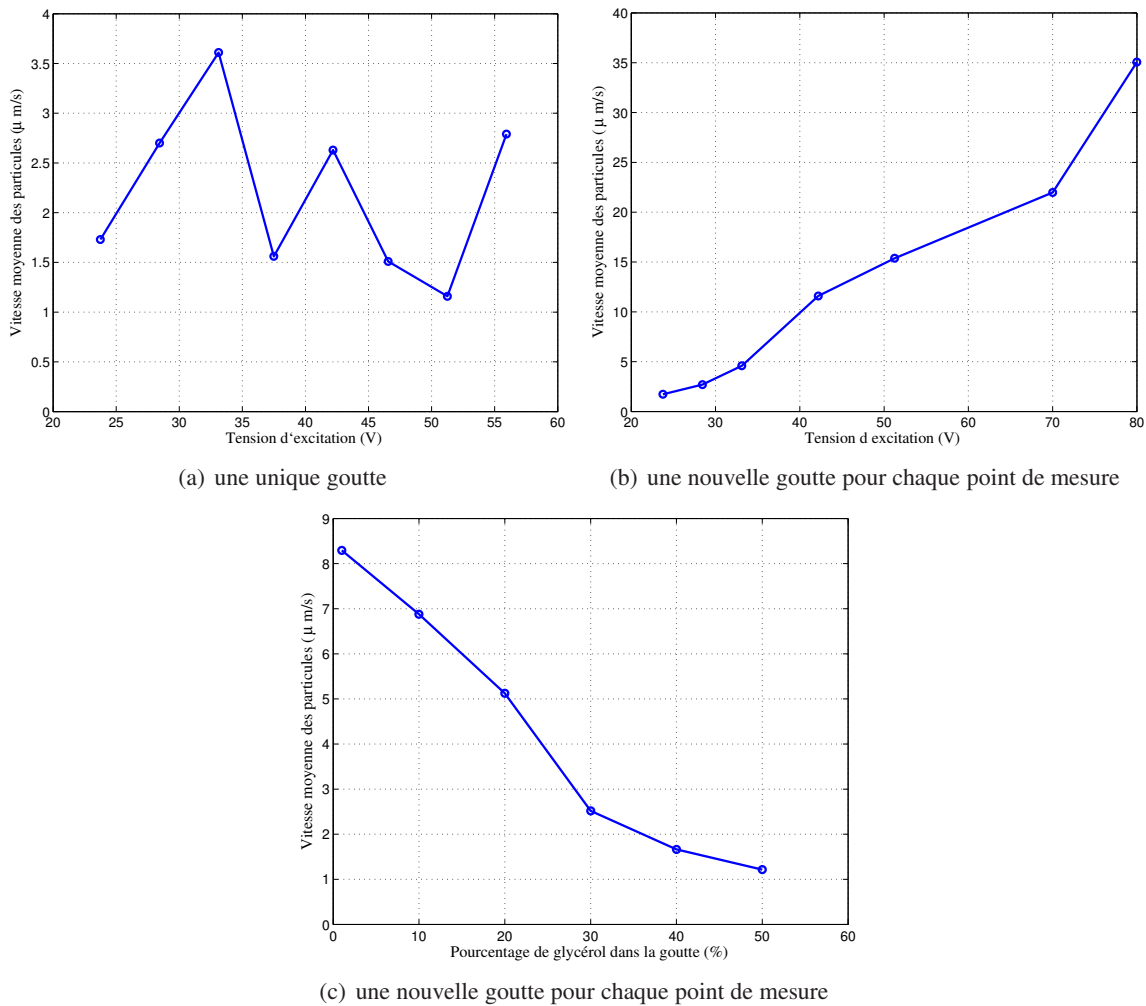


FIGURE 2.33: Vitesse moyenne des particules en fonction de ((a) et (b)) la tension d'excitation, (c) du pourcentage de glycérol dans la goutte

### Qualité de l'isolation inter-gouttes

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons à la qualité d'isolation entre les gouttes. Ayant un angle de contact de  $60^\circ$  (figure 2.34-a), la hauteur réelle de la goutte est de l'ordre de  $360 \mu\text{m}$ . La figure 2.34-a montre qu'en configuration planaire ouverte, la goutte reste bien localisée dans le puits. Nous allons pousser d'avantage le défit, en appliquant une lamelle de verre contre la goutte. L'objectif est de tester la qualité d'isolation entre les gouttes dans une configuration confinée. La distance entre la lamelle et la membrane atteint  $160 \mu\text{m}$  sans que la goutte dépasse la limite externe du puits ( $1,95 \times 1,95 \text{ mm}^2$ ). La figure 2.34-b montre que la goutte prend bien la forme du puits dans les conditions considérées. En effet, la goutte écrasée remplit l'intérieur du puits, soit un volume de  $1,15 \times 1,15 \times 0,05 \text{ mm}^3$  et s'étale sur le volume formé par l'ensemble surface supérieure puits et lamelle en verre, soit un volume supplémentaire de  $1,95 \times 1,95 \times 0,16 \text{ mm}^3$ . Le volume total est, par conséquent, de  $0,484 \text{ mm}^3$  correspondant à  $484 \text{ nL}$ . Nous adopterons cette distance Lamelle-transducteur ( $160 \mu\text{m}$ ) pour l'application biologique envisagée.

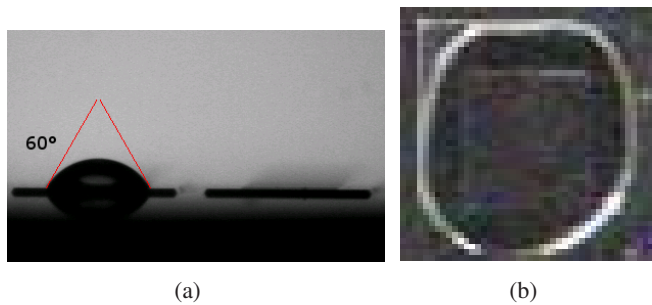


FIGURE 2.34: (a) Une goutte de 400 nL d'eau posée à l'intérieur d'un puits puis (b) écrasée par une lame en verre.

Pour rester dans les mêmes conditions de travail que dans le cadre de l'application biologique, nous nous proposons de valider l'activation acoustique de mélange dans une configuration planaire confinée. Pour cela, une fois encore nous utilisons la lamelle de verre en représentation de la biopuce. Par la suite, nous varions, pour une fréquence donnée, la tension d'excitation du transducteur entre  $25 V_{cc}$  et  $100 V_{cc}$ . Les microgouttes restent piégées à l'intérieur des différents puits. Aucune contamination n'est enregistrée. Cependant, à partir d'un certain seuil de tension d'excitation, une buée apparaît sur la lamelle dans l'espace entre les gouttes (figure 2.35) et s'intensifie en fonction de la tension d'excitation. Ce phénomène peut menacer la qualité d'isolation entre les gouttes. Par ailleurs, la fréquence de résonance de l'ensemble de la membrane en vibration et la matrice des gouttes évolue en fonction du temps étant donnée la perte en volume des gouttes (figure 2.36). Cette information est alors à prendre en compte lors de l'excitation du transducteur.

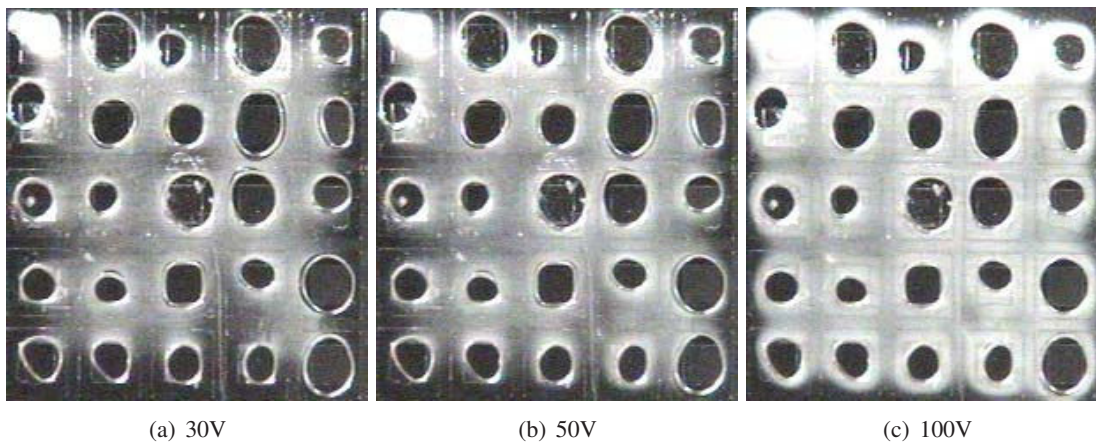


FIGURE 2.35: Phénomène d'évaporation s'intensifiant en fonction de l'amplitude d'excitation

### Caractérisation thermique du dispositif

Le phénomène de buée, illustré par la figure 2.35, doit sa présence à l'un des phénomènes suivant :

- Une élévation de la température de la goutte accélérant ainsi son évaporation.
- Une nébulisation permettant de générer des nano-gouttes à partir de la goutte mère.

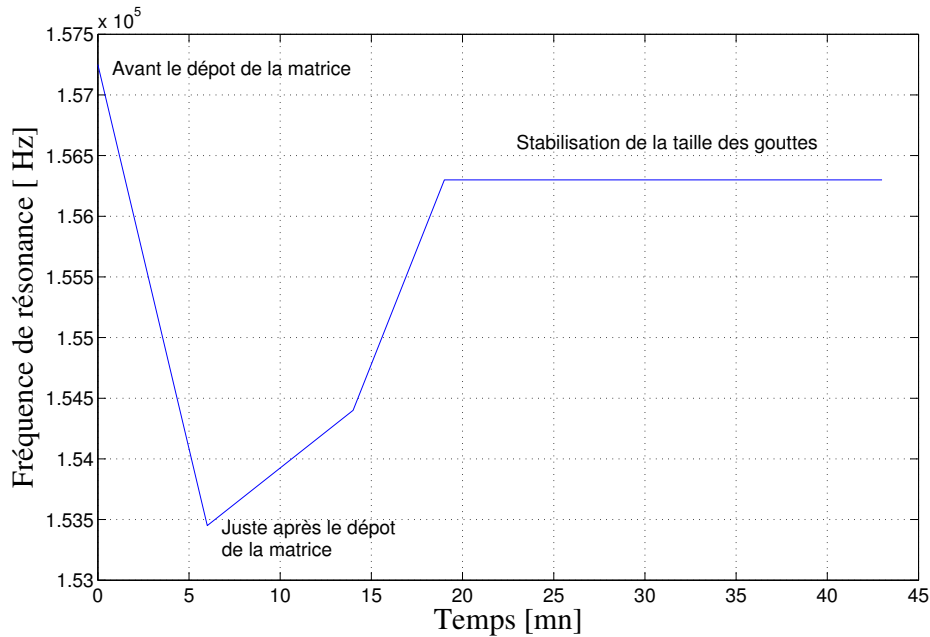


FIGURE 2.36: Evolution de la fréquence de résonance du transducteur en fonction de l'amplitude d'excitation

TABLE 2.5: Paramètres d'excitation

Fréquence de résonance (kHz)	68,9
Mode de résonance	mode n° 5 combinaison des modes (1,3) et (3,1)
Tension d'excitation (V)	34,6
Courant d'excitation (mA)	12,6
Tension de contrôle du transducteur (V)	7,95

Pour trancher entre les deux explications plausibles, nous faisons appel à une caractérisation thermique du dispositif. Cette expérience étant de critère exploratoire, les choix de la fréquence et de la tension ne sont pas optimisés. En effet, nous avons choisi d'exciter le mode 5 que nous avons utilisé pour les différentes caractérisations des vitesses d'écoulement. Les paramètres d'excitation sont résumés dans le tableau 2.5.

La figure 2.37 indique d'une part, la disposition de cinq gouttes de 400 nL de volume sur la surface du transducteur et d'autre part, une numérotation arbitraire des zones de mesure. Une zone de mesure est un carré centré sur la goutte. La température relevée est alors une moyenne sur la zone de mesure. Le liquide utilisé présente une concentration de 20 % en glycérol afin de ralentir l'évaporation naturelle relativement rapide de l'eau.

Nous avons suivi l'évolution de la température des différents échantillons en fonction du temps sous excitation acoustique. Le transducteur est alors excité tout au long de la mesure, pendant 10 mn. Le résultat est présenté dans la figure 2.38.

Notons que les différentes courbes passent globalement par 3 phases :

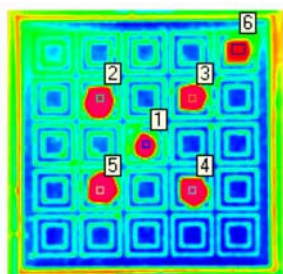


FIGURE 2.37: Disposition de la matrice de gouttes sur la surface du transducteur

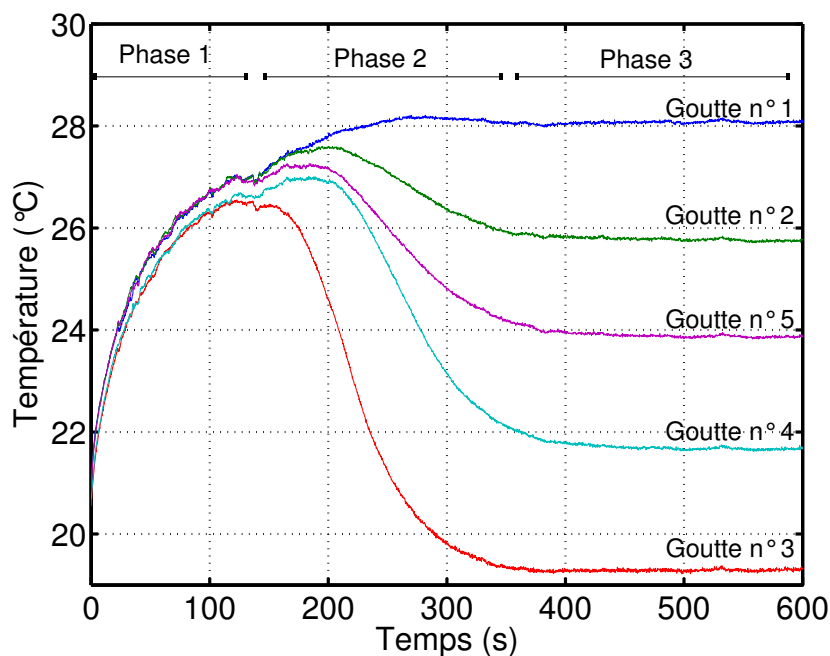


FIGURE 2.38: Evolution de la température en fonction du temps sous excitation acoustique pour différentes gouttes.

**Phase 1** C'est une phase de croissance de la température de la goutte. Celle-ci se voit augmentée d'environ 6,5° C durant les deux premières minutes pour la tension d'excitation considérée.

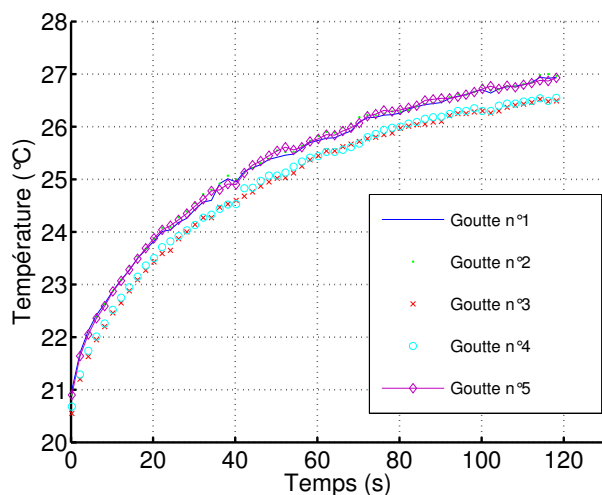


FIGURE 2.39: Evolution de la température sous excitation acoustique en fonction du temps dans un intervalle de [0 2 mn], pour différentes gouttes

La variation thermique durant cette phase suit une loi exponentielle donnée par l'équation (2.2).

$$y = T_0 + K \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right] \quad (2.2)$$

TABLE 2.6: Constantes thermiques

Numéro de la goutte	1	2	3	4	5
$K(10^{-2})$	64,258	64,838	50,21	55,47	56,297
$\tau(10^{-2})$	52,283	48,547	53,795	52,933	51,526
$T_0$	20,99	20,91	20,55	20,68	20,9

Où

- $T_0$  est la température initiale de la goutte qui est égale à la température ambiante.
- $\tau$  est la constante de temps de montée en température.
- $K$  est ....

Pour faciliter l'identification des courbes en utilisant le toolbox 'ident' de Matlab, nous considérons la transformée de Laplace de l'équation précédente donnée par l'équation (2.3).

$$Y(p) - \frac{T_0}{p} = K \cdot \frac{1}{p \cdot (1 + \tau \cdot p)} \cdot U(p) \quad (2.3)$$

Où

- $U(p) = \begin{cases} 0 & \text{si } t < 0; \\ 1 & \text{si } t > 0; \end{cases}$  est un échelon représentant la présence d'excitation acoustique.
- $Y(p)$  est la transformée de Laplace de  $y(t)$  (la température mesurée à l'instant  $t$ ).

La table 2.6 résume les constantes déterminées pour chaque courbe.

**Phase 2** Cette phase est caractérisée par une baisse relativement rapide de la température qui s'étale sur un intervalle d'environ 3 mn. La décroissance de la température ne semble pas provenir d'un phénomène physique mais de la méthode de mesure. Dans l'expérience précédente, une mesure  $T_i$  de la température sur une surface  $S$  d'une goutte est une valeur moyenne telle que  $T_i = \int_S T dS$ . Une inhomogénéité sur la surface  $S$  faussera par conséquent la mesure. En effet, si l'évaporation est inhomogène, une partie de la surface mesurée est celle du liquide tandis que le reste est celui de la membrane. Celle-ci étant oxydée thermiquement, la mesure de sa température est complètement erronée et est largement inférieure à la valeur réelle. La valeur mesurée  $T_i$  est ainsi inférieure à la valeur exacte et est décroissante d'autant que le liquide perd du terrain au profit du Silicium (figure 2.40). Malgré son air logique, cette explication reste à vérifier. Pour cela, il suffit de récupérer des mesures ponctuelles centrées sur les gouttes afin d'éviter la prise en considération de points erronés.

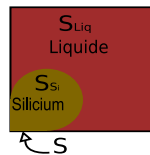


FIGURE 2.40: Intégration de la mesure de la température  $T_i$  sur la surface  $S$

**Phase 3** Dans cette phase, nous observons une température de stabilisation différente d'une goutte à l'autre. Cela pourrait être dû à une différence de viscosité. En effet, la température de stabilisation semble d'autant plus grande que la viscosité croît. Étant donnée l'ordre de dépôt des gouttes 3-4-5-2-1 et la rapidité d'évaporation de l'eau, nous pensons que la viscosité est croissante dans le sens opposé. Cet ordre coïncide avec le classement des températures de stabilisation dans un sens croissant.

### Investigation sur l'origine de la décroissance de la température

#### Explication n° 1

Suite aux expériences précédentes, nous avons deux hypothèses à vérifier :

- La phase de décroissance est-elle due à une erreur de mesure ?  
↳ Pour répondre à cette problématique, nous considérons des mesures ponctuelles. Chaque point correspond à la mesure prise par un capteur. Nous ne moyennons donc plus sur une surface.
- La différence des températures de stabilisation est-elle due à une différence de viscosité entre les gouttes induite par l'évaporation ?  
↳ Pour éliminer ce doute, nous réalisons l'expérience pour chaque goutte à part. Autrement dit, suite au dépôt de chaque goutte, nous procédons à l'acquisition. Cela implique que les temps de mise en route et d'arrêt de l'excitation ne sont plus identiques pour les différentes courbes. C'est pourquoi, nous avons choisi de présenter ces caractéristiques séparément pour une meilleure visibilité.

Nous avons respecté les mêmes paramètres d'excitation du générateur de vibration que dans l'expérience précédente. Une fois encore, l'expérience révèle la présence de trois phases (croissance, décroissance et stabilisation) précédemment décrites (figure 2.41). La mesure de la moyenne de la température sur une surface  $S$  n'est donc pas la seule raison de la décroissance observée. Une réflexion plus profonde sur la question est donc nécessaire. Notons que durant la troisième phase, les températures de stabilisation ne sont toujours pas identiques. L'éventuelle différence de viscosité entre les gouttes ne semble pas expliquer cette observation.

#### Explication n° 2

Étant donnée que le système de mesure présente une erreur absolue, à chaque nouvelle expérience nous réglons l'émissivité de façon à faire coïncider la température initiale en absence de toute perturbation extérieure à la température ambiante. L'émissivité est alors considérée constante tout au long de l'expérience. Cette hypothèse est tout à fait justifiée pour les corps solides. Cependant, elle reste conditionnée par un volume important dans le cas des liquides. Ceci n'étant pas notre cas, l'émissivité des gouttes évolue, probablement, en fonction du temps. En effet, vu la faible taille de la goutte considérée, celle-ci rétrécit rapidement et voit donc son hauteur diminuer. L'émissivité réelle devient alors supérieure à la valeur saisie. Par conséquent, la température réelle est supérieure à celle mesurée (équation 2.4). Cette hypothèse pourrait expliquer la phase de décroissance observée.

$$\sigma = \varepsilon T^4 \quad (2.4)$$

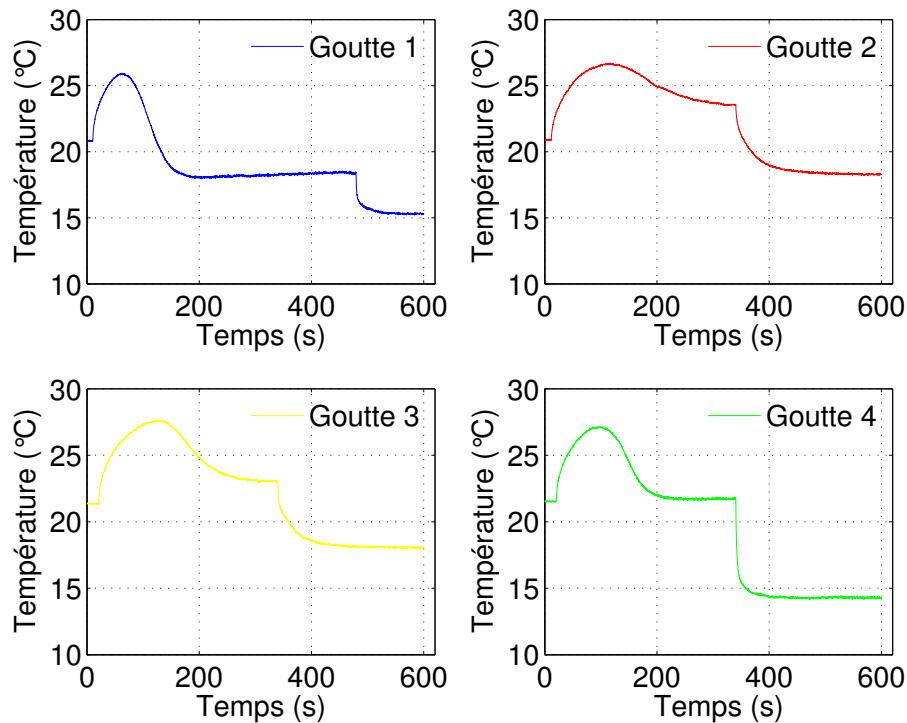


FIGURE 2.41: Variation de la température en fonction du temps en présence d'agitation acoustique ; une mesure ponctuelle par goutte

Où  $\sigma$  est ,  $\epsilon$  l'émissivité de l'échantillon et  $T$  sa température.

Afin de vérifier la justesse de cette explication, nous avons étudié l'évolution de la température de gouttes de même taille 400 nL en absence de champ acoustique sur un intervalle de temps suffisamment large pour entraîner une évaporation consistante du liquide. Théoriquement, la température de la goutte doit rester constante et égale à la température ambiante. Si l'émissivité de la goutte varie en fonction du temps, la température mesurée devrait décroître alors que la température réelle est bien constante.

Les gouttes sont déposées sur la surface structurée du transducteur matriciel sans que ce dernier soit alimenté durant cette étude. La figure 2.42 présente la disposition des gouttes et leurs numéros respectifs. L'évolution de la température des différentes gouttes (de 1 à 5) en fonction du temps en absence de champ acoustique est illustrée par la figure 2.43. Une fois encore, nous retrouvons trois phases : une phase stable durant laquelle la température reste constante et égale à la température ambiante et les deux phases classiques de décroissance et de stabilisation.

Ainsi, nous vérifions que la décroissance de la température relève d'une erreur de mesure. Pour la corriger, il faudrait considérer une correction de la valeur de l'émissivité en fonction du temps.

### Apport du transducteur acoustique en tant qu'un mécanisme de chauffe

Pour quantifier l'apport de l'onde acoustique comme étant un mécanisme de chauffe par rapport à la propagation thermique par conduction induite par la membrane dans le liquide, nous relevons la tempé-





FIGURE 2.42: Un point de mesure par goutte

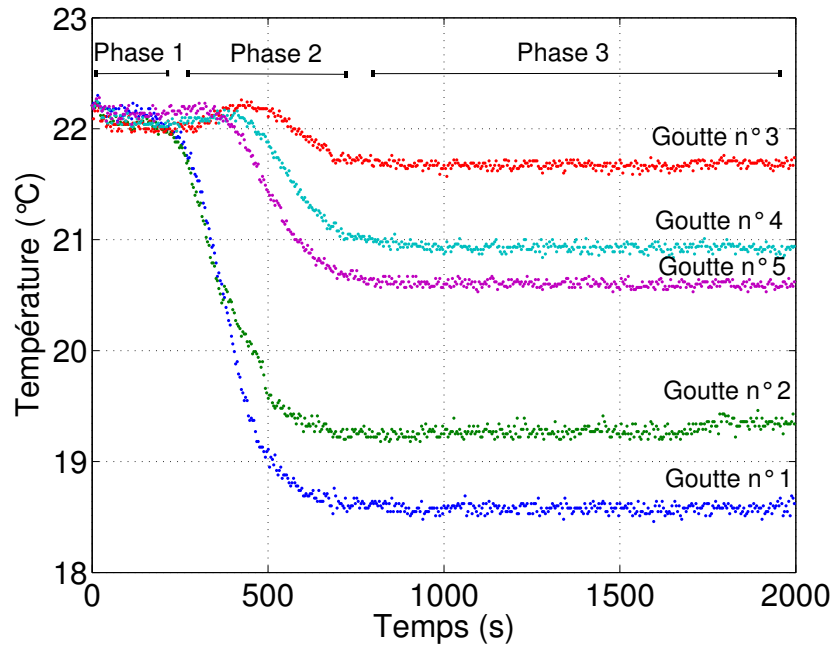


FIGURE 2.43: évolution de la température de gouttes 400nl en absence du champ acoustique

rature de la surface de la piézocéramique. Les paramètres d'excitation sont les mêmes que dans le cadre de la caractérisation thermique des gouttes (table 2.5).

Les capteurs de 1 à 15 relèvent les températures des électrodes en raison de trois points de mesure par électrode comme l'illustre la figure 2.44(a). La figure 2.44(b) présente les variations moyennes des températures en fonction du temps. Nous avons réalisé des cycles de chauffe afin de juger la reproductibilité des pics de chauffage. La variation maximale de température reste constante et est de l'ordre de 1 °C alors que la variation de température dans une goutte sous les mêmes paramètres d'excitation est de l'ordre de 6 °C (voir figure 2.38). Cette différence met en évidence l'effet thermique au sein de la goutte dû à l'effet hydrodynamique, générée par le transducteur matriciel dans la goutte.

**Evolution de la température de la goutte en configuration confinée** Ne perdant pas de vue l'application biologique visée, nous devons investiguer la variation thermique dans la goutte induite par activation acoustique en configuration confinée surtout que la plupart des réactions biologiques sont influencés par la température. Pour cela, la matrice des gouttes est mise en sandwich entre la surface du transducteur et une lamelle en verre représentant la biopuce utilisée dans le cadre de l'application biologique. La lamelle repose sur un cadre de forme carrée creuse d'épaisseur 160  $\mu\text{m}$  fixant ainsi à cette valeur la distance transducteur-lamelle (figure 2.45).

Le transducteur voit les mêmes paramètres d'excitation que dans le cadre de l'application biologique<sup>4</sup> (tableau 2.7). Dans cette disposition, l'évaporation devrait théoriquement être ralentie car le milieu de travail est largement plus humide comparé à une configuration en surface ouverte. L'émissivité est

4. L'application biologique est détaillée dans le chapitre 4

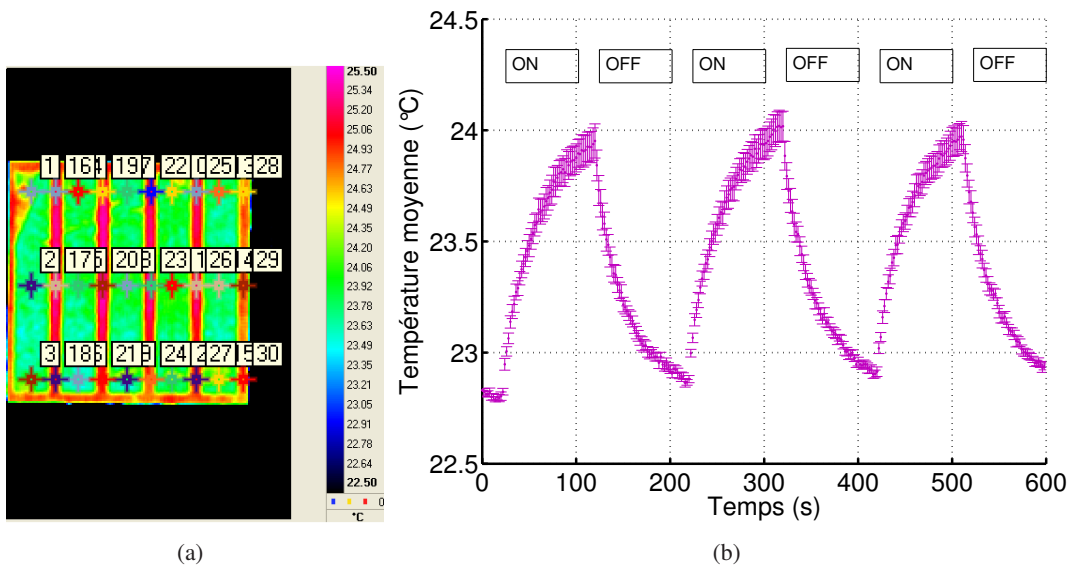


FIGURE 2.44: (a) Image IR de l'élément piézoélectrique, (b) Cycle de variation de la température moyenne des électrodes

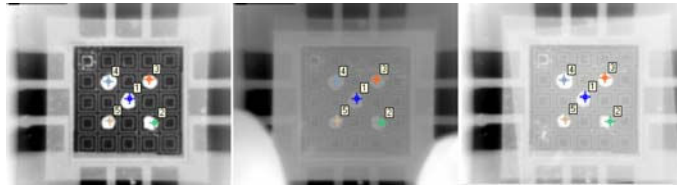


FIGURE 2.45: Matrice de 5 gouttes piégée entre le transducteur et une lame de verre

toujours considérée constante et égale à 1. Nous admettons que la présence de la lamelle n'influence pas cette valeur. Etant donné que nous nous intéressons à la variation relative de la température, une erreur statique n'influence pas nos résultats.

Les caractéristiques données par la figure 2.46 mettent en évidence une croissance des températures des différentes gouttes ne dépassant pas  $0,7^{\circ}\text{C}$ . Bien que les gouttes sont surveillées durant plus que 18 mn, nous n'observons plus la phase classique de décroissance. Il semble que la configuration confinée de la manipulation a permis de préserver les gouttes de l'évaporation étant donné le critère humide de ce milieu. Ainsi, l'émissivité étant constante l'apparition d'une phase de décroissance n'est plus justifiée.

**Influence de la tension d'excitation** Nous avons vu dans le paragraphe 2.2.1.3 dans le cadre de l'étude transducteur pour l'activation d'une goutte que ce dernier induit une variation de température croissante en fonction de sa tension d'excitation. Nous nous attendons dans le cas du transducteur matriciel à un résultat similaire mais encore plus prononcé. En effet, cette déduction découle d'une hypothèse supposant que les deux transducteurs gèrent des énergies acoustiques de même grandeur à la même tension d'excitation et du fait que l'effet thermique est inversement proportionnel au volume mis en jeu (résultat du paragraphe 2.2.1.3).

TABLE 2.7: Paramètres d'excitation (cadre de manipulation biologique)

Signal	fréquence	$V_{cc}$	$V_{contrle}$
Continu	20,24khz	40V	10,6V

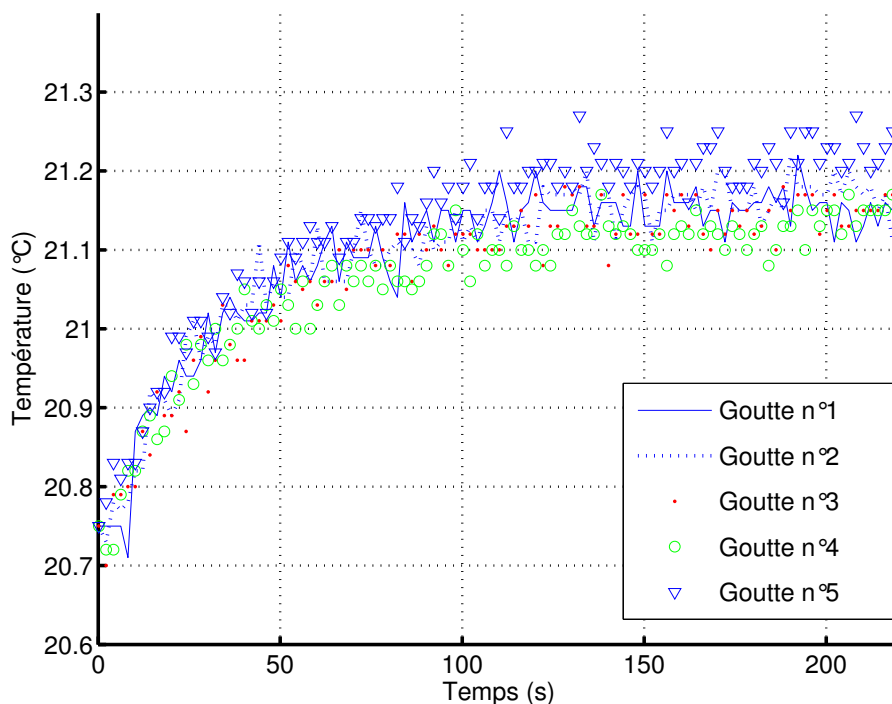


FIGURE 2.46: Variation de la température en fonction du temps sous agitation acoustique en configuration confinée

Les paramètres d'excitation du transducteur sont résumés dans la table 2.9. La figure 2.47 confirme cet analyse avec une croissance de la variation de la température de  $0,7^{\circ}\text{C}$  à  $14^{\circ}\text{C}$ . Rappelons que pour la même gamme de tension [ $20V_{cc}$   $60V_{cc}$ ] le transducteur pour une goutte induit une croissance de la variation thermique allant de  $0,5^{\circ}\text{C}$  à  $2^{\circ}\text{C}$ . La croissance de la température en fonction de la tension d'excitation semble suivre une loi d'allure exponentielle.

#### 2.2.2.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons réalisé un transducteur permettant d'activer le mélange interne dans chaque goutte d'une matrice de 25 échantillons. Nous avons visualisé les étapes du mélange et caractérisé les vitesses d'écoulements en fonction de divers paramètres. Nous avons également étudié l'influence du transducteur comme étant un mécanisme de chauffe, spécialement dans les conditions des manipulations biologiques envisagées. Cependant, ce transducteur matriciel induit un activation globale des 25 échantillons et ne donne pas la possibilité de sélectionner certaines gouttes à activer parmi d'autres. Il ne permet pas non plus de varier l'excitation d'une goutte par rapport à ses voisines. Pour atteindre de

TABLE 2.8: Constantes thermiques

N° de la goutte	1	2	3	4	5
$K(10^{-3})$	3,5	10,129	3,8822	8,7799	7,5604
$\tau(10^{-3})$	559,01	498,45	534,86	499,84	635,01
$T_0$	20,88	20,6	20,72	20,84	20,57
$\Delta T_{max}$	0,48	0,5	0,47	0,47	0,55

TABLE 2.9: Paramètres d'excitation(tension variable)

Fréquence minimale	68 khz
Fréquence maximale	69,5 khz
Sweep	10 ms
Hold	0 ms
Return	1 ms
Type de balayage	Linéaire
intervalle	1 ms

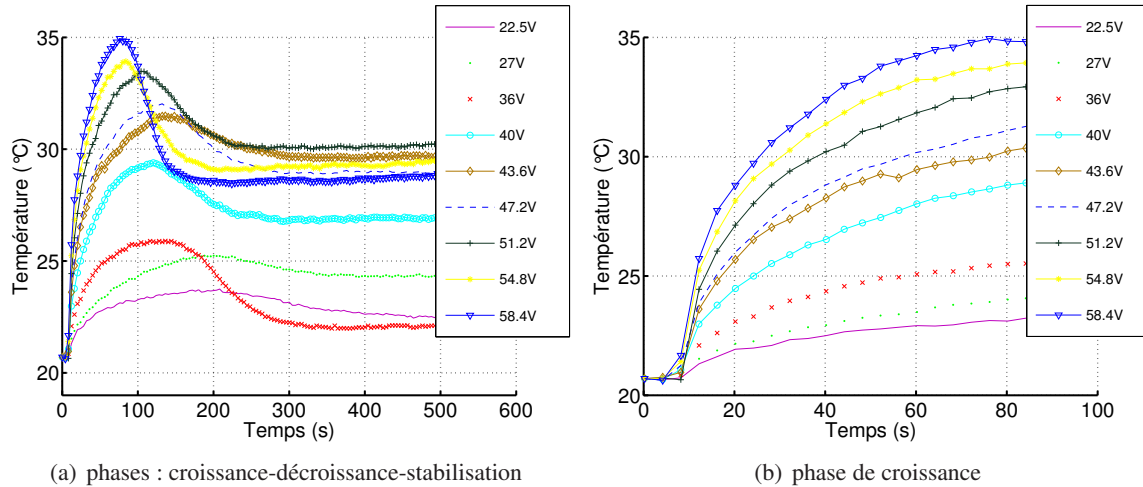


FIGURE 2.47: Variation de la température en fonction du temps pour différentes tensions d'excitations.

telles fonctionnalité et précision, chaque puits de la matrice devrait avoir son propre élément actif afin de localiser la vibration et la rendre indépendante par rapport aux puits adjacents.

### 2.2.3 Traitement "individuel" de gouttes

Dans le domaine des laboratoires sur puce, il est primordial de pouvoir mélanger de faibles volumes. La manipulation simultanée de nombreux échantillons est d'autant intéressante qu'elle permet de gagner en temps et en coût des opérations. Cependant, pour étudier l'apport du mélange il est nécessaire d'avoir des échantillons témoins dans un état statique. Cette fonctionnalité n'est pas offerte par le transducteur matriciel du moment que la piézocéramique excite la totalité de la membrane. D'autre part, la détermination des paramètres d'excitation optimales du transducteur adaptés à chaque application envisagée

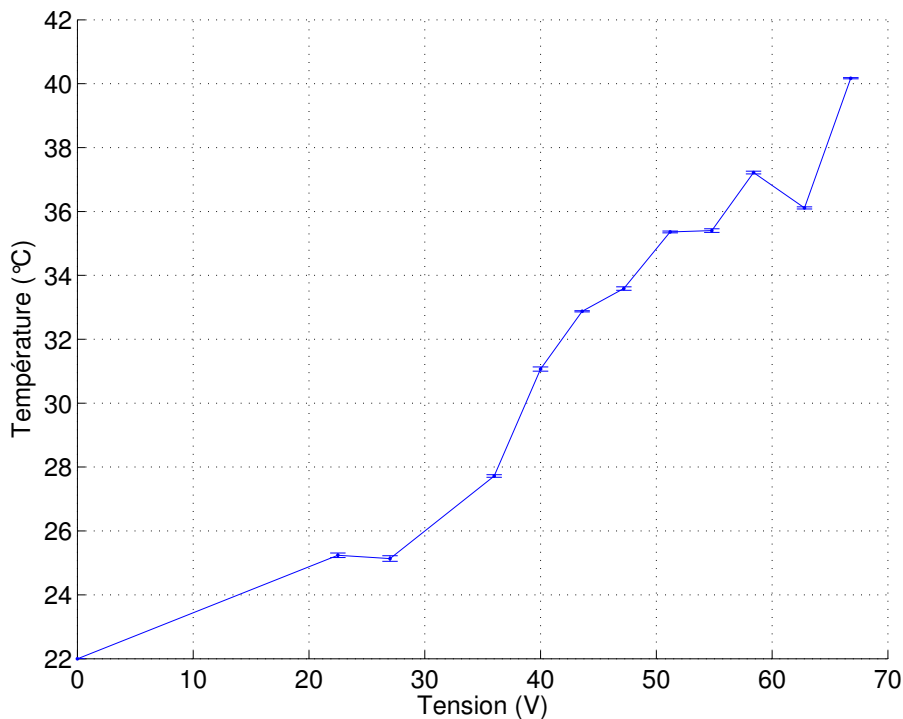


FIGURE 2.48: Augmentation de la température maximale en fonction de la tension d'excitation

nécessite autant d'expériences que de valeur à tester. Le transducteur, dans son état actuel, ne permet pas d'exciter indépendamment les puits afin d'appliquer à chacun une puissance différente. Pour atteindre ces nouveaux objectifs, chaque puits devrait avoir son propre élément actif. Nous avons donc pensé à échanger le principe d'une piézocéramique appliquée à la totalité de la membrane par le collage d'une matrice de piézocéramiques miniaturisées de taille millimétrique. Rappelons qu'un puits admet une côte intérieure de 1,15 mm et une côte extérieure de 1,95 mm. Un élément piézoélectrique d'une forme carré et de taille  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  semble adapté à la mini-membrane intérieure du puits.

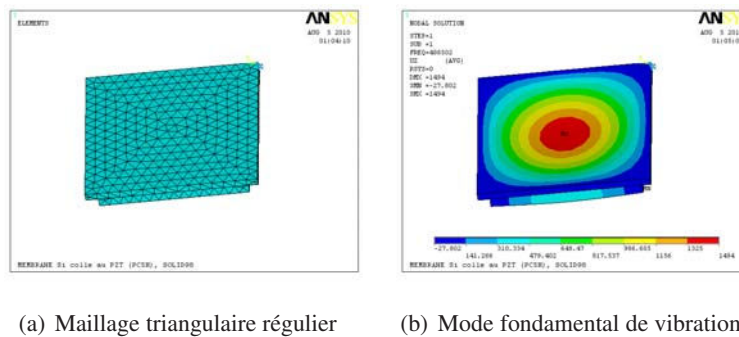


FIGURE 2.49: Simulation du mode de vibration, ANSYS Multiphysiques

La figure 2.49 présente le mode fondamentale d'une telle mini-membrane. Il apparaît à une fréquence de résonance de l'ordre de 500 kHz.

### 2.2.3.1 Fabrication

Il est impossible de penser à un collage manuel des piézocéramiques miniatures étant donnée la difficulté de les manipuler et l'impossibilité de réaliser visuellement un alignement double face pour faire correspondre le centre de l'élément actif au centre du puits. Ainsi, nous faisons encore une fois appel à la technique flip chip pour réaliser cette étape. Nous avons tout d'abord essayé d'imiter le procédé de collage employé dans le cadre du transducteur matriciel.

En effet, la mini-piézo-céramique est rendu solidaire au bras robotisé qui permet de récupérer une fine couche de colle par sérigraphie puis la positionner avec précision par rapport à la structure silicium. Les structures réalisées suivant cette méthode, ont présenté des défauts fabrications sous forme d'un court circuit de la piézocéramique. En effet, la quantité de colle récupérée par sérigraphie est exagérée en comparaison avec la faible taille de l'élément piézoélectrique. Ce fait a impliqué la présence de bourrelet de colle reliant les électrodes inférieures et supérieures.

Nous avons alors testé un second procédé de collage. L'idée est de déposer une couche de colle sur la totalité de la membrane de la structure silicium ( $12 \times 12 \text{ mm}^2$ ) puis positionner les mini-piézo-céramiques à leurs emplacements souhaités. Pour cela, une lamelle de  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  est rendu solidaire au bras robotisé. Celle-ci récupère la colle par sérigraphie. Elle est ensuite plaquée contre la membrane puis décollée laissant ainsi une fine couche de colle sur la membrane (figure 2.50(a)).

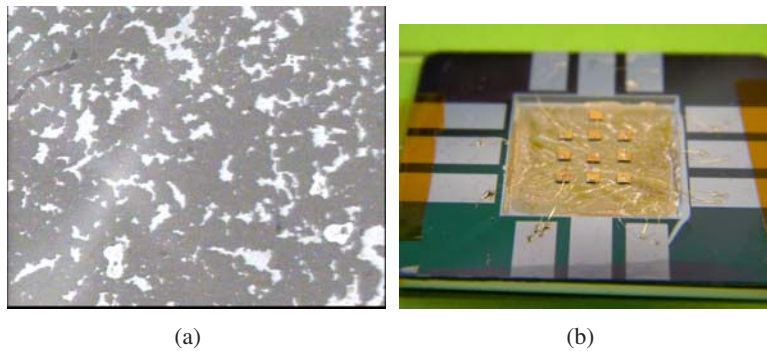


FIGURE 2.50: (a) Répartition de la colle sur la membrane (b) Des piézocéramiques miniatures collées sur la membrane en silicium

La faible impédance observée pour les structures réalisées suivant le procédé de collage n° 1 est vaincu par la seconde méthode d'assemblage. Cependant, aucun mode de résonance n'est observé lors de la caractérisation de l'impédance de chaque piézocéramique (figure 2.50(b)).

## Conclusion

Les procédés technologiques utilisés pour la réalisation des transducteurs acoustiques ont été présentés. Nous avons notamment souligné les critères de choix de chaque élément retenu pour ces réalisations. Nous avons validé expérimentalement les modes de vibrations d'intérêt des transducteurs, déterminés auparavant par simulations par éléments finis. Puis, nous avons validé le pouvoir mélangeur de chaque générateur de vibration. Lors des expérimentations nous avons noté la présence d'un phénomène d'échauf-

fement thermique que nous avons caractérisé par le biais d'un système d'acquisition infra-rouge. Les réponses thermiques enregistrées mettent en avant une évolution temporelle de la température d'allure exponentielle. Nous avons prouvé que l'élévation de la température dans la goutte sujette à une vibration de basse fréquence dépend d'un certain nombre de paramètres comme la tension d'excitation du transducteur, du volume du liquide ou encore de sa viscosité. Nous nous avons interrogé sur l'origine de l'échauffement du liquide et nous avons montré qu'il est du principalement à la propagation de l'onde dans la goutte. Spécialement dans le cas du transducteur matriciel, nous avons opté pour des caractérisations thermiques dans les conditions des manipulations biologiques envisagées afin d'éliminer tout soupçon d'influence thermique sur l'expérimentation. Nous avons exposé un essai de réalisation de transducteur d'activation individuelle de goutte dans l'objectif de "spécifier" certaines gouttes de la matrice par l'excitation. Ce transducteur a présenté une anomalie de fabrication se traduisant par un impédance faible.

## Chapitre 3

# Modélisation des écoulements induits par excitation acoustique dans un fluide

"Dès que nous sommes en mesure de comprendre une théorie, une autre vient prendre sa place." Carl Sagan





# Nomenclature

$\chi_s$	compressibilité isentropique du milieu fluide
$\dot{m}$	source de masse pour le streaming acoustique, $[\text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}]$
$\langle d(x,y,t) \rangle$	valeur moyenne temporelle du déplacement $d$
$\mu_v$	viscosité volumique ou seconde viscosité, $[\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}]$
$\mu$	viscosité dynamique, $[\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}]$
$\omega$	fréquence angulaire de la vibration, $[\text{s}^{-1}]$
$\rho$	densité du fluide, $[\text{kg.m}^{-3}]$
$\varepsilon$	paramètre sans dimension de la théorie de perturbation
$\vec{d}$	vecteur de déplacement de la membrane autour de la position moyenne, $[\text{m}]$
$\vec{f}$	force motrice du streaming acoustique, $[\text{N.m}^{-3}]$
$\vec{i}$	vecteur unitaire suivant l'axe des $x$
$\vec{j}$	vecteur unitaire suivant l'axe des $y$
$\vec{v}$	vecteur vitesse du fluide, $[\text{m.s}^{-1}]$
$\hat{p}$	amplitude complexe indépendante du temps de la pression $p$
$\hat{v}_x$	amplitude complexe indépendante du temps de la composante horizontale $v_x$
$\hat{v}_y$	amplitude complexe indépendante du temps de la composante verticale $v_y$
$c_0$	vitesse du son, $[\text{m.s}^{-1}]$
$f_x$	composante horizontale de la force motrice du streaming acoustique, $[\text{N.m}^{-3}]$
$f_y$	composante verticale de la force motrice du streaming acoustique, $[\text{N.m}^{-3}]$
$k_l$	nombre d'onde de l'onde progressive dans le liquide, $[\text{m}^{-1}]$
$k_s$	nombre d'onde pour la surface en vibration, $[\text{m}^{-1}]$
$P_r$	<b>P</b> ression de <b>r</b> adiation acoustique, $[\text{Pa}]$
$v_x$	composante horizontale du vecteur vitesse du fluide, $[\text{m.s}^{-1}]$

$v_y$	composante verticale du vecteur vitesse du fluide, [m.s <sup>-1</sup> ]
0	indice pour état de repos
1	indice pour harmonique d'ordre 1
2	indice pour harmonique d'ordre 2
A	amplitude de vibration, [m]
f	fréquence d'excitation du générateur de vibration, [kHz]
H	la <b>H</b> auteur du fluide piégé entre deux surfaces solide, [m]
$L_f$	Longueur du fluide, [m]
$L_t$	Longueur du transducteur, générateur de vibration, [m]
p	pression du fluide, [Pa]
$R_e$	partie réelle d'un nombre complexe
$R_s$	nombre de Reynolds pour le streaming acoustique
s	indice pour streaming acoustique stationnaire
t	temps, [s]
$v_c$	vitesse acoustique caractéristique de particules, [m.s <sup>-1</sup> ]
x	abscisse, [m]
y	ordonnée, [m]

## Introduction

Le 'streaming' acoustique est défini, dans sa définition la plus générale, comme étant la formation d'un mouvement quasi-stationnaire dans un fluide sous l'influence d'une onde acoustique. Il est à noter que certains auteurs limite la création de streaming au cas dans lequel l'onde subit une atténuation. Ce type de mouvement peut être généré par la vibration d'un solide en contact avec un fluide au repos ou encore par la génération d'une onde acoustique stationnaire dans un liquide adjacent à une surface solide [56]. Les premières analyses de ce phénomène physique ont été établies par Lord Raleigh [57], puis continuées par Westerweld [58], Nyborg [59, 60] et Schlichting [61]. Lighthill [62] a démontré que le moment du flux causant les écoulements acoustiques doit sa présence à l'atténuation de l'énergie acoustique dans le fluide. Le nombre de Reynolds relatif au streaming a été introduit par Stuart [63]. Ce dernier caractérise le flux crée entre deux surfaces parallèles. Davidson et Riley [64] ont visualisé le flux crée entre deux surfaces cylindriques où le cylindre interne est en vibration et le cylindre extérieur est au repos. L'étude théorique de cette configuration a été établie par Duck et Smith [65]. Le streaming induit par une sphère en vibration a été étudié pour de faible nombre de Reynolds par Wang [66] et pour un large nombre de

Reynolds par Amin et Riley [67]. Lee et Wang ont étudié le streaming dû à l'interaction de deux ondes stationnaires orthogonales dans le voisinage d'une sphère [68]. Vainshtein et Al. ont considéré le cas d'une cellule dont une surface est vibrante [69]. Le flux dans un canal dont les surfaces sont vibrantes, suivant une vibration sinusoïdale et de faible amplitude, a été examiné par Secomb [70].

L'objectif du présent chapitre est de déterminer si le streaming acoustique est à l'origine des écoulements, que nous observons dans nos différentes expériences, dans le liquide. Pour cela, nous proposons une modélisation numérique de ce phénomène afin de retrouver les formes d'écoulement et d'estimer les vitesses de streaming. Nous nous intéressons au cas d'un fluide infini suivant sa longueur et adjacent à deux surfaces solides dont une est animée d'une vibration sinusoïdale de basse fréquence.

### 3.1 Position du problème physique

Nous avons présenté dans l'introduction générale, dans le cadre de l'application biologique, une configuration dans laquelle la goutte est piégée entre le générateur de vibration et une surface solide (surface de la biopuce). Dans cette disposition, la goutte prend une forme relativement cylindrique dont la base inférieure est soumise à la vibration, la base supérieure est au repos et la surface latérale est entourée d'air (figure 3.1). Dans nos différentes expérimentations mettant en œuvre le transducteur matriciel, nous considérons un volume de goutte de 400 nL et une distance entre le générateur de vibration et la biopuce de 160  $\mu\text{m}$  (paragraphe 4.4.3). Il s'en suit un étalement de la goutte sur un diamètre 1,95 mm (voir paragraphe 2.2.2.3). Le transducteur acoustique est excité autour d'une fréquence de résonance  $f$  de 68,5 kHz. Il génère, ainsi, une vibration sinusoïdale de même fréquence de vibration et d'amplitude considérée égale à 0,5  $\mu\text{m}$ .

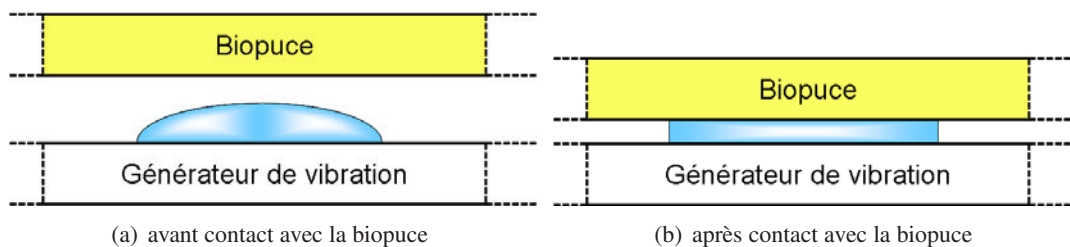


FIGURE 3.1: Représentation de la disposition de la goutte

Étant donnée la symétrie cylindrique du problème décrit (voir figure 3.1(b)), nous considérons une modélisation 2D du phénomène ; une coupe suivant le diamètre de la goutte est adoptée. Sachant que l'amplitude de la vibration considérée est tellement faible devant les dimensions géométriques, nous admettons que la surface latérale de la goutte vibre autour d'un plan fixe : la vibration ne déforme pas le liquide. Ainsi, le liquide est représenté par un rectangle, de longueur  $L_f$  et de hauteur  $H$ , adjacent à deux domaines rectangulaires représentant l'air. Le transducteur acoustique est modélisé par une source de vibration de longueur d'onde  $\lambda$  et de fréquence  $\omega$ . Cette source se situe sur le plan inférieur du liquide, correspondant à  $y=0$  (figure 3.2).

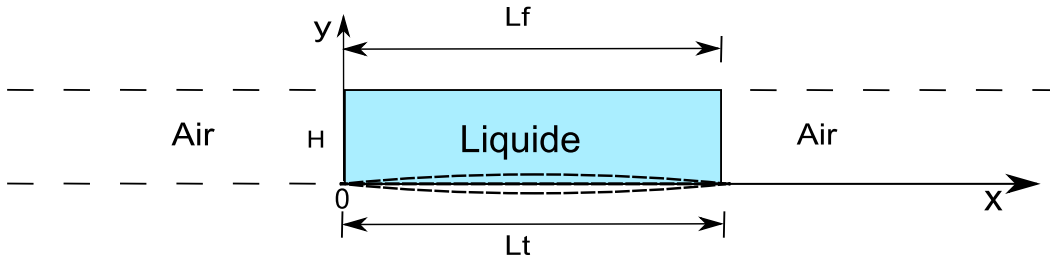


FIGURE 3.2: Schéma synoptique d'une section de liquide entourée d'air

Selon Bradley [71] et Nyborg [59, 60], un streaming acoustique se forme entre les deux plaques. Il est induit par l'oscillation harmonique de la plaque inférieure.

Nous nous intéressons à l'étude du comportement d'un fluide (goutte) entre deux plaques dont une est soumise à une vibration de basse fréquence. Pour cela, nous proposons le développement d'un modèle numérique.

## 3.2 Modélisation mathématique du problème

### 3.2.1 Equations de Base

Dans cette étude, nous considérons le cas d'un fluide réel, de viscosité de cisaillement  $\mu$  et de dilatation  $\mu_v$  non nulles. Ainsi, nous adoptons la forme générale de l'équation de Navier Stokes [39] :

$$\rho \left[ \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v} \right] = -\vec{\nabla} p + \mu \Delta \vec{v} + \left( \frac{1}{3} \mu + \mu_v \right) \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{v}) \quad (3.1)$$

Où  $\rho$ ,  $\vec{v}$ , et  $p$  sont respectivement la masse volumique, la vitesse et la pression du fluide considéré.

Le terme d'advection  $(\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v}$  est homogène à  $\frac{v^2}{H}$  alors que la dérivée temporelle de la vitesse est homogène à  $v.f$ . Du fait que  $H.f = (160.10^{-6}).(68,5.10^3) \approx 10 \text{ m.s}^{-1}$  admet une valeur très grande devant la vitesse  $v$  dont la valeur maximale est de l'ordre du  $\text{mm.s}^{-1}$ , nous pouvons négliger le terme d'advection. Les forces massives étant également négligées, l'équation de Navier Stokes devient :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -\vec{\nabla} p + \mu \Delta \vec{v} + \left( \frac{1}{3} \mu + \mu_v \right) \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{v}) \quad (3.2)$$

Le fluide obéit à l'équation de conservation de masse et à la relation constitutive du milieu.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{v}) = 0 \quad (3.3)$$

$$\chi_s = \frac{1}{\rho} \left( \frac{\partial \rho}{\partial p} \right)_s \quad (3.4)$$

Où  $\chi_s$  désigne la compressibilité isentropique du milieu.

Le fluide (goutte) est entouré par l'air, la pression sur les frontières ouvertes latérales est égale à la pression atmosphérique  $P_{atm}$ . Nous considérons que le gradient de la pression dans la direction normale

à la surface du générateur de vibration est nul. Le gradient de la vitesse tangentielle suivant l'axe des  $x$  est nul. Étant donnée la présence de la biopuce sur la base supérieure, l'onde est complètement absorbée par le fluide. Ainsi, des vitesses d'entraînement nulles sont imposées sur la couche supérieure du fluide. Finalement, nous considérons que la surface vibrante ( $x \in L_t$ ) est animée d'un mouvement sinusoïdale de pulsation  $\omega$ . Ces conditions se traduisent mathématiquement par :

$$p|_{x=0,L} = P_{atm} \quad (3.5a)$$

$$\frac{\partial p}{\partial y}|_{y=0,H} = 0 \quad (3.5b)$$

$$\frac{\partial v}{\partial x}|_{x=0,L} = 0 \quad (3.5c)$$

$$\vec{v}|_{y=H} = \vec{0} \quad (3.5d)$$

$$\vec{v}(t, x, 0) = A \sin(k_s x) \sin(\omega t) \vec{j} \quad \text{avec } x \in L_t \quad (3.5e)$$

Où  $k_s$  est le vecteur d'onde de vibration suivant la surface du générateur de vibration.

### 3.2.2 Streaming acoustique

Pour obtenir les équations relatives au 'streaming' acoustique, nous considérons le développement des variables du problème (3.2), (3.3), et (3.4) (pression, vecteur vitesse et masse volumique du fluide) en série de puissances d'un paramètre sans dimension  $\varepsilon$  [39]. Le paramètre de perturbation  $\varepsilon$  est défini comme le rapport de la vitesse acoustique caractéristique  $u_c$  de la particule et la vitesse de propagation de l'onde  $c_0$ .

$$\varepsilon = \frac{u_c}{c_0}$$

La vitesse caractéristique  $u_c$  est donnée par le produit  $\omega A_0$ , où  $A_0$  est l'amplitude de vibration de la poutre. Ainsi, les développements des différentes variables sont donnés par :

$$\vec{v} = \vec{v}_0 + \varepsilon \vec{v}_1 + \varepsilon^2 (\vec{v}_s + \vec{v}_2) + O(\varepsilon^3) \quad (3.6)$$

$$p = p_0 + \varepsilon p_1 + \varepsilon^2 (p_s + p_2) + O(\varepsilon^3) \quad (3.7)$$

$$\rho = \rho_0 + \varepsilon \rho_1 + \varepsilon^2 (\rho_s + \rho_2) + O(\varepsilon^3) \quad (3.8)$$

Les différentes variables du problème sont remplacées dans les équations (3.2), et (3.3) ainsi que dans les conditions aux limites (3.5) par leurs développements respectifs. En identifiant le coefficient de chaque

---

5. La notation  $x=0,L$  est équivalente à " $x=0$  et  $x=L$ "

puissance, nous retrouvons les systèmes d'équations que vérifient les termes apparaissant dans les développements.

- Les solutions d'ordre zéro ( $\vec{v}_0, p_0, \rho_0$ ) décrivent l'état de repos c'est-à-dire l'état du système en absence d'onde. Ainsi, la vitesse  $\vec{v}_0$ , la pression  $p_0$  et la masse volumique  $\rho_0$  sont constantes et connues.
- Les solutions d'ordre 1 ( $\vec{v}_1, p_1, \rho_1$ ), l'onde acoustique est sinusoïdale et de pulsation  $\omega$ . La résolution des équations de premier ordre nécessite la considération des solutions d'ordre zéro.
- Les solutions d'ordre 2 contiennent des termes constants, de pulsation nulle, ( $\vec{v}_s, p_s, \rho_s$ ) et des termes sinusoïdaux de pulsation  $2\omega$  ( $\vec{v}_2, p_2, \rho_2$ ) [39]. Ce sont les termes constants qui nous intéressent ici étant donné que le streaming est un écoulement permanent. Ces variables sont notées avec l'indice 's' (comme "Streaming"). Elles décrivent l'écoulement hydrodynamique et sont non harmoniques et indépendantes du temps. Elles apparaissent comme solutions de second ordre qui se basent sur les variables d'ordres inférieurs.

### 3.2.2.1 Etudes des variables harmoniques de premier ordre

A l'ordre 1, les équations de conservation de masse et de quantité de mouvement s'écrivent :

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} + \rho_0 \vec{\nabla} \cdot \vec{v}_1 = 0 \quad (3.9)$$

$$-\vec{\nabla} p_1 + \mu \Delta \vec{v}_1 + \left(\frac{1}{3}\mu + \mu_v\right) \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{v}_1) - \rho_0 \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \vec{0} \quad (3.10)$$

D'autre part, en supposant que la solution de premier ordre obéit à une transformation adiabatique, nous en déduisons de l'équation (3.4) la relation suivante liant la pression à la masse volumique :

$$p_1 = c_0^2 \rho_1 \quad (3.11)$$

La dérivation de l'équation (3.10) par rapport au temps donne :

$$-\vec{\nabla} \frac{\partial p_1}{\partial t} + \mu \Delta \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} + \left(\frac{1}{3}\mu + \mu_v\right) \vec{\nabla} \left(\vec{\nabla} \cdot \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t}\right) - \rho_0 \frac{\partial^2 \vec{v}_1}{\partial t^2} = 0 \quad (3.12)$$

En combinant les équations (3.9) et (3.11), nous obtenons :

$$\frac{\partial p_1}{\partial t} = c_0^2 \frac{\partial \rho_1}{\partial t} = -c_0^2 \rho_0 \vec{\nabla} \cdot \vec{v}_1 \quad (3.13)$$

En remplaçant  $\frac{\partial p_1}{\partial t}$  par son expression dans l'équation (3.12) et en divisant par la constante  $\rho_0 c_0^2$  on conclue :

$$\vec{\nabla} \vec{\nabla} \cdot \vec{v}_1 + \frac{\mu}{c_0^2 \rho_0} \Delta \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} + \frac{\frac{\mu}{3} + \mu_v}{c_0^2 \rho_0} \vec{\nabla} \vec{\nabla} \cdot \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} - \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2 \vec{v}_1}{\partial t^2} = 0$$

En posant

$$A_\mu = \frac{\mu}{c_0^2 \rho_0} \quad \text{et} \quad B_\mu = \frac{\frac{\mu}{3} + \mu_v}{c_0^2 \rho_0}$$

l'équation ci-dessus prend la forme suivante :

$$\vec{\nabla}\vec{\nabla}\cdot\vec{v}_1 + A_\mu\Delta\frac{\partial\vec{v}_1}{\partial t} + B_\mu\vec{\nabla}\vec{\nabla}\cdot\frac{\partial\vec{v}_1}{\partial t} - \frac{1}{c_0^2}\frac{\partial^2\vec{v}_1}{\partial t^2} = 0 \quad (3.14)$$

Soient  $v_{1x}$  et  $v_{1y}$  les composantes du vecteur vitesse  $\vec{v}_1$ . Rappelons que toutes les variables d'ordre 1 sont des solutions harmoniques, i.e :

$$v_{1x}(t, x, y) = \widehat{v}_x(x, y) \exp(i\omega t) \quad (3.15)$$

$$v_{1y}(t, x, y) = \widehat{v}_y(x, y) \exp(i\omega t) \quad (3.16)$$

$$p_1(t, x, y) = \widehat{p}(x, y) \exp(i\omega t) \quad (3.17)$$

Sachant que  $\frac{\partial\vec{v}}{\partial t} = i\omega\vec{v}$  et  $\frac{\partial^2\vec{v}}{\partial t^2} = -\omega^2\vec{v}$ , l'équation (3.14) s'écrit :

$$(1 + i\omega B_\mu)\vec{\nabla}\vec{\nabla}\cdot\vec{v}_1 + i\omega A_\mu\Delta\vec{v}_1 - \frac{\omega^2}{c_0^2}\vec{v}_1 = 0 \quad (3.18)$$

En tenant compte des équations (3.13) et (3.18), les amplitudes complexes  $\widehat{v}_x$ ,  $\widehat{v}_y$ , et  $\widehat{p}$ , introduites ci-dessus, sont solutions du système :

$$\begin{cases} [1 + i\omega(A_\mu + B_\mu)]\frac{\partial^2\widehat{v}_x}{\partial x^2} + i\omega A_\mu\frac{\partial^2\widehat{v}_x}{\partial y^2} + (1 + i\omega B_\mu)\frac{\partial^2\widehat{v}_y}{\partial x\partial y} + \frac{\omega^2}{c_0^2}\widehat{v}_x = 0 & (3.19a) \\ i\omega A_\mu\frac{\partial^2\widehat{v}_y}{\partial x^2} + [1 + i\omega(A_\mu + B_\mu)]\frac{\partial^2\widehat{v}_y}{\partial y^2} + (1 + i\omega B_\mu)\frac{\partial^2\widehat{v}_x}{\partial x\partial y} + \frac{\omega^2}{c_0^2}\widehat{v}_y = 0 & (3.19b) \\ i\frac{c_0^2\rho_0}{\omega}\left(\frac{\partial\widehat{v}_x}{\partial x} + \frac{\partial\widehat{v}_y}{\partial y}\right) = \widehat{p} & (3.19c) \end{cases}$$

En tenant compte de (3.6), (3.7), (3.8) et de (3.5), nous déduisons les conditions aux limites suivantes :

$$\widehat{v}_x(x, 0) = 0, \quad (3.20a)$$

$$\widehat{v}_x(x, H) = 0, \quad (3.20b)$$

$$\widehat{v}_y(x, H) = 0, \quad (3.20c)$$

$$\widehat{v}_y(x, 0) = \omega A \sin(k_s x), \quad \text{pour } x \in L_t \quad (3.20d)$$

Les amplitudes  $\widehat{v}_x$ ,  $\widehat{v}_y$  et  $\widehat{p}$  ainsi déterminées, les équations de (3.15) à (3.17) permettent de déduire les composantes complexes  $v_{1x}$ ,  $v_{1y}$  du vecteur vitesse  $\vec{v}_1$  et celle de la pression  $p_1$ .

### 3.2.2.2 Etudes des variables relatives au streaming

Le champ acoustique gouverne le streaming par l'intermédiaire de l'intensité acoustique  $I$  définie par :

$$I = p_1 v_1 \quad (3.21)$$

Il crée une force d'entraînement  $\vec{f}$  et une masse  $m$  données par :



$$\vec{\mathbf{f}} = -\frac{1}{c_0^2} \left\langle p_1 \frac{\partial \vec{\mathbf{v}}_1}{\partial t} \right\rangle - \rho_0 \langle (\vec{\mathbf{v}}_1 \cdot \nabla) \vec{\mathbf{v}}_1 \rangle \quad (3.22)$$

$$\dot{m} = -\frac{1}{c_0^2} \nabla \cdot \langle I \rangle \quad (3.23)$$

Pour exprimer l'intensité acoustique  $I$  en fonction des variables complexes, nous introduirons les expressions (3.15), (3.16), (3.17) dans l'expression (3.21). Ceci facilitera le calcul de la valeur moyenne de l'intensité  $\langle I \rangle$ .

$$I = \frac{p_1 + \bar{p}_1}{2} \cdot \left[ \begin{array}{c} \frac{v_{1x} + \bar{v}_{1x}}{2} \\ \frac{v_{1y} + \bar{v}_{1y}}{2} \end{array} \right] \quad (3.24)$$

$$\langle I \rangle = \frac{1}{2} \left[ \begin{array}{c} Re(\bar{\hat{p}}\hat{u}) \\ Re(\bar{\hat{p}}\hat{v}) \end{array} \right] \quad (3.25)$$

Cette expression de la valeur moyenne de l'intensité acoustique permet de déduire  $\dot{m}$  qui s'écrit comme suit :

$$\dot{m} = -\frac{1}{2c_0^2} \left( \frac{\partial Re(\bar{\hat{p}}\hat{u})}{\partial x} + \frac{\partial Re(\bar{\hat{p}}\hat{v})}{\partial y} \right) \quad (3.26)$$

Nous retrouvons de la même façon la force d'entraînement :

$$\vec{\mathbf{f}} = \left[ \begin{array}{c} f_x \\ f_y \end{array} \right] = \frac{-1}{2} \left[ \begin{array}{c} \frac{\rho_0}{c_0^2} Re(i\bar{\hat{p}}\hat{u}) + \rho_0 Re((\bar{\hat{u}}\frac{\partial}{\partial x} + \bar{\hat{v}}\frac{\partial}{\partial y})\hat{u}) \\ \frac{\rho_0}{c_0^2} Re(i\bar{\hat{p}}\hat{v}) + \rho_0 Re((\bar{\hat{u}}\frac{\partial}{\partial x} + \bar{\hat{v}}\frac{\partial}{\partial y})\hat{v}) \end{array} \right] \quad (3.27)$$

La force d'entraînement  $\vec{\mathbf{f}}$  et la masse  $\dot{m}$  étant calculées, les équations de second ordre relatives au streaming permettent de déterminer les composantes de streaming  $\vec{\mathbf{v}}_s$  et  $p_s$  :

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho_0 \nabla \vec{\mathbf{v}}_s = \dot{m} \\ -\mu \delta \vec{\mathbf{v}}_s - (\mu_v + \frac{\mu}{3}) \nabla \nabla \vec{\mathbf{v}}_s + \nabla p_s = \vec{\mathbf{f}} \end{array} \right. \quad (3.28a)$$

$$\quad (3.28b)$$

En tenant compte des équations (3.6), (3.7), (3.8) et de (3.5), les variables  $p_s$  et  $\vec{\mathbf{v}}_s$  vérifient les conditions aux limites suivantes :

$$\frac{\partial p_s}{\partial y} \Big|_{y=0,H} = 0 \quad (3.29a)$$

$$p_s \Big|_{x=0,L} = P_{atm} \quad (3.29b)$$

$$\frac{\partial \vec{\mathbf{v}}_s}{\partial x} \Big|_{x=0,L} = 0 \quad (3.29c)$$

### 3.3 Modélisation numérique

"La race humaine ne devrait pas mettre tous ses œufs dans le même panier, ou sur une seule planète..." Stephen Hawking

Il est difficile voir impossible de résoudre les systèmes précédents en tenant compte du critère "infini" suivant l'axe des  $x$  de la couche d'air : domaine infini (figure 3.3). Pour résoudre ce problème par une méthode de type éléments finis, il faut se ramener à un problème posé dans domaine de taille raisonnable.

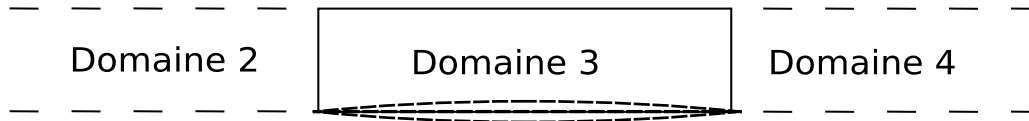


FIGURE 3.3: Schéma synoptique d'une couche de fluide infinie soumise à une vibration locale

**Remarque :**

Wan [72] s'est intéressée à la simulation numérique d'une couche infinie d'air. Pour surmonter la difficulté du domaine "infini", il a utilisé une condition de non-réflexivité **NRBC** (**Non-Reflecting Boundary Condition**) donnée par Givoli [73]. La condition NRBC de second ordre peut être écrite comme suit :

$$\left( \frac{1}{c_0} \frac{\partial^2}{\partial x \partial t} - \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) \vec{v} = \vec{0} \quad (3.30)$$

Pour surmonter la difficulté du domaine "infini", nous faisons appel à la technique **PML** (**Perfectly Matched Layer**) qui consiste à introduire des couches absorbantes et non réfléchissantes de part et d'autre du domaine considéré (Domaines 1 et 5, figure 3.4) [74]. Cette technique a été utilisée avec succès au laboratoire au sein de notre laboratoire et a fait l'objet de plusieurs publications [75].

Les PMLs ont la propriété de progressivement absorber les perturbations dans une couche donnée sans induire de réflexion. Par conséquent, les PMLs n'influencent pas la propagation des ondes acoustiques dans le domaine d'intérêt.

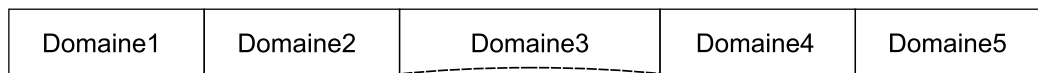


FIGURE 3.4: Schéma énumérant les différents domaines considérés pour la modélisation

En introduisant les couches PML, les deux problèmes précédemment décrits deviennent des problèmes classiques. L'implémentation numérique sur n'importe quel code de calcul ne pose plus de grandes difficultés .

Les différents systèmes sont discrétisés par la méthode des éléments finis. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel de simulation multiphysique Comsol.

Pour résoudre numériquement les différents systèmes établis, nous adoptons le schéma suivant :

1. Résolution problème 1 : Les amplitudes complexes de premier ordre sont déterminées par la résolution numérique du système (3.19) sous les conditions aux limites (3.20).
2. Calcul : La masse  $\dot{m}$  et la force d'entraînement  $\vec{f}$  sont calculées à partir des expressions (3.26) et (3.27).
3. Résolution problème 2 : Le système (3.28) est résolu en respectant les conditions aux limites (3.29) pour déterminer les variables du streaming.

### 3.4 Applications numériques

#### 3.4.1 Application 1 : Couche infinie d'air

Nous considérons dans la présente simulation les mêmes dimensions géométriques, le même type de vibration et les mêmes caractéristiques physiques que l'article de Wan [44]. Ces données sont résumées dans les tables 3.1 et 3.2.

TABLE 3.1: Constantes numériques relatives au type du fluide

Fluides	$c_0(ms^{-1})$	$\rho_0(kgm^{-3})$	$\mu(Pa.s)$	$\mu_v(Pa.s)$
Air	340	1,293	$1810^{-6}$	$0,610^{-6}$
Eau	1500	1030	$1,0110^{-3}$	$4,110^{-3}$ [76]

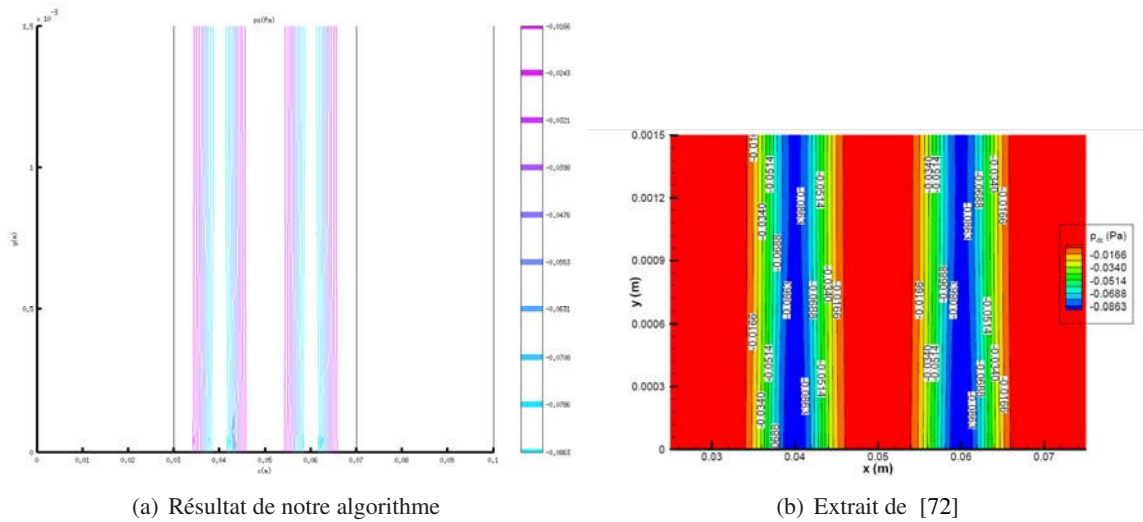
TABLE 3.2: Variables géométriques

Longueur L	100 mm
Longueur $L_t$	40 mm
Longueur $L_f$	40 mm
Hauteur du fluide H	1,5 mm
Vitesse angulaire $\omega$	1000 rad/s
Longueur d'onde $\lambda$	20 mm
Amplitude de vibration $A_0$	0,1 mm
vecteur d'onde $k$	$\frac{2\pi}{\lambda}$ (en rad/m)
Période $T$	$\frac{2\pi}{\omega}$ (en s)

La figure 3.5 met en exergue la similitude des lignes de pression de streaming  $p_s$  obtenues par les deux méthodes de calcul. La figure 3.5(a) correspond au résultat obtenu en utilisant notre code de calcul tandis que la figure 3.5(b) est extraite de l'article de Wan [44]. Dans les deux cas, nous observons une répartition symétrique des lignes de pression dans le domaine d'intérêt. Nous enregistrons dans les deux cas, les mêmes amplitudes de pression variant entre -0,0863 et -0.0166 Pa.

**Remarque :**

*Notre programme de calcul par la méthode des éléments finis met un temps CPU de l'ordre de la minute en utilisant la station relative au Mésocentre de calcul de Franche-Comté tandis que le calcul de Wan pour la même configuration nécessite 12 heures CPU en utilisant la station de travail SGI 2400.*

FIGURE 3.5: Isobares de la pression de streaming  $p_s$ 

La détermination des variables de streaming à travers le problème 2 repose sur la connaissance de la force d'entraînement et le source de masse déterminées suite au problème 1. Nous nous proposons de déterminer l'influence de ces variables sur la résolution du problème 2.

La figure 3.6 présente les isocourbes de la source de masse  $\dot{m}$ . Cette dernière prend une valeur non nulle uniquement à proximité de la surface en vibration. Ainsi, nous présentons cette variable uniquement dans la zone d'intérêt. Une faible variation de l'amplitude de la source de masse ne semble pas affecter les résultats numériques. Ainsi, ce paramètre pourrait être mis à zéro. La figure 3.7 présente les composantes horizontale  $f_x$  et verticale  $f_y$  de la force d'entraînement  $\vec{f}$ . Notons que l'amplitude de la composante horizontale est très grande devant la composante verticale. Elle est, par conséquent, l'élément moteur du flux de streaming induit. Ainsi, nous présenterons dans les simulations suivantes les isolignes de la composante horizontale de la force en plus des variables solutions du problème de streaming  $\beta$ ,  $\vec{v}_s$  et  $|\vec{v}_s|$ .

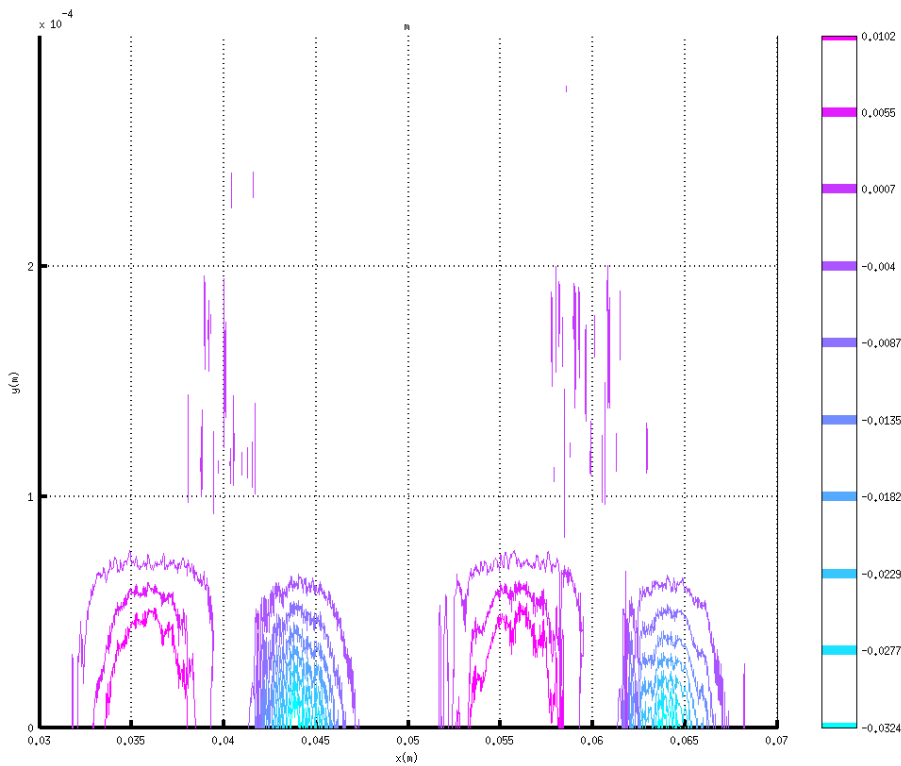


FIGURE 3.6: Les isolignes de la source de masse  $m$

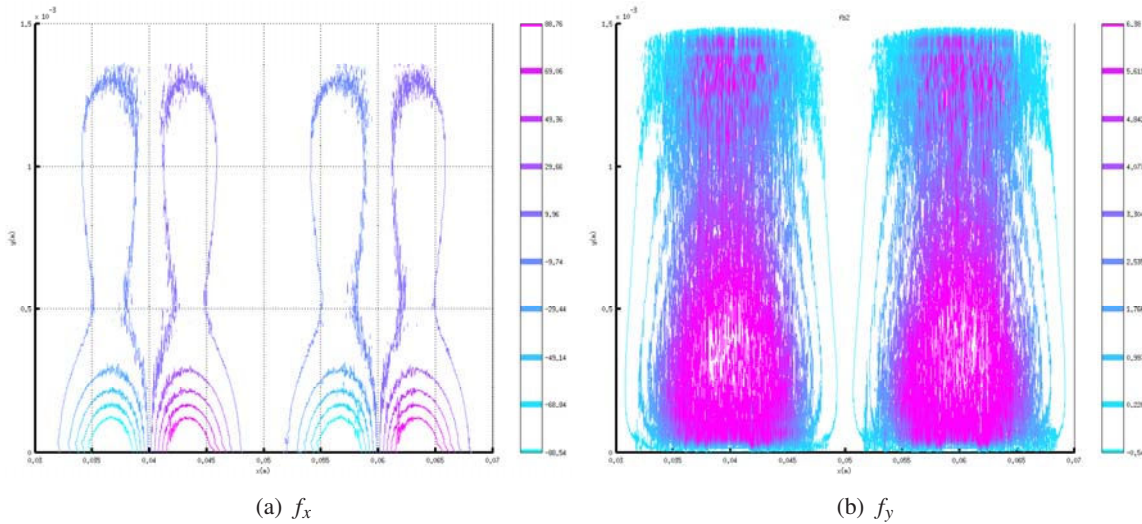


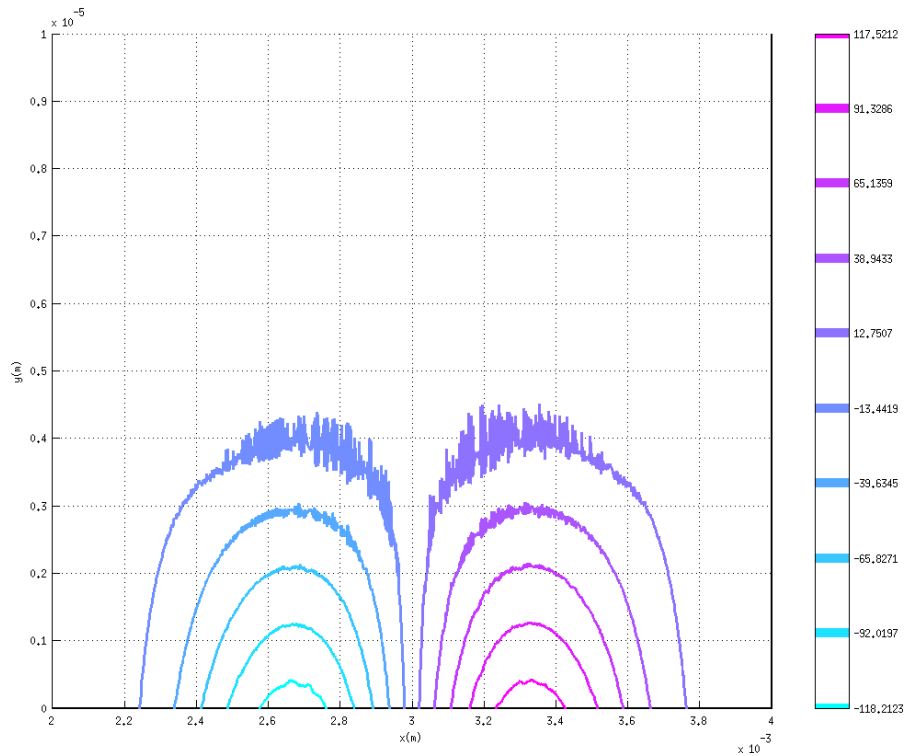
FIGURE 3.7: Les isolignes des composantes horizontale  $f_x$  et verticale  $f_y$  de la force  $\vec{f}$

### 3.4.2 Application 2 : Section de liquide entourée d'air

Nous nous intéressons dans ce paragraphe au cas étudié d'une section de liquide (domaine 3) entourée d'air (domaines 2 et 4) (voir figure 3.4). Nous considérons, dans la suite, la géométrie objectif de notre étude. Nous adoptons les dimensions données par la table 3.3. La figure 3.8 présente les isolignes de la

TABLE 3.3: Constantes utilisées pour la simulation

Longueur $L$	6 mm
Longueur $L_t$	2 mm
Longueur $L_f$	2 mm
Hauteur du fluide $H$	0,16 mm
Vitesse angulaire $\omega$	1000 rad/s
Longueur d'onde $\lambda$	2 mm
Amplitude de vibration $A_0$	0,5 $\mu\text{m}$

FIGURE 3.8: Isolignes de la composante horizontale  $f_x$  de la force  $\vec{f}$ 

composante horizontale de la force d'entraînement. Nous retrouvons un résultat symétrique, en valeur absolue, avec des amplitudes maximales à proximité de la membrane en vibration. Un résultat attendu étant donnée la symétrie, en valeur absolue, de la vibration. L'amplitude maximale enregistrée est supérieure à son homologue dans le cas d'une couche infinie d'air. Ceci se justifie par la faible compressibilité du milieu liquide.

La figure 3.9 présente une répartition symétrique des lignes de la pression  $p_s$ , avec une amplitude maximale et de signe négatif au niveau du nœud central de la vibration (mi-longueur du liquide). Ceci devrait induire un mouvement verticale vers le bas à mi-longueur du liquide. Cependant, l'amplitude maximale de la pression de streaming  $p_s = 0,8 \text{ mPa}$  reste faible comparée à la pression atmosphérique ( $10^5 \text{ Pa}$ ).

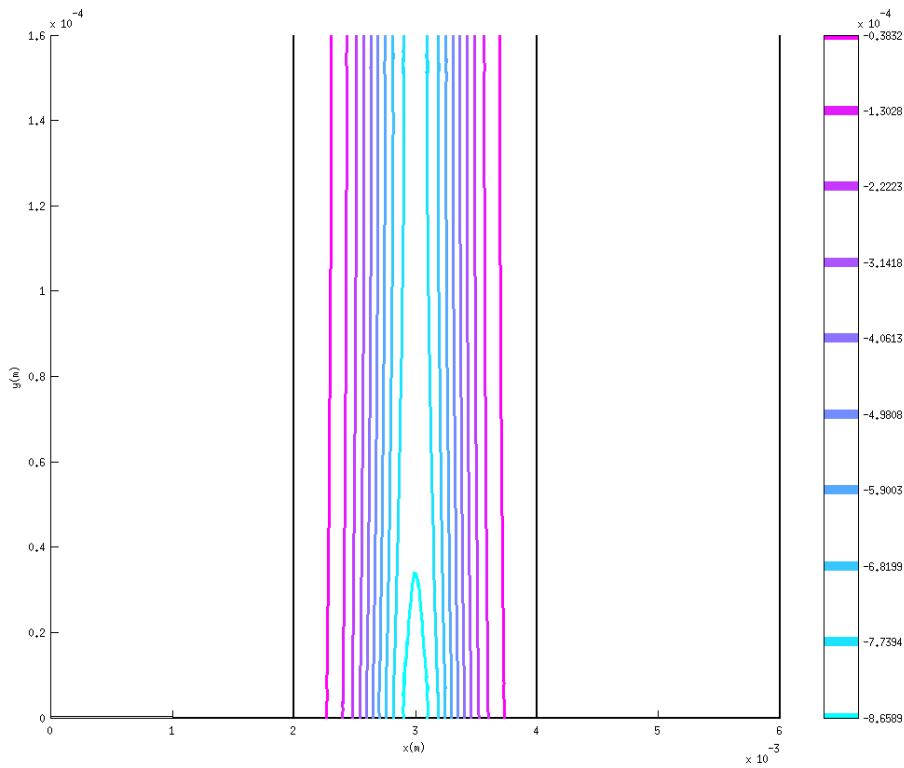


FIGURE 3.9: Isobares de la pression de streaming  $p_s$

La figure 3.10(a) présente le champ des vitesses de streaming. Ces dernières forment deux types de circulations :

- Une circulation vers le haut au niveau des ventres de la vibration.
- Une circulation vers le bas au niveau des nœuds de la vibration.

Ainsi, nous retrouvons bien un écoulement permanent qui s’installe dans la goutte due à la vibration de la membrane.

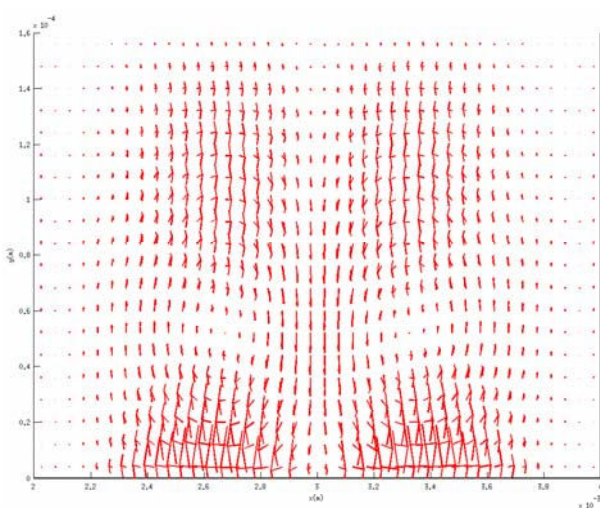


FIGURE 3.10: Champ des vitesses de streaming  $\vec{v}_s$

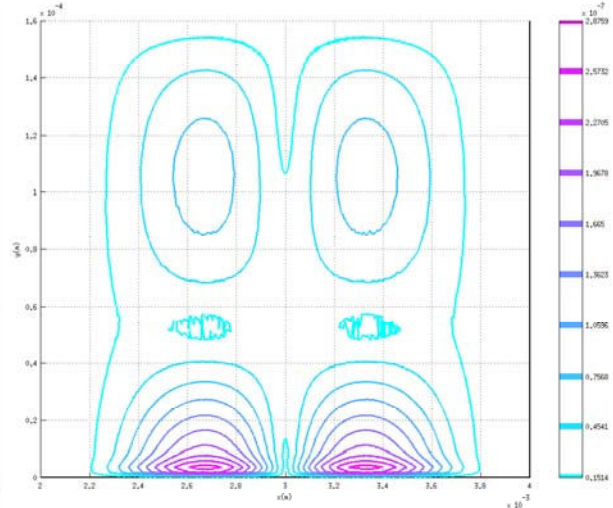


FIGURE 3.11: Norme de la vitesse de streaming  $|\vec{v}_s|$

La norme de la vitesse de streaming  $|\vec{v}_s|$  quant à elle varie entre 0.015 et 0.2  $\mu\text{m.s}^{-1}$  (figure 3.11). Une amplitude moyennement acceptable sachant que la donnée expérimentale est de l'ordre des dizaines de  $\mu\text{m.s}^{-1}$ .

Même si l'amplitude de la vitesse trouvée est inférieure aux données expérimentales, nous avons démontré dans le cadre de cette étude la présence d'un écoulement permanent du à une vibration de basse fréquence au voisinage du liquide. Toute fois, il faudrait étudier la sensibilité de notre modèle aux différentes constantes introduites (viscosités cinétique  $\mu$  et volumique  $\mu_v$  et vitesse du son dans le liquide  $c_0$ ).

### 3.4.3 Application 3 : Couche infinie de liquide

Dans les travaux précédents au sein de notre équipe [45–47], on s'est intéressé au calcul de la pression de radiation acoustique induite par une vibration de basse fréquence dans une couche de liquide infinie pour faciliter le calcul analytique. Pour cela, un certain nombre d'hypothèses simplificatrices ont été adoptées. Nous nous intéressons donc dans ce paragraphe au cas d'une couche liquide infinie afin de présenter une résolution numérique du problème exposé. Dans la suite, nous rappelons dans un premier temps le calcul analytique effectué puis nous présentons nos résultats numériques correspondant à ce cas de figure.

#### 3.4.3.1 Estimation de la pression de radiation acoustique

En une première tentative de modélisation, les équations de l'acoustique linéaire ont été adopté :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -\vec{\Delta} p \quad (3.31a)$$

$$\delta p = \rho c_0^2 \frac{\partial d}{\partial y} \quad (3.31b)$$

Ainsi, on obtient l'équation aux dérivées partielles suivante :

$$\frac{\partial^2 d}{\partial t^2} = c_0^2 \frac{\partial^2 d}{\partial y^2} \quad (3.32)$$

La surpression créée par l'onde est ainsi donnée par :

$$\delta p = \rho c_0^2 \left\{ -\frac{\delta d}{\delta y} \right\} \quad (3.33)$$

Cependant, pour une excitation harmonique de pulsation  $\omega$  comme celle engendrée par la membrane en vibration, la moyenne temporelle du déplacement notée  $\langle d(x, y, t) \rangle$  s'écrit :

$$\langle d(x, y, t) \rangle = \frac{\omega}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} d(x, y, t) dt = 0 \quad (3.34)$$



Par conséquent, la moyenne de la surpression est également nulle (d'après (3.33)). L'utilisation des équations de l'acoustique linéaire trouvent un obstacle, puisqu'il est impossible de créer une force de moyenne temporelle non nulle capable de fournir un déplacement continu à un fluide idéal compressible. Il est donc nécessaire d'insérer une non linéarité.

Les équations de l'acoustique linéaire ne sont plus suffisantes pour exprimer de façon exacte différents phénomènes dus par exemple à la nature de l'onde ou du fluide. Les propriétés des fluides réels font apparaître un terme de non linéarité qui ne relie plus la moyenne de la pression acoustique et la vitesse par une relation de proportionnalité. La moyenne temporelle fait apparaître un terme non nul au second ordre appelé pression de radiation acoustique.

Pour les liquides, le paramètre de non linéarité apparaît dans le terme  $\gamma$  sous la forme :

$$\gamma = 1 + \frac{B}{A} \quad (3.35)$$

où  $B/A$  est le paramètre de non linéarité du liquide. Ce terme apparaît dans la relation non linéaire entre la pression et la densité du liquide. Tenant compte de ce paramètre, la propagation peut s'écrire de manière plus générale [77] :

$$\frac{\partial^2 d}{\partial t^2} = c_0^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\partial d}{\partial y}\right)^{\gamma+1}} \frac{\partial^2 d}{\partial y^2} \quad (3.36)$$

Si l'on suppose que  $\frac{\partial d}{\partial y} \ll 1$ , le développement au premier ordre de l'équation (3.36) conduit à :

$$\frac{\partial^2 d}{\partial t^2} = c_0^2 \frac{\partial^2 d}{\partial y^2} \left(1 - (1 + \gamma) \frac{\delta d}{\delta y}\right) \quad (3.37)$$

qui nous donne pour la surpression créée par l'onde :

$$\delta p = \rho c_0^2 \left\{ -\frac{\delta d}{\delta y} + \frac{1 + \gamma}{2} \left(\frac{\delta d}{\delta y}\right)^2 \right\} \quad (3.38)$$

Le second terme de cette expression est quadratique si bien que sa moyenne temporelle est non nulle et définit l'expression générale de la pression de radiation acoustique  $P_r$  :

$$\langle \delta p \rangle = P_r = \rho c_0^2 \frac{1 + \gamma}{2} \left\langle \left(\frac{\partial d}{\partial y}\right)^2 \right\rangle \quad (3.39)$$

Dans le cas de la couche infinie de liquide, seule l'onde incidente (définie par  $k_y$ ) est prise en compte dans le sens transversal. Avec,  $k_s$  le nombre d'onde pour la surface en vibration ( $k_s = \omega/c_v$ ). L'expression du déplacement de liquide à l'intérieur de la couche de liquide s'écrit :

$$d_l(x, y, t) = d_0 \cos(\omega t - k_o y) \sin(k_s x) \quad (3.40)$$

Le déplacement de la surface en vibration s'écrit :

$$d_v = A \sin(k_s x) \cos(\omega t) \quad (3.41)$$

Si nous insérons l'équation (3.40) dans le terme  $\left\langle \left( \frac{\partial d_l}{\partial y} \right)^2 \right\rangle$  de la pression de radiation acoustique, nous obtenons :

$$\left\langle \left( \frac{\partial d_l}{\partial y} \right)^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_o^2 d_0^2 \sin(k_s x) \sin^2(k_o y) \quad (3.42)$$

Le calcul de la pression de radiation acoustique donne  $Pr \approx 120$  Pa, pour  $\gamma=6,2$  [77],  $f = 30$  kHz, et une vibration d'amplitude  $d_0 = 1 \mu\text{m}$ . Une telle pression pourrait expliquer la déformation du liquide. Cependant, l'amplitude de vibration du liquide est considérée égale à l'amplitude de vibration de la surface. Cette hypothèse est fautive en champ proche.

Par ailleurs, ce calcul analytique permet seulement d'avoir un ordre de grandeur de la pression de radiation acoustique. Néanmoins, son effet sur l'écoulement à l'intérieur du liquide n'a pas été abordé. Nous nous proposons de modéliser numériquement ce problème physique afin de donner les formes d'écoulements induites dans le liquide.

### 3.4.3.2 Résultats numériques

Pour simuler le cas d'une couche infinie de liquide, nous considérons les trois domaines 2, 3 et 4 comme étant des domaines liquides (figure 3.4).

La force d'entraînement induite par l'onde acoustique dans la couche de liquide est  $10^3$  fois plus grande que dans le cas d'une couche infinie d'air (figure 3.12(a)). Cependant, elle prend une valeur non nulle uniquement dans un-quart de l'épaisseur qu'elle occuperait si le fluide considéré est l'air. La forte amplitude de cette force induit naturellement une augmentation des pressions et vitesses de streaming comparées aux résultats dans une couche d'air (figure 3.12(b) et (c)).

La figure 3.12(b) montre la répartition des lignes de pression dans le domaine liquide. Notons que la valeur maximale de la pression de streaming déterminée est de l'ordre de 300 Pa. L'estimation de la pression de radiation estimée dans les thèses précédentes et qui est de l'ordre de 120 Pa n'est donc pas complètement fautive malgré la remise en question sur les différentes hypothèses simplificatrices.

Le champ des vitesses de streaming reste inchangé comparé à celui établi dans le cas d'une couche infinie d'air et ne semble pas être affecté par l'augmentation de viscosité induite par le changement du fluide. Notons que la vitesse de streaming varie entre 4 et 85  $\text{mm.s}^{-1}$  pour le liquide contre une variation entre 1 et 18  $\text{mm.s}^{-1}$  dans le cas d'une couche infinie d'air. L'augmentation de ce paramètre est bien logique mais son amplitude est très importante comparée à nos résultats expérimentaux qui annoncent des vitesses de l'ordre des dizaines de micromètre par seconde.

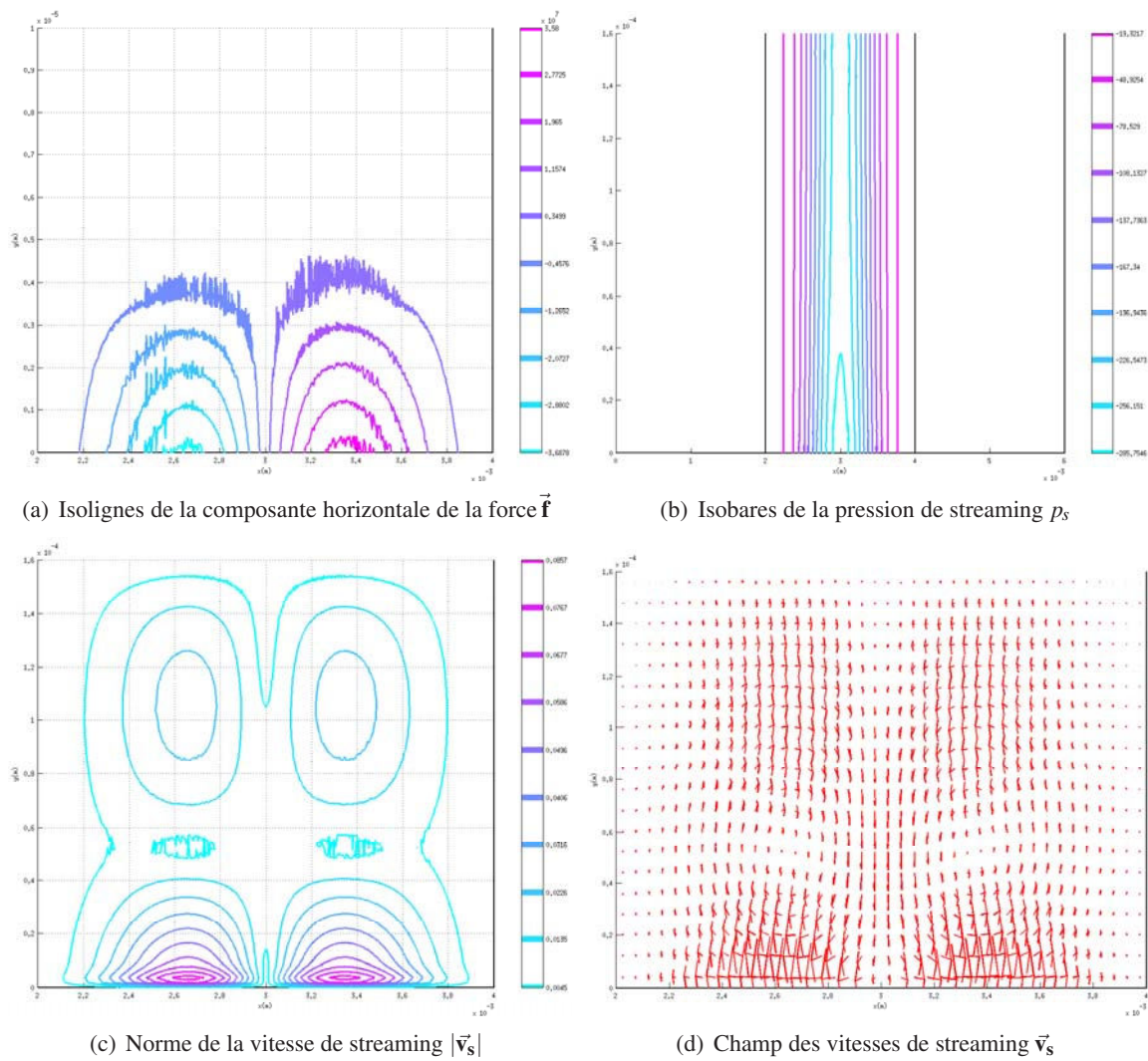


FIGURE 3.12: Cas 2 : couche infinie de liquide

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons adopté la méthode des développements asymptotiques pour analyser le streaming acoustique induit dans un fluide piégé entre une membrane en vibration et une paroi fixe dans trois configurations :

- une couche infinie d’air
- une section de liquide entourée d’air
- une couche infinie de liquide

Dans la première application, nous avons étudié le cas d’une couche infinie d’air ce qui nous a permis d’établir une comparaison avec des résultats obtenus dans un cas similaire par Wan [4] en utilisant les différences finies.

Nous retrouvons les mêmes résultats numériques. Il est à noter, que notre modèle numérique est facile à implémenter en utilisant n'importe quel code de calcul avec un temps moyen d'exécution de l'ordre de la minute (sur la station du Mesocentre de calcul).

Le modèle numérique défini est appliqué au cas d'une section de liquide entourée d'air. Nous retrouvons numériquement la création d'écoulement quasi-permanent dans la goutte du à une vibration de basse fréquence d'une membrane en contact avec le liquide. Les vitesses de streaming calculées sont, cependant, relativement faibles devant celles expérimentalement estimées. Cette observation nous conduit à revoir la sensibilité de notre code de calcul vis à vis les constantes du problème : viscosité cinétique  $\mu$  et volumique  $\mu_v$ , et vitesse du son  $c_0$  dans le liquide.

Nous avons également simulé le cas d'une couche "infinie" de liquide, qui constitue un cas étudié analytiquement dans les travaux précédents dans notre équipe. Nous retrouvons une valeur de pression du même ordre de grandeur que celle analytiquement calculée. Nous avons également présenté les écoulements induits dans le liquide en traçant le champ de vitesse de streaming.

Nous avons ainsi proposé une modélisation numérique des écoulements induits dans le fluide par la vibration basse fréquence d'une membrane. Nous n'avons fait que poser la première brique vers une modélisation complète du phénomène. En effet, à terme nous devrions modéliser le comportement d'une goutte en tenant compte de sa forme et dont la surface de contact liquide-air est libre. Dans une telle disposition, cette interface vibre et se déforme sous excitation acoustique, un phénomène qui devrait être pris en compte dans notre modèle numérique.



## **Chapitre 4**

# **Application au domaine biologique**

"Le théoricien pose certaines questions déterminées à l'expérimentateur et ce dernier essaie, par ses expériences, d'obtenir une réponse décisive à ces questions là et non à d'autres."  
Popper, La logique de la découverte scientifique, page 107



## Introduction

La protéomique est la science qui étudie le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule ou d'un organisme. Pour assurer une analyse efficace d'un fluide biologique (sang, urine, extraits cellulaires...), des outils précis sont évidemment nécessaires. Rendre la surface d'analyse suffisamment intelligente pour délivrer les informations spécifiques et seulement celles-ci, en occultant tout élément qui fausserait le diagnostic, est le cœur du travail mené à l'Institut FEMTO-ST à Besançon, au sein de la plate-forme protéomique 'Clipp' (CLinical and Innovation Proteomic Platform). La colonne vertébrale de cette étude est, bien évidemment, le BIOCAPTEUR.

Les biocapteurs sont des dispositifs permettant d'analyser des interactions biomoléculaires. Ils exploitent la capacité de détection biologique pour une molécule cible, en conjonction avec un transducteur physique qui transforme un signal biologique en un signal mesurable. La base fondamentale de l'analyse biomoléculaire est la spécificité de la reconnaissance moléculaire entre les deux espèces en présence permettant la formation d'un complexe plus ou moins fort entre eux. Pour cela, une première molécule est immobilisée (le ligand) sur la surface du transducteur formant ainsi une couche biologique sensible à la présence d'analyte (figure 4.1).

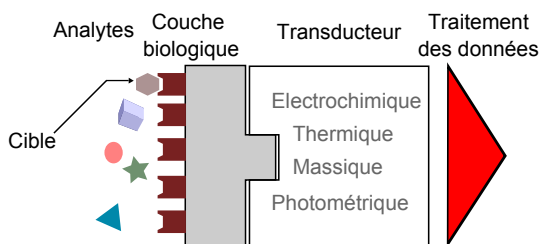


FIGURE 4.1: Principe de fonctionnement d'un biocapteur

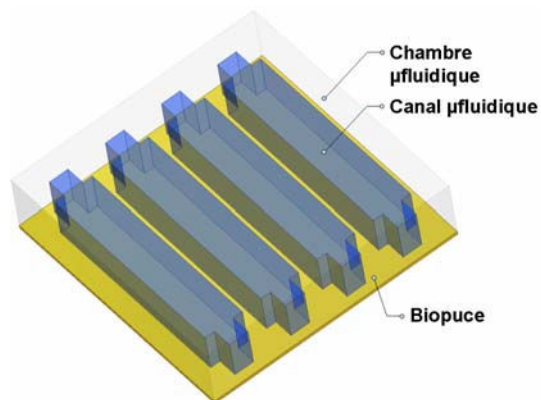


FIGURE 4.2: Représentation d'une cartouche microfluidique d'un système de mesure SPR (Biacore)

L'événement d'immobilisation de la molécule de reconnaissance est alors une étape cruciale et déterminante dans le bon fonctionnement du biocapteur. Classiquement, l'étape d'immobilisation est réalisée en faisant circuler, en boucle ouverte, un liquide contenant les anticorps à proximité d'une biopuce par le biais d'un circuit microfluidique. Cette méthode est généralement adoptée par les biocapteurs SPR commercialisés (Biacore, Biorad,...) [42]. Le Biacore 2000, par exemple, fait appel à un circuit microfluidique constitué de 4 canaux (figure 4.2). Ainsi, se créent autant de zones immobilisées, nommées en notation anglaise 'macroarrays', avec autant de biomolécules différentes que de canaux les transportant au voisinage de la biopuce, ce qui constitue une des limites de cette méthode. Myska et al. [5, 43, 78, 79] ont récemment développé une nouvelle technique permettant d'augmenter le nombre de spots immobilisés. En effet, ils ont conçu un circuit microfluidique nommé Microspotteur à Flux continu (Continuous-Flow Microspotter 'CFM') adapté aux biopuces miniaturisées relatives à l'instrument de mesure SPR Flexchip. Cette méthode repose sur l'emploi d'un circuit fluidique dont les canaux sont perpendiculaires



à la biopuce, contrairement à la disposition classique où ils sont parallèles à la biopuce. Cette configuration permet de réduire la taille des spots et, par conséquent, d'augmenter leur nombre. Ainsi, Il est possible d'adresser indépendamment, avec des molécules différentes, de 12 à 48 spots. Néanmoins, cette méthode reste limitée par la complexité de la réalisation du circuit microfluidique et par la quantité de liquide et de molécules mises en jeu étant donné le fonctionnement en boucle ouverte. Il est possible de s'affranchir de ces inconvénients par le biais de la micro-fluidique discrète. L'immobilisation des biomolécules se fait, dans ce cas, en déposant une matrice de gouttes mères (contenant les biomolécules d'intérêt) sur la surface du biocapteur pour une durée d'incubation. Cette méthode donne lieu à une matrice de spots d'une densité et d'une homogénéité peu satisfaisantes en plus de la faible répétabilité du résultat.

La présente étude vise l'amélioration du processus de greffage moléculaire, en mode fluide discret, en vue d'aboutir à un procédé efficace de fabrication de biopuces. Notre ambition est de développer des puces commercialisables prêtes à l'emploi (autrement dit préalablement fonctionnalisées, activées et immobilisées) pour répondre à des besoins dans différents domaines et particulièrement pour des usages cliniques. Pour cela, nous devons garantir, à court terme, un bon rapport qualité/prix des biopuces immobilisées et à long terme, un procédé de fabrication automatisé.

## 4.1 Principaux types de biocapteurs

Afin de mettre en évidence l'apport de l'activation acoustique dans le domaine du greffage moléculaire, nous nous devons de choisir une méthode de mesure permettant la caractérisation de la couche greffée. Plusieurs méthodes sont utilisées faisant appel à différents types de biocapteurs.

- Dans le cas de **capteurs électrochimiques** [80], le transducteur est une électrode et la détection peut être soit potentiométrique, soit ampérométrique. La précision est supérieure dans ce dernier cas, ce qui explique le grand nombre de biocapteurs ampérométriques mis au point. Depuis la proposition, en 1962, de la première électrode à enzyme sélective du glucose [81], de nombreux biocapteurs électrochimiques à détection ampérométrique, aux multiples applications, ont été proposés [82–85]. D'autres types de capteurs mesurent l'impédance électrique [86], cette mesure s'applique avantageusement aux réactions d'affinité (antigènes-anticorps) car elles sont sensibles aux faibles variations de conductivité à l'interface électrode-substrat immobilisé [87].

- Les **capteurs thermiques**, quant à eux, reposent sur le fait que la plupart des réactions biologiques s'accompagne d'un dégagement de chaleur. Une mesure précise de cette chaleur permet une détermination de différents paramètres :

- constante de liaison (K)
- stoechiométrie de la réaction (n)
- enthalpie ( $\Delta H$ )
- entropie ( $\Delta S$ )

Ainsi en une seule expérience, un profil thermodynamique complet de l'interaction est tracé. Les capteurs thermiques sont cependant relativement peu sensibles et nécessitent des montages différentiels judicieusement équilibrés afin de compenser toute variation de température parasite [88]. De plus, ce type de mesure nécessite une importante quantité de liquide échantillon : 1,5 mL (largement supérieure à la consommation d'un instrument SPR<sup>6</sup> qui est de l'ordre de 200 $\mu$ L). Cet instrument existe au commerce, nous citons à titre d'exemple TA Instruments Nano ITC, MicrocalVP-ITC, et MicrocalITC<sub>200</sub>.

- Les méthodes de **transduction mécanique** sont principalement basées sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Comme une onde acoustique se propage au travers ou à la surface d'un matériau, un changement au niveau de la zone de passage de l'onde propagée affectera sa vitesse et/ou son amplitude. Les variations de la vitesse de l'onde, induites par une augmentation ou une diminution de masse typiquement, peuvent être suivies par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique recherchée. Les transducteurs à onde acoustique sont classifiés selon le mode de propagation de l'onde au travers ou en surface du matériau piézoélectrique. Si les ondes se propagent dans le substrat, elles sont appelées ondes «bulk» (e.g. dans le volume). Les transducteurs les plus communs utilisant ce principe de fonctionnement sont les résonateurs «thickness shear mode» (TSM), mieux connus sous le nom de microbalance à quartz (QCM), et les transducteurs «shear-horizontal acoustic plate mode» (SH-APM). Si, au contraire, les ondes se propagent à la surface du matériau, ce sont des ondes de surface. Les transducteurs couramment utilisés sont les résonateurs à onde acoustique de surface (SAW) et les ondes acoustiques de surface à cisaillement horizontal (SH-SAW). Un cas particulier de transduction par SH-SAW a servi à la détection d'immunoglobulines G en phase liquide [89]. L'ajout d'un guide d'onde aux structures permet de générer des ondes Love, on parle d'un capteur à onde de Love [90].

- Une autre famille de **capteurs nommée photométrique**, s'appuie sur les modifications des propriétés optiques engendrées par la reconnaissance moléculaire (variation de l'absorbance, de la fluorescence, de l'indice de réfraction...). Les mesures optiques par réflexion d'ondes exploitent les propriétés de l'onde évanescente<sup>7</sup>. Lors de la réflexion totale d'une onde, à l'interface de deux milieux d'indice de réfractifs différents, une onde électromagnétique évanescente se propage depuis l'interface vers le milieu d'indice de réfraction le plus faible. L'angle pour lequel l'onde évanescente est fortement augmentée appelé angle de résonance est extrêmement sensible à l'indice de réfraction des couches sur la surface du capteur. La variation de l'angle de résonance est enregistrée au cours de la mesure. On peut ainsi suivre, en temps réel, les caractéristiques intrinsèques des réactions d'affinité. Plusieurs instruments commercialisées se basent sur ce principe de mesure (Biacore, IAsys, Bio-1, GenOptics...) [91, 92]. Dans la suite, nous faisons appel à deux techniques de mesure disponibles au sein de Femto-st :

- La Résonance Plasmonique de Surface (SPR) de type photométrique (instrument commerciale).
- Le capteur à onde de Love de la famille des transducteurs massiques développé au département Temps-Fréquence.

---

6. voir capteur photométrique

7. Une onde évanescente est une onde plane dont l'intensité diminue exponentiellement avec la distance à la source.

## 4.2 Principe de la biorecognition

La détection et l'identification d'entités biologiques en utilisant des biocapteurs présentent un immense intérêt dans les domaines du diagnostique et de la médecine. La reconnaissance biomoléculaire consiste à déterminer l'identité d'une entité biologique à partir de son comportement, interaction ou non, en présence de biomolécules spécifiques de reconnaissance. Pour cela, un ou plusieurs types de biomolécules sont fixés sur la surface d'une biopuce. Les entités à identifier interagissent de manière spécifique avec les biomolécules immobilisées sur la surface formant ainsi un film fin de biomolécules. Dans la présente étude, les biomolécules immobilisées sont des anticorps, autrement appelés ligands, monoclonaux issus du clone 'A9H12' et sont référés par 'Ac'. Les biomolécules spécifiques de reconnaissance sont dans ce cas des antigènes, autrement appelés analytes, 'LAG<sub>3</sub>'<sup>8</sup> et sont référés par 'Ag'<sup>9</sup>.

## 4.3 Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur(chimique)

Dans la construction d'un biocapteur, l'immobilisation du biorécepteur sur la surface d'une biopuce est une étape cruciale. Les techniques d'immobilisation peuvent être divisées en six classes principales [23], à savoir l'adsorption physique, l'inclusion, le confinement, le couplage covalent, la réticulation et la technique Langmuir-Blodgett.

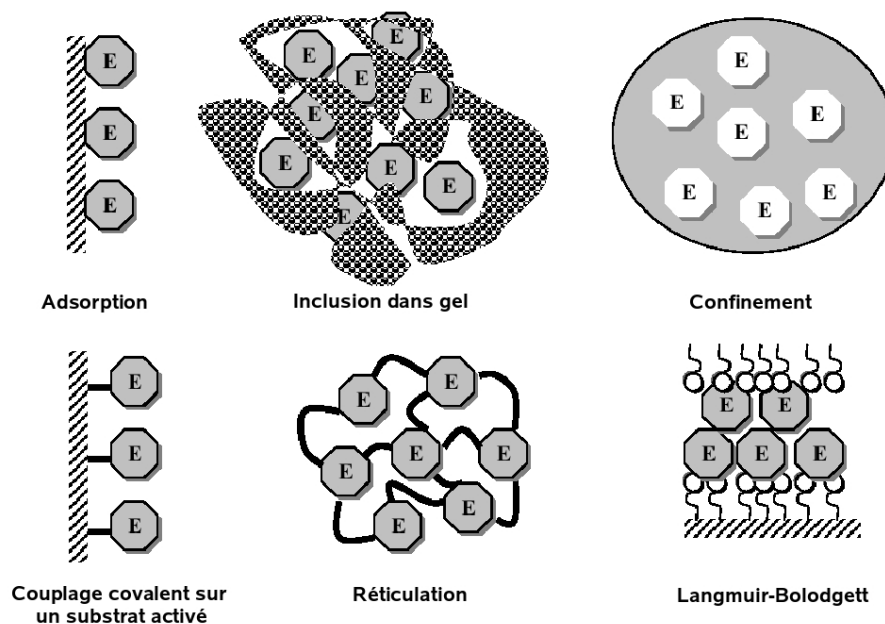


FIGURE 4.3: Méthodes d'immobilisation d'une enzyme - Extrait de [23]

Le couplage covalent est la technique d'immobilisation utilisée dans notre cas. Il conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface de la biopuce. En effet, cette technique d'immobilisation exige

8. Lymphocyte Activation Gene-3

9. A9H12 et LAG<sub>3</sub> sont courtoisement fournis Immutep SA

la présence de groupements fonctionnels complémentaires sur la surface de la puce et sur la cible. Ces groupements sont en générale de type carboxylique (-COOH), amine (-NH<sub>2</sub>), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH). Cette technique d'immobilisation permet l'obtention de couches monomoléculaires, des liaisons stables et des contraintes diffusionnelles limitées. Cependant, parmi les inconvénients du couplage covalent, nous pouvons citer la nécessité d'une surface de biopuce facilement fonctionnalisable pour obtenir finalement un grand nombre de sites actifs.

La première étape de fonctionnalisation de la puce (figure 4.4) est le greffage sur l'or de longues chaînes hydrocarbonées par l'intermédiaire de groupements thiols.

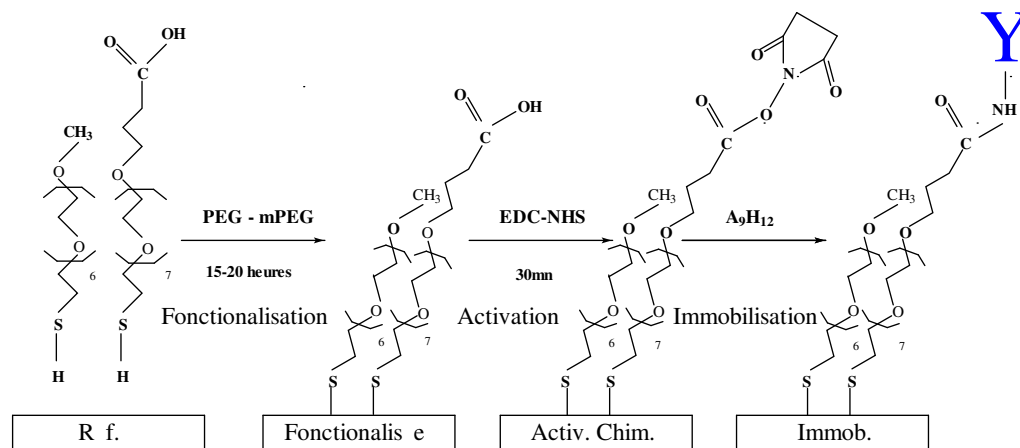


FIGURE 4.4: De la fonctionnalisation chimique à l'immobilisation des anticorps, l'anticorps est symbolisé par la lettre 'Y'

Dans cet objectif, nous utilisons un mélange de deux types de chaînes carbonées : des chaînes à 15 carbones possédant une extrémité thiol (-SH) et une extrémité méthyle (-CH<sub>3</sub>) et des chaînes à 19 carbones possédant une extrémité thiol (-SH) et une extrémité carboxyle (-COOH). Les chaînes à 19 carbones (PEG thiol<sup>10</sup>) sont utilisées, de part leur groupement carboxyle, pour l'immobilisation des anticorps. Les chaînes à 15 carbones (mPEG thiol<sup>11</sup>), possédant un groupement méthyle sont, quant à elles, utilisées en proportion plus importante afin de permettre :

- la formation d'un tapis protecteur de la surface d'or, évitant ainsi une réponse non spécifique de celle-ci (adsorption).
- l'espace des chaînes à 19 carbones, limitant ainsi l'encombrement stérique lors de l'immobilisation. Notons que les chaînes 15 carbones sont d'une longueur plus courte que les chaînes 19 carbones afin que les anticorps accèdent facilement à ces dernières.

10. PEG : PolyEthylène Glycol O-(2-mercaptoethyl)-O'-(methoxy)-hexaethylene

11. mPEG : O-(2-Carboxiethyl)-O'-(2-mercaptoethyl)-heptaethylene glycol acids

Le mélange utilisé des mPEG et PEG thiols présente une concentration de 100  $\mu\text{M}$  (7/3 par mole) dilué dans une solution acétate à 10 mM (pH 4.5). Cette étape permet la formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) d'alcanethiols à la surface de la puce à une molarité théorique de 30 %. En effet, les atomes de soufre S des thiols, instables électroniquement, s'auto-assemblent par une liaison forte avec les atomes d'or à la surface de la puce, rompant ainsi la liaison S-H. La puce d'or étant chimiquement fonctionnalisée est désormais appelée biopuce et est référée par fonctionnalisée dans la figure 4.4. Cette dernière est ensuite rincée avec de l'eau ultrapure.

La seconde étape de la fonctionnalisation est l'activation des groupes carboxyles, précédemment décrits, par l'immersion de la puce dans une solution contenant du N-hydroxysuccinimide (NHS) à 50 mM et du N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (EDC) à 400 mM pendant une demi-heure en mode statique (Biopuce référée par Act.chim.). Un dernier nettoyage clôture la fonctionnalisation et prépare la biopuce à l'étape d'immobilisation des anticorps (Biopuce référée par Immob.).

## 4.4 Optimisation du greffage par agitation acoustique

Dans la présente étude, nous nous intéressons à l'influence de l'agitation acoustique sur le greffage moléculaire. Cependant, pour mettre en évidence ce phénomène, il est primordial d'exclure toute éventualité d'une influence extérieure. En effet, le greffage pourrait dépendre d'un certain nombre de paramètres à savoir la température, la viscosité, la concentration en anticorps, le volume... Ainsi, nous nous proposons d'étudier le degré de dépendance du greffage à ces différentes variables. Pour cela, des expériences préliminaires ont été réalisées par simple dépôt de microgouttes contenant des anticorps directement sur la surface de la biopuce. Après une certaine durée d'incubation, la biopuce immobilisée est rincée. Puis elle est introduite dans le biocapteur SPR pour caractériser les réponses antigéniques des spots.

L'objectif de ces expériences est, d'une part, d'étudier les paramètres agissant sur l'immobilisation et d'autre part, déterminer les conditions adéquates pour faire ressortir l'influence de l'agitation acoustique. Nous commencerons, tout d'abord, par un bref descriptif de la méthode de caractérisation employée : SPR.

### 4.4.1 Principe de la mesure SPR

La Résonance Plasmonique de Surface (SPR) est une technique optique exploitant les ondes électromagnétiques de surface pour sonder les variations de masse, d'indice et d'épaisseur survenant à l'interface entre un métal et un diélectrique (figure 4.5(a)). Ledit métal est une fine couche d'or couvrant la surface d'une lame de verre, alors que le diélectrique est le liquide circulant dans la cartouche fluidique et contenant les molécules d'intérêt [24].

La technique SPR permet de suivre en temps réel, sans marquage, toutes sortes d'interactions se déroulant sur une surface métallique. Dans notre cas, elle permet de suivre l'interaction des antigènes contenus dans la solution avec les anticorps précédemment immobilisés sur la couche métallique. Pour cela, la fenêtre de la biopuce visible par SPR est subdivisée en des Régions d'Intérêt 'ROI' (zones circulaires de la

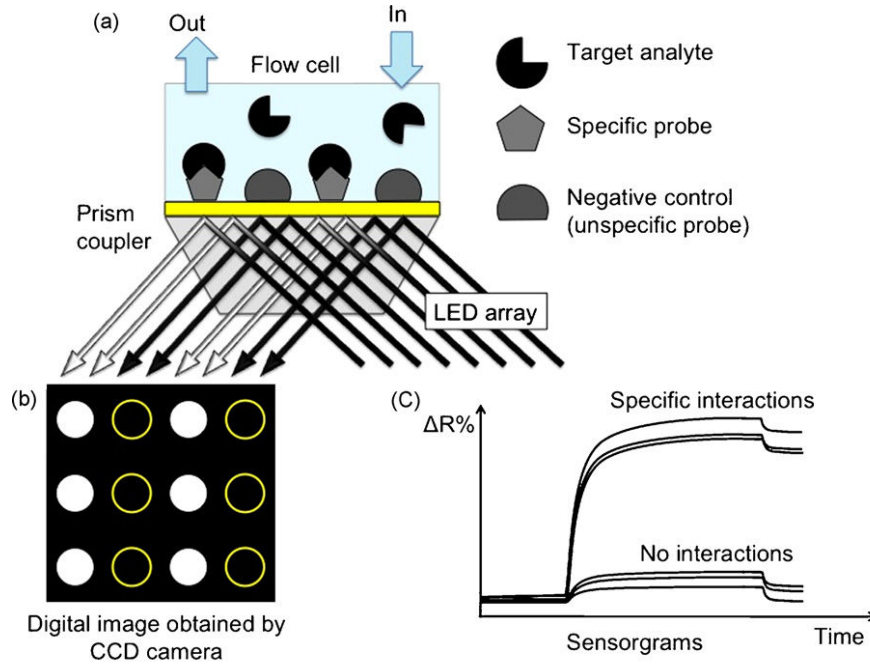


FIGURE 4.5: Principe de la SPR - Extrait de [24]

figure 4.5(b)). Ainsi, nous obtenons au nombre de ROI des sensorgrammes caractérisant les réactions surfaciques au niveau de ces zones d'intérêt.

Le sensorgramme de la figure 4.5(c) présente une réponse typique mesurée en pourcentage de réflectivité (%R) en fonction du temps. Il montre la progression en temps réel des interactions au niveau de 6 ROI. La lecture d'un sensorgramme fournit de nombreuses informations sur l'échantillon en terme de spécificité, de cinétique, d'affinité et de concentration. L'exemple de sensorgramme donnée par la figure 4.6 présente l'interaction typique entre deux molécules spécifiques : la première (représentée en rouge), correspond à l'anticorps fixé lors d'une étape antérieure, et la seconde (représentée en bleu) à l'antigène qui va se lier de façon spécifique à l'anticorps.

La **ligne de base** traduit le passage de tampon de course sur la surface immobilisée en anticorps. L'indice optique du tampon de course permet de fixer la ligne de base à une valeur de résonance constante. Lorsque cet indice varie, comme lors de l'**injection de l'analyte** (ou antigène) en solution, le signal de résonance est instantanément modifié avant de transcrire l'étape d'**association** de l'analyte au ligand. Lorsque la réaction antigénique atteint un état d'équilibre ( $A_c + A_g \rightleftharpoons A_c A_g$ ), le signal de résonance devient un plateau. A la **fin de l'injection** de la solution antigénique, c'est-à-dire lorsque le flux d'analytes est remplacé par un flux de tampon, on assiste à une modification immédiate de l'indice de réfraction, donc à un saut dans le sensorgramme de même amplitude que celui constaté au début de l'injection. Quand le tampon de course passe à flux constant à la surface de la puce, le signal diminue (certains complexes **se dissocient**) jusqu'à atteindre un plateau. Notons que la réaction de dissociation existait à l'étape même de l'association mais était dominée par celle-ci. Il est possible de **régénérer** totalement la surface d'anticorps par une injection de solution de régénération qui rompt les complexes anticorps/antigène.

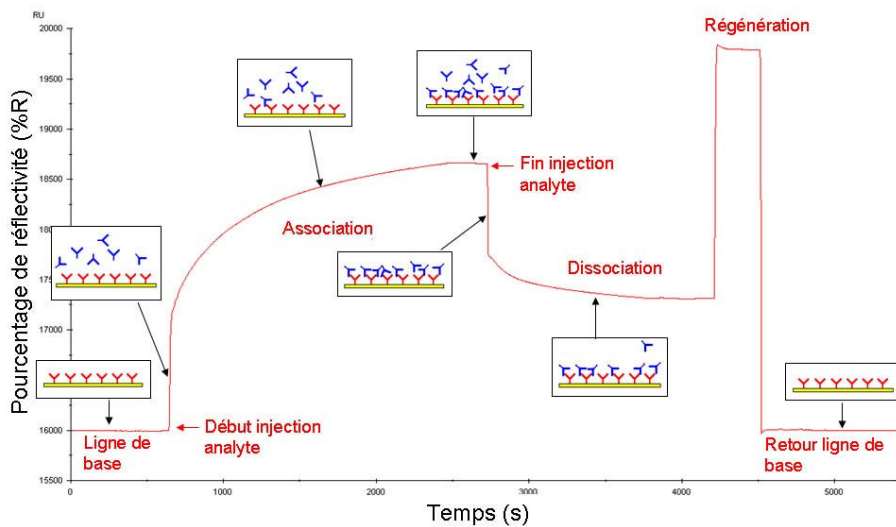


FIGURE 4.6: Explication du sensorgramme de la réaction Ac-Ag (source Biacore AB)

L'injection de cette solution est détectable au niveau du sensorgramme par une pente brutale caractérisant le saut d'indice dû à la modification de l'indice optique de la solution à la surface de la puce. A la suite de la régénération, le signal revient à la ligne de base correspondant à une monocouche d'anticorps au contact du tampon de course. Il est, ensuite, possible de recommencer un nouveau cycle sous réserve d'une régénération satisfaisante.

#### 4.4.2 Sensibilité du greffage à divers paramètres

L'anticorps possède une structure protéique sensible à la dénaturation sous l'action de la température, du pH ou par simple vieillissement. Il perd donc petit à petit sa propriété de biorecognition. Ayant comme objectif d'améliorer l'immobilisation des anticorps par le biais de champs acoustique, nous étudions tout d'abord l'influence de divers paramètres afin de trouver, d'une part, les conditions optimales pour nos expériences, et prouver d'autre part qu'une légère variation de certains paramètres n'influencera pas nos résultats.

##### 4.4.2.1 Influence du pH

L'immobilisation des anticorps dépend étroitement du pH. D'une part, la surface à immobiliser est chargée négativement. D'autre part, la charge de la protéine évolue en fonction du pH de la solution : si le pH est supérieur à  $pI^{12}$  alors l'anticorps est chargé positivement (phénomène d'attraction). Dans le cas contraire, il est chargé négativement (phénomène de répulsion). Afin de choisir un pH qui encouragerait

12.  $pI$  : point isoélectrique correspondant à une protéine à pH neutre

cet événement, nous immobilisons des spots par le biais d'une matrice de gouttes porteuses à des pH différents. La figure 4.7 montre la réponse antigénique de spots immobilisés. Le meilleur résultat est obtenu pour un tampon acétate (10mM) à pH acide de 5,2. Ce tampon est retenu pour la présente étude et sera utilisé pour le reste des expériences sauf indication contraire.

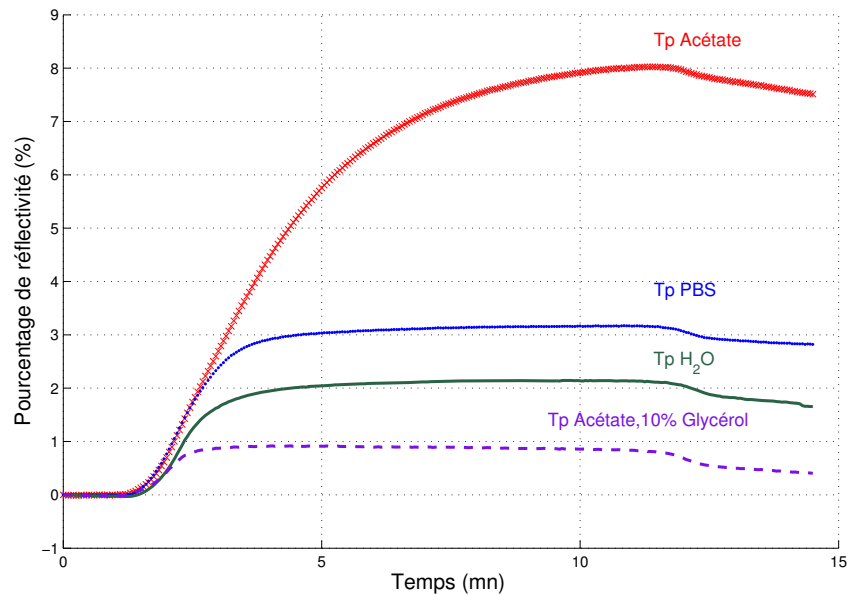


FIGURE 4.7: Sensorgramme des réactions antigéniques de spots immobilisés avec des solutions tampons de pH différents

#### 4.4.2.2 Variation de la concentration en anticorps

Afin d'étudier l'influence de la concentration en anticorps sur la quantité réellement greffée de ces molécules, nous déposons des gouttes mères à des concentrations variant de  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  à  $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La réponse antigénique de la biopuce immobilisée est ensuite étudiée. Nous observons une réponse d'autant meilleure que la concentration en anticorps est plus importante. Néanmoins, la dynamique de la réponse ne semble pas être affectée (figure 4.8). Le graphe 4.9 trace la variation de réflectivité en fonction de la concentration. Cette variation semble linéaire à partir d'une concentration de l'ordre de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  avec un coefficient directeur de  $1,7\%$  par  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Bien que le greffage est sensible à la concentration en anticorps de la solution mère, cette variable ne peut augmenter la densité finale de la couche d'anticorps que d'un coefficient de 1,7. De plus, "jouer" sur ce paramètre revient cher étant donné la prix des biomolécules.



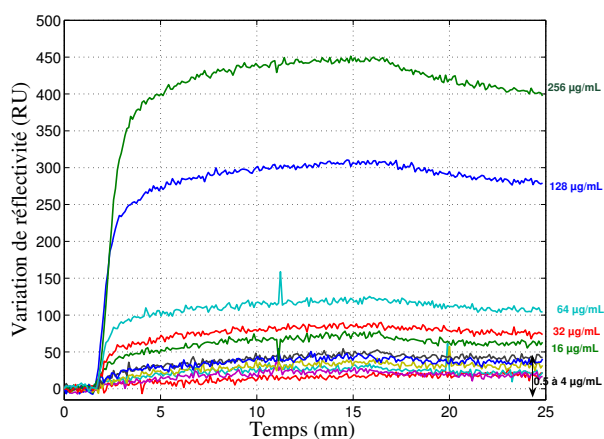


FIGURE 4.8: Variation de réflectivité pour différentes concentrations en anticorps en fonction du temps.

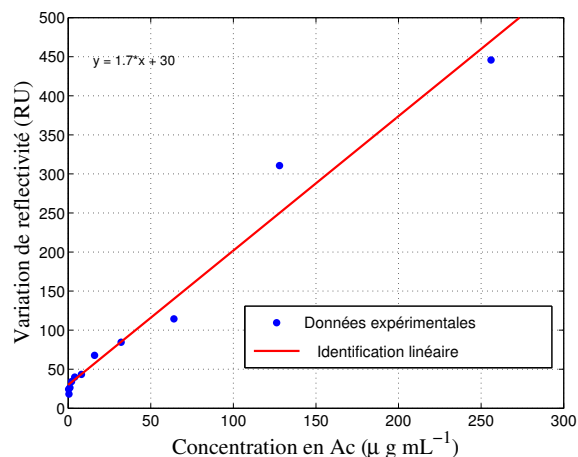


FIGURE 4.9: Niveau de réponse des spots immobilisés en fonction de la concentration des gouttes mères.

#### 4.4.2.3 Variation de la viscosité

La création d'une matrice de spots en surface ouverte s'effectue par simple dépôt d'une matrice de gouttes contenant les anticorps sur la surface fonctionnalisée de la biopuce. Le temps total de contact est appelé temps d'incubation. Il est généralement de l'ordre d'une heure. La taille des gouttes, quant à elle, varie de quelques nanolitres à quelques centaines de nanolitres. Le phénomène d'évaporation dans un tel volume n'étant pas négligeable, une quantité de glycérol est généralement introduite afin de préserver la goutte. Le sensorgramme de la figure 4.10 présente la réponse antigénique de spots immobilisés avec des solutions porteuses d'anticorps à des concentrations en glycérol différentes (concentration en %, volume du glycérol introduit par volume totale). Le taux d'anticorps greffé est globalement trois fois plus faible en présence de glycérol qu'en son absence. Cependant, sans glycérol cette supériorité s'accompagne d'une augmentation de la détection non spécifique dans le cas de solutions biologiques complexes (plasma, sérum, sang...). D'autre part, le greffage semble insensible à la variation de la quantité de glycérol introduite (entre 5 à 20%). Par conséquent, nous pouvons garantir qu'une faible variation de glycérol d'une goutte à l'autre ou d'une expérience à l'autre n'influence point les résultats.

#### 4.4.2.4 Influence de la température

D'une façon générale, une élévation de la température augmente l'activité catalytique, donc la vitesse de la réaction. En effet, la température agit favorablement au niveau de la diffusion des espèces chimiques dans la couche active, ce qui améliore le temps de réponse. Toutefois, ceci peut s'accompagner d'une dénaturation thermique si la température est supérieure à 40° C. La question devient alors lequel des deux phénomènes est plus dominant. La figure 4.11 présente le sensorgramme de l'immobilisation des anticorps à différentes températures (19°, 21°, 23°, 25°).

Nous observons une détérioration de la réponse en fonction de l'augmentation de la température. Il semble que l'hypothèse de la dénaturation des anticorps en fonction de l'augmentation de la température est infirmée. Généralement, il convient de contrôler ou de corriger les effets de température afin d'as-

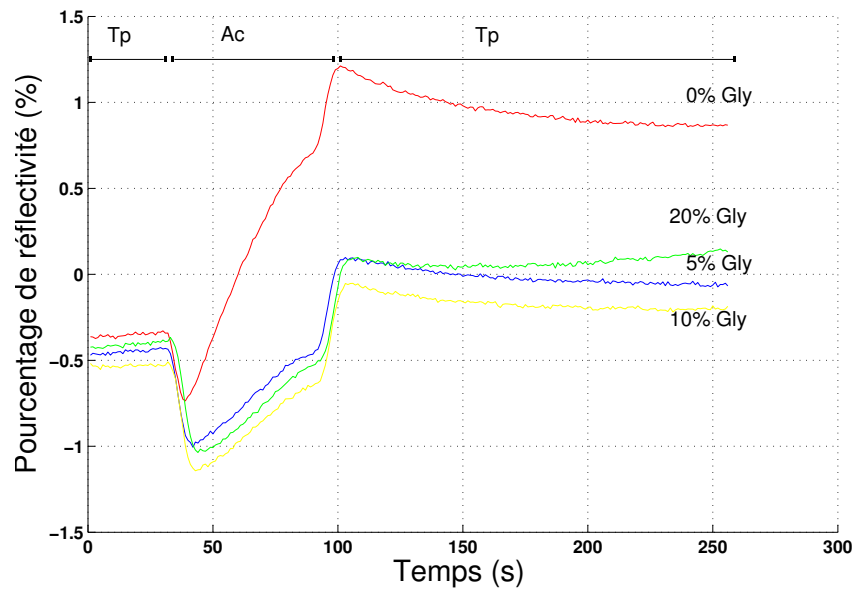


FIGURE 4.10: Sensorgramme : Réponses antigéniques des spots immobilisés pour différentes concentrations en glycérol de la solution porteuse d'anticorps.

sur des mesures fiables. Dans le cadre de notre étude, nous veillerons sur la minimisation de l'effet thermique.

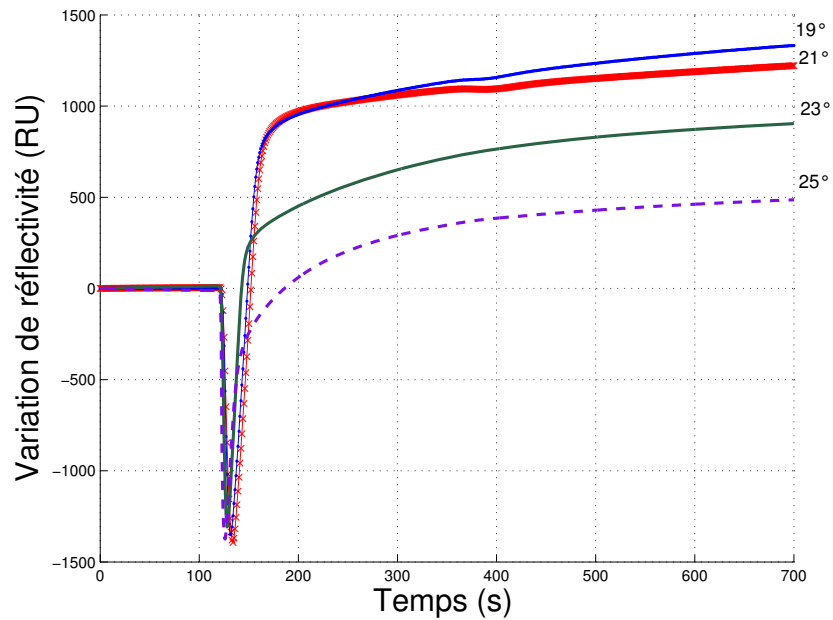


FIGURE 4.11: Variation de réflectivité pour différentes valeurs de la température en fonction du temps.

#### 4.4.2.5 Variation du temps d'incubation

L'immobilisation n'étant qu'une étape dans le process, le temps d'incubation de la solution d'anticorps est généralement pris égale à une heure. Dans notre cas, nous voulons mettre en évidence l'influence du mélange acoustique sur la quantité d'anticorps immobilisée. C'est pourquoi, le temps d'incubation doit être judicieusement choisi. En effet, ce dernier devrait être assez court pour éviter la saturation de la surface afin d'investiguer l'effet du champs acoustique et assez long pour un minimum de réactivité en mode passif et donc la possibilité de comparer avec le mode actif. Les sensorgrammes de la figure 4.12 présentent les réactions antigéniques d'une série de spots d'anticorps immobilisés avec des temps d'incubation différents (10 mn, 30 mn, 1 h, 2 h). Ainsi, nous remarquons que la variation du temps d'incubation n'influence pas la réponse. Une incubation de 10 mn semble une durée suffisante.

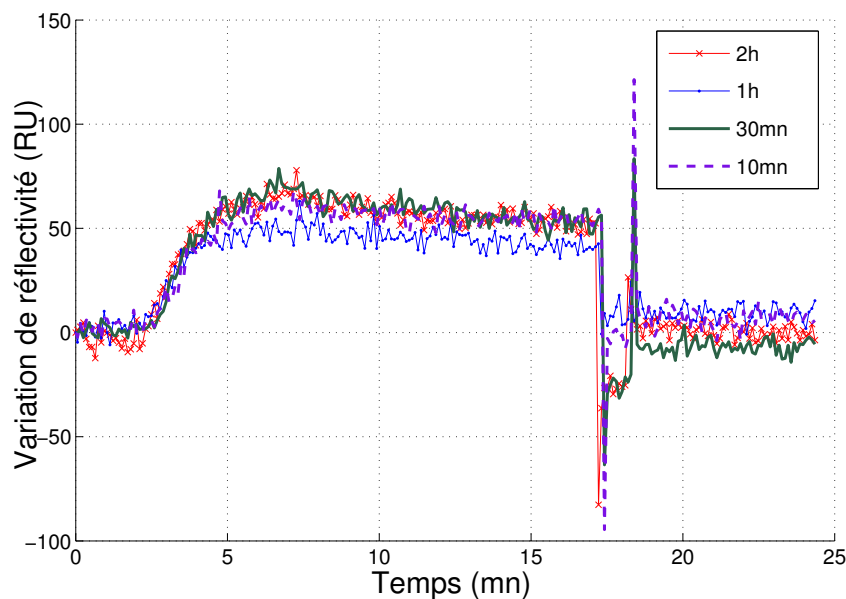


FIGURE 4.12: Sensorgramme des réponses antigéniques de spots immobilisés avec différents temps d'incubation

#### 4.4.2.6 Récapitulatif

Nous avons montré expérimentalement qu'un pH de 5,2 favorise la fixation des anticorps sur la surface de la biopuce et qu'un temps d'incubation de 10 mn est suffisant pour cet événement. Par conséquent, nous adoptons pour la suite des expériences, sauf indication contraire, une solution d'acétate pour diluer les anticorps (pH 5,2) et une durée d'incubation légèrement supérieure au temps d'incubation minimum de 15 mn. L'événement d'évaporation n'étant pas négligeable, nous sommes contraint d'introduire une quantité de glycérol afin de préserver les gouttes. Quoique la présence de glycérol dans la solution nuit au greffage moléculaire à la surface de la puce, la variation de la quantité introduite n'influence pas l'événement biologique. C'est pourquoi, nous nous proposons de travailler à 20 % de glycérol, ce qui correspond à une viscosité de l'ordre 1,76 centipoises/mPa.s (voir annexe B). L'immobilisation est sans doute dépendante de la concentration en anticorps de la solution mère. Cependant, jouer sur ce paramètre

est coûteux. Nous devons donc rechercher une autre technique capable d'optimiser le greffage moléculaire à moindre coût. Dans la présente étude, nous proposons une technique qui permet de rompre l'état d'équilibre dans la goutte mère afin d'accroître l'apport en anticorps à la surface de la biopuce et, par conséquent, augmenter la probabilité d'accroche des ces entités. En effet, il est légitime de penser que les biomolécules immobilisées passivement sont celles situées sur la surface extérieure de la microgoutte. Ce phénomène limitera par sa présence le nombre de biomolécules immobilisées. Pour maximiser ce nombre, nous avons pensé à activer le mélange interne à la microgoutte par champ acoustique (figure 4.13). L'objectif de l'intervention acoustique est de maximiser le taux de transfert de biomolécules à la surface de la biopuce et diminuer le temps nécessaire à la réaction. Cela permettra, dans un second temps, de diminuer les concentrations en anticorps des solutions mères sans nuire au taux d'immobilisation. Afin de mettre en évidence l'apport de l'énergie acoustique dans le greffage des anticorps, nous adoptons pour la suite des expériences une concentration de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , assez faible pour éviter la saturation de la surface et assez importante pour un minimum de réactivité en mode passif afin de permettre une étude comparative entre les deux modes.

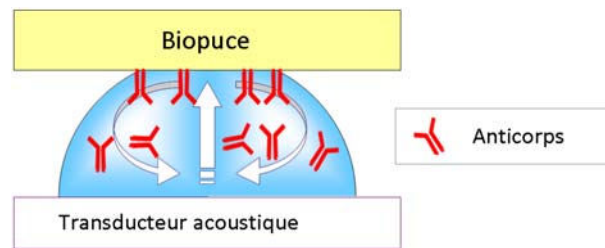


FIGURE 4.13: Activation du mélange interne à la microgoutte par le biais du transducteur acoustique.

#### 4.4.3 Etape d'immobilisation, conditions expérimentales

Afin de mettre en contact la biopuce avec le transducteur acoustique (transducteur matriciel détaillé dans le chapitre 2), nous avons développé un système d'alignement. D'une part, un stylo ventouse solidaire à un positionneur micrométrique permet le positionnement de la biopuce suivant les trois axes  $x$ ,  $y$  et  $z$ . D'autre part, le transducteur matriciel est fixé sur un support dont la planéité est réglable *via* deux degrés de liberté angulaires (figure 4.14).

Les premiers essais suivant cette disposition ont révélé un problème de planéité. En effet, uniquement 75 % des gouttes rentraient en contact avec la biopuce. Afin de surmonter cette difficulté, nous avons tout d'abord déterminé expérimentalement une distance optimale entre le transducteur et la biopuce afin de garantir un contact de cette dernière biopuce avec toutes les gouttes déposées manuellement. Cette distance est estimée à  $160 \mu\text{m}$  (voir paragraphe 2.2.2.3). Par conséquent, nous avons réalisé un cadre de  $160 \mu\text{m}$  d'épaisseur afin qu'il soit placé sur le transducteur pour fixer définitivement la distance qui le sépare de la biopuce. Ainsi, la biopuce est judicieusement positionnée sur le cadre en utilisant la commande micrométrique.

Pour immobiliser les anticorps sur la surface de la biopuce, une matrice de gouttes porteuses est tout d'abord déposée sur la membrane du transducteur acoustique. Ensuite, la biopuce est précisément po-

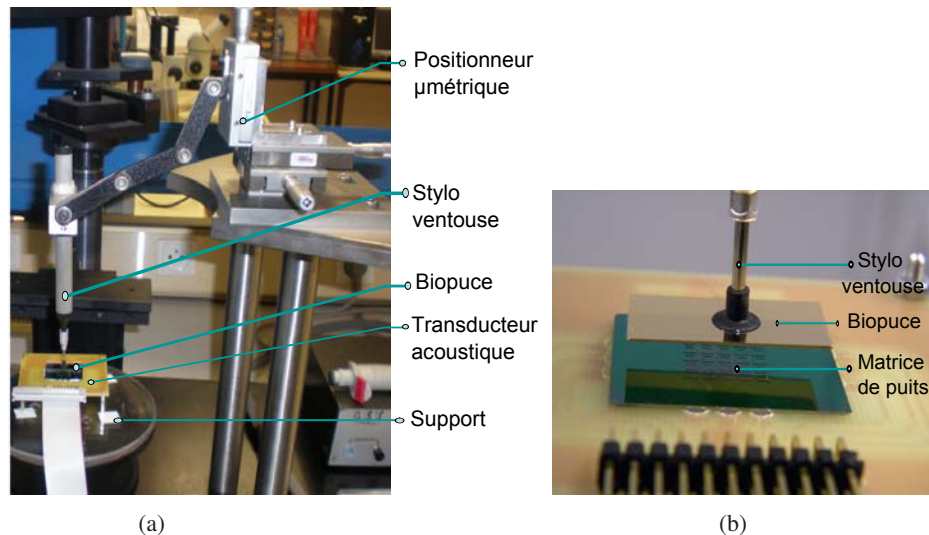


FIGURE 4.14: Système de mise en contact et d'alignement de la biopuce avec le transducteur acoustique. (a) Système global (b) zoom sur le contact biopuce-transducteur.

sitionnée sur le cadre délimitant la matrice. Ainsi se créent autant de spots sur la surface de la biopuce que de gouttes déposées. Suivant que le transducteur soit alimenté ou pas, nous obtenons deux types de biopuces :

- *Biopuce acoustiquement immobilisée* : durant l'immobilisation, la matrice de gouttes est agitée par le biais du transducteur. Cette méthode est décrite comme étant active.
- *Biopuce passivement immobilisée* : elle est également référée par biopuce standard. Le transducteur acoustique n'est pas excité, il est utilisé uniquement comme support.

Notons à ce stade, que dans le cas passif, nous avons fait appel au transducteur uniquement comme support de la matrice de gouttes. Le but est de respecter dans les deux cas de figure les mêmes conditions expérimentales afin d'établir une étude comparative. Dans le cas actif, le transducteur est excité au mode fondamental correspondant à une fréquence de résonance de 18,74 kHz sous une tension de 18 V crête. La figure 4.15 montre l'impédance du transducteur autour de la fréquence de résonance. La figure 4.16 présente la réponse électrique de l'électrode de contrôle<sup>13</sup> suite à l'excitation du transducteur en fonction du temps. Cette information permet de retrouver le même point de fonctionnement du transducteur (la même amplitude vibratoire) pour les différentes expériences réalisées.

Quelque soit le mode d'immobilisation, passif ou actif, après un temps d'incubation de 15 mn la biopuce est rincée à l'eau ultrapure. Ensuite, une étape de passivation de la surface par incubation dans un bain d'agent bloquant (RSA : Rat Serum Albumin) ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) est entreprise. Après une seconde étape de rinçage à l'eau ultrapure, une solution d'éthanolamine (1M) permet de désactiver la surface. La désactivation permet d'éviter le greffage des antigènes sur des fonctions EDC/NHS restant libre. La biopuce est donc prête à une caractérisation de sa réponse antigénique. Pour cela, elle est intégrée dans l'instrument de mesure SPRi (SPRi-Plex de la société GenOptics) afin d'observer en temps réel l'évolution de la réaction anticorps-antigène (Ac-Ag).

13. définie dans le chapitre 2

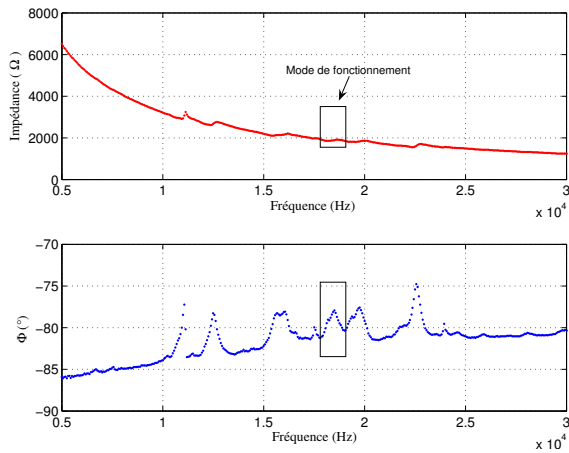


FIGURE 4.15: Analyse d'impédance du transducteur acoustique autour de la fréquence de fonctionnement,  $f_{res} = 18.74kHz$

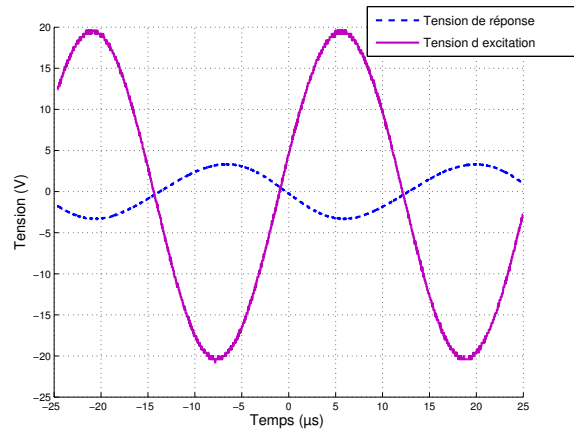


FIGURE 4.16: Tension d'excitation du transducteur et la tension de réponse de l'électrode témoin

#### 4.4.4 Caractérisation SPRI de l'apport acoustique au greffage

##### 4.4.4.1 Calcul de la variation de réflectivité $\Delta R$

L'instrumentation SPR permet de suivre l'évolution réactionnelle à la surface d'intérêt de la puce. Pour cela, une définition du cadre de lecture est établie au travers d'une matrice de 16 x 16 régions d'intérêts (Region Of Interest 'ROI'), ainsi, sans à priori, l'ensemble de la fenêtre sera analysée. Un ROI correspond à une zone d'analyse fournissant une courbe d'interaction (figure 4.6). Le sensorgramme de la figure 4.17 transcrit uniquement l'étape d'immobilisation. Les points de 1 à 4 permettent de calculer la variation du pourcentage de réflectivité due au greffage de molécules. En chaque point  $i$ , le pourcentage de réflectivité et le temps seront référés respectivement par  $R_i$  et  $t_i$ . La réponse spécifique d'un ROI est calculée comme étant la variation du pourcentage de réflectivité donnée par  $\Delta R = R_4 - R_3$ . Afin de prendre en compte une éventuelle dérive de la ligne de base, l'équation précédente est corrigée comme suit  $\Delta R = R_4 - R_3 - \epsilon_{rr} \cdot (t_4 - t_3)$  où  $\epsilon_{rr}$  est le gradient en régime transitoire ( $\epsilon_{rr} = \frac{R_2 - R_1}{t_2 - t_1}$ ).

La grandeur obtenue est corrélée à la variation de masse observée par le ROI en question. Par conséquent, elle évalue la réaction LAG3 - A9H12 en cet emplacement précis. A partir de ce résultat, nous estimons, en une seconde approximation, la quantité d'anticorps A9H12 préalablement immobilisée.

##### 4.4.4.2 Méthode de calcul de la densité surfacique en antigènes

Afin de pouvoir quantifier une interaction biomoléculaire, il est important de pouvoir passer de la grandeur optique mesurée  $\Delta R$  à une grandeur biologique caractéristique de cette interaction. Cela constitue l'opération inverse de la transduction effectuée par le biocapteur SPR qui avait transformé la grandeur d'intérêt (biologique) en grandeur mesurable (optique). Les variations de réflectivité mesurées étant liées aux variations d'indice de réfraction, elles sont images des changements de concentrations surfaciques. Nous allons tout naturellement convertir ces variations en quantité de matière déposée par unité de surface sur le transducteur. Cette grandeur est appelée taux de recouvrement surfacique ( $\Gamma$ ). La conversion

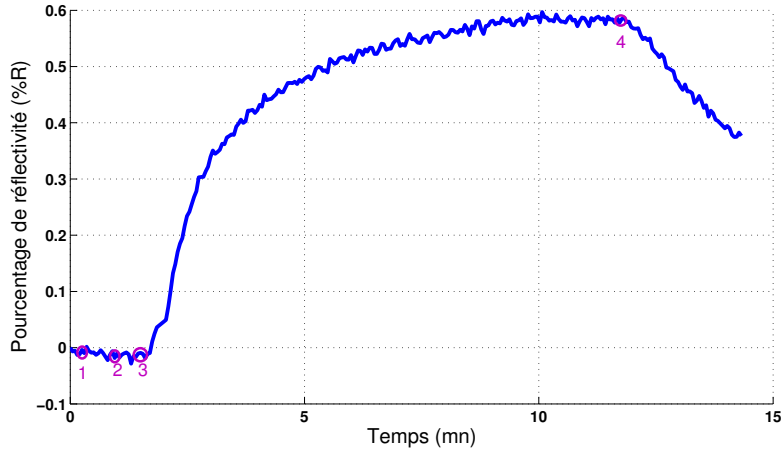


FIGURE 4.17: Sensorgramme de la réaction antigénique, points de mesure pour l'estimation de la densité de surface

des variations de réflectivité en taux de recouvrement peut s'exprimer sous une forme assez complexe si nous appliquons rigoureusement les équations de Maxwell mais, Stenberg et al. [93] ont montré, par des simulations sans approximations basées sur ces équations de Maxwell que la réponse SPR varie de manière quasi-linéaire avec la concentration surfacique de protéines adsorbées et l'ont confirmé par des expériences avec des marqueurs radioactifs. Nous allons donc nous placer dans le régime où la réponse du capteur varie linéairement avec  $\Gamma$ . Cette approximation n'est valable que dans le cas où l'épaisseur de la couche formée ' $e_b$ ' est très petite devant la longueur de pénétration de l'onde évanescente ' $L_{zc}$ ' dans le milieu couvrant ( $e_b \ll L_{zc} \gg 200nm$ ) soit pour des épaisseurs de l'ordre du nanomètre. Dans notre cas, les antigènes forment une monocouche dont l'épaisseur est de l'ordre de la longueur de l'antigène donc de l'ordre de quelques nanomètres. Le taux de recouvrement surfacique est liée à la variation de réflectivité par l'équation (4.1) [94].

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{ZC}}{S_{P,R} \cdot \delta n / \delta C} \quad (4.1)$$

Avec  $\delta n / \delta C$  : incrément d'indice de la molécule étudiée ; et  $S_{P,R}$  : *Sensibilit<sub>Prisme,Rflctivi</sub>*.  
 Dans notre cas de figure,  $L_{ZC} = 1,75 \cdot 10^{-4}$  mm,  $\delta n / \delta C = 1,9 \cdot 10^{-10}$  and  $S_{P,R} = 5,10^3$  [94].

Il en suit :

$$\Gamma (pg/mm^2) = 184,21 \cdot \Delta R (\%) \quad (4.2)$$

#### 4.4.4.3 Influence de l'agitation sur la réponse antigénique de la biopuce

Afin de mettre en évidence l'importance de l'agitation acoustique des gouttes durant l'étape d'immobilisation des anticorps, le dispositif expérimental est reproduit sur différentes puces SPR identiques avec et sans agitation acoustique. Les expériences ont été réalisées de façon rigoureusement identique. En effet, les substrats SPRi, biopuces adaptées à l'appareil SPRi, utilisés sont équivalents. De plus, nous

avons utilisé le même dispositif de positionnement et le même transducteur matriciel. Les conditions opératoires sont également identiques (une durée d'incubation de 15 mn à température ambiante). Seule la mise en oeuvre du phénomène d'agitation acoustique durant l'immobilisation diffère les puces dites activement immobilisées de leurs homologues dites passivement réalisées. Des conditions expérimentales identiques étant respectées dans les deux cas, nous avons procédé identiquement pour l'analyse de chaque puce réalisée.

En effet, après l'étape d'immobilisation de 5 zones en anticorps (*via* 5 gouttes porteuses d'anticorps, voir figure 4.18), effectuée soit en mode passif soit en mode actif, nous procédons à l'insertion de la biopuce en question au sein de l'instrumentation SPRi.

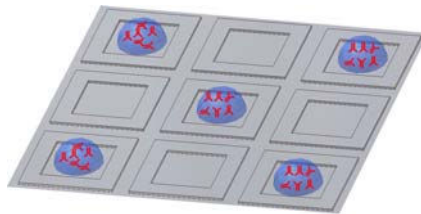


FIGURE 4.18: Positions des gouttes sur la membrane du transducteur.

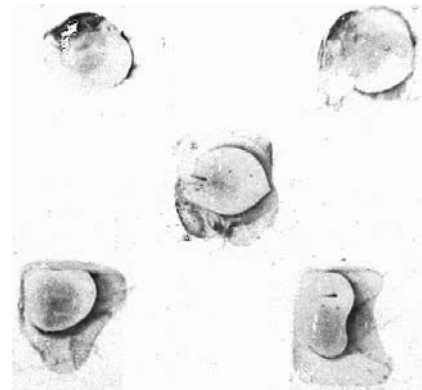


FIGURE 4.19: Image SPRi en contraste de phase de la biopuce activement immobilisée, inversion des nuances Noir/Blanc pour faciliter l'impression

Tout d'abord, nous observons une image SPRi de la zone d'intérêt en contraste de phase. La figure 4.19 présente un exemple des images enregistrées. Nous retrouvons les 5 zones immobilisées. Cependant, cette image n'est pas exploitable quantitativement. Pour cela, une définition du cadre de lecture est établie au travers d'une matrice 16 x 16 ROIs de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre (1 ROI = 1 courbe d'interaction). Ainsi, une reconstitution spatiale des niveaux de réponse de la puce à l'injection de solutions antigéniques peut être réalisée. Dans l'exemple ci-dessous, nous avons testé et approuvé en triplicata des spots obtenus à partir de gouttes mères de 400 nl de volume à une concentration d'anticorps de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Trois cycles injection/régénération sont réalisés successivement afin de vérifier le caractère fonctionnel des immunopuces à l'injection de solutions antigéniques. La figure 4.20 est une illustration du niveau de réponse atteint pour un spot exemple, aux différentes injections de solutions antigéniques (100 nM, 100 nM et 250 nM). Cette réponse classique prouve que l'activation acoustique n'a pas détérioré ou changé la fonctionnalité de la couche d'anticorps. Notons qu'à ce stade là, la régénération s'effectue correctement avant chaque nouvelle injection antigénique.

La figure 4.21 montre que la réponse d'un ROI relevé sur un spot acoustiquement immobilisé (référé par 'Spot B') est 2,64 fois plus importante que celle de son homologue d'un spot passivement immobilisé (référé par 'Spot A'). Nous comparons également ces données aux réponses des ROI de référence (référés 'Ref.') relatifs à chaque puce. Ces références correspondent à des ROI pris à l'extérieur des spots. Cette présentation met en évidence la qualité de la mesure. En effet, le signal de référence ayant la



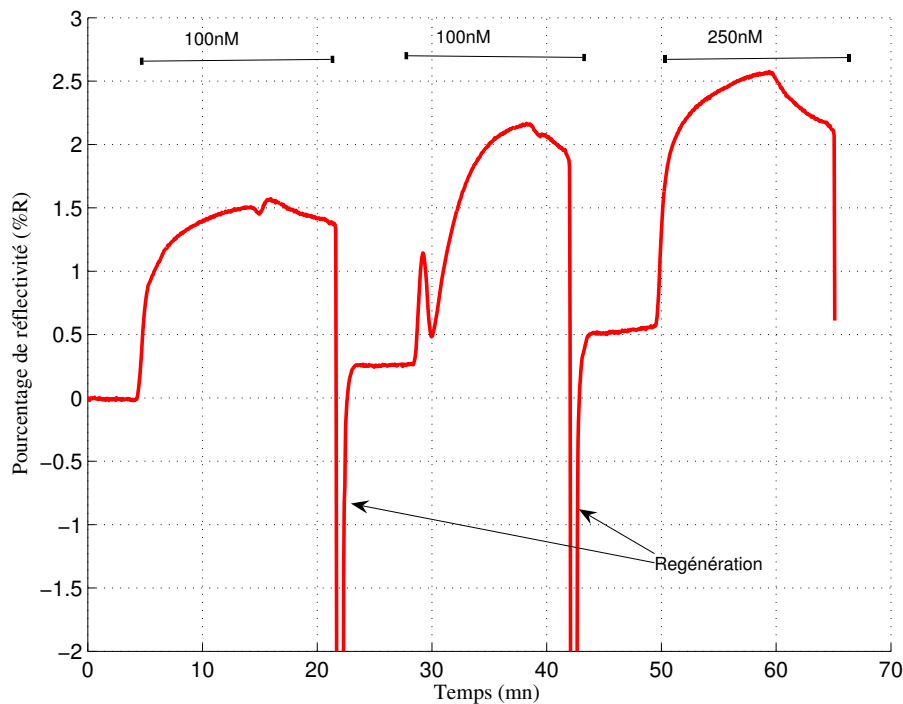


FIGURE 4.20: Réponse d'un ROI immobilisée acoustiquement à différentes solutions antigéniques (100 nM, 100 nM puis 250 nM).

même amplitude dans les deux cas, le rapport signal sur bruit est largement amélioré grâce à l'agitation acoustique.

Rappelons que 256 courbes par puce sont enregistrées correspondant à 256 ROIs fictifs déterminés dans la fenêtre d'analyse SPRi. Ces données permettent de tracer la topographie de la quantité d'anticorps immobilisée en calculant pour chaque ROI la variation du pourcentage de réflectivité ( $\Delta R$ ). Les représentations 2D et 3D de l'ensemble des courbes enregistrées sont présentés dans la figure 4.22. Pour les biopuces standard et activée, nous notons cinq régions distinctes qui correspondent aux zones de contact entre les gouttes porteuses et la surface chimiquement activée. Dans les deux cas, la période de contact (ou temps d'incubation) était assez longue pour garantir la greffe significative d'A9H12 mais assez importante pour atteindre la saturation de la surface en anticorps en mode passif. Nous pouvons observer les variations de réflectivité dues à la capture de LAG-3 pour la biopuce activée sont 2,5 à 3 fois plus haute que pour la biopuce standard. En réponse à une solution antigénique de 100 nM, la variation moyenne du pourcentage de réflectivité dans le cas d'une biopuce acoustiquement activée est d'environ  $1,64 \pm 0,17 \%$  contre  $0,64 \pm 0,26 \%$  dans le cas d'une biopuce standard. Utilisant l'équation (4.2), nous retrouvons la densité antigénique respective à chaque cas. Le niveau de capture des antigènes est d'environ  $410 \pm 42,5 \text{ pg/mm}^2$  dans le cas actif contre  $160 \pm 65 \text{ pg/mm}^2$  pour une biopuce standard.

En plus du gain en réponse antigéniques, l'utilisation du dispositif acoustique améliore l'homogénéité des réponses globales des biopuces résultantes. La figure 4.23 présente un Coefficient de Variation (CV) de l'ordre de 0,2 pour des couches acoustiquement immobilisées alors qu'il est de 0,8 dans le cas standard. La réduction du Coefficient de Variation peut être interprétée comme une amélioration de la

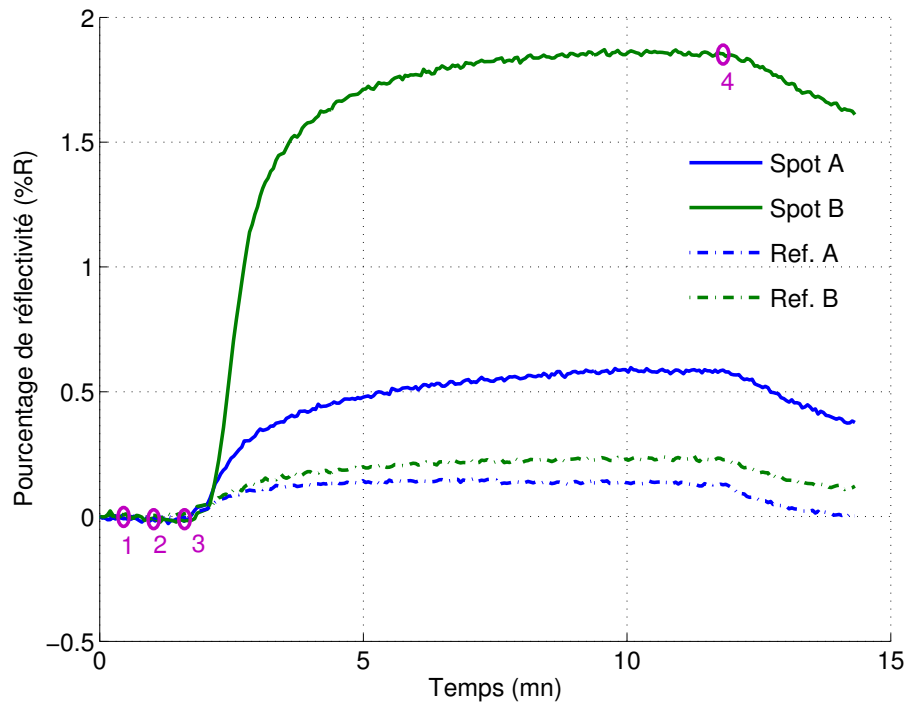


FIGURE 4.21: Réponses de deux spots (courbes continues) immobilisés sans agitation acoustique (A) et avec agitation acoustique (B) et de leurs références respectives (courbes discontinues) à l'injection d'une solution antigénique (250 nM).

reproductibilité du greffage en comparaison avec le mode standard. La perturbation de l'état d'équilibre dans la goutte durant le greffage a pu mener à une immobilisation plus reproductible des anticorps sur la surface de la biopuce. En outre, des petites hétérogénéités topographiques et chimiques sur la surface de la biopuce ont pu être réduites, devenant moins limitatives pour le transfert des anticorps.

#### 4.4.4.4 Estimation de la densité surfacique en anticorps

Pour ce couple anticorps/antigène  $A_9H_{12}/LAG_3$ , nous avons précédemment établi dans des expériences SPR précédentes, en fluide continu (données non présentées) que le niveau de saturation se produit, dans les mêmes conditions expérimentales, à un rapport molaire de 1/1 (1 antigène pour 1 anticorps). Cette observation se traduit par l'occupation de 50 % des sites de liaisons des anticorps (chaque anticorps possède deux sites de liaisons). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que la densité moyenne des anticorps est égale à celle des antigènes, soit  $410 \text{ pg/mm}^2$  en mode actif contre  $160 \text{ pg/mm}^2$  en mode passif. En se basant sur cette évaluation indirecte de la densité en anticorps, nous déduisons que l'immobilisation des anticorps est plus efficace sous agitation acoustique que dans des conditions de spotting standard. Nous rappelons que cette démonstration a été effectuée pour :

- une concentration en anticorps des gouttes mères relativement basse ( $100 \mu\text{g.mL}$ )
- une courte durée d'incubation (15 mn).

Cependant, cette démarche reste critiquable du moment qu'elle repose sur une hypothèse observée en microfluidique continue mais reste non vérifiable, en mode spotting, par une mesure directe. En outre, toutes les caractérisations SPRi sont réalisées sur la biopuce préalablement immobilisée. Par conséquent,

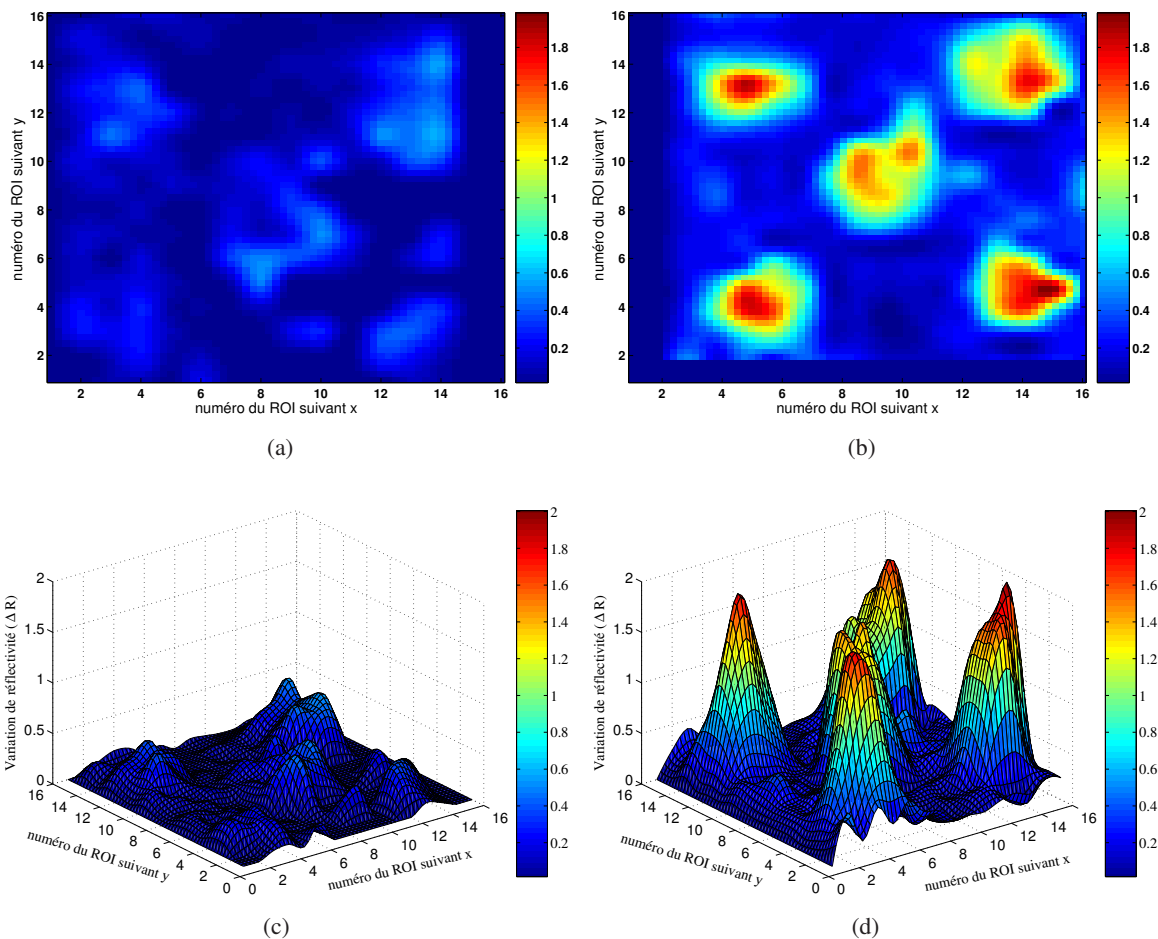


FIGURE 4.22: Topographie de la variation de réflectivité ( $\Delta R$ ) de deux biopuces passivement (a et c) et activement (b et d) immobilisées en réponse à une solution antigénique de 250 nM. Le pourcentage de réflectivité suivant l'axe des z, les coordonnées des spots suivant les axes x et y.

le phénomène d'immobilisation n'est pas observable. Nous ne pouvons donc pas, par cette méthode, étudier la dynamique de la réaction. Pour répondre à ces besoins, nous faisons appel à un second type de transducteurs, de la famille des capteurs massiques, les capteur à ondes de Love.

#### 4.4.5 Caractérisation en temps réel du greffage par un biocapteur à onde de Love

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec le département temps fréquence représenté par Dr. Lamia El Fissi qui a développé dans le cadre de sa thèse les capteurs à ondes de Love [95].

##### 4.4.5.1 Structure des capteurs à onde de Love

Les principales composantes du capteur à ondes de Love (figure 4.24), sont les suivantes :

- Le substrat piézoélectrique : le quartz coupe AT (notation (YXlt)/36°/90°). Cette coupe permet de générer une onde transverse dont la vitesse de propagation est de l'ordre de  $5100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  avec un coefficient

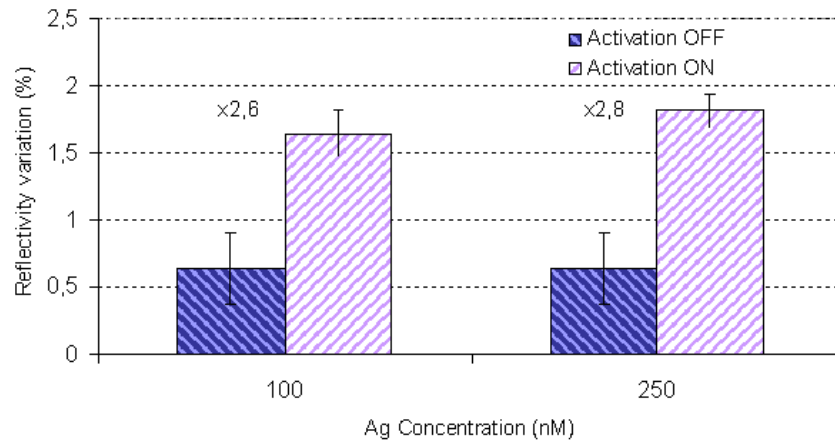


FIGURE 4.23: Variation maximale de réflectivité par spot, en réponse à des solutions antigéniques de 100 nM et 250 nM d'une biopuce standard (Activation OFF) et une biopuce acoustiquement immobilisée (Activation ON). Un gain moyen enregistré de 2.6 à 2.8.

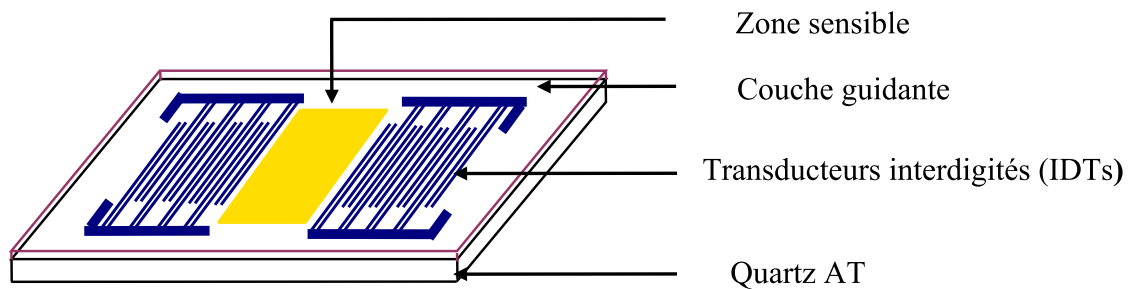


FIGURE 4.24: Schéma d'un capteur à ondes de Love

du couplage électromécanique ( $K^2$ ) de l'ordre de 0,14 %.

- Les transducteurs interdigités sont, en général, réalisés par dépôt d'une couche métallique (Aluminium typiquement), et masquage par une couche polymérisée. Le choix de les réaliser à base d'une couche d'aluminium est fondé sur le fait que l'aluminium présente une faible masse volumique par rapport à celle de l'or et que les IDTs à base d'aluminium sont mieux disposés à vibrer en hautes fréquences et réduisent de fait l'amortissement des ondes de surface [96].

- La couche guidante est un élément clef du fonctionnement d'un capteur à ondes de Love. Cette couche permet de confiner l'onde acoustique à la surface du capteur et ainsi de créer l'onde de Love. Les dispositifs développés dans notre laboratoire utilisent une couche de  $\text{SiO}_2$  pour plusieurs raisons :

- la célérité acoustique inférieure à celle du quartz ( $3764 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ),
- son caractère chimiquement inerte, et sa résistance à de nombreux traitements chimiques,
- sa compatibilité avec les milieux biologiques,
- la possibilité de fonctionnaliser sa surface,

– la faible dérive de ses propriétés avec le temps.

• Particulièrement, dans notre cas, un dépôt d'or 'Au' sur la zone sensible permet de rester dans les mêmes conditions que les biopuces utilisées dans les expériences précédemment présentées (rappelons qu'une biopuce est une lame de verre couverte d'une fine couche d'or).

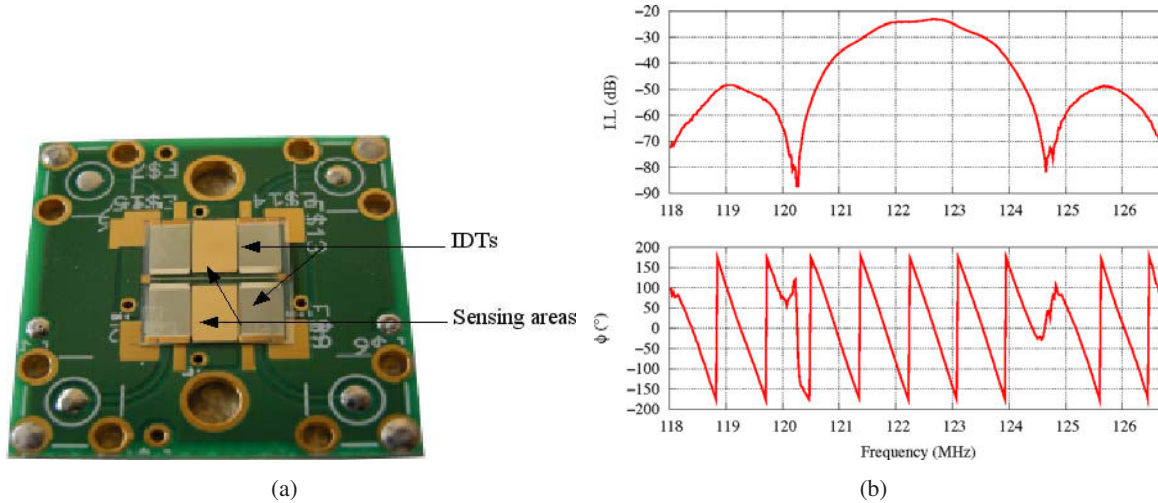


FIGURE 4.25: (a) Photographie des capteurs acoustique à onde de Love duals collés sur un circuit imprimé (26x26 mm<sup>2</sup>)x e. (b) Réponse typique du capteur à onde de Love.

La figure 4.25(a) montre le dispositif utilisé. Ce dernier présente deux capteurs à onde de Love réalisés simultanément. Autrement dit, ils ont suivi les mêmes étapes technologiques lors de leur fabrication. Nous pouvons donc affirmer sans ambiguïté qu'ils sont parfaitement identiques. Cet atout garantit l'exactitude de notre étude comparative sur l'immobilisation en présence et en absence de champs acoustique, en utilisant les capteurs duals de chaque dispositif. Dans son état actuel, le capteur à onde de Love ne permet pas une caractérisation temps réel d'une matrice de gouttes mères. C'est pourquoi, nous nous limiterons dans cette étude à une seule goutte. L'objectif est de mettre en évidence l'effet du champ acoustique sur la dynamique du greffage moléculaire.

#### 4.4.5.2 Dispositif expérimental

Pour observer en temps réel l'étape d'immobilisation en modes passif et actif, le capteur à onde de surface remplace la biopuce dans notre banc expérimental. Autrement dit, le capteur est rendu solidaire au positionneur micrométrique afin qu'il soit judicieusement mis en contact avec la goutte porteuse des anticorps. Le système d'alignement est le même que celui décrit dans le paragraphe 4.4.3. Les propriétés acoustiques du capteur sont surveillées à une fréquence d'échantillonnage de 1 Hz en utilisant l'analyseur de réseau 'Rohde et de Schwartz ZVC' commandé par GPIB. Dans notre cas, nous nous intéressons aux propriétés en transmission d'un quadripôle, et plus particulièrement au paramètre  $\mathcal{S}_1$  qui représente la fonction de transfert du quadripôle dont on extrait des fonctions de déphasage et de

TABLE 4.1: Paramères d'excitation du transducteur acoustique

Start frequency	63 kHz	Sweep	10 ms
Stop frequency	65 kHz	Hold	0 ms
Signal generator voltage	55 mV	Return	1 ms
Offset	0 mV	Type	Linear
Amplified voltage PP	25 V	Interval	1 ms

perles d'insertion associées à la propagation de l'onde acoustique dans le substrat piézoélectrique. Ces fonctions sont enregistrées pour le post-traitement. La figure 4.26 présente le dispositif expérimental.

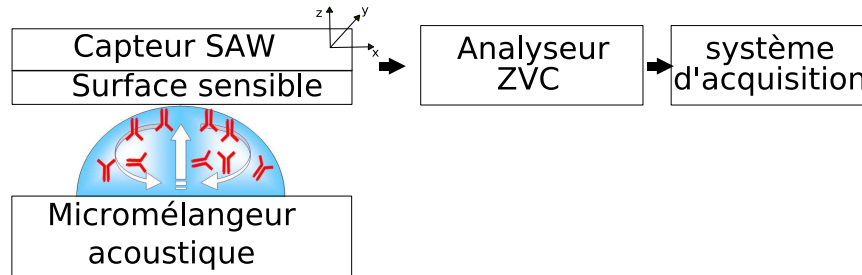


FIGURE 4.26: Schéma du banc expérimental.

Dans cette expérience, nous caractérisons l'immobilisation d'un seul spot, par le biais d'une seule goutte porteuse. Ainsi, nous n'avons plus de limites de taille ou de volume de goutte. Nous nous proposons de travailler avec un volume de  $10 \mu\text{L}$  utilisé dans le cadre de la caractérisation du capteur à onde de Love [95]. Suite à cette augmentation de volume d'intérêt, nous choisissons d'exciter le mélangeur acoustique à une fréquence de résonance maximisant la vibration au centre de la membrane. Cette fréquence,  $68.4 \text{ kHz}$ , correspond à un mode dégénéré formé par la combinaison des modes (1,3) et (3,1). Par ailleurs, la fréquence de résonance du mélangeur dépend étroitement du volume de la goutte déposée. Ce dernier, quant à lui, évolue en fonction du temps due aux phénomènes d'évaporation. Par conséquent, pour garantir que le mode de résonance reste excité pendant toute la durée de l'expérience, le mélangeur sera alimenté en mode de balayage autour de la fréquence initiale de résonance  $63,9 \text{ kHz}$ , correspondant à la résonance de l'ensemble "membrane + goutte". Les paramètres d'excitation sont donnés par le tableau 4.1.

#### 4.4.5.3 Calcul de la densité surfacique en anticorps

Le mécanisme de détection d'espèces cibles par les capteurs à ondes acoustiques de Love repose essentiellement sur l'effet de masse. C'est-à-dire sur le fait que tout changement de masse en surface du capteur provoque une perturbation de l'onde acoustique et notamment un changement de sa vitesse de phase. La sensibilité de la vitesse de l'onde à l'effet de masse se définit comme le rapport de la variation relative de vitesse par rapport à la masse surfacique due au dépôt de la couche sur le chemin de propaga-

tion de l'onde acoustique (zone sensible) [97]. La variation de vitesse se traduit par une variation de la fréquence passant ainsi de la fréquence  $f_0$  à la fréquence  $f_1$ , comme illustré en figure 4.27.

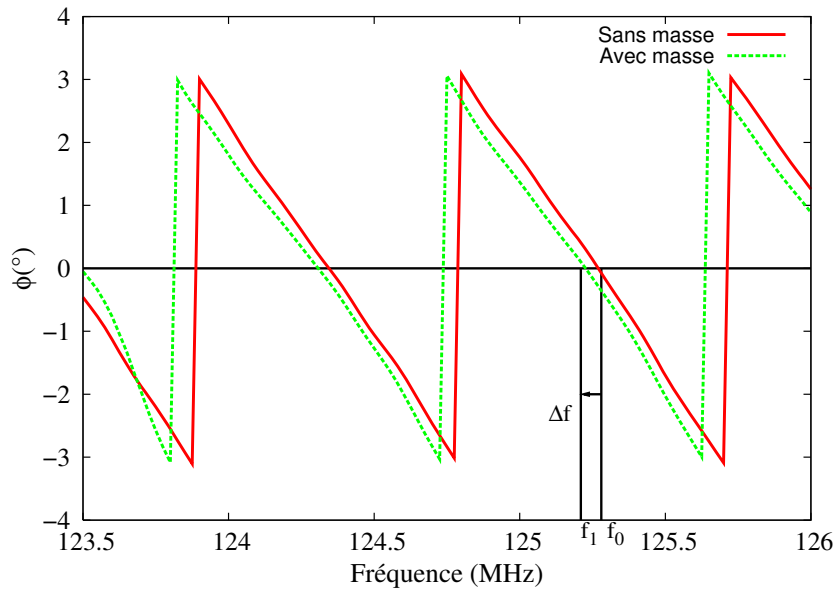


FIGURE 4.27: Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur

Cette sensibilité, que nous noterons  $S_m$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) peut s'exprimer ainsi :

$$S_m = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta(\rho_b b)} \quad (4.3)$$

$$= \frac{\Delta f}{f_0} \frac{1}{\Delta(\rho_b b)} \quad (4.4)$$

$$= \frac{\Delta f}{f_0} \frac{A}{\Delta m} \quad (4.5)$$

avec

- $V_0$  la vitesse de phase du dispositif non perturbé
- $f_0$  la fréquence correspondante
- $\Delta(\rho_b b)$  la modification de la densité surfacique de masse
- $\Delta V$  et  $\Delta f$  les variations de vitesse et de fréquence conséquentes de la variation de la masse surfacique
- $\Delta m$  la variation de masse vue par le capteur

La sensibilité à l'effet de masse est un des critères les plus utilisés pour estimer l'efficacité d'un capteur d'espèces physiques, chimiques ou biologiques à ondes acoustiques, et permet la comparaison entre des capteurs exploitant des principes différents.

La limite de détection est la variation minimale du paramètre mesuré que l'on sera capable de détecter ; la sensibilité intrinsèque du capteur est calibrée expérimentalement à  $250 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  [98]. Si nous consi-

dérons un bruit de mesure de  $0.3^\circ$ , nous atteignons alors une limite de détection de l'ordre de  $60 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ . D'après [99], la phase de la ligne à retard en fonction de la fréquence satisfait la relation suivante :

$$\frac{\Delta\phi}{\Delta f} = 360 \cdot \frac{L_{cc}}{V} = 3 \cdot 7710^{-4} \text{ (}^\circ \cdot \text{Hz}^{-1}\text{)} \quad (4.6)$$

Avec  $L_{cc}$  la distance centre à centre des IDTs en m, et  $V$  la vitesse de phase de l'onde en  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

D'après les deux équations (4.5) et (4.6), la masse adsorbée est déduite comme suit :

$$\frac{\Delta m}{A} = \frac{\Delta f}{f_0 \cdot S_m} \text{ [ng}\cdot\text{cm}^{-2}\text{]} \quad (4.7)$$

#### 4.4.5.4 Caractérisation temps réel du greffage

Après l'étape de fonctionnalisation et d'activation chimiques, la zone sensible du capteur à ondes de Love est prête pour un greffage des anticorps. La figure 4.28 montre la réponse typique du capteur. En effet, pour être considérée comme référence, une goutte de  $10 \mu\text{L}$  de tampon acétate  $10 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 4,5$ ) est déposée au centre de la membrane du mélangeur. Ce tampon est celui utilisé ultérieurement pour diluer les anticorps. Ainsi, le capteur ne verra pas une différence entre les gouttes référence et porteuse, ne serait ce que l'immobilisation des anticorps. Il est ensuite judicieusement positionné pour mettre la goutte en contact précis avec la zone sensible, en garantissant l'absence de contact avec les IDTs. Une fois le contact établi, nous observons la réponse du capteur jusqu'à la stabilisation de la ligne de base au voisinage de  $-27,3 \text{ dB}/37,7^\circ$  (figure 4.28 : zone 1). Ensuite, le capteur est soulevé afin de nettoyer la surface du mélangeur et déposer une nouvelle goutte contenant cette fois-ci les anticorps (figure 4.28 : zone 2). Dès que le contact est assuré, un shift de la phase indique le début de la formation du film d'anticorps à la zone sensible (figure 4.28 : zone 3). Après un temps d'incubation de l'ordre de  $16 \text{ mn}$ , une troisième goutte tampon est déposée, identique à la première. Le but est de tester la stabilité de la couche d'anticorps formée. Le signal reste stable témoignant de la bonne qualité de greffage (figure 4.28 : zone 5). Les capteurs duals, étant des parties d'un seul et unique dispositif, ont vue les mêmes procédures de fonctionnalisation et d'activation chimiques. Les surfaces sensibles, autrement appelées surfaces de capture, sont par conséquent identiques. Nous appliquons également le même dispositif expérimental pour caractériser le greffage dans les deux modes passif et acoustiquement activé. Ainsi, nous pouvons procéder à la comparaison des résultats obtenus dans les deux cas de figures. La figure 4.29 montre les variations de phase enregistrées dans les deux modes ; en présence de champs acoustique (courbe rouge) et en son absence (courbe verte). Comme illustré par cette figure, le mélange acoustique augmente le taux de transfert des anticorps vers la zone sensible. En effet, nous observons une variation de la phase de  $8,24^\circ$  en mode acoustiquement activé contre  $3,35^\circ$  dans le cas passif. En utilisant l'équation (4.7) du paragraphe précédent, nous déduisons la densité surfacique en anticorps dans chaque cas. Celle-ci est estimée à  $713 \text{ ng}/\text{cm}^2$  dans le premier cas contre  $290 \text{ ng}/\text{cm}^2$  dans le second. Par conséquent, le gain obtenu grâce à l'agitation acoustique des gouttes mères est de  $2,46$ . Cette valeur nous rappelle le gain moyen obtenu par agitation acoustique, qui est de l'ordre  $2.6$ , déduit des mesures SPRi des réponses antigéniques des puces (figure 4.23), un résultat tout à fait attendu.



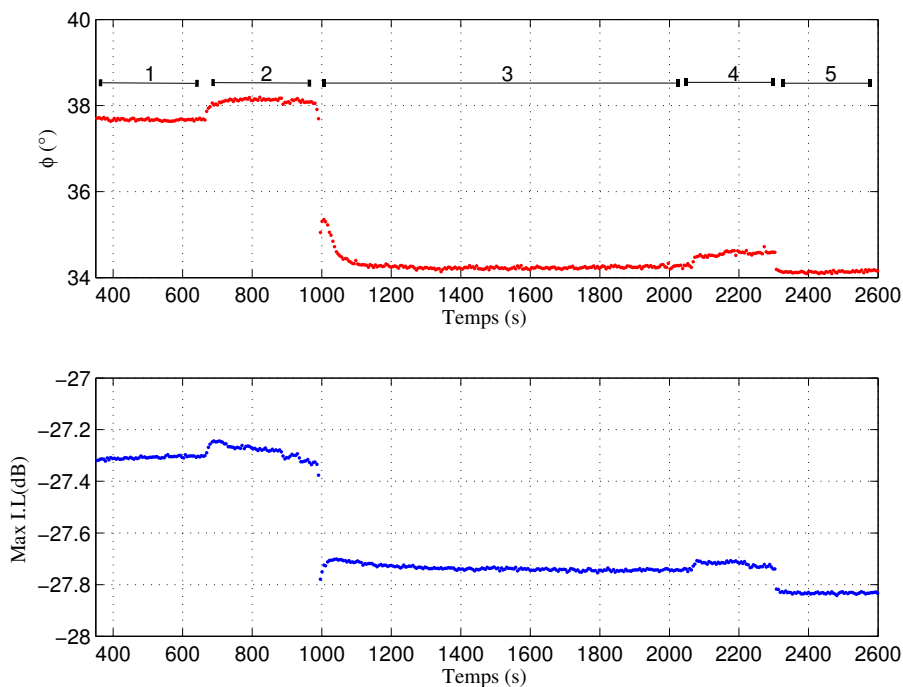


FIGURE 4.28: Réponse temporelle typique du capteur à onde de Love à un greffage sur sa zone sensible

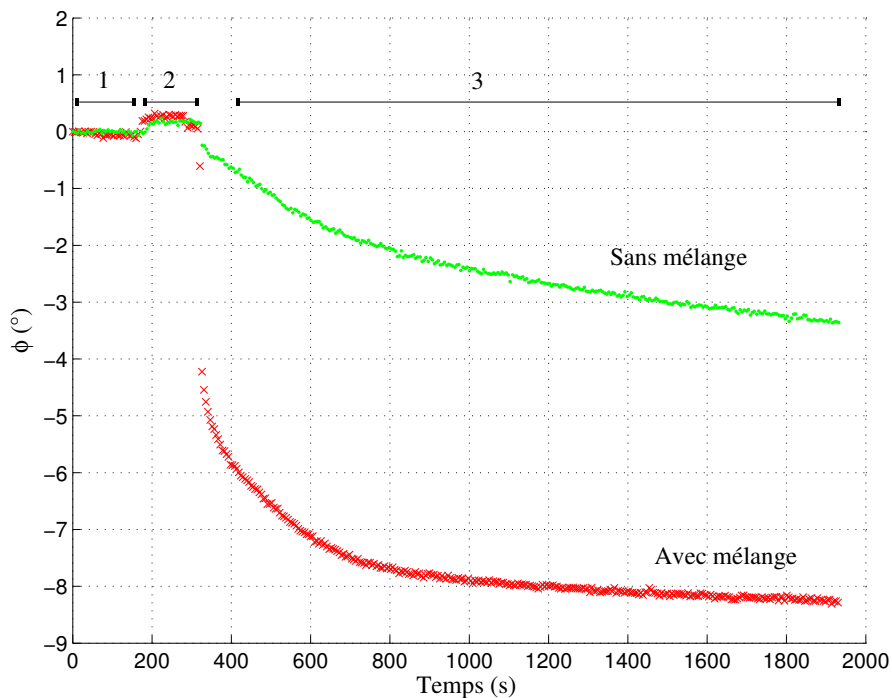


FIGURE 4.29: Variation de la phase du capteur en fonction du temps en réponse au greffage d'anticorps sur la zone sensible, comparaison entre les modes passif et actif.

Par ailleurs, il est clair que l'agitation acoustique a accéléré le greffage. Pour quantifier cette amélioration, estimons le temps de réponse  $\tau$ . Généralement, le temps de réponse d'un greffage ou d'une réaction

antigénique est le temps écoulé avant d'observer un état stationnaire où toute variation du système n'est plus significative. En pratique, des mesures à 90 % du signal stationnaire sont réalisées [100]. Ainsi, nous calculons cette grandeur dans les deux cas de figure étudiés. En mode passif,  $\tau$  est égal à 580 s tandis qu'il est de moins de 220 s dans le cas acoustiquement activé. Le temps de réponse se voit, alors, réduit au moins par 2. L'agitation du milieu a donc diminué ce facteur en assurant un apport régulier de la goutte vers la surface de la biopuce.

#### 4.4.5.5 Influence de l'agitation acoustique sur la réponse antigénique

Les expériences précédentes, que ce soit à travers l'instrumentation SPRi ou le biocapteur à onde de Love, ont montré une amélioration du greffage moléculaire autant en quantité de molécules immobilisées qu'en temps de réponse ou encore en temps de réaction. La diffusion moléculaire classiquement considérée limitant pour cette étape se voit vaincue ou, plus humblement, réduite. Ces résultats positifs nous encouragent à une ambition supérieure : pourquoi pas espérer améliorer la réaction anticorps-antigène ? Le type de réaction est cette fois-ci différent du fait que la réaction antigénique n'est pas uniquement limité par la diffusion et la perméabilité de la couche 'liquide/surface de la biopuce' comme pour un greffage moléculaire mais en plus par la quantité d'anticorps préalablement immobilisée. Nous rappelons que la limite classiquement observée pour le couple  $A_9H_{12}/LAG_3$  est de 1 antigène pour 1 anticorps. Un gain de 2 par agitation acoustique signifie que tous les sites de liaisons sont occupés ce qui semble bien évidemment très ambitieux.

Nous nous attaquons dans cette partie à l'étude de l'influence acoustique sur la réaction antigénique. Pour cela, nous avons saturé les surfaces sensibles des biocapteurs duals en anticorps à travers leur incubation dans une solution d'anticorps à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pendant une demi-heure. Les deux surfaces sensibles sont alors identiquement greffées. Ensuite, ces surfaces sont désactivées par le biais d'une solution d'éthanolamine (1M). Cette préparation est clôturée par rinçage à l'eau ultrapure des biocapteurs. Comme dans le cas du greffage, nous faisons appel à une goutte de  $10 \mu\text{L}$  de tampon, cette fois-ci du PBS (Phosphate Buffer Saline, solution de dilution des antigènes), afin d'être considérée comme référence.

La figure 4.30 présente l'évolution de la phase du capteur à onde de Love en fonction du temps. Une fois que la ligne de base est établie (zone 1), nous procédons au nettoyage du mélangeur suivi du dépôt d'une goutte porteuse d'antigènes de  $10 \mu\text{L}$  de volume à une molarité de 250 nM (zone 2). Dès que le contact 'goutte-zone sensible' est assuré, la réaction anticorps-antigènes débute (zone 3). Nous avons suivi la même procédure décrite pour les deux modes avec et sans agitation. La figure 4.30 compare les variations de phase obtenues dans les deux cas. Nous observons une variation de phase de  $4,5^\circ$  en présence d'agitation acoustique contre une variation de  $3,6^\circ$  en absence de toute perturbation, correspondant respectivement à des densités de  $389,19 \text{ pg/cm}^2$  et  $311,35 \text{ pg/cm}^2$ . Ces mesures illustrent une augmentation des complexes Ac-Ag de 20% grâce à l'agitation acoustique. Les densités en anticorps étant égales, nous avons ainsi prouvé que l'agitation acoustique permet d'accéder à 20% des sites d'anticorps habituellement non utilisés.

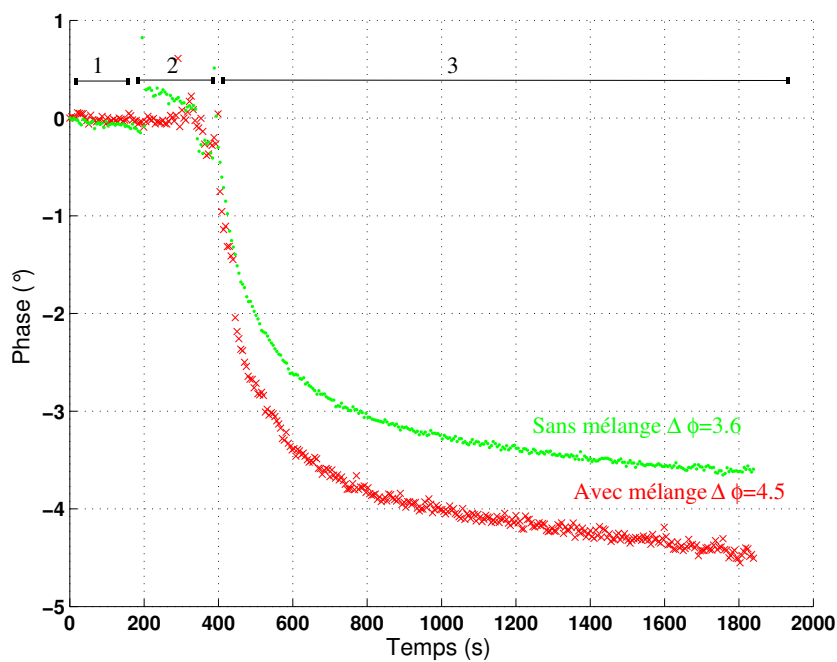


FIGURE 4.30: Réponse du capteur à onde de surface en réponse à la formation de complexes Ac-Ag sur sa zone sensible

#### 4.4.5.6 Régénération du biocapteur à onde de Love

Nous avons fait le choix dans l'étude de la réponse antigénique à une sollicitation acoustique de comparer les deux modes actif et passif en utilisant des biocapteurs duals identiquement immobilisés. Néanmoins, il est possible de penser à une seconde méthode qui ferait appel à un seul et unique capteur. Cette méthode consiste à réaliser une première réaction antigénique, sous excitation acoustique par exemple, suivie d'une étape de régénération de la surface qui brisera la liaison Ac-Ag. Puis une seconde réaction antigénique se déroulera, cette fois-ci, en absence de toute perturbation. Cependant, cette méthode repose lourdement sur la perfection de la régénération. Un résultat établi dans ces conditions laissera la porte ouverte à une critique de la qualité de la couche d'anticorps après régénération. La figure 4.31 montre un exemple de difficulté d'une telle étude. En effet, la réaction antigénique a induit une diminution de la phase de l'ordre de  $7^\circ$ . Théoriquement, la régénération devrait induire une augmentation de la phase de même amplitude. Cependant, la variation obtenue est de l'ordre de  $6^\circ$ . Ceci laissera entendre que certains couples Ac/Ag n'ont pas été dissociés. Cette remarque permettrait de critiquer une quelconque comparaison avec une réaction antigénique ultérieure à cette régénération. Nous avons procédé au nettoyage du mélangeur et l'introduction d'une nouvelle goutte de régénération mais le résultat final n'est point satisfaisant. Une dérive de la ligne de base de toute goutte tampon, prise comme référence, est constamment notée.

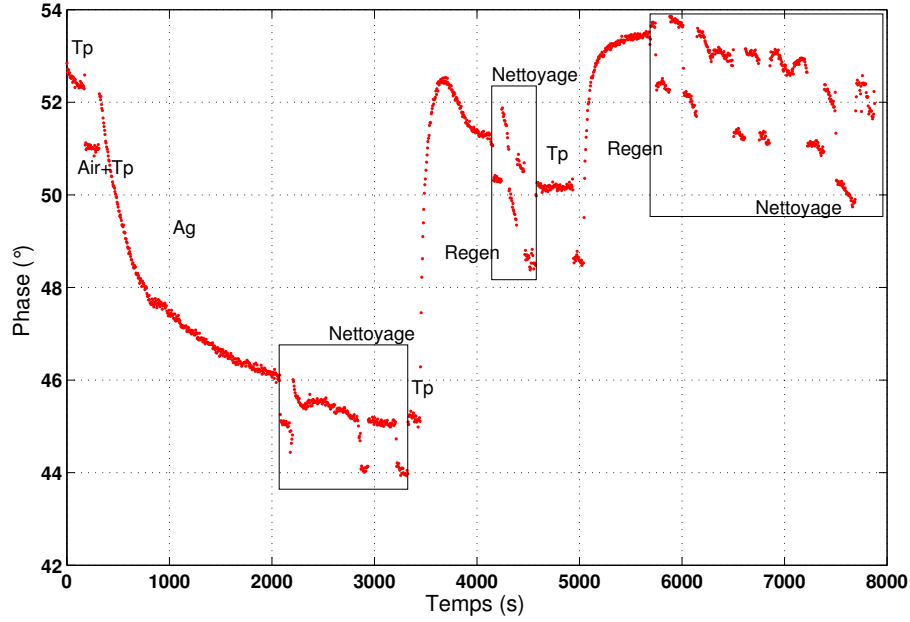


FIGURE 4.31: Réponse du capteur à onde de Love à une réaction antigénique suivie d'une régénération.

#### 4.4.6 Modélisation de l'apport de l'agitation sur le greffage : diffusion ou transport

##### 4.4.6.1 Equation de Fick

La diffusion est le mécanisme de transport de la matière sous l'effet d'un gradient de concentration, depuis les zones concentrées en matière vers les zones moins concentrées. Les particules peuvent être des molécules, des atomes ou des ions, des défauts ponctuels, des électrons libres ou des trous électroniques, *etc.* Dans notre cas, l'espèce diffusante est une molécule biologique. Soit  $c(x,t)$  leur concentration, exprimée en nombre de particules ou de moles par unité de volume. La loi empirique de Fick décrit ce phénomène en énonçant qu'au régime permanent le flux de matière,  $J$ , est proportionnel au gradient de concentration par l'intermédiaire du coefficient de diffusivité,  $D$  :

$$\vec{J} = -D \cdot \overrightarrow{\text{grad}} C \quad (4.8)$$

Plaçons-nous dans un système unidirectionnel et considérons le flux de particules. L'équation (4.8) devient :

$$J = -D \frac{\delta c}{\delta x} \quad (4.9)$$

En régime transitoire, le flux de chaque point varie avec le temps, il faut donc compléter l'équation précédente par une équation de bilan écrite dans un système unidirectionnel. Pour des espèces conservatives, c'est l'équation de continuité :

$$\frac{\delta J}{\delta x} = -\frac{\delta c}{\delta t} \quad (4.10)$$

Des équations (4.9) et (4.10), nous déduisons l'équation générale de la diffusion donnée par la relation 4.11.

$$\frac{\delta c}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta x} \left( D \frac{\delta c}{\delta x} \right) \quad (4.11)$$

Cette équation ne peut être résolue analytiquement tant que le coefficient de diffusion  $D$  dépend de la concentration des molécules et ainsi de  $x$  et  $t$ . Cependant, elle se voit notablement simplifiée si cette grandeur est considérée constante (équation 4.12).

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad (4.12)$$

#### 4.4.6.2 Solution de l'équation de diffusion

##### Diffusion pure

Nous modéliserons une situation simple où toutes les molécules, pour un temps  $t < 0$ , sont concentrées sous forme de couche "mince" en sandwich entre deux échantillons identiques et semi-infinis (figure 4.32). Nous pouvons, ainsi, écrire à  $t=0$  :  $c(x,t) = Q \cdot \delta(x)$ , où  $\delta$  désigne la distribution de Dirac et  $Q$  est égale à la quantité de molécules en présence par unité d'air. La conservation totale des particules se traduit par  $\forall t, \int_{-\infty}^{\infty} c(x,t) dx = Q$ .

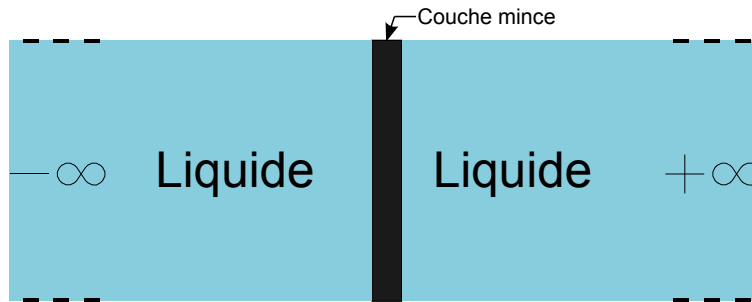


FIGURE 4.32: Diffusion des molécules biologiques du liquide sur la surface du transducteur

En respectant les conditions initiales, la solution de l'équation générale de diffusion quant  $\epsilon \rightarrow 0$  s'écrit sous la forme 4.13 [101–103]. Elle donne le champs de concentration dans le liquide en fonction de  $x$  et  $t$ . C'est l'expression d'une gaussienne qui s'amortit en racine carré du temps, tout en s'élargissant en fonction de  $\frac{x}{\sqrt{D_i t}}$  (figure 4.33).

$$\frac{c(x,t)}{Q} = \frac{1}{2\sqrt{\pi D_i t}} \cdot \exp\left(-\frac{x^2}{4D_i t}\right) \quad (4.13)$$

Notre problème physique réel est encore plus compliqué que le modèle présenté. En effet, les molécules, à  $t = 0$ , ne sont pas concentrées dans un volume d'épaisseur  $\epsilon$  mais elles sont réparties dans le liquide. Pour rapprocher le modèle présenté du cas réel, nous admettons que la longueur du liquide ( $X_{max}$  à  $t < 0$ ) se décompose en une infinité d'épaisseur  $\epsilon$  (avec  $\epsilon \rightarrow 0$ ). Chaque épaisseur  $\epsilon$  se trouvant à un ordonnée  $x_1$  diffuse dans la totalité du liquide. Cela traduit la répartition des molécules sur la totalité du liquide. La expression 4.13 devient alors :

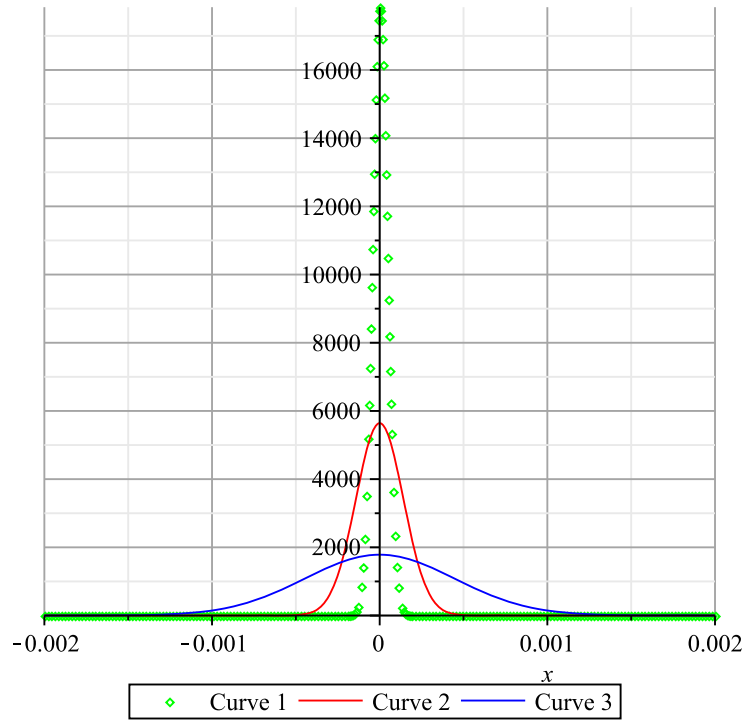


FIGURE 4.33: Evolution des profils de concentration avec la durée de diffusion pour trois valeurs du temps

$$\frac{c(x,t)}{Q} = \frac{1}{2\sqrt{\pi Di.t}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-x_1)^2}{4Di.t}\right) \quad (4.14)$$

A l'instant  $t$ , la quantité de molécules  $Q_m(x_1, t)$  provenant de la couche mince située à  $x_1$  et qui a été adsorbée à la surface du capteur SAW, est celle qui atteint le capteur, autrement dit dont l'abscisse est compris entre  $X_{max}$  et  $\infty$ . Il s'en suit :

$$Q_m(x_1, t) = \int_{X_{max}}^{\infty} \frac{1}{2\sqrt{\pi Di.t}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-x_1)^2}{4Di.t}\right) dx \quad (4.15)$$

La quantité totale de molécules immobilisée à l'instant  $t$  sur la surface du capteur et provenant de la totalité du liquide est alors :

$$Q_{tot}(t) = \int_0^{X_{max}} Q_m(x_1, t) dx_1 \quad (4.16)$$

Remarque : Rappelons nous que la phase du capteur SAW à l'instant  $t$  est image de la quantité totale de molécules greffée sur sa surface entre  $t=0$  et  $t$ . Ainsi, la phase du capteur évolue comme l'intégrale sur le temps de l'équation (4.16).

Le calcul présenté est très approximatif. L'objectif est d'obtenir des ordres de grandeurs et la forme globale de l'évolution de la loi de diffusion dans le temps.

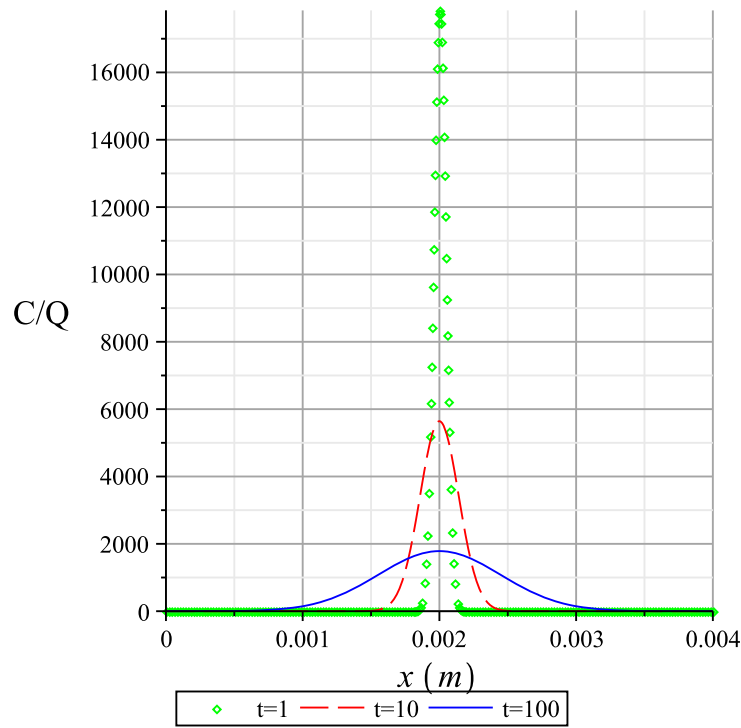


FIGURE 4.34: Evolution des profils de concentration avec la durée de diffusion pour trois valeurs du temps

### diffusion et transport

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons au transport des molécules par une force acoustique. Il est donc intéressant de voir comment le profil de la solution est modifié par l'action d'une force de transport. La solution de l'équation correspondante (4.17) s'écrit :

$$\frac{c(x,t)}{Q} = \frac{1}{2\sqrt{\pi Di.t}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-x_1 - \langle v \rangle .t)^2}{4Di.t}\right) \quad (4.17)$$

Où  $\langle v \rangle$  est la valeur moyenne de la vitesse de déplacement des particules.

On retrouve la même gaussienne, qui se translate avec la vitesse  $\langle v \rangle$ .

Dans le cas réel, en présence d'une force acoustique, le volume liquide peut être divisé en première approximation en deux domaines :

- $0 < x < x_{DD \rightarrow D}$  : Ce domaine voit la coexistence des deux phénomènes le **D**éplacement et la **D**iffusion des particules.
- $x_{DD \rightarrow D} < x < X_{max}$  : Dépassant une interface fictive située à  $x = x_{DD \rightarrow D}$ , uniquement la diffusion persiste. Ce domaine est nommé couche limite.

En supposant que la transition parfaite entre les deux domaines, la traduction mathématique de cette description est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{c(x,t)}{Q} = \frac{1}{2\sqrt{\pi Di.t}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-x_1 - \langle v \rangle .t \cdot 0,5 \cdot \text{erfc}(10^5 \cdot (x_1 - x_{DD \rightarrow D})))^2}{4Di.t}\right) \quad (4.18)$$

Notons dans l'expression précédente, la présence de la fonction d'erreur complémentaire 'erfc'<sup>14</sup> de façon à ce que la quantité :

$$0,5 \cdot \text{erfc}(10^5 \cdot (x_1 - x_{DD \rightarrow D})) = \begin{cases} 1 & \text{si } x < x_{DD \rightarrow D} \\ 0 & \text{si } x > x_{DD \rightarrow D} \end{cases}$$

Elle est donnée par :

$$\text{erfc}(z) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-u^2} du \quad (4.19)$$

La suite des calculs est identique à celui établi dans le cadre de la co-existence de la diffusion et du déplacement. La phase du capteur à onde SAW évolue suivant la loi suivante :

$$\frac{c(x, t)}{Q} = \int_0^{X_{max}} \int_{X_{max}}^{\infty} \frac{1}{2\sqrt{\pi Di \cdot t}} \cdot \exp\left(-\frac{(x - x_1 - \langle v \rangle \cdot t \cdot 0,5 \cdot \text{erfc}(10^5 \cdot (x_1 - x_{DD \rightarrow D})))^2}{4Di \cdot t}\right) dx dx_1 \quad (4.20)$$

#### 4.4.6.3 Résultats expérimentaux

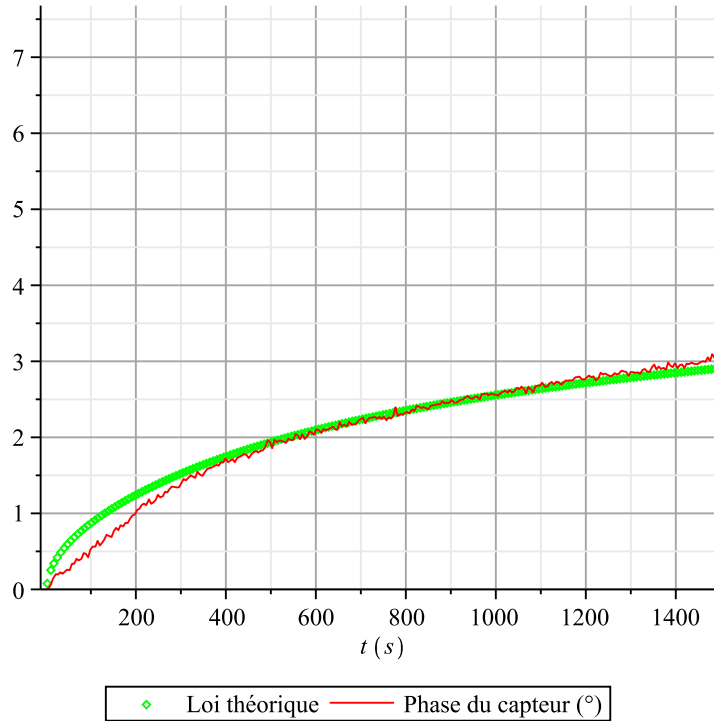


FIGURE 4.35: Variation de la phase du capteur en fonction du greffage moléculaire en absence d'excitation acoustique en comparaison avec la loi théorique

La figure 4.4.6.3 compare le signal mesuré par le capteur à onde de surface SAW en absence d'agitation acoustique à la loi théorique présentée par l'équation (4.16) en considérant les données numériques de la

14. Cette fonction est tabulée dans de nombreux ouvrages (statistique notamment)



table 4.3. L'amplitude de l'expression théorique est ajustée de façon à confondre les deux courbes pour des temps importants. Par conséquent, l'amplitude théorique n'est pas caractéristique. Cependant, cette figure met en exergue un comportement temporel semblable pour les deux courbes. Un résultat d'autant plus éloquent que le coefficient de diffusion  $D_i$ , adopté dans le calcul de  $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  reste dans l'ordre des grandeurs présentés dans la littérature (table 4.2).

TABLE 4.2: Ordre de grandeur de la diffusivité [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]

Gaz	$10^{-5} - 10^{-3}$
Solide	$10^{-15} - 10^{-13}$
Al dans Cu	$1,30.10^{-30}$
Liquide	$10^{-10} - 10^{-9}$
NaCl dans l'eau	$1,9.10^{-9}$
Sucre dans l'eau	$0,52.10^{-9}$

Sous excitation acoustique, la phase du capteur SAW dresse un profil plus rapide de l'immobilisation moléculaire avec une forte pente à l'origine (figure 4.4.6.3). Nous comparons cette donnée à la loi théorique donnée par l'équation (4.20). L'amplitude de cette loi est, une fois encore, non représentative. Cependant, nous retrouvons bien un comportement très rapide au début de la courbe traduisant la prépondérance du déplacement moléculaire au détriment de la diffusion. Nous retrouvons dans la deuxième partie une constante de temps plus lente image de la diffusion. La similitude entre les résultats expérimental et théorique semble confirmer la coexistence du déplacement et de la diffusion moléculaires.

TABLE 4.3: Données numériques

$X_{max}$	$2,5.10^{-3}$
$D_i$	$10^{-9}$
$\langle v \rangle$	$10^{-3}$
$x_{DD \rightarrow D}$	$0,7.10^{-3}$

#### 4.4.7 Caractérisation XPS

La Spectrométrie de Photoélectrons induits par rayons X (X-Ray photoelectron spectrometry : XPS), dont le principe est donné par la figure 4.37, a été récemment utilisée pour caractériser des couches minces chimiques [104] et biologiques [105, 106]. Dans la présente étude, l'analyse XPS est réalisée dans l'objectif de caractériser les couches d'anticorps immobilisés. L'idée est de caractériser qualitativement l'effet de l'agitation acoustique durant le greffage sur les couches obtenues. Les mesures sont réalisées en utilisant un instrument 'Thermo Scientific Fisher', qui est équipé de deux chambres à vide. L'appareil est interfacé en utilisant le logiciel 'Avantage 5.2' qui permet le contrôle, l'enregistrement et le traitement des données. La source polychromatique admet deux filaments Aluminium et Magnésium. La puissance de la source peut varier entre 50 à 300W. Pour notre étude, nous avons utilisé le filament de magnésium comme source à une puissance de 200W. Dufrêne [105] a réalisé les caractérisations à une pression de travail comprise entre  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  mbar. Du fait qu'une pression supérieure garantit une meilleure

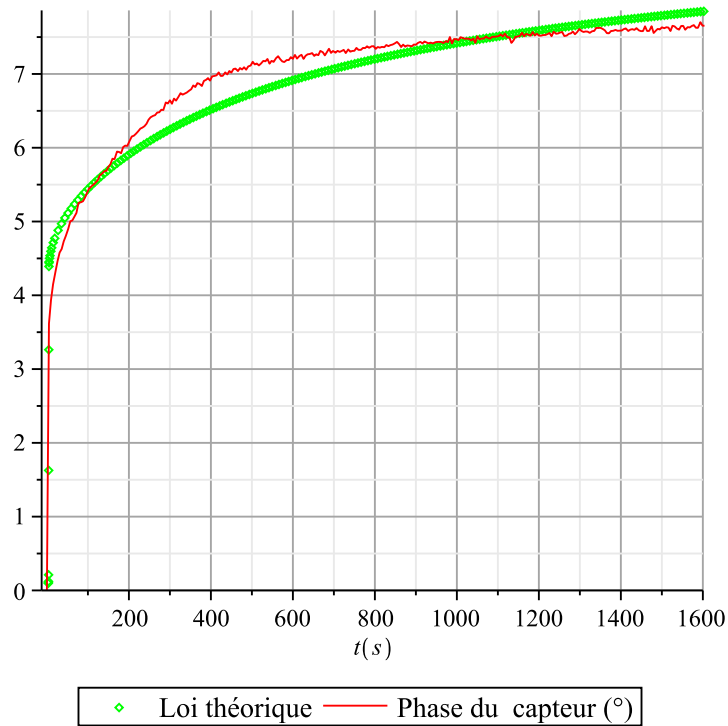


FIGURE 4.36: Variation de la phase du capteur sous excitation acoustique en fonction du greffage moléculaire en comparaison avec la loi théorique

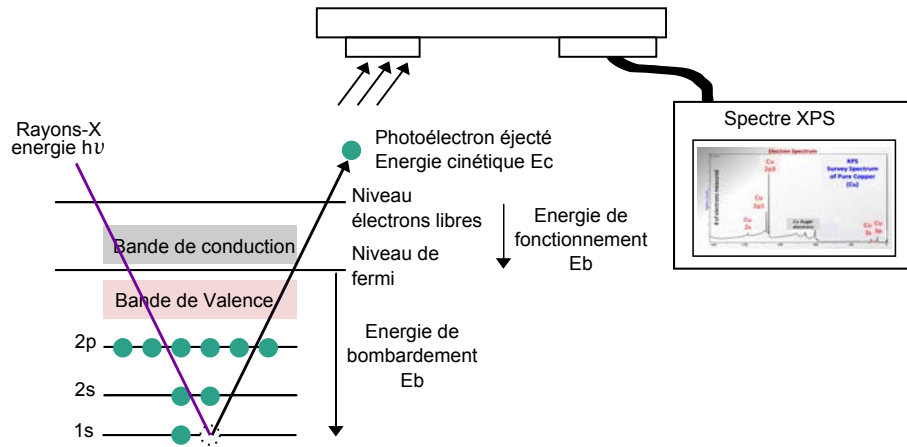


FIGURE 4.37: Principe de la spectrométrie photoélectronique par rayons X.

analyse, nous choisissons des pressions de  $10^{-8}$  dans la chambre primaire et de  $10^{-10}$  dans la chambre d'analyse. Les séquences du spectre Au4f, C1s, et O1s sont enregistrées. L'énergie de bombardement a été déterminée en prenant comme référence celle du composant C1s à 285 eV. La figure 4.38 montre la contribution de chaque espèce chimique dans quatre cas :

- une puce de référence : sans aucun traitement chimique ou biologique.
- une biopuce fonctionnalisée et activée chimiquement.
- une biopuce immobilisé en mode passif.

– une biopuce immobilisé en mode acoustiquement activé.

En comparant les différentes puces dans l'ordre de leur présentation, nous constatons que la contribution de l'or décroît. Ce résultat témoigne de l'augmentation globale des espèces chimiques présentes. Cependant, nous notons que la puce de référence présente une contribution chimique, celle-ci pourrait être due à une contamination de sa surface. Par exemple, le carbone C1s est perçu à un pourcentage de 24,64 %. Cette valeur est doublée suite à la fonctionnalisation et l'activation chimiques, témoignant cette fois-ci de l'existence d'une couche NHS. En comparant les biopuces immobilisées, nous constatons que les deux espèces chimiques étudiées C1s et O1s sont plus présentes dans le cas de la biopuce immobilisée en présence d'agitation acoustique, l'augmentation de la contribution chimique est de l'ordre de 6 %.

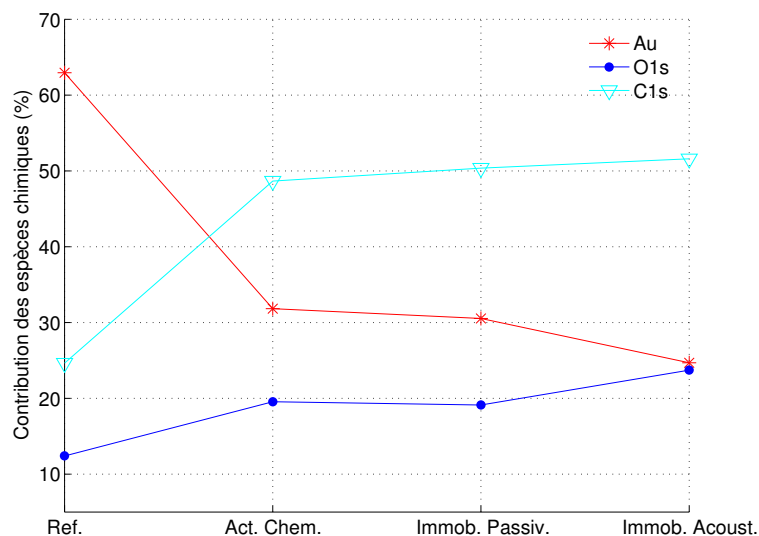


FIGURE 4.38: Contributions des différentes espèces chimiques en fonction de l'étape de fonctionnalisation ; mesure par technique XPS

La figure 4.39 présente un spectre de carbone C1s plus large dans le cas de la biopuce immobilisée acoustiquement, exprimant la présence d'une plus large variété de carbone. Notons cependant qu'à l'opposé du spectre d'or Au4f, les mesures des différentes espèces chimiques sont plutôt perturbées, ceci est probablement dû à la faible rigidité de la couche biologique comparée à celle de l'or. Cependant, ce phénomène ne fausse pas nos résultats. Ces observations rejoignent les démonstrations expérimentales et quantitatives précédentes, établies moyennant l'instrument SPR ou le biocapteur à onde de Love, sur la conclusion que la perturbation de l'état d'équilibre dans les gouttes durant le greffage augmente le transfert de molécules vers la surface de la biopuce.

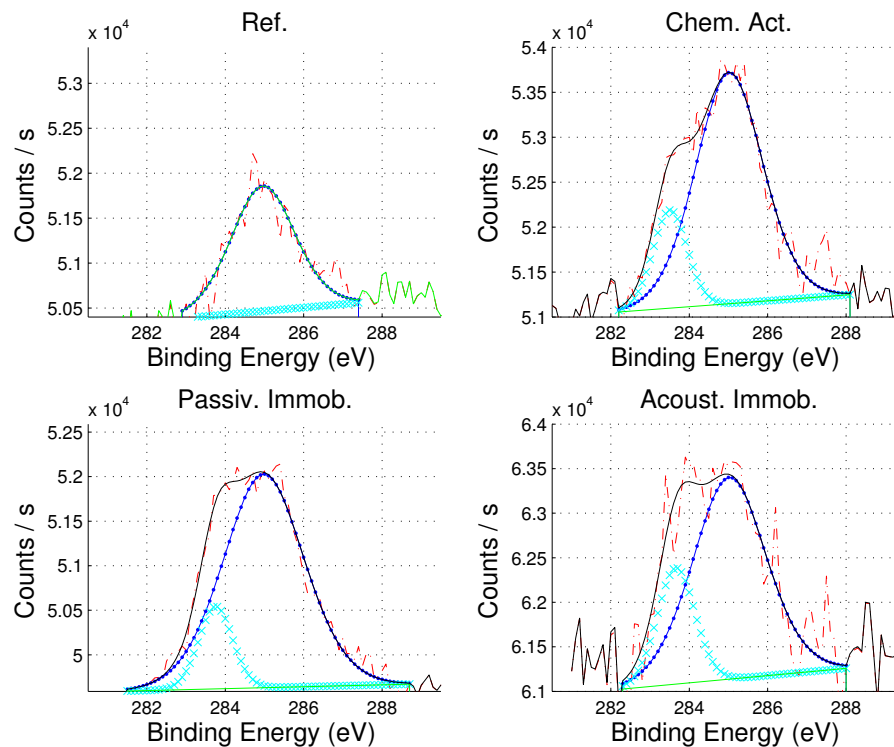


FIGURE 4.39: Séquences de spectres du C1s pour chaque étape de fonctionnalisation

## Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet du mélange induit par champ acoustique sur deux types de réactions biologiques. La première est le greffage, autrement appelé immobilisation, des anticorps et la seconde est la réaction antigène-anticorps.

Nous avons démontré dans un premier temps en utilisant une instrumentation SPRi que les biopuces immobilisées sous agitation acoustique répondent mieux aux solutions antigéniques quel que soient leurs concentrations. En effet, nous avons enregistré un gain moyen de l'ordre de 2,7.

Afin d'observer en temps réel le greffage moléculaire et ainsi étudier la dynamique de cet événement, nous avons fait appel à un second type de transducteur nommé capteur acoustique à onde de Love. Ce dernier voit sa phase varier en fonction de la quantité de molécules greffées sur sa zone sensible. A travers ces mesures, nous avons montré que la rupture de l'état d'équilibre dans la goutte durant l'immobilisation non seulement permet d'augmenter le transfert de molécules mais aussi de réduire par deux le temps de réponse de la réaction et ainsi le temps total nécessaire à l'incubation. En effet, nous avons enregistré par le biais du capteur à ondes de surface un déphasage de  $6,24^\circ$  dans le cas du greffage actif contre  $3,35^\circ$  dans le cas passif, correspondant des densités surfaciques respectives de l'ordre de  $713 \text{ ng/cm}^2$  et  $290 \text{ ng/cm}^2$ . Les constantes de temps enregistrées sont de l'ordre de 220 s dans le cas actif contre 580 s

dans le cas passif.

Autrement dit, en utilisant l'agitation acoustique nous pouvons garantir une qualité supérieure de greffage à moindre coût et avec des temps de réaction courts. Ces points sont cruciaux pour le développement de nouvelles rangées de protéines, en particulier en supprimant l'utilisation des échantillons fortement concentrés qui mènent généralement à un empilement ou à la formation de multicouches de ligands sur la surface de la biopuce.

En outre, l'homogénéité sur la surface des matrices biologiques est un point crucial dans leur développement pour le diagnostic. Dans cette objectif, nous avons démontré que le coefficient de variation est plus faible dans le cas des puces activement immobilisées. Cette réduction annonce une meilleure reproductibilité.

Nous avons également fait appel à une technique XPS afin de qualitativement conforter nos précédents résultats. Ainsi nous avons prouvé encore une fois que la contribution des espèces chimiques se voit augmentée de 6 % grâce à l'agitation acoustique durant le greffage.

Des mesures par capteur à onde de surface ont également montré une amélioration, grâce à l'agitation acoustique, d'un second type de réactions biologiques, la réaction Ac-Ag. En effet, nous avons noté une augmentation de l'ordre de 20 %. Classiquement pour le couple Ac-Ag étudié, la réaction s'effectue avec un rapport de 1 anticorps pour 1 antigène. Autrement dit, uniquement 50 % des sites d'anticorps sont occupés. L'amélioration apportée par l'agitation acoustique signifie que nous avons rompu avec ce ratio pour occuper 20 % de sites supplémentaires.

L'activation acoustique des gouttes est, sans doute, un moyen efficace pour optimiser le greffage des anticorps à la surface de la puce. Néanmoins, les expériences ont été réalisées dans un but exploratoire et doivent être considérées comme une preuve de concept. Par ailleurs, les paramètres d'excitation du champ acoustique n'ont pas été optimisés. Il est fort probable qu'un ajustement de ces paramètres puisse conduire à de meilleurs résultats. Une étude paramétrique permettra de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Un autre volet de recherche dans ce domaine serait la miniaturisation du mélangeur acoustique afin de recevoir une matrice de 100 gouttes/cm<sup>2</sup>. La relève de ce déficit rendra le dispositif commercialisable et même compétitif.

Nos résultats XPS ne sont qu'un premier pas vers une caractérisation quantitative des couches biologiques en utilisant ce moyen de mesure. Une étude plus approfondie permettra de relier chaque spectre observé à l'espèce chimique lui correspondant.

# Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse portent principalement sur l'étude d'un microdispositif d'activation de mélange (micromélangeur) qui crée un écoulement continu à l'intérieur de chaque goutte d'une matrice tout en évitant la contamination entre les différentes gouttes et l'élévation exhaustive de la température du liquide. Ces contraintes sont imposées par l'application du dispositif dans le domaine biologique, précisément dans l'optimisation du greffage moléculaire à une surface solide. L'idée est d'introduire, à travers la vibration générée, une dynamique dans la goutte pour garantir un apport régulier de biomolécules vers la surface solide (biopuce) et ainsi accroître la probabilité de greffage à cette dernière.

Nous avons tout d'abord présenté quelques principes physiques qui peuvent être utilisés pour créer un flux interne à la goutte ou encore de mélanger plusieurs gouttes entre elles. Cela nous permet de situer les mélangeurs basés sur les vibrations de basses fréquences dans un contexte général. Nous avons également présenté un certain nombre d'activateurs de mélange employés dans le domaine du greffage moléculaire. Il en ressort que l'utilisation du générateur de vibration de basse fréquence, dans ce cadre applicatif, présente certains avantages par rapport aux autres dispositifs. Parmi ces avantages, l'utilisation de techniques de microfabrication telles que l'usinage chimique réduisant les coûts, la possibilité de le miniaturiser ou encore la possibilité de structurer sa surface en fonction de l'application en vue.

Pour étudier le comportement de la goutte sous agitation acoustique dans une configuration confinée, nous avons proposé, en s'inspirant des travaux de Wan [44], un modèle de l'écoulement généré dans le liquide en résolvant numériquement l'équation de Navier-Stokes. Pour cela, nous avons utilisé des développements asymptotiques au second ordre des variables du problème. Puis, nous avons développé en utilisant le logiciel Comsol une modélisation numérique basée sur la méthode des éléments finis qui traite le cas d'une goutte de liquide ou encore le cas d'une couche "infinie" de liquide. Ainsi, nous nous sommes intéressés au cas d'une goutte confinée entre le générateur de vibration (à la base inférieure de la goutte) et une surface solide (à la base supérieure de la goutte). Cette disposition est justifiée par l'application biologique qui positionne la puce sur laquelle les biomolécules se grefferont en contact avec la surface supérieure de la goutte. Ainsi, nous avons prouvé la création de flux quasi-stationnaire dans la goutte en présence de vibration de basse fréquence. Nous avons, cependant, trouvé des vitesses d'écoulement relativement faibles comparées à celles classiquement observées. L'étude de la sensibilité du modèle vis-à-vis des constantes du problème (masse volumique, viscosité, célérité...) semble nécessaire et pourrait expliquer la différence entre la théorie et l'expérimentale. Nous avons également étudié

le cas d'une couche de liquide dont l'épaisseur est négligeable devant sa longueur assimilé au cas d'une couche "infinie" de liquide. Ce cas présente spécialement la difficulté des frontières ouvertes que nous avons résolu par l'emploi de la technique des couches absorbantes PMLs. Ainsi, nous avons comparé les pressions de streaming obtenu par rapport à l'étude analytique mise en place dans les travaux précédents [45–47]. Les efforts de modélisation de l'interaction vibro-acoustique avec un liquide présentés dans ce chapitre constituent une première étape d'une modélisation numérique complète qui prendrait en considération la déformation de l'interface liquide-air induite par la vibration.

Les transducteurs développés dans les travaux précédents au laboratoire permettent de déplacer de manière unidimensionnelle ou bidimensionnelle et réversible des gouttes ayant un volume compris entre 1 et 100  $\mu\text{L}$ , néanmoins ces dispositifs n'ont pas été testés dans le domaines biologique. Dans le cadre de notre étude, nous avons expérimenté l'influence de l'activation de mélange au greffage moléculaire. Classiquement, le greffage moléculaire en mode 'spotting' s'effectue par simple dépôt des gouttes portant les biomolécules sur la surface à fonctionnaliser. Cette méthode présente l'inconvénient d'un greffage statique étant donné l'équilibre rapidement établi dans la goutte. Nous avons utilisé le transducteur matriciel dans l'objectif de simultanément induire un écoulement dans les gouttes porteuses des biomolécules. Pour cela, nous positionnons minutieusement la puce à immobiliser en contact avec la matrice des gouttes précédemment disposées sur la membrane du transducteur en vibration. Des caractérisations par SPR, ont prouvé que l'immobilisation dynamique en utilisant notre système multiplie par trois la réponse antigénique des puces immobilisées comparée à un greffage statique. Ce résultat est prometteur, il représente la première brique du développement d'une technique innovante pour immobiliser des biopuces. Pour une étude temps réel de l'influence de l'agitation acoustique sur l'immobilisation, nous avons fait appel à un biocapteur à onde de Love. Nous avons montré que même la dynamique de la réaction se voit accéléré par l'agitation acoustique. Pour identifier les courbes, nous nous sommes appuyés sur la loi de diffusion ou loi de Fick en prenant en compte le déplacement des molécules en présence de vibration.

Ces trois années de recherche m'ont permis d'aborder un vaste champ disciplinaire ; non seulement dans les domaines de la conception, de la modélisation, de la fabrication et de la caractérisation de dispositifs acoustique pour la création de mélange dans des volumes allant de quelques centaines de nano-litres à quelques dizaines de micro-volumes mais aussi dans le domaine de la biologie. Pour mener à bien ce sujet de recherche, j'ai aussi bien appris à monter des collaborations qu'à affronter des domaines scientifiques relativement éloignés de ma spécialité de départ.

Différents points mériteraient d'être complétés, améliorés ou approfondis dans l'avenir :

- Le premier concerne la conception et le dimensionnement du transducteur matriciel. En effet, nous avons validé que la structuration de la membrane empêche toute contamination entre les gouttes. Nous pouvons donc projeter une miniaturisation de la matrice et/ou l'augmentation du nombre de gouttes prises en charge. Ceci répondra mieux aux exigences des applications biomédicales. Un changement plus profond dans la structure même du transducteur matriciel consiste dans l'utilisation d'une matrice d'éléments piézoélectriques telle que nous l'avons testé dans le paragraphe 2.2.3. Ainsi, chaque goutte

---

serait adressée individuellement et les paramètres de l'écoulement serait adapté pour chaque type de gouttes. Cette modification est assez compliquée à mettre en œuvre au détriment de la simplicité de l'actuel micromélangeur. Le second point consiste dans la volonté de créer des écoulements d'une vitesse variable. Ceci permettrait une étude exhaustive sur l'influence des différents paramètres sur la réaction biologique en cours. Cependant, la réalisation d'un tel dispositif en se basant sur le couplage d'un élément piézoélectrique avec une membrane risque d'être complexe voir irréalisable. Une idée que nous avons testé mais ne figure pas dans ce manuscrit est l'utilisation d'un transducteur annulaire à onde de surface pour l'activation de mélange dans chaque goutte. La finalité du projet serait de créer une matrice de transducteurs annulaires sur un même support. L'excitation des transducteurs étant complètement indépendante, la maîtrise de la vitesse d'écoulement dans chaque goutte devrait ainsi être garanti.

- Dans le cadre des caractérisations des effets thermiques des micromélangeurs, nous avons fait appel à une visualisation par thermographie **InfraRouge** des gouttes. Cependant, cette méthode présente certaines limitations dont la condition de réflectivité de l'objet à caractériser. Il serait intéressant d'adopter ou de concevoir une nouvelle méthode de caractérisation qui permet d'intégrer un capteur thermique au sein même de la goutte.
- L'utilisation du transducteur matriciel dans le cadre de l'application biologique a montré que la création d'une dynamique dans la goutte lors du greffage moléculaire augmente le taux de molécules immobilisées. Cette démonstration doit être prise comme une preuve de concept. L'étude détaillée sur l'influence des différents paramètres du transducteur sur le taux de greffage pourrait révéler de meilleures conditions expérimentales pour un résultat optimal.





## Annexe A

# La piézoélectricité

### A.1 Quelques notions sur la piézoélectricité

Un solide est dit piézoélectrique s'il se polarise électriquement sous l'action d'une contrainte (effet direct) et se déforme si un champ électrique lui est appliqué (effet inverse). Les deux effets sont indissociables. Ils existent cinq grandes classes de matériaux piézoélectriques les cristaux, les céramiques polycristallines, les polymères, les composites et les couches minces.

#### A.1.1 Piézoélectricité naturelle

Une maille de cristal de quartz est composée d'atomes de silicium portant une charge électrique positive et d'atomes d'oxygène portant une charge électrique négative. La figure A.1 montre qu'en absence de déformation, le barycentre des charges positives est confondu avec celui des charges négatives. Le cristal reste donc électriquement neutre.

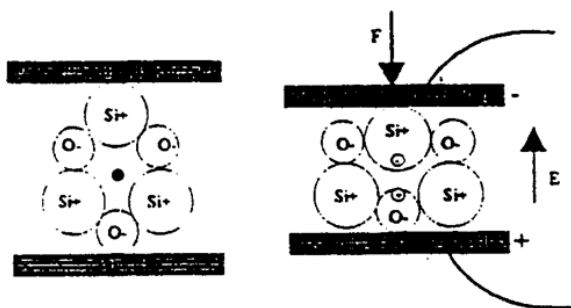


FIGURE A.1: Comportement d'une maille de cristal de quartz en réponse à l'application d'une force

Quand une pression est appliquée, la maille cristalline se déforme, de telle sorte que le barycentre des charges positives et celui des charges négatives s'écartent. Ainsi, un dipôle électrique se crée et fait apparaître, à son tour, des charges de signes opposés sur les deux électrodes : c'est l'effet direct.

Réciproquement, quand une tension électrique est appliquée, sous l'effet de forces électrostatiques, la maille se déforme : c'est l'effet inverse. Dans ses deux formes, l'effet piézoélectrique est linéaire : le champ électrique et la déformation sont proportionnels.

Si des électrodes métalliques sont déposées sur les deux faces du matériau piézo-électrique et qu'une tension oscillante dans le temps à une fréquence  $f$  est appliquée sur ces deux électrodes, la plaque se déforme avec la même fréquence. Son mouvement se communique au milieu adjacent engendrant ainsi des ultrasons. Dans de tels cristaux au repos, les charges électriques sont séparées, mais symétriquement distribuées. Quand une pression agit, l'asymétrie des charges génère une tension (La tension est une force d'extension.). Par exemple, un quartz de  $1 \text{ cm}^3$  soumis à une force de  $2 \text{ kN}$  peut produire environ  $12\,500 \text{ V}$ . On a là donc un capteur (Un capteur est un dispositif qui transforme l'état d'une grandeur physique observée en une grandeur utilisable,...) de pression.

### A.1.2 Piézo-électricité artificielle

La majorité des matériaux piézo-électriques utilisés dans la fabrication des transducteurs sont au départ des matériaux ferroélectriques, c'est à dire que la courbe liant le champ électrique et la déformation n'est plus une droite. Il nous faut maintenant considérer la structure des matériaux ferroélectriques. En effet, ils sont composés d'une multitude de grains dont chacun est un cristal : ce sont des matériaux polycristallins. Chaque petit cristal possède un axe privilégié, ici représenté par une flèche, mais ces axes sont orientés de façon aléatoire, de sorte que l'effet piézoélectrique résultant est nul (figure A.2). On peut cependant réorienter dans le même sens les axes des grains par l'application d'un champ électrique intense, d'abord à haute température, puis pendant une phase de retour à la température ambiante : cette procédure est appelée polarisation et il en résulte que le matériau ferroélectrique acquiert une piézoélectricité.



FIGURE A.2: Représentation schématique d'un matériaux polycristallin, avant et après la polarisation

## A.2 Différents matériaux piézoélectrique

De nombreux **cristaux** présentent, naturellement, des propriétés piézoélectriques. On peut citer le Quartz ( $\text{SiO}_2$ ), le Niobate de Lithium ( $\text{LiNbO}_3$ ) ou le Tantalate de Lithium ( $\text{LiTaO}_3$ ).

Pour des applications médicales, l'utilisation de **céramiques polycristallines** est plus courante. Par exemple, le PZT, qui est composé de plomb, de zirconium et de titane ( $\text{PbZr}_x\text{Ti}_{(1-x)}\text{O}_3$ ), est fabriqué par frittage de microcristaux. On parle de **céramique piézoélectrique**. C'est la forme la plus utilisée, principalement en raison de leur facilité de fabrication et des nombreuses propriétés qu'on peut obtenir en faisant varier la composition chimique, les paramètres de la fabrication, etc.

Certains **polymères** tels que le PVDF (PolyVynilDiFluorure) et des copolymères tels que le P(VDF-TrFE) peuvent acquérir des propriétés piézo-électriques. Ils se caractérisent par une faible impédance acoustique et sont donc supérieurs à ce point de vue.

Dans un **composite**, le matériau piézoélectrique est divisé et plongé dans une matrice non piézoélectrique (une résine). Son origine provient du constat selon lequel aucun matériau existant n'avait à la fois une impédance acoustique assez faible pour bien transmettre son énergie aux tissus biologiques et une valeur du couplage électromécanique  $k_f$  élevée. En effet, les céramiques souffrent d'une impédance acoustique, trop élevée et les polymères d'une valeur de  $k_f$  trop faible. L'idée est donc née qu'il fallait utiliser à la fois une céramique à  $k_f$  élevée, associée à un matériau passif de faible impédance acoustique de sorte que le matériau résultant ait une impédance acoustique plus faible tout en gardant un  $k_f$  comparable avec celui

Les avantages des **couches minces** piézoélectriques sont notamment leur faible puissance de fonctionnement, l'importance des forces générées et les larges gammes de fréquences d'utilisation. Les couches sont en général fabriquées par un procédé sol-gel et ont une épaisseur comprise typiquement entre 0,5 et 5 microns. Le matériau le plus utilisé est là aussi le PZT. Les coefficients piézoélectriques mesurés sur les couches minces sont plus faibles que ceux du matériau massif à cause de l'effet du substrat [15]. Une forme des équations d'état piézoélectriques, reliant les grandeurs mécaniques ( $S$  : déformation et  $T$  : contrainte) aux grandeurs électriques ( $E$  : champ électrique et  $D$  : induction) est donnée par le système A.1 suivant :

$$\{S\} = [s^E] \{T\} + [d^t] \{E\}, \quad (\text{A.1a})$$

$$\{D\} = [d] \{T\} + [\epsilon^T] \{E\}, \quad (\text{A.1b})$$

Où

- $[s^E]$  est le tenseur des raideurs élastiques à champs électrique constant,
- $[\epsilon^T]$  la constante diélectrique (en F/m) à contrainte constante,
- et  $[d]$  la constante de charge à champ électrique nul ou constant, traduisant l'effet piézoélectrique direct (en C/N) ; Sa transposée  $[d]^t$  traduit l'effet inverse.

Cette formulation est généralement adoptée par les fournisseurs des céramiques piézoélectriques. En considérant l'axe des  $z$  confondu avec l'axe de polarisation, ces matrices s'écrivent alors comme suit :

$$[s^E] = \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{12} & s_{11} & s_{13} & 0 & 0 & 0 \\ s_{13} & s_{13} & s_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & s_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & s_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & s_{66} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 16,4 & -5,3 & -7 & 0 & 0 & 0 \\ -5,3 & 16,4 & -7 & 0 & 0 & 0 \\ -7 & -7 & 18,9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 43 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 45 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 45 \end{bmatrix} * 10^{12} \text{ m}^2/\text{N}$$

$$[d] = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{24} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 540 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 540 & 0 & 0 \\ -171 & -171 & 374 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} * 10^{12} \text{ m/V}$$

$$\varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{33} \end{bmatrix} F/m ; \varepsilon/\varepsilon_0 = \begin{bmatrix} 1730 & 0 & 0 \\ 0 & 1730 & 0 \\ 0 & 0 & 1700 \end{bmatrix}$$

Les données numériques sont relatives à une piézocéramique de la famille PSI-5A utilisée dans le cadre de notre étude. Ces caractéristiques sont données par le fournisseur 'Piezosystems' [5]. La représentation d'état des équations piézoélectriques adoptée par Ansys multiphysiques est donnée par le système A.2.

$$\{T\} = [c] \{S\} - [e] \{E\} \quad (\text{A.2a})$$

$$\{D\} = [e]^T \{S\} + [\varepsilon] \{E\} \quad (\text{A.2b})$$

Par identification des deux systèmes A.1 et A.2, nous déduisons les formulations des matrices  $c$  et  $e$  à :

$$\begin{cases} [c] = [s]^{-1} \\ [e] = [d][c] \end{cases}$$

La spécification des critères de la piézocéramique sous Ansys est formulée comme suit :

TABLE A.1: Propriété du matériau piézoélectrique PSI-5A

```

MP,DENS,2,7750 ! PSI5A : DENSITY
TB,PIEZ,2 ! DEFINE PIEZO. TABLE
! PIEZO MATRIX CONSTANTS
TBDATA,3,-2.6206 ! e31
TBDATA,6,-1.9806 ! e31
TBDATA,9,+19.7884 ! e33
TBDATA,14,12 ! e15
TBDATA,16,12 ! e15
! PERMITTIVITY
EMUNIT,EPZRO,8.854e-12
MP,PERX,2,998.1274 !  $\epsilon_{11}^S$ 
MP,PERY,2,998.1274 !  $\epsilon_{11}^S$ 
MP,PERZ,2,775.2592 !  $\epsilon_{33}^S$ 
! DEFINE STRUCTURAL TABLE FOR PSI-5A
TB,ANEL,2
! INPUT [C] MATRIX FOR PSI-5A
TBDATA,1,6.0976E10,1.9706E10,2.9882E10 !  $C_{11}^E, C_{12}^E, C_{13}^E$ 
TBDATA,7,6.0976E10,2.2584E10 !  $C_{11}^E, C_{13}^E$ 
TBDATA,12,5.2910E10 !  $C_{33}^E$ 
TBDATA,16,2.3256E10 !  $C_{66}^E$ , attention inversion
TBDATA,19,2.22E10 !  $C_{44}^E$ 
TBDATA,21,2.22E10 !  $C_{44}^E$ 

```



## **Annexe B**

# **Viscosité des solutions aqueuses en glycérol**



TABLE B.1: Viscosité de des solutions aqueuses de glycérol en Centipoises/mPa s

Pourcentage de Glycérol	Température (°C)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0(1)	1,792	1,308	1,005	0,8007	0,6560	0,5494	0,4688	0,4061	0,3565	0,3165	0,2838
10	2,44	1,74	1,31	1,03	0,826	0,680	0,575	0,500	x	x	x
20	3,44	2,41	1,76	1,35	1,07	0,879	0,731	0,635	x	x	x
30	5,14	3,49	2,50	1,87	1,46	1,16	0,956	0,816	0,690	x	x
40	8,25	5,37	3,72	2,72	2,07	1,62	1,30	1,09	0,918	0,763	0,668
50	14,6	9,01	6,00	4,21	3,10	2,37	1,86	1,53	1,25	1,05	0,910
60	29,9	17,4	10,8	7,19	5,08	3,76	2,85	2,29	1,84	1,52	1,28
65	45,7	25,3	15,2	9,85	6,80	4,89	3,66	2,91	2,28	1,86	1,55
67	55,5	29,9	17,7	11,3	7,73	5,50	4,09	3,23	2,50	2,03	1,68
70	76	38,8	22,5	14,1	9,40	6,61	4,86	3,78	2,90	2,34	1,93
75	132	65,2	35,5	21,2	13,6	9,25	6,61	5,01	3,80	3,00	2,43
80	255	116	60,1	33,9	20,8	13,6	9,42	6,94	5,13	4,03	3,18
85	540	223	109	58	33,5	21,2	14,2	10,0	7,28	5,52	4,24
90	1310	498	219	109	60,0	35,5	22,5	15,5	11,0	7,93	6,00
91	1590	592	259	127	68,1	39,8	25,1	17,1	11,9	8,62	6,40
92	1950	729	310	147	78,3	44,8	28,0	19,0	13,1	9,46	6,82
93	2400	860	367	172	89	51,5	31,6	21,2	14,4	10,3	7,54
94	2930	1040	437	202	105	58,4	35,4	23,6	15,8	11,2	8,19
95	3690	1270	523	237	121	67,0	39,9	26,4	17,5	12,4	9,08
96	4600	1580	624	281	142	77,8	45,4	29,7	19,6	13,6	10,1
97	5770	1950	765	340	166	88,9	51,9	33,6	21,9	15,1	10,9
98	7370	2460	939	409	196	104	59,8	38,5	24,8	17,0	12,2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69,1	43,6	27,8	19,0	13,3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81,3	50,6	31,9	21,3	14,8

Viscosity of water taken from 'Properties of Ordinary Water-Substance,' N.E. Dorsey, p. 184. New York (1940)

# Bibliographie

- [1] S.-K. HSIUNG, C.-H. LEE, J.-L. LIN et G.-B. LEE : Active micro-mixers utilizing moving wall structures activated pneumatically by buried side chambers. *J. Micromech. Microeng.*, 17:129–138, 2007.
- [2] R. YAMADA et H. TADA : Manipulation of droplets by dynamically controlled wetting gradients. *Langmuir*, 21:4254–4256, 2005.
- [3] P.-G. DE GENNES : Guidage d’une microgoutte par un faisceau laser. *C.R. Physique*, 6:1149–1152, 2005.
- [4] J. J. LEE, H. MOON, J. FOWLER, T. SCHOELLHAMMER et C.J. KIM : Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. *Sensors and Actuators A*, 95:259–268, 2002.
- [5] C. VAUCHIER et Y. FOUILLET : Microfluidics and integration. *LETI Annual review*, 2003.
- [6] Phil PAIK, Vamsee K. PAMULA et Richard B. FAIR : Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems. *Lab On Chip*, 3:253–259, 2003.
- [7] F. CARON, J. CARLIER, S. ARSCOTT, V. THOMY, J.-C. FOURIER, J.-C. CAMART, P. TABOURIER et C. DRUON : Déplacement de microvolumes de liquides dans des microsystèmes à vocation biologique. Congrès Français de Mécanique, Nice, France, 2003.
- [8] J.R. MILLMAN, K.H. BHATT, B.G. PREVO et O.D. VELEV : Anisotropic particle synthesis in dielectrophoretically controlled microdroplet reactors. *Nature Materials*, 4:98–102, 2004.
- [9] U. LEHMANN, S. HADJIDJ, V.K. PARASHAR, A. RIDA et M. GIJS : Two dimensional magnetic manipulation of microdroplets on a chip. Proc. of Transducers’05, pages 77–80, Seoul, South Korea, 2005.
- [10] Leprevost JEAN-CHRISTOPHE : *Mélange laminaire dans des écoulements bidimensionnels périodiques et tridimensionnels ouverts*. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, FRANCE, 2000.
- [11] Abraham LEE, Asuncion LEMOFF et Robin MILES : Magnetohydrodynamic (mhd) driven droplet mixer. *WO 03/078040 A1*, 2003.
- [12] Achim WIXFORTH : Acoustically driven planar microfluidics. *Superlattices and Microstructures*, 33:389–396, 2003.

- [13] S. DANIEL, M.K. CHAUDHURY et P.-G. DE GENNES : Vibration-actuated drop motion on surfaces for batch microfluidic processes. *Langmuir*, 21:4240–4248, 2005.
- [14] Yiqi LUO, Fang YU et Richard N. ZARE : Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab on Chip*, 8:694–700, 2008.
- [15] Sriram NATARAJAN, Andrew HATCH, David G. MYSZKA et Bruce K. GALE : Optimal conditions for protein array deposition using continuous flow. *Analytical chemistry*, 80:8561–8567, 2008.
- [16] L. MALIC, T. VERES et M. TABRIZIAN : Biochip functionalization using electrowetting-on dielectric digital microfluidics for surface plasmon resonance imaging detection of dna hybridization. *Biosens Bioelectron*, 24:2218–2224, 2009.
- [17] G. KRISHNAMOORTHY, E. T. CARLEN, D. KOHLHEYER, R. B. M. SCHASFOORT et A. van den BERG : Integrated electrokinetic sample focusing and surface plasmon resonance imaging system for measuring biomolecular interactions. *Anal. Chem.*, 81:1957–1963, 2009.
- [18] Alan RENAUDIN, Vincent CHABOT, Etienne GRONDIN, Vincent AIMEZ et Paul G. CHARETTE : Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (saw) and surface plasmon resonance (spr) on a common substrate. *Lab Chip*, 10:111–115, 2010.
- [19] G. D. MEYER, J. M. Mor' an MIRABAL, D. W. BRANCH et H. G. CRAIGHEAD : Nonspecific binding removal from protein microarrays using thickness shear mode resonators. *IEEE Sensors journal*, 6:254–261, 2006.
- [20] S. CULAR, D. W. BRANCH, V. R. BHETHANABOTLA, G. D. MEYER et H. G. CRAIGHEAD : Removal of nonspecifically bound proteins on microarrays using surface acoustic waves. *IEEE Sensors journal*, 8:314–320, 2008.
- [21] J. SCORTESSE : *Moteurs et micro moteurs piézoélectriques : Réalisation, étude de matériaux électroactifs. Transport de liquides*. Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 2001.
- [22] S. ALZUAGA : *Manipulation de gouttes de liquides par des méthodes acoustiques*. Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 2004.
- [23] K MOSBACH : *Methods in Enzymology : Immobilized Enzymes*. Academic Press, 1976.
- [24] Simona SCARANO, Marco MASCINIA, Anthony P.F. TURNER et Maria MINUNNIA : Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 25:957–966, 2010.
- [25] S.C. TERRY : *A gas chromatographic air analyser fabricated on silicon wafer using integrated circuit technology*. Thèse de doctorat, Stanford University, 1975.
- [26] A. MANZ, N. GRABER et H.M. WIDMER : Miniaturized total chemical analysis systems : a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B*, 1:244–248, 1990.
- [27] D.R. REYES, D. LOSSIFIDIS, P.A. AUROUX et A. MANZ : Micro total analysis system : Introduction, theory and technology. *Anal. Chem.*, 74:2623–2636, 2002.
- [28] S. K. CHO, H. MOON et C.J. KIM : Creating, transporting, cutting and merging of liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. *J. Microelectromech. Systems*, 12:70–80, 2003.

- 
- [29] E. B. DUSSAN : On the spreading of liquids on solid surfaces : Static and dynamic contact lines. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 371-400:1979, 11.
- [30] M.G. LIPPMANN : Relations entre les phénomènes électriques et capillaires. *Ann. Chim. Phys.*, 5:494–549, 1875.
- [31] H. MOON, S.K. CHO, R.L. GARRELL et C.J. KIM : Low voltage electrowetting-on-dielectric. *J. Appl. Phys.*, 92:4080–4087, 2002.
- [32] S.K. CHO, H. MOON et C.-J. KIM : Creating, transporting, cutting and merging liquid droplets by electrowetting based actuation for digital microfluidic circuits. *J. Microelectromechanical Systems*, 12:70–80, 2003.
- [33] T.B. JONES, M. GUNJI et M. WASHIZU : Dielectrophoretic liquid actuation and nanodroplet formation. *J. Appl. Phys.*, 89:1441–1448, 2001.
- [34] T.B. JONES : Frequency-based relationship of electrowetting and dielectrophoretic liquid microactuation. *Langmuir*, 19:7646–7651, 2003.
- [35] J. CARLIER, F. CARON, C. DRUON, P. TABOURIER, J.-C. CAMART et J.-P. LE PESANT : Transport diélectrophorétique de microgouttes pour un lab-on-chip à vocation biologique. Colloque d'Hydrotechnique - Microfluidique, pages 275–282, Toulouse, France, 2002.
- [36] T.B. JONES : On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting. *Langmuir*, 18:4437–4443, 2002.
- [37] R. AHMED, D. HSU, C. BAILEY et T.B. JONES : Dispensing picoliter droplets using dielectrophoretic (dep) micro-actuation. *Microscale Thermophysical Engineering*, 8:271–283, 2004.
- [38] M. SHIKIDA, K. INOUCHY, H. HONDA et K SATO : Magnetic handling of droplet in micro chemical analysis system utilizing surface tension and wettability. Tech. Digest, IEEE MEMS'04, pages 359–362, Maastricht, Netherlands, 2004.
- [39] Wesley Le Mars NYBORG : *Physical acoustics "Principles and Methods"*. Academic Press, 1965.
- [40] J SCORTESSE, JF MANCEAU et F. BASTIEN : Displacement of droplets on a vibrating structure. *Ultrasonics.*, 40:349–53, 2002.
- [41] S. DANIEL, J. SIRCAR, S. and Gillem et M.K. CHAUDHURY : Ratcheting motion of liquid drops on gradient surfaces. *Langmuir*, 20:4085–4092, 2004.
- [42] E. L. SCHMID, T. A. KELLER, Z. DIENES et H. VOGEL : Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Anal. Chem.*, 69:1979–1985, 1997.
- [43] S NATARAJAN, PS KATSAMBA, A MILES, J ECKMAN, GA PAPALIA, RL RICH, BK GALE et DG MYSZKA : Continuous-flow microfluidic printing of proteins for array-based applications including surface plasmon resonance imaging. *Analytical Biochemistry*, 373:141–146, 2008.
- [44] Qun WAN et A.V. KUZNETSOV : Numerical study of the efficiency of acoustic streaming for enhancing heat transfer between two parallel beams. *Flow, Turbulence and Combustion*, 70:89–114, 2003.

- [45] Stéphane BEWERSI : *Actionneurs ultrasonores : Application de nouveaux principes utilisant des ondes quasi-progressives à la réalisation de micro-moteurs. Etude de l'interaction avec des liquides.* 1998.
- [46] S. ALZUAGA : *Manipulation de gouttes de liquides par des méthodes acoustiques.* Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 2004.
- [47] Jonathan BENNÈS : *Etude réalisation et caractérisation de microsystèmes pour la manipulation des liquides.* Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, 2006.
- [48] J.-F. MANCEAU : *Miniaturisation des actionneurs piézoélectriques à ondes progressives.* Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 1996.
- [49] S. BIWERSI : *Actionneurs ultrasonores : Application de nouveaux principes utilisant des ondes quasi-progressives à la réalisation de micro-moteurs. Étude de l'interaction avec des liquides.* Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 1998.
- [50] F. BASTIEN, S. BIWERSI et J.-F. MANCEAU : Actionneur ultrasonore pour le déplacement de gouttelettes de liquides ou de matériaux pulvérulents. Brevet Français, demande n° 98/02351, février 1998.
- [51] S. ALZUAGA, J.-F. MANCEAU et F. BASTIEN : Motion of droplets on solid surface using acoustic radiation pressure. *J. Sound and Vibration*, 282:151–162, 2005.
- [52] R. YAHIAOUI : *Etude par microvibrrométrie de films minces et de dispositifs micromécaniques.* Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, 2002.
- [53] J. JONSMANN et S. BOUWSTRA : On the resonant frequencies of membranes. *In MME '95.*, pages 225–229, 1995.
- [54] J. SCORTESSE : *Moteurs et micro moteurs piézoélectriques : Réalisation, étude de matériaux électroactifs. Transport de liquides.* Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 2001.
- [55] D. BEYSSEN : *Conception, étude et réalisation de micro-capteurs et micro-actionneurs chimiques et biologiques à base de dispositifs à ondes acoustiques de surface.* Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré Nancy-I, 2006.
- [56] P. VAINSHTEIN : Rayleigh streaming at large reynolds number and its effect on shear flow. *J. Fluid Mech.*, 285:249–264, 1995.
- [57] Lord RALEIGH : On the circulations of air observed in kundt' tubes and on some allied acoustical problems. *Philos. Trans. Roy. Soc.*, A175:1–71, 1884.
- [58] P.J. WESTERWELT : The theory of steady state rotational flow generated by sound field. *J. Acoustic. Soc.*, 25:60–67, 1953.
- [59] W.L. NYBORG : Acoustic streaming due to attenuated plane wave. *J. Acoustic. Soc. Amer.*, 25:68–75, 1953.
- [60] W.L. NYBORG : Acoustic streaming near a boundary. *J. Acoustic. Soc. Amer.*, 30:329–339, 1958.
- [61] H. SCHLICHTING : *Boundary-Layer Theory.* McCraw-Hill, New York, 1955.

- 
- [62] J. LIGHTHILL : Acoustic streaming. *J. Sound Vibration*, 61:391–418, 1978.
- [63] J.T. STUART : Double boundary layers in oscillating viscous flow. *J. Fluid Mech.*, 24:673–687, 1966.
- [64] B.J. DAVIDSON et N. RILEY : Jets induced by oscillating motion. *J. fluid Mech.*, 53:287–303, 1972.
- [65] P.W. DUCK et F.T. SMITH : Steady streaming induced between oscillating cylinders. *J. Fluid Mech.*, 91:93–110, 1979.
- [66] C.Y. WANG : Acoustic streaming on a sphere near an unsteady source. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 71:580–584, 1982.
- [67] N. AMIN et N. RILEY : Streaming from a sphere due to pulsating source. *J. Fluid Mech.*, 210:459–473, 1990.
- [68] C.P. LEE et T.G. WANG : Near-boundary streaming around small sphere due to two orthogonal standing waves. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 85:1081–1088, 1989.
- [69] P. VAINSHTEIN, M. FICHMAN et D. PNUELI : Secondary streaming in a narrow cell caused by a vibrating wall. *J. Soud Vibration*, 180:529–537, 1995.
- [70] T.W. SECOMB : Flow in channel with pulsating walls. *J. Fluid Mech.*, 88:273–288, 1978.
- [71] C.E. BRADLEY : Acoustic streaming field structure, the influence of the radiator. *J. Acous. Soc. Am.*, 100:1399–1408, 1996.
- [72] Q. WAN : *Numerical and Theoretical Analysis of Beam Vibration Induced Acoustic Streaming and the Associated Heat Transfer*. Thèse de doctorat, Graduate Faculty of North Carolina State University, 2003.
- [73] D. GIVOLI : Non-reflecting boundary conditions. *J. Comput. Phys.*, 94:1–29., 1991.
- [74] J.-P. BERENGER : A perfectly matched layer for the absorption of electromagnetic waves. *J. Comput. Phys.*, 114:185–200, 1994.
- [75] A. KHELIF, S. MOHAMMADI, A. A. EFTEKHAR, A. ADIBI et B. AOUBIZA : Acoustic confinement and waveguiding with a line-defect structure in phononic crystal slabs. *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, 108:084515, 2010.
- [76] Ahmad MOSHAI, Rasool SADIGHI-BONABI et Mohammad TAEIBI-RAHNI : Effects of bulk viscosity in non-linear bubble dynamics. *Journal of physics : condensed matter*, 16:1687–1694, 2004.
- [77] R.T. BEYER : *Non linear acoustics*. Physical Acoustics, vol 2B, W. P. Mason, Academic, New York, 1965.
- [78] D. A. CHANG-YEN, David G. MYSZKA et B. K. J. GALE. : Journal of microelectromechanical systems. *A novel PDMS microfluidic spotter for fabrication of protein chips and microarrays*, 15:1145–1151, 2006.

- [79] M.A. EDDINGS, A.R. MILES, J.W. ECKMAN, J. KIM, R.L. RICH, B.K. GALE et D.G. MYSZKA : Improved continuous-flow print head for micro-array deposition. *Anal. Biochem.*, 382:55–59, 2008.
- [80] A. L. GHINDILIS, P. ATANASOV, M. WILKINS et E. WILKINS : Immunosensors electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosens. Bioelectron.*, 13:113–131, 1998.
- [81] L. C. CLARK et C. LYONS : Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 45:102–129, 1962.
- [82] Anthony P. F. TURNER, Isao KARUBE et George S. WILSON : *Biosensors : Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 1987.
- [83] Frieder SCHELLER et Florian SCHUBERT : *Biosensors*. Elsevier, 1990.
- [84] L. BLUM et COULET : *Biosensors : Principles and Applications*. Marcel Dekker, 1991.
- [85] M. COMTAT : Quelques exemples d'applications du transfert d' électrons entre des conducteurs électroniques et des biomolécules. *JOURNAL DE PHYSIQUE IV Colloque Cl, supplément au Journal de Physique III*, 4:185–196, 1994.
- [86] P. PLESS, K. FUTSCHIK et E. SCHOPF : Rapid detection of salmonella by means of a new impedance-splitting method. *J. Food Prot.*, 57:369–376, 1994.
- [87] J. R. MARTIN, J. P. CLOAREC et E. SOUTEYRAND : Des mesures d'impédances électrochimiques à la conception de biocapteurs. *In Impédances Electrochimiques*, 1995.
- [88] B. DANIELSSON, L. BUELOW, C. R. LOWE, I. SATOH et K. MOSBACH. : Evaluation of the enzyme thermistor as a specific detector for chromatographic procedures. *Analytical Biochemistry*, 117:84–93, 1981.
- [89] E. GIZELI, M. LILEY, C. LOWE et H. VOGEL : Antibody binding to a functionalized supported lipid layer : a direct acoustic immunosensor. *Anal. Chem.*, 69:4808–4813, 1997.
- [90] Gunter KOVACS et Adrian VENEMA : Theoretical comparison of sensitivities of acoustic shear wave modes for biochemical sensing in liquids. *Appl. Phys. Lett.*, 61:639–641, 1992.
- [91] John HODGSON : Light, angles, action. *Bio Technology*, 12:31 – 35, 1994.
- [92] M. MINUNNI, P. SKLADAL et M. MASCINI : A piezoelectric quartz crystal biosensor as a direct affinity sensor. *Anal. Lett.*, 27:1475, 1994.
- [93] E. STENBERG, B. PERSSON, H. ROOS, C. URBANICZKY et J. COLLOID. : Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Interface Science*, 143:513–526, 1991.
- [94] Emmanuel MAILLART : *Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel*. Thèse de doctorat, Université Paris XI, 2004.
- [95] Lamia EL-FISSI : *Détection et mesure de nanoparticules pour les applications de capteurs en milieu liquide*. Thèse de doctorat, L'UFR Des sciences et techniques de l'université de Franche-Comté, 2009.

- 
- [96] C. CAMPBELL : *Surface Acoustic Wave Devices for Mobile and Wireless Communications*. Application of Modern Acoustics, 1998.
- [97] G. SAUERBREY : Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 155:206, 1959.
- [98] J.-M. FRIEDT, K.H. CHOI, F. FREDERIX et A. J. CAMPITELLI : Combined surface acoustic wave and surface plasmon resonance measurement of collagen and fibrinogen layers. *Biological Physics*, 130:50, 2003.
- [99] J.-M. FRIEDT, K. H. CHOI, F. FREDERIX et A. CAMPITELLI : Simultaneous atomic force microscope and quartz crystal microbalance measurements : Methodology validation using electrodeposition. *Journal of the Electrochemical Society*, 150:229, 2003.
- [100] N. JAFFREZIC, E. SOUTEYRAND, C. MARTELET, S. COSNIER, P. LABBE et C. PIJOLAT : *Les capteurs chimiques*. 1996.
- [101] Jean PHILBERT : *Diffusion et transport de matière dans les solides*. Les éditions de physique, 1985.
- [102] Hugo B. FISCHER, John E. LIST, C. Robert KOH, Jorg IMBERGER et Norman H. BROOKS : *Mixing in Inland and Coastal Waters*. Academic Press, 1979.
- [103] J. CRANK : *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, 1956.
- [104] L. EL FISSI, J.-M. FRIEDT, F. CHÉRIOUX et S. BALLANDRAS : Amine functionalized su-8 layer guiding love mode surface acoustic wave. *Sens. and Act. (B)*, 144:23–26, 2010.
- [105] Y. F. DUFRENE, H. VERMEIREN, J. VANDERLEYDEN et P.G. ROUXHET : Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of azospirillum. *Microbiology*, 142:855–865, 1996.
- [106] N. MOZES et S. LORTAL : X-ray photoelectron spectroscopy and biochemical analysis of the surface of lactobacillus helveticus atc12046. *Microbiology*, 141:11–19, 1995.



## Résumé

Pour fixer en parallèle des milliers de biomolécules (ADN, ARN, protéines, etc.) à la surface des puces à ADN ou à protéines, il faudrait choisir parmi une multitude de méthodes, selon la biomolécule à fixer et la nature du support, elle-même conditionnée par la méthode de détection utilisée. Jusque-là, l'immobilisation de biomolécules sur une puce en utilisant la microfluidique continue présentait l'avantage d'un greffage en mode dynamique. Dans ce mode, les biomolécules sont continuellement transportées, via des microcanaux, à proximité de la puce. La volonté continue d'augmenter le nombre des zones immobilisées nécessite l'emploi de la microfluidique discrète pour cette fonction biologique. En effet, en mode spotting (simple dépôt de gouttes contenant les biomolécules) le nombre de zones immobilisées est uniquement limité par le volume de liquide minimum pouvant être déposé. Cependant, en choisissant cette méthode fluidique, il fallait, jusque là, renoncer à une réaction en mode dynamique : le greffage s'effectue ainsi en mode passif. Ces travaux de thèse présentent une méthode pour créer une dynamique à l'intérieure des gouttes porteuses des biomolécules durant l'opération de greffage moléculaire. Nous avons choisi d'utiliser un générateur de vibration de basse fréquence permettant d'induire simultanément des écoulements dans plusieurs gouttes. De la conception, la réalisation et la caractérisation des générateurs de vibration à la caractérisation et la modélisation de l'écoulement induit par ce dispositif dans le liquide, ou encore à la caractérisation de l'opération biologique visée, nous démontrons l'efficacité des vibrations basses fréquences dans ce domaine.

**Mot-clés :** Vibration acoustique basse fréquence, Caractérisation thermique Infra Rouge, Optimisation de greffage moléculaire, Micromélangeur goutte, Capteur à onde de surface, Caractérisation SPRi.

---

## Abstract

Development of Lab-On-Chip devices is expected to dramatically change biochemical analyses, allowing notable increase of processing quality and throughput provided the induced chemical reactions are well controlled. In this work, we investigate the impact of local acoustic mixing to promote or accelerate such biochemical reactions, such as antibody grafting on activated surfaces. To do that, we propose an acoustic micromixer using low frequency vibration that generates a parallel mixing in droplet matrix. The present study details on one hand the conception, realization and characterization of the micromixer. On the other hand, it concerns the characterization and modelisation of the generated vibration interaction with droplet. We prove the efficiency of low frequency vibration for drop mixing and its impact on biological reactions.

**Key words :** Low frequency vibration, Droplet matrix micromixer, Infra-red drop imaging, Ab grafting optimization, SAW Ab grafting sensor, SPRi antigenic reaction sensing.