



**HAL**  
open science

# Microfluidique 3D et actionneurs magnétiques : de leur intégration à la préparation d'échantillons biologiques

Marc Fouet

► **To cite this version:**

Marc Fouet. Microfluidique 3D et actionneurs magnétiques : de leur intégration à la préparation d'échantillons biologiques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30036 . tel-01355777v2

**HAL Id: tel-01355777**

**<https://theses.hal.science/tel-01355777v2>**

Submitted on 26 Jun 2017

**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

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

Présentée et soutenue par :

**Marc Fouet**

le mercredi 20 avril 2016

**Titre :**

Microfluidique 3D et actionneurs magnétiques.  
De leur intégration à la préparation d'échantillons biologiques.

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

**Unité de recherche :**

LAAS - CNRS

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Anne - Marie Gué

**Jury :**

Stéphanie Descroix, Rapporteur

Olivier Théodoly, Rapporteur

Aurélien Daynès, Examineur

Pascal Swider, Président



# Remerciements

Une thèse. Ces quelques années sont l'unité de temps à l'échelle d'un projet de recherche, mais une étape capitale au niveau individuel : plus longue que le lycée ou que n'importe quel séjour dans un établissement du supérieur pour ma part. Ces débuts dans le monde de la recherche ont été riches et bénéfiques, scientifiquement et humainement. Si je me suis autant épanoui, instruit et amusé pendant ces années, c'est avant tout grâce aux personnes que j'ai pu rencontrer et à un environnement exceptionnel.

Le laboratoire qui m'a accueilli pour cette thèse, le LAAS, avec Jean Arlat à la barre, a toujours réuni des conditions idéales pour le travail (grande interdisciplinarité, équipement récent et de qualité) mais aussi pour le reste. C'est particulièrement vrai au sein de notre grand thème-équipe N2I/N2IS, à la tête desquels se sont succédés Carole Rossi, Jean-Yves Fourniol et Georges Landa. La diversité des membres et des sujets de recherche ont participé à la richesse de nos échanges, au laboratoire comme à l'extérieur.

C'est à Anne-Marie Gué que je dois mes premiers pas dans la recherche. Elle m'a accordé sa confiance en tant que stagiaire et plus tard en tant que thésard. Tout en étant habile dans l'équilibre de ses fonctions de direction et vice-direction (de recherches et du laboratoire respectivement), elle a toujours été disponible et à l'écoute. Sa vue d'ensemble et ses conseils ont souvent été utiles, et quand les résultats ou manuscrit tardaient à arriver, elle n'a jamais cessé d'employer une de ses plus grandes qualités : la patience ! Par ailleurs Anne-Marie m'a proposé de participer à plusieurs séminaires et conférences, dont certaines assez loin, j'ai adoré participer à ces missions, partager de belles expériences et j'en garderai d'excellents souvenirs.

Stéphanie Descroix et Olivier Théodoly ont vaillamment accepté, malgré de fortes contraintes de temps, d'évaluer le travail de thèse et mon manuscrit en étant rapporteurs. Aurélien Daynès et Pascal Swider ont également accepté de faire partie du jury. Les retours que j'ai obtenus ont été utiles, m'ont permis de prendre du recul, et j'ai au final vraiment apprécié notre interaction.

La transmission de connaissances et de techniques est fondamentale en début de thèse, notamment lorsque le projet s'inscrit dans la continuité d'autres travaux. Sébastien Cargou, précédent doctorant d'Anne-Marie Gué, a su prendre le temps pour me former et m'inculquer son amour de la paillasse propre. Son énergie, son originalité et ses talents culinaires étaient toujours les bienvenus. Rémi Courson, orfèvre en microtechnologies, a été mon mentor en

## Remerciements

---

salle blanche. J'ai beaucoup appris de lui, et sans son travail ou ses conseils, cette thèse n'existerait pas. Je regretterai sa jovialité et les débuts de découpage de films secs au scalpel. . .

Le projet de recherche dans lequel s'inscrivait cette thèse, Digidiag, a permis plusieurs collaborations et échanges intéressants et fructueux, entre autres avec nos partenaires du laboratoire PharmaDev (IRD, Toulouse) : Rémi Manczak, Thi Thu Vu, Karine Reybier et Jan Sudor.

Une partie conséquente de la thèse est consacrée à la fabrication de puces microfluidiques, le LAAS est doté d'une plateforme de microtechnologies bien équipée, et l'aide du service TEAM a été capitale. Plus spécifiquement, nos puces n'auraient pu voir le jour sans l'aide de Véronique Conédéra, pour ses nombreux conseils, ainsi que Laurent Mazon et Adrian Laborde (photolithographie), David Bourrier et Sylviane Baster (croissances électrolytiques), Ludovic Salvagnac et Guillaume Libaude (métallisations), Pierre-François Calmon et Vinciane Luque (conception des masques), Fabien Mesnilgrante (traitements de surface), David Colin et Samuel Charlot (découpe des puces et conseils d'intégration) et enfin Benjamin Reig (formation au MEB et caractérisation).

Afin de caractériser les puces et mettre en place les expériences, j'ai également pu bénéficier du soutien formidable de Charline Blatché (qui m'a initié à la culture cellulaire - et à mettre ma blouse), Sandrine Assie-Souleille, et Nicolas Mauran. Tous les chefs-d'œuvre mécaniques (supports de puce) et les idées associées ont été fournis par Xavier Dollat. La réalisation d'une carte électronique (contrôle en courant) a été nécessaire pendant la thèse, j'ai reçu l'aide précieuse de Christophe Escriba et Fabrice Mathieu (conception et composants), de Daniel Médale (routage), et de Xavier Bouquet (placements, soudures).

Bien évidemment l'expérience de la thèse passe aussi par les interactions quotidiennes, en premier lieu avec notre géniale équipe de microfluidiciens. Les discussions avec Aurélien Bancaud, de sciences ou d'autres, m'ont fait réfléchir, m'ont motivé, elles vont me manquer. Aurélien échange librement sur ses travaux (c'est agréable!), et m'a permis de participer à certains. Il a contribué à améliorer ma vision globale de la recherche dans le vivant, et m'a indiqué des pistes intéressantes pour des post-doc, son aide fut précieuse. Le travail avec Pierre Joseph a également été une chance, Pierre s'est toujours montré disponible malgré un emploi du temps chargé et les contraintes géographiques, et au delà du travail qui fut intéressant et fructueux, je garde de très bons souvenirs de tous les moments passés ensemble.

Maud Mader, incarnation du rock et du chic dans la recherche, a accepté que l'on publie nos travaux ensemble et m'a donné un sacré coup de pouce, je n'oublierai pas! J'aurai bien sûr plaisir à me rappeler tous mes collègues et amis qui ont su rendre ces années joyeuses et faciles : Sébastien Méance (camarade et bible informatique, j'espère que la cohabitation n'a pas été trop longue ;), Vincent Picot (ton humour m'a souvent dépassé, mais il me manque), Stéphane Pinon (qui prépare le monde de demain), Hubert Ranchon (mon modèle), Loïc Recoules (champion DTC... bonne chance au pays des caribous), Ana Trapaidze (toujours courageuse et très amicale :), Joris Lacroix (qui m'a trop souvent laissé gagné au foot en ligne), Antoine Naillon (mon deuxième modèle :), Rémi Malbec (manipule l'ADN aussi bien que

les balles de tennis ;), Marius Socol (sait élever des poules et le degré de connaissances des personnes l'entourant, dans l'humour et la gentillesse), Sandrine Pélofy (le savoir faire du 2 couleurs repose sur toi i, Cyril Renault-Sentenac (sait donner le rythme à un match de ping-pong ;), Clément Roux (toujours aussi cool et curieux), Catherine Afatsawo (katie katoche... stagiaire princesse ;), Sabri Iraïn (joyeux sportif), Amel Zedek (adorable, tu amènes un peu de douceur dans ce monde féroce), Amani Migaou (tu fais équipe avec Amel!), Zineb Yanha (qui après m'avoir supporté des mois nous amenais quand même des cornes de gazelles succulentes), Otman Maalal (aussi sympa que discret), et le dernier arrivé Vassilios Tastsidis (good luck and enjoy your microfluidics experience).

Bien que la microfluidique ait été au coeur de mes activités, il y avait heureusement de formidables personnes au laboratoire pour me faire découvrir d'autres facettes de la recherche et varier les discussions! Anne Hemeryck et Marie Brut ont toujours œuvré pour la bonne ambiance, l'organisation des réunions, la vie du groupe vous doit beaucoup. Si j'ai aussi bien été accueilli dans cette équipe, c'est aussi grâce à Cloé Lanthony (on a fini de boire ton héritage), Jean-Marie Ducéré (une autre encyclopédie vivante... à quand la création d'un statut de mi-permanent ? ;), Guillaume Taton (Monsieur génial ;), Medhi Bahrami (le mystérieux!), Adrien Ramond (sait mieux faire du roller que son sosie Robert Downey Jr.), Ludovic Glavier (Monsieur parfait ? aussi dévoué pour ses collègues que pour réussir son swing), Théo Calais (interprète hors pair pour mes blagues incomprises), Mathilde Guiltat (top chef pâtissière), Sabeha Zedek (rayonnante et assidue sur la glace :), Wenli Chen (souvent débordante d'énergie et d'humour, tu m'as bien sauvé pour mon pot de thèse!). Je repense aussi à Vincent, Lorena, Andrea, Nicolas, André, Mahamadou, Marie, Pattamonn, Ying Ning, Jean... être exhaustif me serait bien impossible.

Je vous remercie tous d'avoir créé ces conditions idéales, et ces nombreux souvenirs qui vont m'accompagner longtemps j'espère.

L'essence de ma motivation, ce sont mes proches qui me l'apportent au quotidien. Qu'ils soient à Toulouse, à Paris, à Singapour, à Boston, en Californie ou ailleurs, je tiens à remercier mes amis pour tous les moments (parfois trop courts) passés ensemble et pour leurs encouragements. Merci infiniment à ma famille qui a toujours été là pour moi. À ma sœur, qui m'a si souvent montré le chemin, et à mes parents, qui nous ont consacré tant de temps et d'énergie, et encouragé à faire ce que l'on aime : merci pour votre soutien et votre amour. Finally I want to thank Christy, who supported me every day despite the distance, made my life happier, more exciting, and keeps motivating me.

*Toulouse, Avril 2016*

Marc



# Abstract

Microfluidic chips are key elements for solutions and biological samples handling and analysis. They are enablers for micro-scale studies and are the cornerstone of lab on chips, at the cutting edge of medical diagnostics. The aim of this thesis work was to explore functional possibilities offered by 3D microfluidic architectures for the development of diagnostic tools relying on cell sorting, tagging and handling. These functions were investigated on monocytes subpopulations, which are markers for many inflammatory diseases. In order to cover a consistent series of necessary steps for complex biological samples pretreatment, three additional functions were studied : size sorting with hydrodynamic filtration, immuno-isolation by magnetic separation, and on-chip tagging with magnetic microparticles. To perform tagging reactions, a micromixer based on diffusion and flow split and recombination (baker's transform) was fabricated and characterized. Analytical (diffusion) and numerical (diffusion-advection) models are showed, together with test experiments on the devices for mixing reactions of fluorescein/-water and cells/microbeads. New approaches of hydrodynamic filtration based size sorting were investigated by devising 3D bypass structures, that allow developing a mixing strategy (tagging reactions) suited to cells and particles. An analytical model for flows and sorting efficiency is introduced and compared to the devices characterization. Furthermore, it was shown that this approach also enables sorting of sub-micron particles (like blood microparticles). All 3D microfluidic systems were obtained thanks to an original dry film photoresist stacking (lamination) technique, dramatically reducing micro-fabrication time, even though compatible with standard process. This fabrication technique also enables magnetic micro-sources integration in lab on chips by realizing planar micro-coils underneath microfluidic channels. By coupling the effects of integrated micro-coils to the fields generated by external magnets, we brought the proof of concept of systems dedicated to trapping, focusing and separating (in flow) magnetic microbeads. Models (magnetic fields and forces) are described along with devices characterization. Conception of specific instrumentation (current source) for micro-coils actuation is also shown, as it allows time and intensity control over applied magnetic fields.

Key words :

3D Microfluidics - Dry film - Cell sorting - Magnetophoresis - Hydrodynamic separation





# Résumé

Les puces microfluidiques sont des éléments clés pour la manipulation et l'analyse de solutions et d'échantillons biologiques. Elles facilitent les études aux échelles microscopiques et sont le fondement du concept de laboratoire sur puce, à la pointe des diagnostics médicaux. L'objectif de ces travaux de thèse a été d'explorer les possibilités fonctionnelles offertes par les architectures microfluidiques 3D, dans le cadre du développement d'outils diagnostiques reposant sur le tri, le marquage et la manipulation de cellules. Ces fonctions ont été validées sur des sous-populations de monocytes, qui sont des marqueurs de maladies inflammatoires. Afin de couvrir une chaîne cohérente d'étapes nécessaires au prétraitement des échantillons biologiques complexes, trois fonctions complémentaires ont été étudiées : le tri par taille par filtration hydrodynamique, le tri immunologique par séparation magnétique et le marquage sur puce par microparticules magnétiques. En vue d'effectuer des réactions de marquage (sondes fluorescentes ou microbilles magnétiques), un micro-mélangeur reposant sur la séparation et recombinaison de flux (transformation du boulanger) a été fabriqué et caractérisé. Des expériences de test des dispositifs pour les mélanges fluorescéine/eau et cellules/microbilles sont proposées, ainsi que les modèles analytiques et numériques associés. De nouvelles approches de tri par taille par filtration hydrodynamique ont été étudiées, en réalisant des structures 3D en "bypass", qui rendent possible une stratégie de mélange adaptée aux cellules et particules. Un modèle analytique des écoulements et de l'efficacité de tri et de mélange est proposé, ainsi qu'une caractérisation des dispositifs. Il a été démontré que cette approche permettait également de réaliser la séparation d'espèces sub-micrométriques comme les microparticules sanguines. Tous les systèmes microfluidiques 3D ont été obtenus par une technique originale d'empilement (laminage) de films secs photosensibles, réduisant nettement le temps de micro-fabrication et compatibles avec les procédés standards. Cette technique de fabrication permet également l'intégration de micro-sources magnétiques dans les laboratoires sur puce par la réalisation de micro-bobines planaires sous des canaux microfluidiques. En couplant les effets des micro-bobines intégrées aux champs générés par des aimants extérieurs, nous apportons la preuve de concept de systèmes pour la séparation, la déviation et le piégeage de microbilles magnétiques. Les modèles (champs et force magnétiques) et la caractérisation des dispositifs seront présentés. Nous aborderons également la réalisation d'instrumentation spécifique (source de courant) pour l'actionnement des bobines, permettant le contrôle (temporel et en intensité) des champs magnétiques appliqués.

Mots clefs :

Microfluidique 3D - Film sec - Tri cellulaire - Magnétophorèse - Séparation hydrodynamique



# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Résumé (Anglais/Français)</b>	<b>v</b>
<b>1 Introduction et contexte de l'étude</b>	<b>1</b>
1.1 Motivations . . . . .	1
1.2 Objectifs de la thèse . . . . .	2
1.2.1 Projet de recherche . . . . .	2
1.2.2 Résumé des activités . . . . .	3
1.3 État de l'art . . . . .	4
1.3.1 La diversité de l'outil microfluidique . . . . .	4
1.3.2 Tri cellulaire et mélange . . . . .	5
1.3.2.1 Techniques actives . . . . .	6
1.3.2.2 Techniques passives . . . . .	7
1.3.2.3 Mélange de particules . . . . .	11
1.3.3 Technologies pour une architecture 3D . . . . .	18
1.3.3.1 Les géométries en microfluidique . . . . .	18
1.3.3.2 Procédés . . . . .	19
1.3.4 Connexions et interfaces en microfluidique . . . . .	27
1.3.4.1 Architecture . . . . .	28
1.3.4.2 Connexions fluidiques . . . . .	29
1.3.4.3 Connexions électriques . . . . .	31
1.3.5 Magnéto-microfluidique . . . . .	34
1.3.5.1 Actionnement magnétique : matériaux et force . . . . .	34
1.3.5.2 Différentes approches pour les systèmes . . . . .	39
1.3.6 Vers une application biologique . . . . .	53
1.3.6.1 Les monocytes : cellules du système immunitaire . . . . .	53
1.3.6.2 Différentes sous-populations de monocytes . . . . .	54
1.4 Conclusion . . . . .	58
<b>2 La microfluidique 3D pour la préparation d'échantillons</b>	<b>63</b>
2.1 Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D . . . . .	63
2.1.1 Principe et étude numérique . . . . .	64
2.1.1.1 Principe . . . . .	64
2.1.1.2 Première approximation . . . . .	65
2.1.1.3 Modèle simplifié, diffusion 1D . . . . .	67

2.1.1.4	Éléments finis . . . . .	71
2.1.2	Approche expérimentale . . . . .	73
2.1.2.1	Design des dispositifs . . . . .	73
2.1.2.2	Tests de mélange . . . . .	75
2.2	Tri de particules par taille . . . . .	79
2.2.1	Principe et modèle . . . . .	79
2.2.2	Approche expérimentale . . . . .	83
2.3	Opérations sur des particules avec une structure en bypass . . . . .	89
2.3.1	Principe . . . . .	89
2.3.2	Designs . . . . .	94
2.3.3	Approche expérimentale et résultats . . . . .	96
2.4	Microfabrication de dispositifs 3D . . . . .	102
2.4.1	Procédé de fabrication . . . . .	102
2.4.2	Films photosensibles . . . . .	104
2.4.2.1	SU-8 . . . . .	104
2.4.2.2	TMMF . . . . .	107
2.4.2.3	DF . . . . .	108
2.4.3	Structures multi-niveaux : limitations spécifiques et solutions . . . . .	111
2.4.3.1	Laminage . . . . .	111
2.4.3.2	PEB : une étape critique . . . . .	111
2.4.3.3	Conclusion . . . . .	113
2.5	Mise en œuvre des dispositifs et instrumentation associée . . . . .	116
2.5.1	Visualisation - Microscopie de fluorescence . . . . .	116
2.5.2	Marquage de cellules . . . . .	119
2.5.3	Microfluidique . . . . .	121
2.5.3.1	Connexion des puces . . . . .	121
2.5.3.2	Remplissage . . . . .	123
2.6	Conclusion . . . . .	127
<b>3</b>	<b>Systèmes microfluidiques et actionnement magnétique</b>	<b>129</b>
3.1	Introduction . . . . .	130
3.1.1	Force magnétique . . . . .	130
3.1.1.1	Calculs par méthode des éléments finis . . . . .	131
3.1.1.2	Calculs analytiques . . . . .	132
3.1.2	Calculs de trajectoires . . . . .	137
3.1.3	Thermique . . . . .	138
3.2	Électro-aimants filaires . . . . .	139
3.2.1	Principe des dispositifs hybrides . . . . .	139
3.2.2	Focalisation magnétique . . . . .	141
3.2.3	Pièges adressables . . . . .	146
3.3	Microbobines spirales . . . . .	149
3.3.1	Tri vertical . . . . .	149
3.3.2	Système d'aiguillage (hybride) . . . . .	151
3.4	Microfabrication . . . . .	154

---

3.4.1	Procédé de fabrication . . . . .	154
3.4.1.1	Bobines filaires . . . . .	155
3.4.1.2	Bobines spirales . . . . .	156
3.4.2	Caractérisation . . . . .	159
3.4.2.1	Bobines filaires . . . . .	163
3.4.2.2	Bobines spirales . . . . .	163
3.5	Montages expérimentaux et intégration . . . . .	166
3.5.1	Intégration et support de puce . . . . .	166
3.5.2	Alimentation des bobines . . . . .	169
3.5.3	Sédimentation . . . . .	173
3.6	Conclusion . . . . .	176
	<b>Conclusion</b>	<b>179</b>
	<b>Abréviations</b>	<b>183</b>
	<b>A Compléments d'introduction</b>	<b>185</b>
A.1	Tri cellulaire classique . . . . .	185
	<b>B Écoulements et diffusion en microcanaux</b>	<b>189</b>
B.1	Profils de vitesse . . . . .	189
B.1.1	Écoulement dans un cylindre . . . . .	189
B.1.2	Écoulement dans un canal de section rectangulaire . . . . .	191
B.2	Diffusion 1D dans un micromélangeur . . . . .	195
	<b>C Calculs de force magnétique</b>	<b>199</b>
C.1	Expression de la force magnétique . . . . .	199
	<b>D Instrumentation</b>	<b>201</b>
D.1	Plan de la carte électronique de contrôle d'intensité . . . . .	201
	<b>Bibliographie</b>	<b>217</b>



# 1

## Introduction et contexte de l'étude

### 1.1 Motivations

La vie en société a permis aux Hommes d'étendre leur influence et leur communication. Les outils disponibles (éducation, production, divertissement) sont nombreux, mais les besoins individuels et sociétaux demeurent et évoluent. L'amélioration des technologies existantes est un objectif constant (on peut citer la puissance de calcul accrue pour l'informatique, l'augmentation des rendements pour les transports et la production d'énergie, ou encore la portabilité de la plupart des équipements...). La société a donc besoin d'agrandir son savoir, et ce pour plusieurs raisons : la première est culturelle (comprendre notre monde), mais aussi pour en tirer des avantages technologiques, et on pourrait éventuellement inclure une raison économique (économie du savoir). Enfin un des piliers actuels de la société est l'accès à la santé, et la bonne gestion des coûts et bénéfices associés. Avec des défis tels que l'allongement de l'espérance de vie, il est primordial d'offrir un système de santé efficace, ce qui inclut notamment des diagnostics précoces, fiables et abordables.

Technologie, savoir, santé : ces noms font partie des missions de la recherche publique. Le fait qu'ils soient intimement liés est une traduction de la complexification des sciences. L'interdisciplinarité - terme certes tendance, mais à juste titre - est on ne peut plus présente sur ces domaines où une approche par plusieurs thématiques est requise.

L'acquisition du savoir en biologie (et donc lié à la santé) a particulièrement bénéficié de la course à la miniaturisation. L'avènement des microscopes au XVII<sup>ème</sup> siècle permettent de découvrir la cellule. La diffraction aux rayons X et la microscopie électronique amènent Watson et Crick à révéler la structure de l'ADN en 1953 (prix Nobel en 1962). Le développement des cytomètres en flux depuis les années 50, puis la commercialisation des premiers trieurs de cellules FACS (Fluorescence-activated cell sorting) dans les années 70 témoignent du contrôle (comptage et manipulation) de la matière vivante à petite échelle...

Aujourd'hui encore, la recherche est très active dans cette direction. Les capillaires (composants de base de l'électrophorèse capillaire et de la cytométrie en flux) ont été miniaturisés et intégrés sur des systèmes dédiés à l'origine à la fabrication de composants micro-électroniques. C'est le début d'un nouveau domaine de recherche, la microfluidique. Une des premières



applications (1979) n'est autre que de la chromatographie en phase gaz, la colonne (habituellement un capillaire) étant gravée dans un wafer de silicium, et intégrée à un capteur [1]. L'essor des MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) à partir des années 70-80 amènera des procédés et connaissances qui bénéficieront au développement de la microfluidique dans les années 1990-2000.

Comment pourrait on définir la microfluidique ? Il s'agit avant tout d'une science, dédiée à l'étude de phénomènes et systèmes incluant des écoulements à l'échelle sub-millimétrique (de manière générale inférieure à 500  $\mu\text{m}$ ). La microfluidique peut également être considérée comme un outil ou un ensemble de techniques. De nombreux systèmes sont qualifiés de microfluidiques, et servent une application particulière : médecine (diagnostic), biologie, chimie analytique... Une des constantes de la discipline est notamment la conception de "laboratoires sur puces", ou encore  $\mu\text{TAS}$  (micro Total Analysis Systems), voués à l'intégration de toutes les étapes d'un processus de préparation d'échantillon et d'analyse sur un microsystème.

Le travail présenté ici s'inscrit dans cette continuité, et traite de la conception d'un système pour le traitement d'échantillons biologiques, essentiellement dirigé sur le tri de cellules avant leur analyse. Une architecture en trois dimensions (microfluidique 3D), ainsi que des actionneurs magnétiques intégrés sont utilisés pour ces fonctions de tri et de piégeage.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes, du Centre National de la Recherche Scientifique (LAAS-CNRS). Le laboratoire, et plus particulièrement le groupe Nano Ingénierie et Intégration des Systèmes (N2IS), possède un savoir faire et un historique certain en ce qui concerne la recherche en micro et nanofluidique.

L'organisation du manuscrit est basée sur trois axes. Tout d'abord sera présenté l'état actuel des techniques et connaissances liées à notre thématique de recherche. On y introduira les fonctions de tri et mélange, la microfluidique 3D, les systèmes magnétofluidiques, les bases de l'intégration des systèmes fluidiques et on détaillera une application biologique pour la validation de notre approche. La deuxième partie traitera du tri et du mélange de particules et cellules, en utilisant la microfluidique 3D. Une troisième partie sera consacrée à la présentation de deux types de systèmes magnétofluidiques, pour le tri et le piégeage de micro-particules magnétiques.

## 1.2 Objectifs de la thèse

### 1.2.1 Projet de recherche

Un des enjeux scientifiques et technologies dans le domaine de la santé est de disposer d'outils diagnostics performants et fiables. Le tri cellulaire est communément utilisé, et permet d'obtenir un grand nombre d'informations. Cette technique, assez versatile, permet (avec les bons marqueurs) d'isoler des pathogènes, de détecter des pathologies (cancer, maladies infectieuses...), ou encore d'analyser des populations cellulaires. La cytométrie en flux représente l'arsenal principal pour réaliser ces tests, mais d'une part requiert de nombreuses opérations

manuelles (peu d'automatisation), et d'autre part reste coûteuse (entre 0.5 et 1 million d'euros pour l'appareil, et plusieurs dizaines de milliers d'euros par an pour le fonctionnement).

Une variété de techniques sont disponibles pour le tri cellulaire, et la microfluidique en propose de nouvelles (détaillées au paragraphe 1.3.2). En outre, les dimensions micrométriques ouvrent la voie aux études de cellules uniques, qui sont une avancée dans l'extraction de certaines propriétés (mécaniques [2], lien génétique-phénotype [3]. . .) et dans la compréhension de mécanismes (cancer [4], réponse immunitaire, environnements dynamiques [5]. . .).

L'utilisation de microbilles magnétiques pour le tri de cellules présente un certain nombre d'avantages, comme une excellente spécificité (précipitation immunologique), la rapidité du tri lorsqu'il est réalisé en batch, ou la polyvalence de la méthode (possibilité de changer de cibles en choisissant d'autres anticorps, de multiplexage avec différents types d'anticorps par bille. . .). L'intégration du tri magnétique en microfluidique présente donc des atouts, et constitue un domaine en expansion (paragraphe 1.3.5).

L'intégration de toutes les fonctions sur une puce microfluidique (de la préparation de l'échantillon à la détection, en passant par le tri) présente des difficultés. De nouvelles méthodes de fabrication, notamment en introduisant une dimension verticale aux dispositifs (microfluidique 3D, 1.3.3), facilitent cette intégration et rendent accessibles des designs originaux, jusque là trop complexes à réaliser.

La recherche entreprise dans le cadre de ces travaux de thèse se positionne donc essentiellement autour de deux problématiques :

- L'amélioration des outils diagnostiques reposant sur le tri de cellules, ainsi que la manipulation de cellules uniques. Un actionnement magnétique (agissant sur des microbilles magnétiques) sera utilisé.
- L'exploration de solutions faisant intervenir des architectures 3D.

Des travaux ont déjà été menés sur ces axes de recherche au LAAS-CNRS. L'environnement technologique (salle blanche, plateforme de caractérisation. . .) y est propice, et des avancées importantes ont eu lieu, des techniques polymères de microfabrication 3D [6] au tri magnétophorétique pour applications biologiques [7, 8]. Cette thèse s'inscrit en continuité des développements précédemment effectués.

Par ailleurs, un modèle d'application biologique (monocytes du sang, 1.3.6) a été proposé par le laboratoire PharmaDev (Institut de Recherche pour le Développement et Faculté de pharmacie de Toulouse). Une collaboration entre PharmaDev et le LAAS donne lieu à une étude sur la partie détection du dispositif (impédancemétrie), celle-ci ne sera pas détaillée ici.

### 1.2.2 Résumé des activités

Une première partie du travail effectué pendant la thèse est axé autour de la préparation d'échantillon en microfluidique. La séparation de particules (sub-microniques et micro-niques) a été abordée en s'associant aux travaux de recherches de M. Mader, S. Irain, P. Joseph et via l'encadrement de stages (Z. Yanha, actuellement en thèse à l'UTC, et O. Maalal). Les

technologies de fabrication 3D par laminage sont appliquées au développement de dispositifs de tri par taille, reposant sur un principe hydrodynamique. Les tailles de tri présentées peuvent avoir pour application la séparation de microparticules sanguines, de nanoparticules, à l'extraction de plasma, cependant une extrapolation à des tailles de tri plus grande est tout à fait envisageable, pour séparer les globules rouges des leucocytes dans un échantillon sanguin par exemple.

Toujours dans le cadre de la préparation d'échantillon, des fonctions de mélange, et plus particulièrement de marquage sont étudiées. Tout d'abord en appliquant une technique de mélange efficace (transformée du boulanger, adaptée à une architecture 3D), au marquage de cellules par des microbilles magnétiques. Ensuite en réalisant une structure originale, qui s'appuie sur le principe de filtration hydrodynamique, et pouvant également être dédiée au marquage de cellules et particules. Un nouveau matériau (film sec DF) est testé puis utilisé pour fabriquer ces structures, montrant ainsi que les techniques de laminage sont pertinentes pour la conception de dispositifs microfluidiques 3D à moindre coûts [9, 10]. Les deux structures (nommées par la suite "mélangeur 3D" et "bypass") sont ensuite intégrées au sein d'un système de tri magnétique avec les mêmes procédés de fabrication.

Enfin la dernière problématique traitée lors de ces travaux de thèse est la séparation et le piégeage de microparticules magnétiques. Ces particules sont en général attachées sélectivement à un certain type de cellules (on cherche ici à séparer et piéger des monocytes). Plusieurs approches sont proposées, à travers l'utilisation de micro actionneurs intégrés (micro-bobines) et leur combinaison avec des aimants permanents (systèmes "hybrides") [11, 12].

### 1.3 État de l'art

#### 1.3.1 La diversité de l'outil microfluidique

Comme tout domaine de recherche en pleine expansion, la microfluidique mobilise de manière intense la communauté scientifique (environ 25000 publications par an depuis 2012<sup>1</sup>). Une diversification et de nombreuses spécialités sont apparues. L'objectif n'est pas ici de donner une vision exhaustive de toute la recherche en microfluidique, mais plutôt un aperçu de certaines spécificités. On peut tenter d'établir une classification de cette recherche avec différents angles.

**Domaine d'application** L'outil microfluidique sert dans des domaines fondamentaux (vérification des lois physiques aux petites échelles, compréhensions de processus biologiques) et applicatifs (détection, réalisation de mélanges et tâches complexes, automatisation...). Des domaines aussi divers que la physique, la chimie, la biologie, la médecine et même l'art sont concernés.

**Type de dispositif** Les puces microfluidiques peuvent incorporer différentes fonctions. On retrouve régulièrement dans la littérature des actionneurs (manipulation d'objets, de particules, de cellules...) et des capteurs (physiques, chimiques, biologiques). Des fonctions de

---

1. Publications comportant le terme "microfluidic\*". Source Google Scholar.

production (gouttes, particules, fils de polymère) ou de calcul existent également.

**Procédés et matériaux** Un des thèmes importants est la fabrication des systèmes fluidiques. Historiquement, la photolithographie (dure, avec des matériaux employés comme le silicium et le verre, ou douce, avec l'utilisation de polymères), venant de l'industrie de la micro-électronique, constituait la base de la fabrication pour la microfluidique. D'autres techniques de microfabrication se sont développées (lamination, roll-embossing, impression 3D), et des matériaux nouveaux apparaissent (microfluidique papier, teflon, laques bio-dégradables). Dans les systèmes commercialisés, des plastiques (PS, PMMA) sont le plus souvent employés, et l'industrie utilise des procédés connus et robustes comme le moulage par injection, la soudure ultrasonique...

**Géométries** Concernant les échelles, nous avons précisé que des canaux sont généralement considérés comme microfluidiques lorsque une des dimensions au moins est inférieure à 500  $\mu\text{m}$ . Un autre gap à considérer est celui du micron, on parle alors de nanofluidique pour des systèmes sub-microniques. En plus des dimensions, les systèmes microfluidiques revêtent différentes géométries. On peut distinguer des systèmes capillaires (avec des diamètres internes avoisinant les 10  $\mu\text{m}$  pour les plus fins), des puces avec des structures et réseaux en 2D, en 3D, mais aussi des laboratoires sur disques dont l'architecture radiale est particulière.

**Actionnement des fluides** Ces dispositifs fluidiques comportent par définition au moins un fluide, qui est a priori en mouvement. L'origine de la mise en mouvement peut être différente selon les systèmes, les plus classiques sont le contrôle en pression, les pousse-seringues, les pompes péristaltiques, les vannes pneumatiques intégrées, une source de tension (flux électro-osmotique, électro-mouillage), la gravité (microfluidique centrifuge), ou encore l'effet de la capillarité (et vannes capillaires associées).

D'autres organisations et sous classifications sont évidemment possibles, mais ce résumé permettra de situer plus facilement l'état de l'art dans différentes catégories que nous abordons par la suite.

#### 1.3.2 Tri cellulaire et mélange

Le tri de cellules est une fonction essentielle pour effectuer un diagnostic ou préparer un échantillon dans cet objectif. Les principales techniques de tri cellulaire en microfluidique seront présentées dans cette partie, nous aborderons également le mélange de particules et de cellules.

Différentes catégorisations des techniques de tri en microfluidique existent dans la littérature. Divers articles de revue proposent par exemple une différenciation selon l'emploi de marqueurs fluorescents, de billes, ou selon si la séparation est effectuée sans marqueur [13]. Yu *et al.* opposent les systèmes habituels (de taille macroscopique) aux outils microfluidiques [14]. Les formats des dispositifs employés peuvent être également différents (puce microfluidique "classique", disque - microfluidique centrifuge - , papier) [15]. Enfin les techniques actives, passives, et combinaisons des deux peuvent être listées [16, 17].

Les méthodes classiques (disponibles hors microfluidique) sont décrites en annexes, partie A.1. L'approche adoptée dans cette partie est de présenter brièvement les techniques actives (champ d'excitation extérieur requis) avant de se focaliser sur les techniques passives et d'aborder pour finir le mélange de particules.

### 1.3.2.1 Techniques actives

Les techniques dites actives nécessitent l'apport d'un champ d'excitation (autre que celui de quantité de mouvement éventuellement fourni par le fluide). Les méthodes magnétiques, électrocinétiques, optiques, acoustiques et mécaniques sont brièvement introduites.

**Magnétiques** Les procédés magnétiques font appel à des nano ou micro particules magnétiques. Ce sont des systèmes basés le plus souvent sur des aimants permanents, des électroaimants et leur combinaison. Nous développons cette présentation dans le paragraphe 1.3.5.

**Électrocinétiques** Sont regroupés sous le terme "électrocinétiques" toutes les méthodes reposant sur l'application d'un champ électrique pour engendrer une séparation de particules ou cellules.

**L'électrophorèse** permet de séparer un corps chargé en appliquant un champ électrique uniforme - une différence de potentiel - (les cellules ou particules, souvent négativement chargées à leur surface, se déplacent vers la cathode).

**La diélectrophorèse** correspond au mouvement d'un corps dans un champ électrique non uniforme, causé par la polarisabilité du corps (particule, cellule...). Un champ alternatif (AC) peut être utilisé pour polariser les objets non chargés (voir Figure 1.1 a-c). Une cellule possédant une perméabilité électrique plus élevée que celle du milieu se dirigera alors vers les régions de forte intensité du champ (et réciproquement).

Des méthodes électrocinétiques peuvent être également employées pour transporter les particules et les cellules à séparer, avec un flux électro-osmotique (mouvement du fluide causé par la migration des ions en solution sous l'influence du champ électrique), ou avec l'électro-mouillage (EWODS), qui permet le déplacement de gouttes, et qui représente une part de l'activité en microfluidique (Figure 1.1 d-e). Cependant ce ne sont pas les propriétés des particules ou des cellules qui sont utilisées avec ces deux dernières techniques, mais celles du fluide porteur.

**Optiques** Une particule (ou une cellule) présente devant un faisceau de lumière diffracte la lumière et engendre une modification de la vitesse des photons formant le faisceau. Cette modification produit une force. Ashkin *et al.* ont montré dès 1986 que ce phénomène peut être utilisé pour réaliser une pince optique [21, 22]. Si la particule possède un indice de réfraction inférieur à celui du milieu, et étant donné le profil d'intensité (en général) gaussien du faisceau de lumière, la force de diffraction compense un déséquilibre d'intensité dans le faisceau et attire ainsi la particule vers le centre (Figure 1.2 c-d). Selon les longueurs d'onde des lasers employés, la puissance et la géométrie, des objets de moins de 100 nm jusque 100  $\mu\text{m}$  peuvent être séparés ou piégés [16].

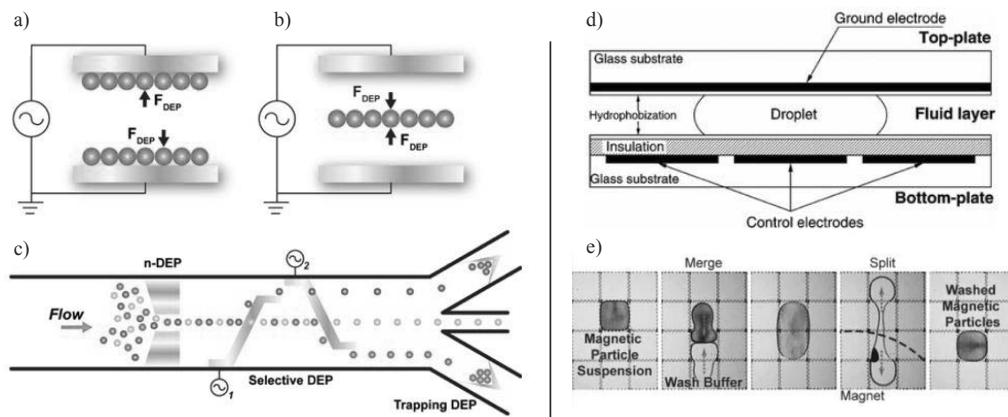


FIGURE 1.1 – Techniques électrocinétiques. a)-c) Principe de la DEP (a) positive et b) négative) et c) exemple d'application (revue du groupe de Di Carlo [18]). d) Dispositif EWOD : lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre les électrodes, la goutte se déplace (Teh *et al.* [19]). e) Exemple d'application : étape de lavage de particules magnétiques lors d'un test immunomagnétique (Ng *et al.* [20]).

D'autres techniques plus complexes sont depuis apparues, elles permettent par exemple de séparer en flux les particules selon leur taille, forme et indice de réfraction (chromatographie optique [23]), de générer des matrices de pièges optiques, ou de coupler la séparation diélectrophorétique avec des matériaux photo-activables.

**Acoustiques** L'acoustofluidique permet la manipulation de particules et cellules en appliquant des ondes acoustiques. Dans la plupart des cas, des ondes stationnaires sont envoyées avec des transducteurs piézoélectriques (Figure 1.2 a-b). La taille, densité et déformabilité des objets sont les critères de séparation. Des particules en latex, particulièrement efficaces pour l'acoustophorèse, peuvent ainsi être accrochées à des cellules (via les bons marqueurs), et remorquer avec elles les cellules aux nœuds de pression.

### 1.3.2.2 Techniques passives

Il est possible, sans faire appel à des champs externes, de séparer des éléments en fonction de leur taille, forme, et propriétés mécaniques et chimiques. Ces techniques dites passives exploitent uniquement l'hydrodynamique (éventuellement la chimie de surface dans le cas de séparation par affinités) et sont d'autant plus efficaces et simples à intégrer.

**Filtration physique** Le principe de filtration le plus simple est celui d'un orifice laissant passer les particules de plus petites tailles et bloquant les plus grosses. On peut distinguer les systèmes à membranes, à piliers, à barrières, à flux tangentiel et également à cliquets (ou pinces) [24], utilisés pour sonder la déformation de cellules. Les membranes, piliers et barrières fonctionnent de manière similaire et présentent l'inconvénient majeur de provoquer des blocages [16, 18].

Afin de diminuer cet effet, la filtration à flux tangentielle a été développée. Elle consiste à faire passer l'échantillon dans un canal doté de fentes latérales (perpendiculaires à l'écoulement) :

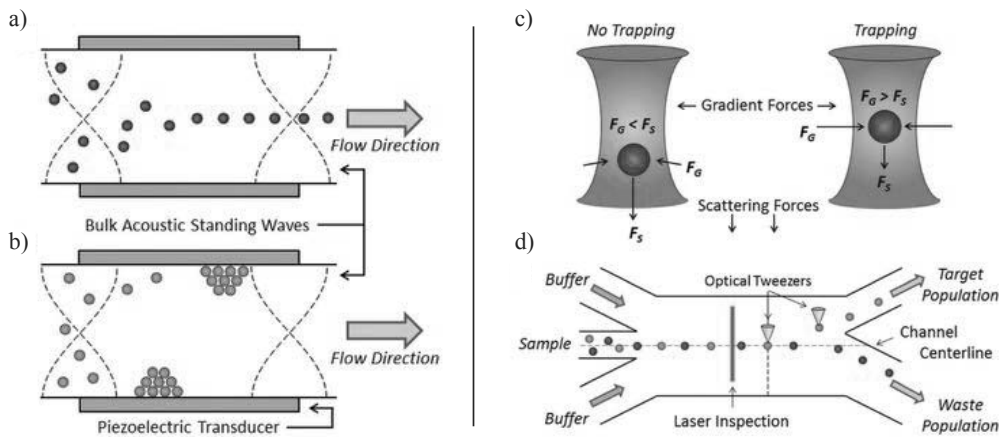


FIGURE 1.2 – Techniques optiques et acoustiques. a) b) Séparations acoustiques a) positives (migration vers les nœuds de pression) et b) négatives, dépendant des compressibilités et densités des cellules/particules et du fluide. c) Principe de la pince optique (équilibre entre forces de dispersion  $F_S$  et de gradient  $F_G$ ). d) Exemple d'application à la cytométrie. Toutes les figures sont tirées de la revue de C. Wyatt Shields IV *et al.* [13].

les particules plus petites passent dans les fentes alors que les plus grosses restent dans le canal principal. Une des applications est à titre d'exemple la séparation de globules blancs à partir de sang complet [25].

**Fractionnement en flux pincé** Lorsqu'un flux de cellules est pincé par un rétrécissement du canal de sorte que les cellules sont positionnées et alignées le long d'une paroi de la canalisation, un élargissement abrupt du canal résultera en la séparation par taille des cellules (voir Fig. 1.3 a-b). Ce principe de fractionnement en flux pincé a été proposé par Yamada *et al.* en 2004 [26]. L'hypothèse que les cellules se déplacent selon les lignes de courant du flux est admise (écoulement rampant). Des variantes ont également été publiées : plusieurs canaux de sortie, couplage avec la sédimentation [27]...

**Filtration hydrodynamique** La filtration hydrodynamique a été introduite également par Yamada et Seki en 2005 [28]. En admettant toujours que le centre des particules suit les lignes de courant du flux, on considère une particule qui est adjacente au bord d'une canalisation. La distance entre le bord du canal et le centre de la particule est celle de son rayon et ne peut être inférieure. On peut donc prélever, sur le même bord de canal, une partie de liquide correspondant au flux contenu entre le bord de la canalisation et le centre de la particule. Si d'autres particules, plus petites, possèdent leur centre dans ce flux, elles seront aspirées dans les canaux latéraux (Figure 1.3 c).

Ce principe est illustré en l'utilisant d'abord pour focaliser des particules près des parois avant de les trier par taille. Yamada et Seki montrent, toujours dans la même publication, son utilisation pour trier et concentrer des leucocytes à partir du sang. Les débits des canaux latéraux doivent correspondre à des rayons de coupure précis dans le canal principal, par conséquent chaque canal latéral est dimensionné en conséquence. C'est le ratio des résistances de sorties (latérale et principale) qui définit ce rayon de coupure, à chaque embranchement. On peut en déduire que le design de la puce (avec plus de 80 canaux latéraux) est assez complexe, d'autre

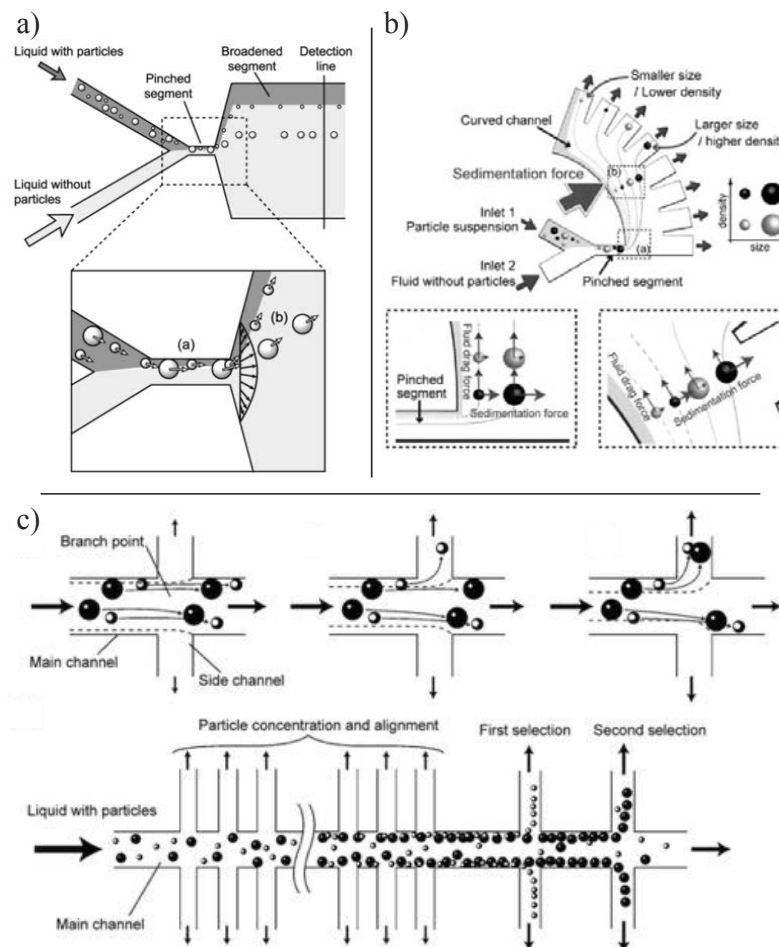


FIGURE 1.3 – Fractionnement par flux pincé et filtration hydrodynamique. a) Principe du fractionnement en flux pincé [26]. b) Utilisation couplée du fractionnement en flux pincé et de la sédimentation [27]. c) Principe de la filtration hydrodynamique et exemple d'application (focalisation et séparation de particules) [28].

part le débit total est assez faible du fait de nombreux et longs canaux (grands volumes). Inglis et Herman proposent une approche en se limitant à 20 canalisations secondaires, offrant toujours une bonne précision de rayon de coupure et une gamme de fonctionnement étendue (concentration baissée d'un facteur 10 pour des tailles de particules à 12% d'écart, plus petite particule séparée à  $7.6\ \mu\text{m}$  et plus grosse particule acceptée à  $50\ \mu\text{m}$  [29].

**Déplacement latéral déterministe** La fabrication de micropiliers au sein d'un canal microfluidique est nécessaire pour obtenir un déplacement latéral déterministe (DLD). Dans ce type de dispositifs, les particules cheminent à travers une forêt de piliers pour être séparées par taille, mais aussi par forme et déformabilité. Le DLD est un principe hydrodynamique montré pour la première fois en 2004 par Huang *et al.*, en séparant des particules de  $0.4\ \mu\text{m}$  à  $1.03\ \mu\text{m}$  avec une résolution de moins de 20 nm (voir Fig. 1.4 c), ainsi que des chromosomes (61 et 158 kb, à faible vitesse en utilisant à champ électrique) [30]. Une première revue (après dix années de recherche sur le DLD) résume les règles de designs (calcul - non trivial - du diamètre de coupure, les critères de forme, taille et d'espacement pour les piliers, effets de



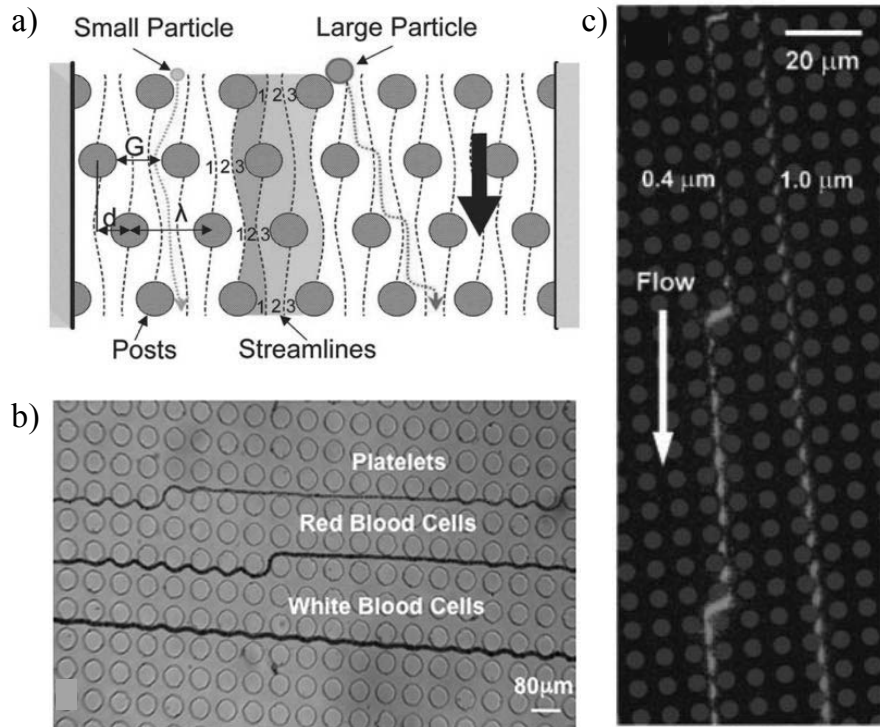


FIGURE 1.4 – Séparation par DLD. a) Principe (schema dans Davis *et al.* [32]). b) Exemple d'application pour la séparation du sang [33]. c) Article original de Huang *et al.* sur le tri de particules sub-micrométriques. [30]

bords, collecte des filtrats...) et les applications (séparation de particules, composés du sang, populations de globules blancs, pathogènes, gouttes...) [31].

**Inertielles** Le nombre de Reynolds, rapport des forces inertielle et visqueuse appliquées au fluide, et traduisant le régime d'écoulement, peut atteindre, avec des écoulements rapides, des valeurs avoisinant 1 à 100 dans les systèmes microfluidiques [18]. Le Reynolds particulaire,  $Re_p$ , peut atteindre l'unité, les forces inertielles deviennent dans ce cas importantes, et l'hypothèse, souvent posée, que la particule considérée suit les lignes de courant n'est plus valide.

$$Re = \frac{\rho v d_{canal}}{\mu} \text{ et } Re_p = Re \left( \frac{d_p}{d_{canal}} \right)^2 \quad (1.1)$$

Les nombres de Reynolds et Reynolds particulières sont donnés ci-dessus.  $\rho$  est la masse volumique du fluide,  $v$  la vitesse de l'écoulement,  $\mu$  est la viscosité dynamique du fluide,  $d_{canal}$  une longueur caractéristique de l'écoulement (une des dimensions du canal en général) et  $d_p$  est la dimension caractéristique de la particule (diamètre).

Di Carlo *et al.* ont montré qu'il était possible de séparer par taille des cellules avec un canal en forme de serpent [34]. D'autres dispositifs, basés sur des canaux en forme spirale ont montré la possibilité de séparer des cellules (CTCs) par taille en utilisant les forces de poussée et de Dean [35], voir Fig. 1.5 a-c). Enfin l'usage de l'élasticité du milieu (écoulements visco-élastiques) couplée aux effets inertiels est par ailleurs discutée dans la littérature [36].

**Biomimétisme et affinité** Plusieurs phénomènes affectant la dynamique des cellules dans les vaisseaux sanguins ont été décrits et reproduits en microfluidique. Zweifach et Fung ont observé en 1968 et 1973 que les globules rouges, lorsqu'ils rencontrent une bifurcation, se dirigent préférentiellement vers le vaisseau présentant le débit le plus élevé. L'effet Zweifach-Fung a été utilisé pour la séparation de plasma en microfluidique. Le mécanisme de cet effet de séparation de phase n'est pas élucidé pour le moment, et suscite une activité de recherche construite notamment autour de la modélisation des profils de vitesse et de nouvelles techniques de vélocimétrie pour l'observation des globules rouges [37]. Une autre observation indique que les leucocytes voyagent préférentiellement en périphérie des vaisseaux sanguins alors que les érythrocytes restent en majorité au centre. Là encore, la séparation des globules blancs du sang a été possible en mimant cet effet, en microfluidique (Fig. 1.5 f).

En plus d'être en périphérie des capillaires, les leucocytes sont amenés à rouler à la surface des vaisseaux avant d'être recrutés (on distingue les étapes de roulage, d'adhésion et migration transendothéliale puis d'adhésion aux protéines des matrices tissulaires) [38]. Les premières protéines de surface à avoir été étudiées sont les sélectines (E-selectine, L-selectine et P-selectine, découvertes dans les années 90), responsables de l'adhésion cellulaire et présentes à la surface des cellules endothéliales activées ainsi que sur les plaquettes activées. Le phénomène de roulage est utilisé en microsystèmes pour séparer des populations de cellules (leucocytes, cellules cancéreuses et même plaquettes). Choi *et al.* ont proposé en 2012 un système déterministe [39], comprenant des poutres inclinées sur le sol de la puce, et dont la surface est marquée de P-selectine : les cellules possédant le marqueur de la P-selectine sont déviées et acheminées d'un côté de la canalisation, de la même manière que pour le DLD (voir Fig. 1.5 d-e).

En plus du "cell rolling" et des effets hémodynamiques, d'autres mécanismes d'adhésion ("ferme" ou transitoire) sont employés. On peut notamment citer les colonnes de chromatographie par affinité, des microsystèmes comportant des piliers fonctionnalisés avec des anticorps ou des aptamères [13], et des variantes avec un contrôle magnétique dont les piliers sont marqués avec des nano particules [40] ou formés de microparticules [41].

#### 1.3.2.3 Mélange de particules

Dans cette section nous avons pour le moment abordé les problématiques de séparation de particules (et cellules). Certaines techniques actives (notamment utilisant la force magnétique) ne peuvent être envisagées qu'après avoir marqué les cellules cibles avec des anticorps ou des particules. Une préparation de l'échantillon est donc nécessaire, en particulier des étapes de mélange (cellules et anticorps, ou particules et anticorps suivi que particules et cellules).

Le mélange d'une espèce en solution provient de la réalisation de deux phénomènes : la diffusion, qui est toujours présente, résultant d'un gradient de concentration de l'espèce, et l'advection, venant du transfert de matière (présence d'un flux). Dans les systèmes macroscopiques, on recherche essentiellement à provoquer des écoulements turbulents pour mélanger (l'importance de l'advection est nettement supérieure à celle de la diffusion), mais le régime est le plus souvent laminaire dans le cadre des microsystèmes (du fait de leur taille). Le mélange représente donc un challenge aux micro-échelles et de ce fait mobilise la communauté

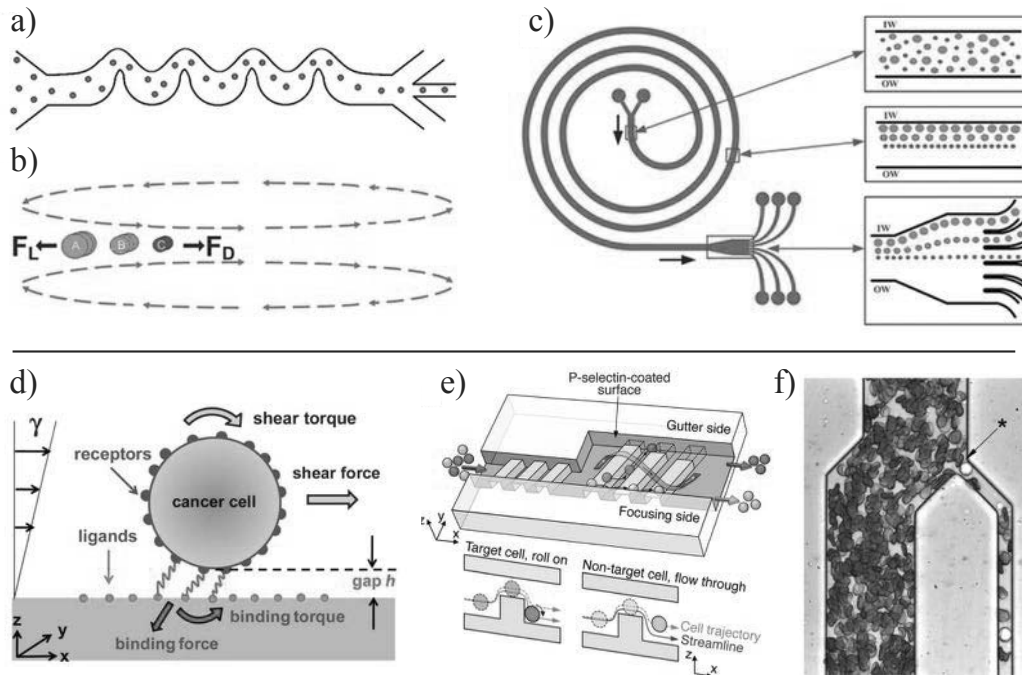


FIGURE 1.5 – Techniques inertielles et biomimétiques. a)-c) Séparations inertielles avec un dispositif a) en serpentin [34] c) en spirale [35]. b) Montre l'équilibre entre les forces de poussée (lift) et les forces de Dean attirant les particules vers le centre. Les figures a)-c) sont reprises de [13]. d) Phénomène de roulement des leucocytes [42] et e) application au tri de cellules cancéreuses (leucémie) [39]. f) Isolation biomimétique de leucocytes (l'étoile montre un globule blanc juste après l'intersection) [43].

scientifique. Des revues d'articles sont publiées périodiquement [44, 45, 46, 47, 48, 49, 50], et de nombreuses techniques y sont répertoriées. On distingue notamment les mélangeurs actifs (on ajoute de l'énergie sous forme mécanique, acoustique, électromagnétique, thermique...) des mélangeurs passifs, pour lesquels différentes méthodes reposant uniquement sur l'hydrodynamique et la diffusion existent pour améliorer les performances de mélange.

Nous nous intéresserons ici uniquement aux mélangeurs passifs (un exemple de mélangeur actif magnétique sera donné au paragraphe 1.3.5), et plus particulièrement au mélange de particules.

Le micromélange passif peut être réalisé en utilisant différentes méthodes. On peut citer l'injection (un flux de l'espèce à mélanger est introduit avec une très faible épaisseur au centre de deux flux contenant les autres réactifs, afin de profiter d'une distance de diffusion très faible), les canaux en zigzag, les structures à chevrons (impose une rotation au flux), les puits (induction de recirculations), le mélange en gouttes (microréacteurs, distance de diffusion plus faible et mouvement internes à la goutte), ou encore le laminage (partitionnement et juxtaposition des flux à mélanger pour obtenir des distances de diffusion faibles)...

La diffusion de grosses molécules, et a fortiori de particules ou cellules étant très faible, il est d'autant plus difficile de mélanger des objets micrométriques sans advection.

Lin *et al.* ont réalisé un dispositif permettant de mélanger des cellules (CTCs parmi des globules blancs, qui ont des tailles voisines) avec des microbilles fonctionnalisées (3  $\mu\text{m}$  de diamètre, anti-EpCAM) afin d'augmenter la taille des CTCs et de pouvoir les discriminer en employant un microfiltre [51]. Ce dispositif en deux dimensions repose sur la création de vortex de Taylor-Görtler, qui nécessitent un rapport de forme des canalisations élevé (80  $\mu\text{m}$  de large et 400  $\mu\text{m}$  de haut) et des zigzag (Fig. 1.6 a). L'angle de chaque élément de mélange (zig et zag) ainsi que la concentration en bille sont étudiés, les efficacités de mélange et de couplage obtenues sont proches de 100%.

Un design utilisant des serpentins à deux niveaux, rappelant les plis et villosités d'un intestin (Fig. 1.6 b), est proposé par Jung *et al.* pour mélanger des microbilles magnétiques (2.8  $\mu\text{m}$  de diamètre), des pathogènes (E. Coli, Staphylocoque doré et Salmonelle) et des nanoparticules d'or (30 nm de diamètre) [52]. Une séparation magnétique ainsi qu'une détection de code bar d'ADN porté par les nanoparticules suivent. Seule l'efficacité de capture a été étudiée en fonction du débit, elle est dépendante de l'efficacité de mélange et peut atteindre 100% pour des débits faibles (4  $\mu\text{Lh}^{-1}$ ). Il est indiqué qu'un mélange total est obtenu après seulement 1/4 du mélangeur, même à haut débit (5  $\text{mLh}^{-1}$ ) mais la caractérisation proposée (couleur uniforme) ne permet pas de donner d'indication sur l'avancement de la réaction de marquage.

La méthode de "séparations et recombinaisons", autrement appelée laminage, est astucieuse et adaptée à la microfluidique. Si l'on regarde les profils de concentration sur une section droite de canal en entrée et en sortie de dispositif, le laminage correspond le plus souvent à la "transformation du boulanger". En supposant que l'on mélange deux composés, un front de diffusion sera observé en entrée, et étant donné que l'opération de mélange consiste à

Chapitre 1. Introduction et contexte de l'étude

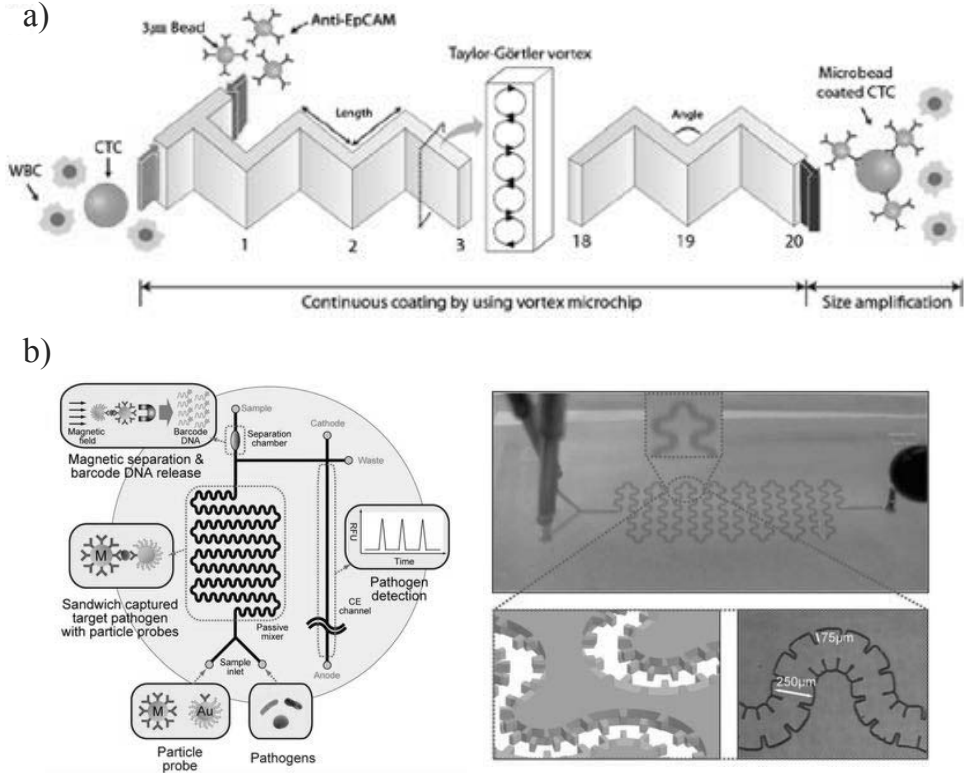


FIGURE 1.6 – a) Dispositif de mélange utilisant des vortex de Taylor-Görtler [51]. b) Système de détection de pathogène utilisant un étage de mélange intégré à base de serpentins structurés en forme d'intestin [52].

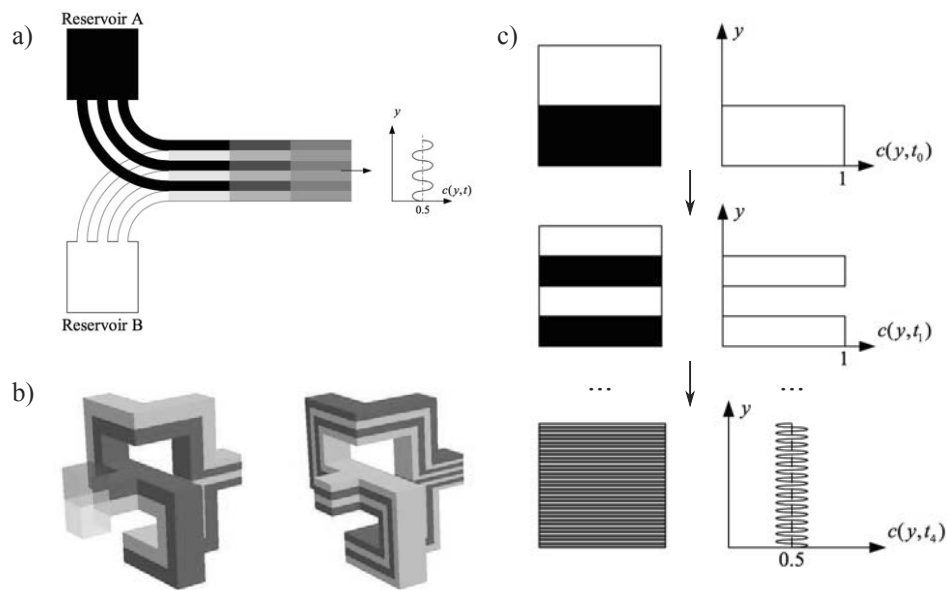


FIGURE 1.7 – Principe du laminage. a) Séparation des flux dès l'injection (nombre de fronts de diffusion déterminé) [47]. b) Structure proposée par Tan *et al.* [53] et étudiée numériquement par P. Carrière (illustration P. Carrière [54]). c) Principe des séparations-recombinaisons (transformation du boulanger) avec nombre de couches et profils de concentration [47].

dupliquer en séparant et juxtaposant les flux, deux fronts seront obtenus en sortie <sup>1</sup> (voir Fig. 1.7). Après  $n$  unités de mélange, on obtient donc  $2^n$  fronts de diffusion. La distance entre deux fronts de diffusion diminue donc exponentiellement alors que la différence de pression (due à chaque étage) évolue linéairement [53].

P. Carrière étudie numériquement la transformée du boulanger pour obtenir plus d'informations sur l'écoulement et simplifier le travail de caractérisation de systèmes réels [54]. Un écoulement rampant est considéré, les résultats montrent que les "couches" (fronts de diffusion) obtenues par simulation sont proches du modèle théorique de la transformée. Une observation est que des régions non chaotiques (diminuant l'efficacité du mélange) pourraient exister dans les angles (opposés) du système. D'une part ces régions sont a priori associées à la géométrie employée (section carrée), d'autre part une solution proposée est d'alterner le sens de rotation des unités de mélange placées en série.

Ces dispositifs présentent cependant une difficulté de réalisation : le laminage nécessite l'accès à la troisième dimension. On trouve dans la littérature des systèmes en PDMS (plusieurs couches fines de PDMS sont alignées et empilées). Dès 2005, Tan *et al.* proposent un système de mélange de cellules et billes magnétiques intégré à une séparation magnétique (avec un aimant permanent). La géométrie décrite (Fig. 1.8 a), avec des rotations du flux à  $180^\circ$ , prend en compte la sédimentation des particules magnétiques qui sont en général assez lourdes (il est courant de travailler avec des particules de densité  $> 2$ ), ainsi que celle des cellules. La sédimentation peut paraître un détail mais se révèle importante : en sortie du dispositif (après

1. Cela est comparable à l'action d'un boulanger qui pétrit une pâte : en l'étirant d'abord puis en la repliant sur elle-même, d'où le nom de cette transformée.

mélangeur et séparation magnétique), 42.2% des cellules non marquées sont récupérées (45.7 % pour un mélangeur qui est un canal droit), et ce taux de recouvrement descend à 29.4% pour des cellules marquées - entourées de billes magnétiques - (3.4 % dans un canal droit). Cette étude montre donc que le laminage avec cette géométrie, en plus de mélanger, permet d'éviter des phénomènes de sédimentation non souhaités. En revanche la technologie utilisée impose des tailles de canaux relativement grandes : 200  $\mu\text{m}$  de large, un étage de mélange mesurant 700  $\mu\text{m}$  de long et 600  $\mu\text{m}$  de haut.

D'autres études publiées beaucoup plus récemment se consacrent toujours aux dispositifs de séparation-recombinaison. Sadabadi *et al.* montrent comment obtenir (à partir d'un seul étage) des taux de mélange, mesurés avec des fluorophores et une réaction acido-basique, de 80 et 85% pour des flux inférieurs à 15 et 40  $\mu\text{L min}^{-1}$  respectivement [55]. En revanche les dimensions de l'étage de mélange (Fig. 1.8 b) sont assez grandes également (et limitées par l'alignement de couches de PDMS de 80  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, une marge d'erreur de 15  $\mu\text{m}$  a été prévue).

Une approche originale qui permet de s'affranchir de canaux en "3D"<sup>1</sup> est proposée par Yasui *et al.* [56]. La transformée du boulanger est, dans cette publication, réalisée avec un dispositif "2.5D", qui ne nécessite pas d'alignements (Fig. 1.8 c). Les efficacités de mélanges (moléculaires) de fluorescéine ainsi que d'anticorps, après 1 cm de mélangeur, atteignent 100% en environ 50 et 300 ms respectivement.

Des systèmes sont aussi réalisés avec les techniques d'usinage habituelles, comme ceux que Neerincx *et al.* proposent en 2011 [57]. Un design permettant de réaliser 24 opérations de séparation-recombinaison de flux en un seul étage est proposé (Fig. 1.9 a). Cependant, bien qu'intéressantes pour le mélange et présentant de faibles pertes de charge, ces structures restent de tailles millimétriques et donc non intégrables dans un microsystème.

Enfin d'autres techniques de microfabrication sont utilisées pour réaliser des structures de séparation-recombinaison : Liao *et al.* montrent la réalisation de dispositifs semblables à ceux décrits par P. Carrière, mais à section circulaire, avec une technique d'écriture directe par laser femtoseconde [58], voir Fig. 1.9 b). Il est montré (étude numérique et expérimentale) que l'efficacité de mélange est supérieure à celle d'un canal droit (simple diffusion), avec  $Re = 5.3$ .

Dans cette partie "Tri cellulaire et mélange", nous avons exposé un grand nombre de techniques de séparations (actives et passives), ainsi que l'importante diversité de systèmes existant pour le mélange de particules ou cellules. Le mélange est considéré essentiellement comme une étape de préparation de l'échantillon, qu'il est possible d'intégrer avec un étage de séparation. Il est clair que l'apport de la 3D offre plus de liberté en terme de design, mais se reflète également sur l'efficacité des mélanges. La majorité des systèmes présentés utilisent le PDMS, très présent dans la communauté microfluidique. La partie suivante introduit les différents procédés permettant d'obtenir des canalisations en trois dimensions.

---

1. 3D telle que définie dans le paragraphe 1.3.3.

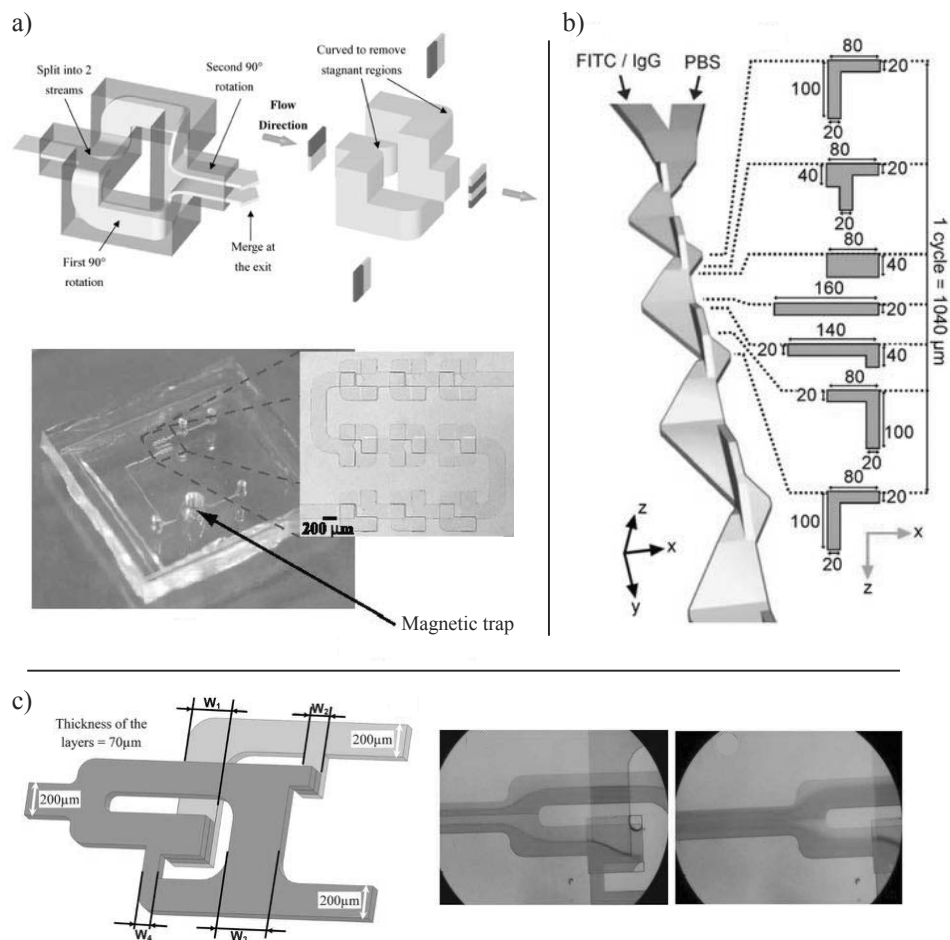


FIGURE 1.8 – Dispositifs de mélange par laminage en PDMS. a) Tan *et al.* proposent une suite de mélangeurs basés sur la transformation du boulanger [53]. b) Dispositif à un seul niveau, en PDMS, de Yasui *et al.* [56]. c) Mélangeur (un seul étage) à 3 niveaux de PDMS, étudié par Sadabadi *et al.* Les images de microscopie représentent les flux pour  $400 \mu\text{Lmin}^{-1}$  (gauche) et  $40 \mu\text{Lmin}^{-1}$  (droite) [55].



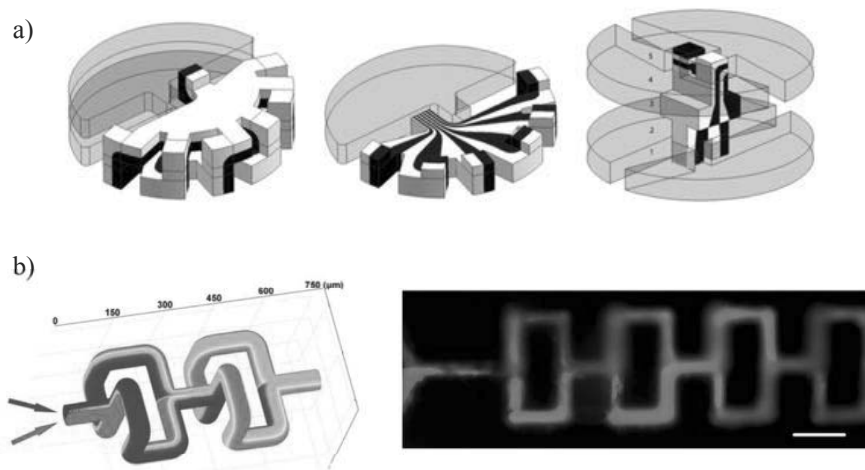


FIGURE 1.9 – Technologies de fabrication moins conventionnelles pour le micromélange. a) Dispositif réalisé par usinage (Neerinx *et al.*) [57]. b) Microsystème de Liao *et al.* obtenu par écriture laser directe [58].

### 1.3.3 Technologies pour une architecture 3D

La microfluidique fait appel à des dimensions de l'ordre micrométrique, par conséquent les techniques de fabrication sont complexes et souvent coûteuses. La micro-électronique "standard" a posé les bases pour l'utilisation d'un certain nombre de matériaux (résines photosensibles, silicium), et la microfluidique n'ayant pas forcément les mêmes besoins, on observe une évolution à la fois des matériaux et des procédés de fabrication. Ceux-ci permettent dans certains cas de s'affranchir de contraintes dimensionnelles, et de pouvoir proposer des dispositifs moins planaires, à plusieurs niveaux...

#### 1.3.3.1 Les géométries en microfluidique

On commencera, par souci de clarté, par définir les termes qui seront employés pour qualifier les géométries des structures. Bien évidemment, après fabrication, tous les dispositifs sont réels, en volume (et ainsi en trois dimensions). Cependant nous distinguerons ici trois types de géométries.

**Structures 2D** Les écoulements à échelles micrométriques que nous considérons ont lieu dans des canalisations, qui sont dans la majorité des cas fermées (présence d'un "couvercle" ou "capot" plan). Dans le cas où le profil des murs du réseau de canaux ne dépend pas de la hauteur (axe verticale  $z$  pour des canalisations situées sur le plan  $(xy)$ ), nous dirons qu'il s'agit de microfluidique 2D (voir exemple Fig. 1.10).

**Les structures 2.5D** Une évolution de la microfluidique 2D consiste à fabriquer des canalisations (et des objets contenus dans les canaux) dont le profil varie avec la hauteur. Ces structures sont éventuellement couvertes d'un capot (plan), comme pour des géométries "2D". Si on retire virtuellement ce capot, et que l'on observe une structure 2.5D de dessus, tous les canaux et objets seraient visibles (on est en présence d'une structure complètement ouverte).

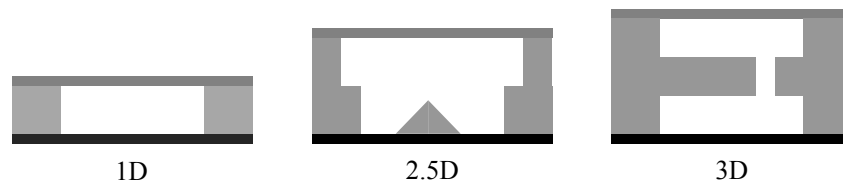


FIGURE 1.10 – Schéma de la terminologie employée pour les structures 2, 2.5 et 3D. Les couches noires et rouges représentent un substrat et un capot, respectivement. À noter : des géométries plus complexes (arcs de cercles, capillaires. . .) existent pour les structures 2.5 et 3D.

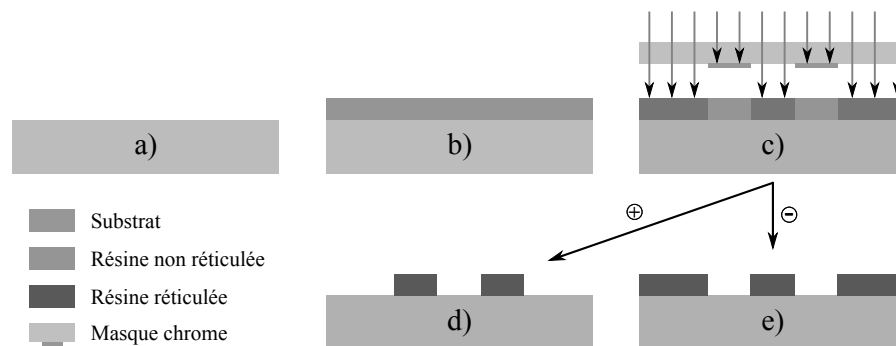


FIGURE 1.11 – Procédé de photolithographie. a) Préparation du substrat. b) Dépôt de la résine (à la tournette le plus souvent). c) Insolation à travers un masque chrome. Après recuit et développement, on obtient la résine structurée : d) résine positive et e) résine négative.

**Les structures 3D** Tous les cas de figures non compris dans les structures 2 et 2.5D correspondent à de la 3D. Des puces contenant ainsi plusieurs étages, des tunnels, des structures non ouvertes. . . sont ainsi envisageables. Les dispositifs 3D ne sont pas forcément nouveaux, cette définition impliquant par exemple qu'un écoulement en capillaire relève de la microfluidique 3D (même si l'on ne peut pas parler de "puce" dans ce cas). Des exemples de structures sont donnés Fig. 1.10.

### 1.3.3.2 Procédés

Les principaux procédés de fabrication permettant d'obtenir des architectures 3D (et *a fortiori* 2 et 2.5D) seront couverts dans cette partie.

**La photolithographie** Tout au long du manuscrit nous serons amenés à traiter des procédés de microtechnologies, et plus particulièrement le terme de photolithographie reviendra régulièrement. La Figure 1.11 rappelle le procédé, il consiste à structurer une résine selon un motif qui aura été dessiné et reporté sur un masque. La résine est donc déposée, pré-recuite, insolée à travers le masque avec des UVs, recuite puis développée. Pour une résine positive, la partie insolée sera solubilisée et inversement : pour une résine négative, la partie insolée restera et la partie non insolée sera solubilisée lors du développement.

**Lithographie dure** Les techniques de micro-fabrication se basant sur le verre et le silicium (lithographie dure) sont, dans de nombreux ouvrages dédiés à la microfluidique, opposées aux

techniques employant des matériaux polymères (dites lithographie douce) [59, 60, 61]. Les propriétés inorganiques de ces matériaux imposent effectivement des procédés particuliers, mais bien connus car pour la plupart issus de la micro-électronique. L'usage le plus courant pour créer des canalisations est de graver le silicium et de se servir d'un wafer de verre comme d'un capot, après soudure anodique.

La gravure du silicium peut se faire en phase sèche ou humide, et être isotrope ou anisotrope. Cela impact la géométrie obtenue, par ailleurs celle-ci est aussi affectée par la direction du plan cristallin du silicium. D'après notre définition, la première application microfluidique (chromatographie phase gaz [1]) utilise un élément comportant une géométrie 3D. Il s'agit de la vanne d'injection, microfabriquée, comprenant un substrat de silicium (utilisé également pour la colonne) qui a été gravé ainsi qu'un diaphragme (nickel). La double gravure permet donc d'obtenir des géométries 2.5D et 3D.

Les procédés employant ces matériaux sont robustes, le caractère hydrophile du silicium et du verre est, en phase liquide avec des milieux aqueux, un atout pour le remplissage des microcanaux, mais les principaux inconvénients résident essentiellement dans le coût de fabrication, et dans la relative fragilité des puces (le silicium se clive facilement).

**Lithographie douce** Dans la partie 1.3.2.3, des dispositifs avec plusieurs niveaux de PDMS ont été présentés [53, 55]. Il est possible de structurer le PDMS à l'aide d'un moule, souvent constitué de résine photosensible (SU-8) déposée sur un substrat ou en aluminium. La puce en PDMS obtenue est alors collée sur un substrat (lame ou lamelle de verre, ou autre pièce de PDMS). Un léger plasma O<sub>2</sub> est souvent employé pour préparer les surfaces avant l'étape de mise en contact (collage). Ce procédé de réplification est couramment appelé lithographie douce. En procédant successivement à des alignements et collages, plusieurs couches de PDMS peuvent être empilées pour former des dispositifs 3D. Une des premières applications de cette technique est la création de valves, présentée par l'équipe de Quake en 2000 (Unger *et al.* [62]). Sur un niveau, des liquides circulent dans des canaux, alors que sur un autre niveau un réseau de canalisations est pressurisé par un gaz (air, azote...). Une fine couche de PDMS, très déformable, sépare les deux réseaux. Lorsque la pression augmente dans le réseau de gaz, la membrane est déformée et plaquée dans le réseau liquide, empêchant ainsi la circulation. Quake montre aussi que ces valves peuvent aussi être combinées par trois pour former une pompe péristaltique. Ces valves sont depuis utilisées communément en microfluidique, pour mieux intégrer les dispositifs. Par exemple Park *et al.* présentent près de dix ans plus tard une chambre de culture cellulaire (deux niveaux de PDMS empilés) à perfusion continue et étudient la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules alvéolaires [63]. Le choix du PDMS pour ces systèmes présente l'avantage d'un coût relativement faible, il s'agit d'un procédé rapide, et il est possible d'obtenir un large éventail d'épaisseurs pour les couches de PDMS. En revanche l'alignement est difficile et ne permet pas d'obtenir des résolutions importantes.

**Empilements de couches structurées** Ce même principe d'empilement peut être appliqué à des procédés non basés sur de la réplification. L'utilisation directe de résines photosensibles pour la fabrication de microcanaux est une possibilité, et leur empilement peut être envisagé.

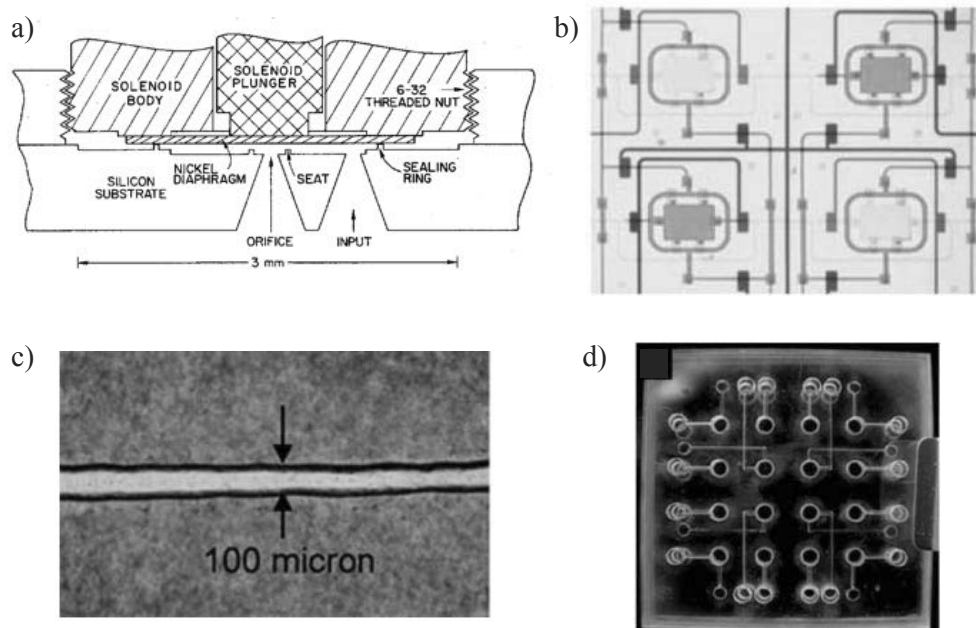


FIGURE 1.12 – Procédés de lithographie dure et d'empilements. a) Micro-vanne d'injection obtenue par gravures d'un substrat de silicium [1]. b) Chambres de culture avec vannes intégrées (les 3 liquides sont introduits avec des colorants), obtenues par empilements de couches de PDMS [63]. c) Microcanaux obtenus pour une puce fabriquée à partir de papier et de cire, et d) vue de dessus de la puce à 3 niveaux de canalisation conçue en PMMA et cire [67].

Dès 2002 la SU-8 est remarquée comme étant la meilleure solution pour le collage de 2 wafers de silicium parmi un panel de 4 résines photosensibles, d'autant plus que la soudure est réalisée à basse température [64]. Blanco *et al.* utilisent en 2004 cette même technique pour d'obtenir des structures microfluidiques 3D : deux wafers (pyrex ou silicium) sont enduits d'un niveau de SU-8 que l'on structure, et les wafers sont collés par la SU-8 [65]. Un des deux substrats peut être retiré par gravure HF si besoin. En déposant une couche de résine sacrificielle avant le dépôt de SU-8, il est même possible de réaliser un dispositif uniquement en résine (100% SU-8), après un lift-off [66].

Enfin l'empilement peut être appliqué à des matériaux bas coût comme le papier. Gong *et al.* ont ainsi réalisé un dispositif à 5 niveaux (3 niveaux de canalisations) avec du papier ou du plastique, de la cire et des lames de verre [67]. Le procédé consiste tout d'abord à structurer le papier (découpé au scalper ou au laser), puis à l'imprégner de cire (le tout chauffé à la température de fusion de la cire, 60°C). Ensuite la structure en papier est pressée entre deux lames de verre, l'ensemble étant ensuite immergé dans de l'eau chaude (70°C). Un gaz est introduit à l'entrée de la puce pour chasser la cire présente dans les canalisations. Une fois refroidi, une puce est obtenue, et la cire permet de coller différentes couches entre elles (ici le papier et le verre, mais d'autres matériaux peuvent être utilisés). Les structures 3D sont obtenues avec le même procédé, les couches peuvent être obtenues avec du PC, du PMMA et du papier. Pour un papier d'une épaisseur de 100 µm, les plus faibles largeurs de canalisations obtenues sont 50 µm. En revanche pour le PMMA (épaisseur 1 mm), on monte à des largeurs de 200 µm.

L'accroche de différents matériaux entre eux peut être réalisée, on l'a vu, avec de la cire. La fonctionnalisation de surface permet d'élargir les possibilités, en permettant par exemple l'accroche de PDMS sur différents thermoplastiques (PC, COC, PMMA et PS), en utilisant une activation plasma puis un greffage d'APTES [68]. Un autre linker à base d'amine a également été utilisé pour accrocher du PDMS à des couches de PC, PET, PVC et PI [69].

**Structuration 3D par laminage** Les empilements impliquent de structurer les couches avant de les assembler. Le laminage de couches photosensibles permet une option différente : il s'agit de successivement laminer puis structurer ces couches. Les films photosensibles peuvent être fabriqués (à partir de résine liquide) ou achetés directement. Au laboratoire, des travaux précédents ont permis la réalisation de films secs photosensibles à partir de SU-8 (résine époxy négative, développée par IBM à la fin des années 80) [70]. Le procédé consiste en l'enduction de résine sur un substrat souple (tri couche PET/adhésif/liner), de procéder au pré-recuit, puis de retirer et laminer cette couche flexible sur la surface d'intérêt (éventuellement déjà structurée). Suivent l'insolation, le recuit puis le développement. En répétant ces étapes en boucle, il est possible d'obtenir des dispositifs en 3D en empilant les couches. La différence principale avec les techniques d'empilement est que l'insolation est réalisée après le report, permettant de meilleurs alignements.

Fabriquer ses propres films secs permet de travailler avec des épaisseurs sur-mesures, mais ajoute un temps considérable au procédé. Une autre approche est l'utilisation de films secs photosensibles déjà disponibles sur le marché. Vulto *et al.* décrivent l'utilisation d'une résine Ordyl SY300 (épaisseurs de 28 et 54  $\mu\text{m}$ ) pour la fabrication d'une puce microfluidique "sandwich", où la résine est comprise entre deux substrats [71]. Des éléments actifs (DEP) sont disposés sur les deux substrats. Des rapports de forme de 2 sont obtenus, et l'Ordyl est présentée comme une alternative intéressante à moindre coût face à la SU-8 pour les couches épaisses (500  $\mu\text{m}$ ).

Le TMMF est décrit comme une autre alternative pour le laminage, mais n'est proposé que dans des dispositifs 2D où les canaux et le capot sont en TMMF [72]. Le procédé est moins coûteux en comparaison de la lithographie dure (pyrex et soudure anodique), aussi bien pour la fabrication de puces que pour l'implémentation de la connectique [73].

L'utilisation d'un autre film, le PerMX, pour la fabrication de puces en 3D est rapportée par Meier *et al.* [74]. Une combinaison de gravure de verre, de laminage de film sec PerMX 3050 (2 couches de 50  $\mu\text{m}$ ) et de dépôt de SU-8 2150 ont permis d'obtenir une structure à 3 niveaux de canalisations. Une autre publication de Meier (2014) [75] traite de l'intégration d'un dispositif d'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) : une bobine est construite par un enroulement de fil conducteur autour d'une canalisation verticale, et un réseau de canalisation en 3D est ainsi nécessaire. La fabrication repose sur le laminage de 2 couches de PerMX 3050 ainsi que du laminage d'une couche de résine SUEX D650 comprise entre les deux. Le tout repose sur un wafer de verre. Ces technologies permettent d'obtenir des dispositifs microfluidiques 3D avec de bonnes résolutions. Cependant il s'agit de matériaux relativement coûteux, les temps de process sont longs, et l'utilisation de SU-8 et SUEX conduit à des coulées lors des pré-recuit (SU-8, 95°C) et recuit après insolation (SUEX, 85°C), ce qui oblige à utiliser un laser UV pour réaliser les ouvertures des canaux (étape supplémentaire).

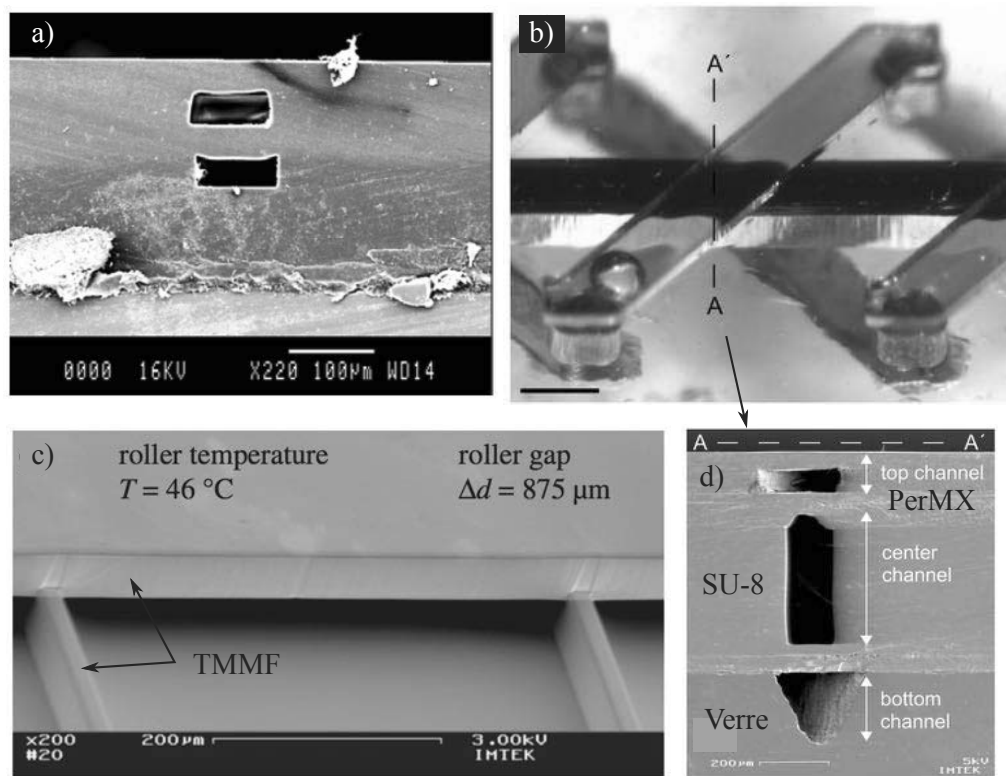


FIGURE 1.13 – Techniques de laminage. a) Empilement de 5 couches de SU-8 : films secs réalisés à partir de résine liquide [70]. b) d) Empilements de plusieurs matériaux : verre / SU-8 / PerMX (film sec commercial), vue de dessus et vue en coupe MEB [72]. c) Laminage de films de TMMF (vue en perspective d'une ouverture, au MEB) [74].

**Impression** Les techniques d'impression 3D sont en pleine expansion et offrent des possibilités de prototypage rapide hors du commun. De nombreux secteurs sont touchés par cette transformation (divertissement, automobile, sécurité, logement . . .) et la microfluidique en fait probablement partie. Une revue de 2014 (O'Neill *et al.* [76]) traite des avancées de l'impression 3D (ainsi que de l'écriture directe par laser, vue plus bas) et compare différentes techniques. On distingue ainsi la stéréolithographie (durcissement d'une résine photosensible liquide à l'aide d'un laser, voir Fig. 1.14), la polymérisation deux photons (décrite plus loin également), l'impression par fusion (fusion d'un fil de polymère et extrusion, solution la moins chère et la plus grand-public), et impression par jet d'encre 3D (dépôts successifs de résine d'accroche et de poudre, ou bien de différentes couches de résine photodurcissable).

La stéréolithographie permet une plus grande précision. Ainsi Au *et al.* [77] utilisent cette technique pour construire des puces microfluidiques présentant différentes caractéristiques (canaux en spirale 3D, flow focusing . . .) et testent les résolutions obtenues, le sens d'impression, la visualisation au microscope à fluorescence (comparaison avec une lame de verre). Leurs puces sont notamment intégrées avec des connectiques Luer-Lock (pas besoin de support). Mais bien qu'offrant les résolutions les plus intéressantes, la technique employée nécessite que la résine liquide ait le temps de s'écouler (en dehors des espaces fermés, canalisations, . . .) pendant la construction. D'autre part, même avec un faisceau laser d'une largeur de 100  $\mu\text{m}$  et une précision de 50  $\mu\text{m}$  pour les tranches, les canaux présentant des caractéristiques convenables mesurent 500  $\times$  500  $\mu\text{m}$  au plus petit.

De même, le générateur de gouttes d'alginate proposé par Tendulkar *et al.* est réalisé par stéréolithographie [78]. Les 8 buses d'injection ont un diamètre minimum de 380  $\mu\text{m}$  et permettent d'obtenir une taille de billes comprise entre 500 et 700  $\mu\text{m}$  de diamètre. On notera en plus qu'après l'impression 3D, au moins deux étapes de nettoyage sont nécessaires, ainsi qu'une finition de surface pour obtenir une pièce.

Enfin on citera deux réalisations pour lesquelles l'impression 3D par fusion a été utilisée. En 2012, Kitson *et al.* testaient déjà cette technique pour un dispositif qualifié de millifluidique (canaux de 800  $\mu\text{m}$  de diamètre) [79]. Et plus récemment, Erkal *et al.* proposent un dispositif microfluidique (puce et support combinés) pour une approche modulaire, avec un système d'électrodes interchangeables [80]. Les canaux sont de 500  $\times$  500  $\mu\text{m}$ , similaires aux dispositifs précédents.

**Techniques optiques** L'obtention de motifs et/ou de canalisations en trois dimensions peut également avoir lieu via des techniques optiques, essentiellement des dérivées de la photolithographie ou via l'utilisation de lasers femtoseconde.

Un double dépôt de résine photosensible peut être effectué, cela permet de créer des structures en 2.5D (par exemple des piliers de SU-8 9  $\mu\text{m}$  de diamètre sur d'autres piliers plus large de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre comme le montrent Campo *et al.* [81]). Une inclinaison lors de l'insolation permet d'obtenir des structures tridimensionnelles (motifs de piliers après une combinaison d'expositions unique ou double, inclinaison et rotation [81], grilles/filtres obtenus après deux insolutions avec inclinaisons [66] . . .). Les doubles insolutions (un seul dépôt, deux expositions avec des longueurs d'onde différentes) sont également utilisées pour des structures 2.5D, de

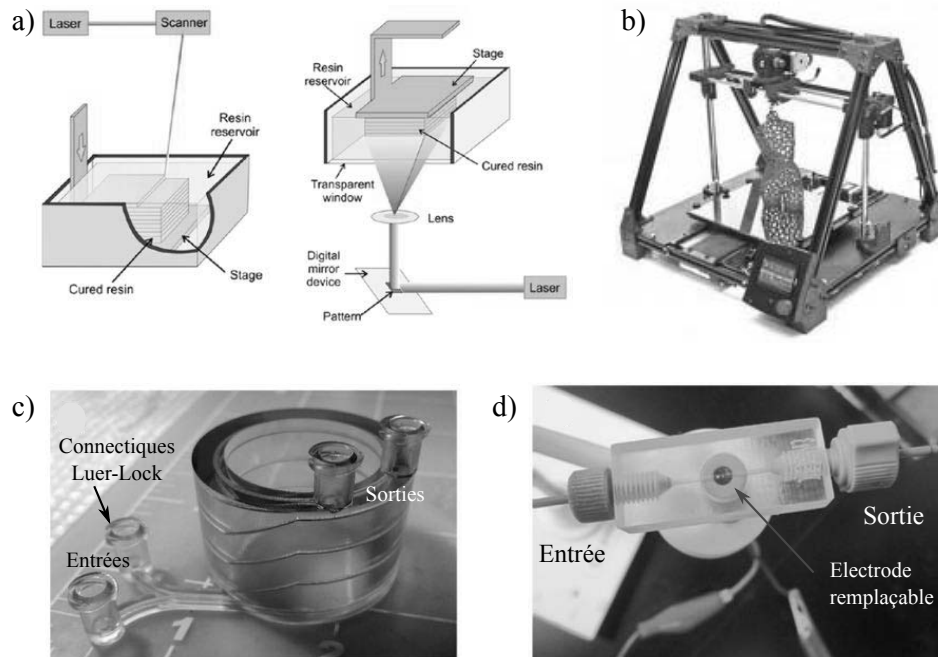


FIGURE 1.14 – Procédés d'impression 3D. a) Principe de la stéréolithographie avec différents arrangements : attache de la pièce au support (haut/bas), écriture par faisceau ou miroir digital et projection. La quantité de résine nécessaire pour le bain, la résolution et vitesse d'écriture dépendent de ces configurations. b) Imprimante 3D par fusion open source "RepRap", utilisée par exemple dans les initiatives "Open Lab" promouvant la création et l'utilisation de matériel libre de droit dans les laboratoires. c) Dispositif 3D spiral réalisé par stéréolithographie [77]. d) Dispositif à électrode interchangeable, fabriqué par fusion [80].



même pour la lithographie à décalage de phase qui en plus permet d'obtenir des résolutions inférieures à la longueur d'onde employée. Toutes ces méthodes reposent sur l'utilisation d'équipements standards de photolithographie, en revanche le temps de développement des structures 3D peut être long, et une méthode additionnelle est souvent utilisée pour la création d'un capot afin de fermer les canaux.

Les lasers femtoseconde constituent une autre solution pour la microfluidique 3D. Le principe est basé sur l'absorption 2 photons ou multiphotons non linéaire du matériau, les longueurs d'onde utilisées étant en général voisines de 800 nm, et la durée d'un pulse de l'ordre de 100 ns. Des revues récentes couvrent le fonctionnement et l'utilisation, qu'on peut distinguer selon les matériaux employés : polymères [82] (PMMA, PS, COP, résine photo sensible) ou verre [83] (verre photostructurable ou silice fondue), ainsi que selon le mode d'absorption (2 photons - 2PP ou TPP - ou multiphotons). L'écriture directe laser permet ainsi l'ablation dans la masse des matériaux (devant éventuellement s'accompagner d'une attaque chimique en phase liquide pour le verre photostructurable), le changement d'indice de réfraction optique au sein du matériau (PMMA, verre), et la polymérisation 2 photons induit une réticulation de résine photosensible (SU-8 par exemple) au point focal.

En 2012, He *et al.* utilisent par exemple la TPP pour écrire directement sur de la SU-8 afin de former une structure d'échangeur, permettant à 3 canalisations de se croiser au même point (voir Fig. 1.15) [84]. Le laser utilisé possède une longueur d'onde de 800 nm, est focalisé par un objectif à immersion huile de 60X, la durée de l'impulsion est de 120 fs et la fréquence de répétition de 80 MHz mais aucune donnée concernant le temps d'écriture n'est fournie.

Hengsbach *et al.* proposent en 2014 un dispositif pour étudier l'effet de surfaces microstructurées sur la mobilité cellulaire [85]. Les microcanaux sont réalisés en SU-8 (insolation avec un laser standard) mais une autre résine est nécessaire pour structurer la surface (dimensions nanométriques, méthode TPP), la IP-Dip (NanoScribe) est utilisée. Des lignes de 150 nm de large peuvent être obtenues (rapport d'aspect de 3.5), mais le temps d'écriture n'est pas non plus indiqué.

Les travaux de Liao *et al.* ont déjà été commentés dans la partie 1.3.2.3 "Mélange de particules". Les canalisations en 3D sont obtenues par écriture directe femtolaser dans du verre mésoporeux (réseau de pores de 10 nm de diamètre) [58]. Après écriture, le verre nécessite un recuit à environ 1150°C, ce qui permet de refermer les pores et de ne laisser que les microcanaux pour le passage du liquide.

Hanada *et al.* utilisent l'écriture femtolaser pour la fabrication d'une puce optofluidique : d'une part les canaux sont obtenus par ablation, mais des guides d'onde (modification de l'indice optique) sont également réalisés [86]. Le matériau choisi est un verre photostructurable, exposé au laser femtoseconde (vitesse de déplacement donnée à  $1 \text{ mm s}^{-1}$ ), recuit à différentes températures (2h30 minimum de recuit) puis gravé au HF 10% aux ultrasons pour retirer les parties modifiées (ablation).

L'ablation dans les matériaux type verre peut ainsi être réalisée en deux étapes (exposition puis attaque chimique HF) ou en une seule étape (ablation directe dans l'eau) [83]. Les avantages de l'écriture directe avec femtolaser sont l'absence de dégagement de chaleur (due à la durée courte de l'impulsion) [82], la focalisation (confinement au volume focal), la possibilité, pour la

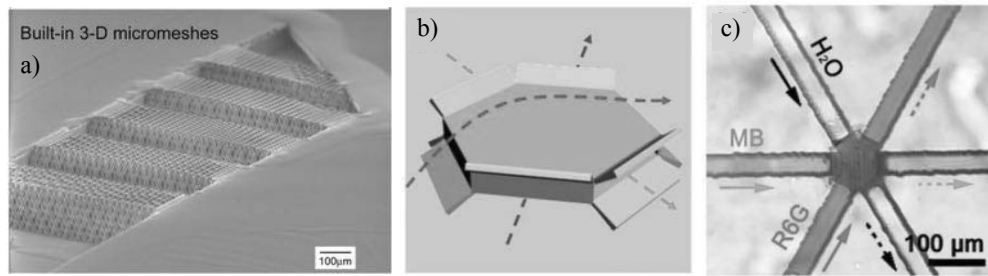


FIGURE 1.15 – Techniques optiques. a) Inclinaisons lors de l'insolation et obtention de filtres à l'intérieur d'un canal microfluidique (pour la fragmentation de gouttes) [66]. b) c) Structure d'échangeur réalisée par TPP dans la SU-8 (canaux en SU-8 également) et fonctionnement avec des liquides colorés [84].

TPP, de descendre à des résolutions en dessous des limites de diffraction (résolution de 100nm avec longueur d'onde de 800nm pour le laser), ainsi que la flexibilité (ablation, changement d'indice, polymérisation). En revanche les temps d'écriture sont relativement longs selon la résolution souhaitée et la taille du dispositif, ce qui rend l'industrialisation du procédé difficile.

Toutes les techniques de microfabrication pour obtenir des dispositifs microfluidiques 3D ne sont pas mentionnées ci-dessus : les couches sacrificielles pour les résines photosensibles (temps de révélation assez longs), ou encore les micro-usinage, moulage à injection, soudure ultrasonique (adaptés pour une production de masse mais coûteux lors du développement de prototypes, à l'échelle d'un laboratoire) sont autant de possibilités. De plus les techniques présentées peuvent être combinées lors d'un même procédé.

Un dispositif microfluidique 2D ou 2.5D présente un grand potentiel d'applications, et peut agir sur 3 dimensions (focalisation - dérapage - en 3D après un virage par exemple [87]). La 3D apporte néanmoins de nouvelles fonctionnalités, une meilleure distribution de l'échantillon, et une meilleure intégration. De nouvelles problématiques sont soulevées : la complexité des procédés, les temps de fabrication, et aussi les conditions d'utilisation (observation, remplissage...).

### 1.3.4 Connexions et interfaces en microfluidique

Le design en microfluidique a son importance au sein de la puce et des fonctions principales, mais est également essentiel pour interfacier le composant avec les équipements, à l'échelle macroscopique. Quelques équipes se penchent sur la question de l'intégration en microfluidique, même si cet aspect est souvent considéré comme relevant d'un côté "pratique" et de l'industrialisation. Deux revues (Nge *et al.* et Temiz *et al.*, en 2013 et 2014), synthétisent quelques possibilités pour l'intégration, mais aussi pour la fabrication et les matériaux [88, 89]. Dans cette partie nous introduirons différents types d'architectures pour les dispositifs, ainsi que l'intégration de connexions fluidiques et électriques. Certaines applications demandent d'intégrer d'autres composants (optiques, magnétiques...), mais elles sont plus spécifiques par rapport à la majorité des composants microfluidiques, et ne seront pas traitées ici.

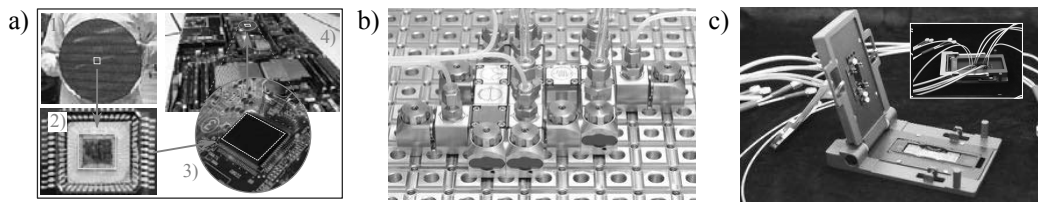


FIGURE 1.16 – Systèmes modulaires. a) Procédé d'intégration classique en microélectronique. 1. Fabrication de puces sur un wafer (silicium) en salle blanche. 2. Intégration dans un boîtier et soudure des points de contacts aux pattes du boîtier (wire bonding). 3. Création d'un circuit imprimé sur lequel est placé (soudé) le composant (boîtier). 4. Image d'une carte mère d'ordinateur personnel : plusieurs circuits imprimés (cartes) peuvent être connectées entre elles pour former un ensemble complexe. b) Eléments modulaires milli-microfluidiques de la société Ehrfeld. c) Support de puce de la société Micronit qui fonctionne avec différents modules (cartes) microfluidiques de la même marque.

### 1.3.4.1 Architecture

La microélectronique et la microfluidique présentent des similitudes (fabrication, analogies dans les équations de certains systèmes simples comme les réseaux de résistances...), il est ainsi légitime de se poser la question de leurs points communs en terme d'intégration. Les composants microélectroniques sont en général fabriqués sur wafer, découpés, puis intégrés dans un boîtier où l'on fait la liaison entre connexions électriques du composant et les connectiques externes (pattes du composant), par exemple par wire bonding (Fig. 1.16 a). Les composants ayant besoin d'un grand nombre de connexions (processeurs, mémoires...) sont placés dans des boîtiers proposant une connectivité en matrice sur une de leur face (Ball Grid Array ou Land Grid Array). Les composants sont ensuite reportés sur un circuit imprimé (PCB) formant une carte, puis ces cartes peuvent être de nouveau assemblées (cas d'un ordinateur avec une carte mère pouvant accepter d'autres cartes accessoires, réseau, graphique, etc.).

Pour la microfluidique, il n'y a pour le moment pas d'approche standardisée ou de normes pour les connectiques. Cependant des systèmes modulaires peuvent être proposés. Le fabricant Allemand Ehrfeld Mikrotechnik construit des modules (cubes ou plaques de quelques centimètres de côté) contenant des microréacteurs, échangeurs de chaleurs, vannes et capteurs, qui peuvent être organisés et connectés sur des grandes plaques ou dans des racks, voir Fig. 1.16 b). En 2003, Motorola (Grodzinski *et al.* [90]) met au point un système à base de cartes microfluidiques interconnectées (connexions fluidiques et électriques) qui n'est pas sans rappeler les structures "multicartes" de la microélectronique et des PCBs (Fig. 1.19 a).

Une autre conception de l'intégration est de se diriger vers des systèmes "reprogrammables". Les microprocesseurs électroniques possèdent des transistors (élément de base de la logique), mais aussi des mémoires (un registre) afin de conserver une liste des actions à exécuter. Ces propriétés sont transposées à la microfluidique avec le transistor (déjà cité [62, 91]), et des fonctions logiques (portes logiques, bascules, horloge, registre à décalage...) : Rhee et Burns montrent en 2009 la possibilité de construire des microprocesseurs microfluidiques 8 bits [92]. Moins d'éléments de contrôle sont nécessaires (une ligne d'alimentation en pression, une ligne de commandes pneumatiques, et éventuellement une horloge externe) mais l'inconvé-

nient majeur est la taille des éléments (l'essentiel du dispositif est dédié au contrôle comparé à la taille occupée par la fonction cible, comme le mélange de 4 liquides colorés). D'autres systèmes transfèrent les contrôles externes sur le dispositif microfluidique, aboutissant à des systèmes très intégrés. C'est le cas du système centrifuge de Clime *et al.* (2015), où une pompe, des vannes et le contrôle électronique sont intégrés au support de puce (disque) [93], voir Fig. 1.17 a).

Une autre manière d'obtenir un système programmable, au lieu de fournir une liste d'instructions à traiter, est de modifier l'architecture de la puce. Ainsi, Renaudot *et al.* créent un dispositif dont les murs, en paraffine, peuvent être fondus et repositionnés grâce à un système de gouttes et d'électrodes (EWODs, voir Fig. 1.17 c) [94]. Lim *et al.* proposent, dans la même idée, un "puzzle" qui consiste en une base (une matrice) en PMMA, avec des canaux, et des jonctions (trous) dans lesquels viennent s'enficher des éléments "fonction" en PDMS (jonctions T, entrées/sorties, flow focusing...) [95] (Fig. 1.17 b). Ces solutions sont limitées (en taille, en nombre de possibilités) mais marquent les débuts d'une reconfigurabilité sur puce, en plus des capacités à être programmable.

La microfluidique est souvent caractérisée par des débits faibles (résistances élevées dans les microcanaux), la parallélisation pour traiter plus d'échantillon ou pour de la production est donc un enjeu. Saber *et al.* étudient les contraintes associées au design de réseaux multi-échelles : des critères dépendant de l'application et des objectifs doivent être fixés (minimisation de la perte de charge, distribution homogène des flux...) afin d'optimiser la structure [96]. Il est difficile de faire émerger des règles générales d'architecture pour l'harmonisation des échelles, l'intégration étant spécifique de l'application : l'analyse d'un échantillon précieux ira dans les sens d'un volume mort minimal, alors que pour un autre échantillon ou de la production l'objectif sera par exemple le travail avec une perte de charge fixée.

Enfin, un des intérêts de la miniaturisation est associé à la portabilité. On voit ainsi un nombre croissant de systèmes basés sur des dispositifs mobiles comme les smartphones, alimentés par batteries pour être autonomes et utilisant les écrans et caméras de ceux-ci pour les analyses, le contrôle et l'interface utilisateur [97, 98]. Un système complètement autonome pour l'analyse, en milieu extra terrestre, d'acide aminés (analyse dédiée aux missions spatiales) est même présenté dès 2011 (Mora *et al.* [99]).

#### 1.3.4.2 Connexions fluidiques

La jonction entre les canaux microfluidiques d'une puce et les périphériques externes (pompes, vannes et multiplexeurs pour le contrôle, capillaires et tubes pour l'acheminement de fluides) nécessite des connexions fluidiques. On en distingue plusieurs types (classification issue de la revue de Temiz *et al.* [89]).

**Connexions insérées** L'utilisation d'élastomères comme le PDMS permet un maintien mécanique par compression du matériau (Fig. 1.18 a). Des tubes (en acier ou inox) et des capillaires peuvent donc être insérés directement dans l'épaisseur de la puce. Les premiers systèmes PDMS (Whitesides, Quake... [100, 62]) reposent sur ce principe. Scott *et al.* fabriquent même un connecteur "D-sub" standardisé, en PDMS, permettant la connexion simultanée de 9 ports

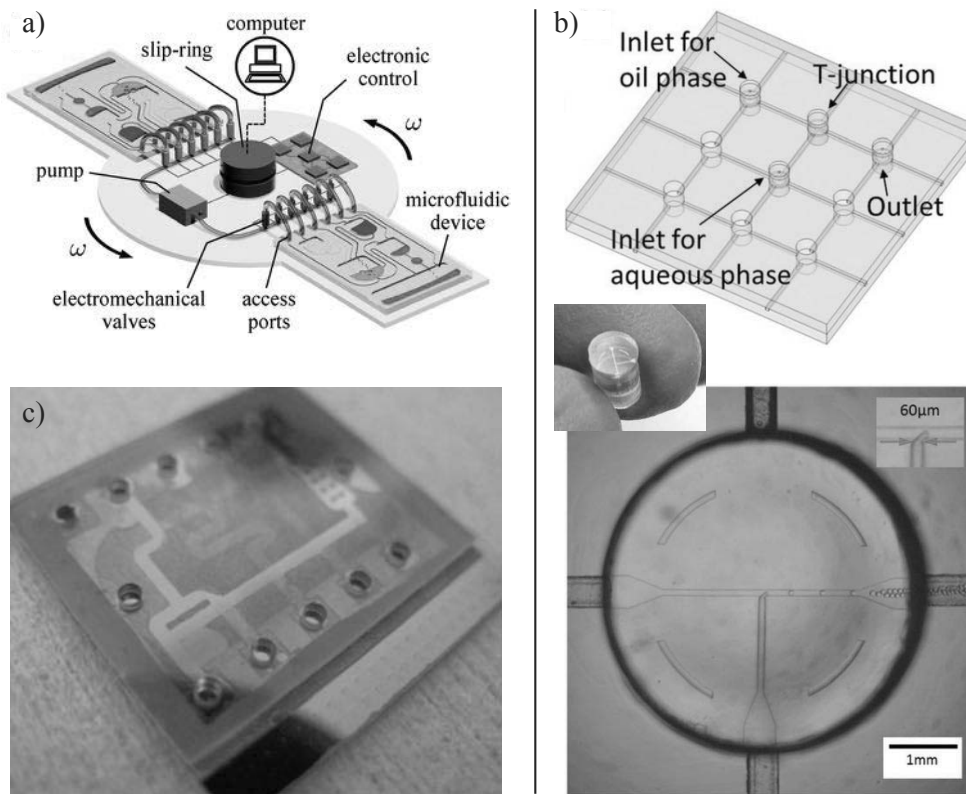


FIGURE 1.17 – Dispositifs programmables et reconfigurables. a) Système centrifuge proposé par Clime *et al.* où l'actionnement des fluides est dirigé par la force centrifuge appliquée au disque mais également à une pompe et un système de vannes embarqués [93]. b) Méthode de fabrication modulaire (façon puzzle) que présentent Lim *et al.* pour réaliser différents systèmes en PDMS à partir d'un même moule [95]. L'illustration montre la création de gouttes dans une jonction en T. c) Système de réseau microfluidique reconfigurable où les canalisations, en paraffine, peuvent être déplacées après chauffage et actionnement de gouttes d'eau par électro-mouillage [94].

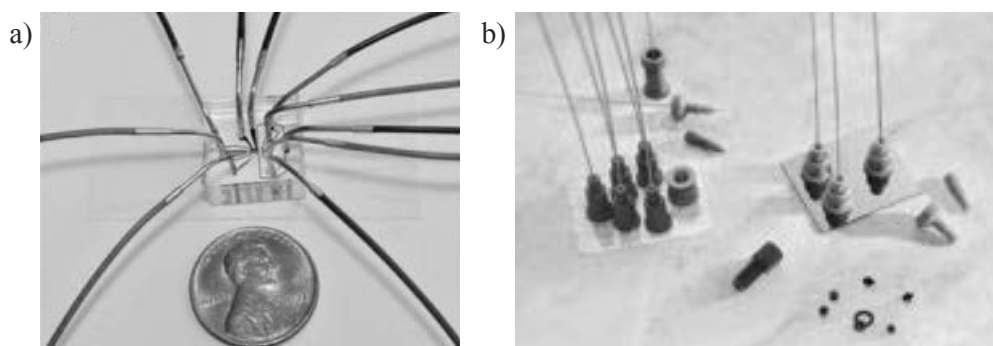


FIGURE 1.18 – Connexions fluidiques. a) Connexions par insertion. Ici des connecteurs en inox sont directement insérés dans du PDMS. b) Connexions permanentes : illustration de la société IDEX montrant l'application de ses connectiques NanoPort. Les ports comprennent un joint torique pour l'étanchéité et sont en plus fixés par un disque adhésif.

jusqu'à une pression de 1 bar [101]. Les limitations des connexions insérées sont d'une part la limitation en pression (il n'est pas rare de trouver des applications requérant plusieurs bars), d'autre part l'usure et le déchirement du polymère (PDMS) apparaissent trop rapidement pour une utilisation intensive (nombreuses connexions/déconnexions). Enfin le système n'est pas mobile (il ne faut pas bouger les capillaires et connectiques).

**Connexions par contact rétractables** À échelle macroscopique, l'utilisation de joints et de compression est habituelle. On peut transposer cette technique en microfluidique : des joints toriques ("O-ring"), films de paraffine [90] ou tubes évasés (PTFE) [102] forment l'interface (voir joints toriques Fig. 1.19 a). L'étanchéité est en plus assurée par compression via l'utilisation de vis, de verrous, de vide ou encore d'aimants. Ces solutions sont en général synonymes de haute densité de connexions (interface jusqu'à 100 tubes) et une résistance en pression suffisante (le plus souvent 10 bars ou plus).

**Connexions permanentes** Les connectiques restant en place de manière permanente peuvent faire appel à des colles, des adhésifs, ou encore à des soudures métalliques. Les limitations sont les bouchons (colles liquides), les temps de procédés assez longs (étapes manuelles, temps de cuisson longs), ainsi que la compatibilité biologique et chimique pour les adhésifs et colles [89]. Une solution commerciale communément adoptée est la connectique NanoPort™ (Idex, voir Fig. 1.18 b), elle permet la connexion de capillaires directement vers la puce, mais sa taille est assez large et le collage est long et nécessite de monter à des températures élevées (plus de 160°C). Wang *et al.* proposent par ailleurs un procédé basé à la fois sur l'insertion de capillaires (dans le PDMS) et le collage, cette connectique résiste à des pressions de plusieurs dizaines de bars (< 40 bars) [103] [103].

Enfin, d'autres possibilités existent pour les connexions fluidiques. Dans les systèmes à EWODs, une arrivée de capillaires est par exemple généralement suffisante [104]. L'impression 3D permet par ailleurs, comme présenté au paragraphe 1.3.3, de créer les connectiques avec le support de puce ou les puces directement [80].

De nombreux critères peuvent être considérés pour les liaisons fluidiques, parmi eux : les coûts et facilité de fabrication, l'espace occupé, la facilité et rapidité pour les branchements, la flexibilité et la possible réutilisation, les volumes morts, la non contamination des fluides et la compatibilité biologique et chimique, la tenue en pression, et par exemple la compatibilité avec les solutions commerciales (capillaires, connexions Luer Lock et standards Idex)... [89] Un compromis est à choisir entre tous ces points selon l'application et les priorités du cahier des charges.

### 1.3.4.3 Connexions électriques

Les puces microfluidiques comprenant de l'actionnement actif ou une détection faisant appel à un système électrique (électrodes, effet hall, magnétorésistance...) doivent être connectées électriquement au monde extérieur. La soudure ou le collage (colle conductrice) de conducteurs sur les puces sont une solution pour du développement rapide mais des approches plus

pérennes existent.

Les connecteurs à insertion sont ceux que l'on retrouve pour les formats standards de cartes (SD, MicroSD, cartes SIM...). Le contact est réalisé à l'aide de languettes mobiles qui viennent toucher une surface métallisée sur la puce. On les appelle connecteurs de bords ou encore sockets, et l'écartement entre deux connexions (pitch) est en général standard : 1.1 (microSD), 1.27 ou 2.54 mm. Grodzinski *et al.* donnent un exemple (non fonctionnel) de connecteur à carte [90], des industriels utilisent également ce type de connexions (compteur de cellules Scepter™ de chez Merck, par exemple).

Les connecteurs à ressorts ("pogo pins") sont tout aussi utilisés pour la microfluidique. Les fabricants de puces et supports de puces proposent ce type de connecteurs dans leur support (Micronit, microLiquid...). Ces connecteurs sont aussi particulièrement adaptés pour les systèmes utilisant un nombre important de connexions (dispositifs EWODs, où il faut un nombre minimum d'électrodes... [105, 106], voir Fig. 1.19 b). De plus, ils se présentent sous forme de barrettes ou sous forme unitaire ce qui laisse une certaine flexibilité dans les designs.

On peut également citer les systèmes qui intègrent des composants microélectroniques directement avec les puces microfluidiques. Les capteurs CMOS (habituellement utilisés avec une optique sur les caméras et appareils photos) peuvent servir par exemple de cytomètre intégré. Dans les travaux de Huang *et al.* (2014), les structures microfluidiques (canaux en PDMS) sont directement déposées sur le capteur CMOS [107]. Une source de lumière blanche au dessus de la structure permet aux ombres des cellules d'être captées puis analysées (voir Fig. 1.19 c).

**En conclusion**, on retiendra que l'intégration est synonyme d'adaptation d'échelle. La taille des systèmes est le plus souvent liée avec les applications visées et le type d'échantillon traité (ADN, protéines, micro-nanoparticules, cellules, gouttes...). La microélectronique a apporté son influence et des solutions pour les connexions fluidiques et électriques sur puce. Des solutions sont flexibles, temporaires, adaptées à du prototypage (connexion insérées pour les capillaires, soudures ou collage de fils électriques), d'autres sont plus robustes et tournées vers de plus grandes densités d'intégration (joints toriques et connecteurs à ressorts par exemple). Les connectiques électriques continuent d'évoluer avec par exemple de nouvelles techniques d'alimentation qui émergent (transfert d'énergie sans fil, piézoélectriques transformant une pression des doigts en tension d'alimentation...) ou l'utilisation de métaux liquides (Galinstan). Ces développements sont d'autant plus bienvenus que l'intégration en microfluidique est régulièrement l'aspect limitant des dispositifs en terme de performance (efficacité, débits, tensions et intensités appliquées...).

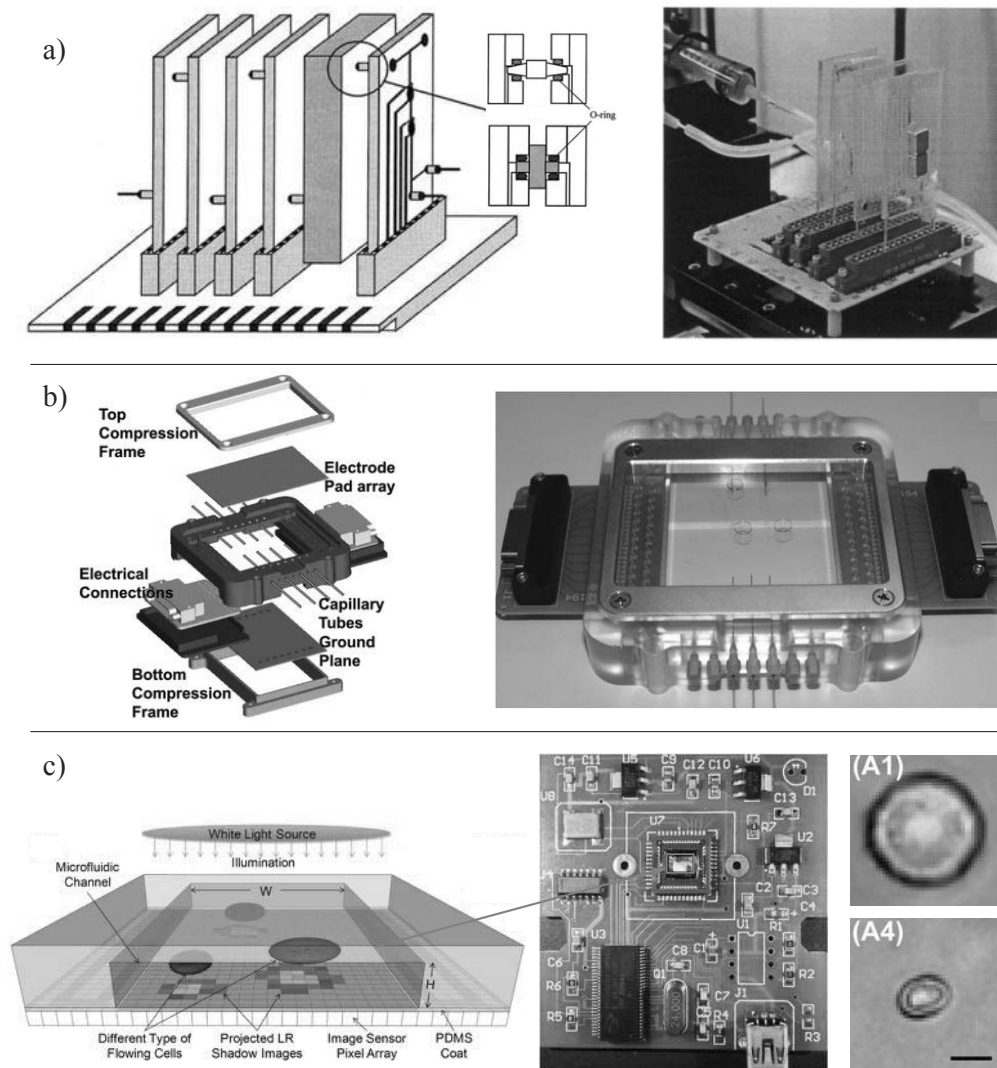


FIGURE 1.19 – Connexions électriques. a) Connecteurs à insertions (de bords) - non fonctionnels - et jonctions fluidiques par joints toriques, proposés par Grodzinski *et al.* [90]. b) Des connecteurs à ressorts (pogo pins) assurent les contacts électriques pour ce système de déplacement de gouttes par électro-mouillage, illustrations Kim *et al.* [105]. c) Système CMOS intégré : le dispositif microfluidique est directement relié à un composant électronique sur un circuit imprimé (rectangle rouge) [107].



### 1.3.5 Magnéto-microfluidique

La microfluidique est, nous l'avons vu, intimement liée aux applications d'analyses (chimiques, biologiques. . .) et à leur intégration. La séparation de cellules basée sur un champ magnétique à fort gradient (MACS [108], voir paragraphe 1.3.2) est apparue dans les années 90. Le développement des nanoparticules (notamment des nano et microbilles superparamagnétiques), leur utilisation dans les analyses de laboratoire (manuelles ou automatisées) et la tendance à la miniaturisation ont conduit à leur introduction en microfluidique à partir des années 2000. Des systèmes intégrant la génération des champs magnétiques (et/ou de leurs gradients) et la manipulations d'objets magnétiques sont ainsi apparus. Les matériaux qu'il est possible de manipuler et les méthodes pour parvenir à leur actionnement sont introduits dans cette partie.

#### 1.3.5.1 Actionnement magnétique : matériaux et force

Par "actionnement magnétique" il faut comprendre que l'on décrit une action (une force) engendrée par des champs magnétiques sur un matériau dont les propriétés magnétiques lui permettent d'être sensible à ces champs. Afin de pouvoir présenter les différents systèmes d'actionnement magnétique, une brève introduction des notions de matériaux magnétiques et de force magnétique est proposée.

**Matériau magnétique** Lorsqu'un matériau est placé dans un champ magnétique  $\mathbf{H}$  (excitation magnétique), les moments atomiques du matériau (dus à la direction des spins des électrons) s'ajoutent pour former une réponse globale :

$$\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M}). \quad (1.2)$$

L'induction magnétique  $\mathbf{B}$  est le produit de  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ Hm}^{-1}$ , la perméabilité magnétique du vide, et de la résultante du champ magnétique (ou excitation magnétique)  $\mathbf{H}$  et de la magnétisation volumique  $\mathbf{M}$ .

On peut exprimer le caractère magnétique d'un matériau en utilisant la susceptibilité magnétique volumique  $\chi$  telle que  $\mathbf{M} = \chi\mathbf{H}$ . Les unités (SI) sont les suivantes :  $\chi$  est sans dimension,  $\mathbf{B}$  en tesla (T), et  $\mathbf{H}$  et  $\mathbf{M}$  sont exprimés en ampère par mètre (A/m). La susceptibilité magnétique volumique  $\chi$  est en toute rigueur un tenseur hystérétique : l'aimantation du matériau dépendra de l'excitation magnétique appliquée dans le passé.

Différents comportements peuvent être distingués pour le magnétisme, et caractérisés selon la valeur de  $\chi$  :

- $\chi < 0$  : le matériau est diamagnétique, le champ magnétique dans le matériau est atténué par la magnétisation induite (e.g. l'eau,  $\chi_{eau} = -1.2 \cdot 10^{-5}$ ).
- $\chi = 0$  : cas du vide.
- $\chi > 0$  : le matériau est paramagnétique (souvent  $\chi$  est faible) et le champ est très légèrement amplifié (e.g. l'aluminium,  $\chi_{Al} = 2.2 \cdot 10^{-5}$ ).
- $\chi \gg 0$  : le matériau est paramagnétique et ferromagnétique (ou ferrimagnétique ou antiferromagnétique, selon les phénomènes mis en jeu), e.g. le fer :  $\chi_{Fe} = 200$ , mais  $\chi$

peut atteindre des valeurs de  $10^5$ . Selon l'importance de l'hysteresis, ces matériaux sont qualifiés de durs (aimantation permanente en l'absence d'excitation magnétique) ou de doux si cette aimantation résiduelle est faible.

- $\chi \approx 0.1 - 1$  : le matériau peut être superparamagnétique. Cette forme de magnétisme apparaît dans les nanoparticules ferro ou ferrimagnétiques : si les particules sont suffisamment petites, et en considérant des échelles de temps très courtes ( $\approx 10^{-10}$  s), leur magnétisation peut changer aléatoirement de direction sous l'influence de la température. Les particules possèdent en général une taille  $< 10$  nm. En considérant une échelle plus grande, le matériau se comporte comme un matériau ferro/ferrimagnétique en présence d'un champ magnétique, et présente une magnétisation nulle en l'absence d'excitation.

Nous verrons l'importance de ces matériaux et comportements en introduisant les éléments (cellules, particules...) sur lesquels il est possible d'agir avec des champs magnétiques.

**Force magnétique** Si une action est réalisée sur des matériaux magnétiques avec des champs magnétiques, c'est qu'il existe une force générée par ces champs. L'origine et le calcul de cette force sont abordés dans le chapitre sur le magnétisme 3.1.1 et en annexe C.1. Afin de simplifier l'expression de la force magnétique nous considérons les hypothèses suivantes :

- la force est appliquée sur un matériau magnétique de volume  $V$
- le matériau magnétique et le milieu dans lequel il est plongé sont homogènes et isotropes (on définit pour chacun une susceptibilité magnétique moyenne  $\chi$  qui est un scalaire)
- le champ magnétique n'est pas assez fort pour créer un état de saturation dans le matériau magnétique, la relation entre la magnétisation  $\mathbf{M}$  et  $\mathbf{H}$  est linéaire et  $\chi$  est une constante.

$$\mathbf{F}_m = \frac{V\Delta\chi}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (1.3)$$

Le volume du matériau est noté  $V$ ,  $\Delta\chi$  est la différence de susceptibilité magnétique entre le matériau considéré et le milieu dans lequel il est plongé. Le point important de cette mise en équation est de remarquer que la force magnétique dépend non seulement du champ magnétique mais aussi de son gradient.

En toute rigueur la grandeur intéressante à observer pour comparer la capacité de différents systèmes à déplacer un objet magnétique (indépendamment des susceptibilités mises en jeu) est le gradient du champ magnétique "efficace" [109] :

$$\mathbf{G} = \mu_0 \left( \frac{\mathbf{H}}{H} \cdot \nabla \right) \mathbf{H} \quad (1.4)$$

$\mathbf{G}$  est exprimé en T/m et peut ainsi servir à la comparaison des systèmes sans devoir prendre en compte les propriétés magnétiques ( $\chi$ ) des objets qu'on actionne.

**Que peut on manipuler ?** Les objets les plus polyvalents qu'il est possible de manipuler avec des champs magnétiques sont des mini-micro robots. Bien que certains de ces robots

ne se déplacent pas dans des liquides ou des espaces confinés, la littérature fournit des exemples de convergence entre la microfluidique et la robotique. La société SRI International (anciennement Stanford Research Institute) a déposé des brevets dans les années 2000 sur l'utilisation de microrobots associés à des surfaces électroadhésives pour le prélèvement, la préparation et le transport de réactifs, en milieu liquide ou non [110]. On peut aussi citer les travaux de Ichikawa *et al.* qui contrôlent deux types de microrobots (une pince et un couteau) pour l'énucléation d'ovocytes en canaux microfluidiques [111]. L'alignement des robots avec un support mobile (placé hors du canal) est réalisé avec des aimants, tandis que l'actionnement des pinces est dû au champ magnétique créé par une bobine intégrée au support (voir Fig. 1.20 a).

Les fonctions de transport peuvent être assurées par d'autres éléments, vivants, comme les bactéries. En 1975, Richard Blakemore découvre les bactéries magnétotactiques (BMT) : il s'agit d'espèces découvertes dans les sédiments marins et dont la motilité est dirigée par le champ magnétique local [112]. Une structure (organite appelée magnétosome) composée de plusieurs nanoparticules (en général des cristaux de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou greigite  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) est contenue dans le cytoplasme et impose un moment magnétique aux cellules (Fig. 1.20 b). En 2004, Lee *et al.* montrent le contrôle (piégeage) et le transport de bactéries magnétotactiques avec deux types de structures (pièges avec un fil conducteur formant une boucle, et matrice de fils conducteurs superposés croisés) [113]. Lu *et al.* utilisent également des micro-électroaimants et des aimants permanents pour contrôler des BMT, notamment pour l'investigation de leur vitesse de nage : en moyenne la poussée générée par la nage des bactéries est évaluée à 4 pN. Une autre approche est proposée par Lina *et al.* pour contrôler la trajectoire des bactéries en utilisant différents designs de plots magnétiques et des bobines externes [114]. La force générée par ces structures est estimée à 34 pN, ce qui permet d'après l'article de dévier les bactéries mais n'induit pas de piégeage. La capacité à manipuler les MBT présente des intérêts en biotechnologies et médecine (fonctions de transport ciblé), qui peuvent être apportés en microfluidique à travers ces systèmes de contrôle intégrés (qui en outre permettent l'étude de ces mêmes bactéries).

Chez les mammifères, les globules rouges (encore appelés hématies ou érythrocytes) sont des cellules du sang chargées du transport de l'oxygène. C'est l'hémoglobine, une protéine contenue dans leur cytoplasme, qui fixe le dioxygène (jusqu'à 4 molécules). Cette protéine contient du fer (4 atomes), et, alors que l'hémoglobine oxygénée possède un caractère diamagnétique (dû à l'appariement des électrons des atomes de fer), l'hémoglobine "seule" (désoxyhémoglobine) montre un comportement paramagnétique. La différence de susceptibilité magnétique avec l'eau est  $\Delta\chi \approx 3 \cdot 10^{-6}$ , cette différence est faible mais peut être exploitée avec de forts champs magnétiques [115]. Des dispositifs microfluidiques ont par exemple été construits pour séparer les cellules selon leur propriétés magnétiques intrinsèques [116].

La découverte du superparamagnétisme par Louis Néel en 1949<sup>1</sup> permet de comprendre les phénomènes liés à des grains de matériau magnétique de taille nanométrique. Ces nanoparticules (en général d'une taille de l'ordre de 10 à 50 nm) peuvent être stabilisées et suspendues

---

1. Néel exprime notamment un temps de relaxation (portant maintenant son nom), fonction du volume du grain considéré et de la température, qui à la durée moyenne entre deux changements de direction de l'aimantation.

dans un liquide pour former une solution colloïdale. Il existe de nombreuses possibilités de synthèse de ces particules et fluides : par broyage, coprécipitation, microémulsion, en utilisant des canaux microfluidiques. . . Nous choisissons dans le cadre de ce manuscrit de ne pas traiter les synthèses de micro et nanoparticules. Les applications des ferrofluides concernent des domaines très variés, allant du transfert thermique dans les enceintes audio aux amortisseurs de voitures en passant par les œuvres d'art (fontaines, montres. . .) et bien sûr les biotechnologies. En microfluidique on peut citer l'utilisation des gouttes de ferrofluides, servant au mélange ou au transport, mais également à la magnétophorèse inverse. Dans ce dernier cas la phase porteuse est le ferrofluide, et on déplace des gouttes dans lesquelles on aura placé des solutions, cellules ou autres éléments d'intérêt.

Les nanoparticules peuvent être utilisées hors du cadre des ferrofluides, et directement en solution. En modifiant leur surface et en y plaçant des marqueurs (anticorps), ces nanoparticules peuvent marquer des cellules, pathogènes ou analytes particuliers (technologies MACS). Ces séparations peuvent bien entendu être réalisées dans des dispositifs microfluidiques. Enfin, ces nanoparticules peuvent être intégrées dans des matrices plus larges, polymères ou inorganiques, afin de créer des microbilles (Fig. 1.20 d). Ces billes peuvent être de taille nano à micrométrique (typiquement de 100 nm à 100 µm), possèdent un caractère superparamagnétique et contiennent des nanoparticules (en général de la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou de la maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Selon la méthode de fabrication des microparticules, les nanoparticules peuvent former un cœur magnétique dans la bille, être réparties dans la masse ou être localisées en surface de la microbille. Ces billes peuvent être fonctionnalisées, et présentent les mêmes applications que les nanoparticules. En revanche elles permettent de concentrer les matériaux magnétiques à une échelle de l'ordre du micromètre, tout en gardant leur propriété superparamagnétique (sans magnétisation rémanente, à température ambiante et aux échelles de temps supérieures au temps de relaxation de Néel). Des particules (micro et nano) ferromagnétiques existent également, et les forces magnétiques auxquelles elles sont soumises sont supérieures (à taille comparable) aux particules superparamagnétiques. En revanche, une fois magnétisées, elles peuvent former des agrégats et conservent leur aimantation. De nombreux types de microparticules sont disponibles commercialement, avec une large gamme de surfaces fonctionnalisées (groupements chimiques tels carboxyles et amine, ou protéines, dont anticorps, acides nucléiques. . .).

Pour les travaux de thèse l'attention s'est portée préférentiellement sur les microbilles superparamagnétiques. Elles peuvent servir au marquage de n'importe quel type de cellule si les marqueurs de surface sont disponibles, requièrent pour leur déplacement un gradient de champ magnétique efficace moins important que pour des nanoparticules, la visualisation au microscope optique est possible et des fournisseurs proposent des modèles où des fluorophores sont intégrés en forte concentration, rendant la visualisation en fluorescence plus évidente également.

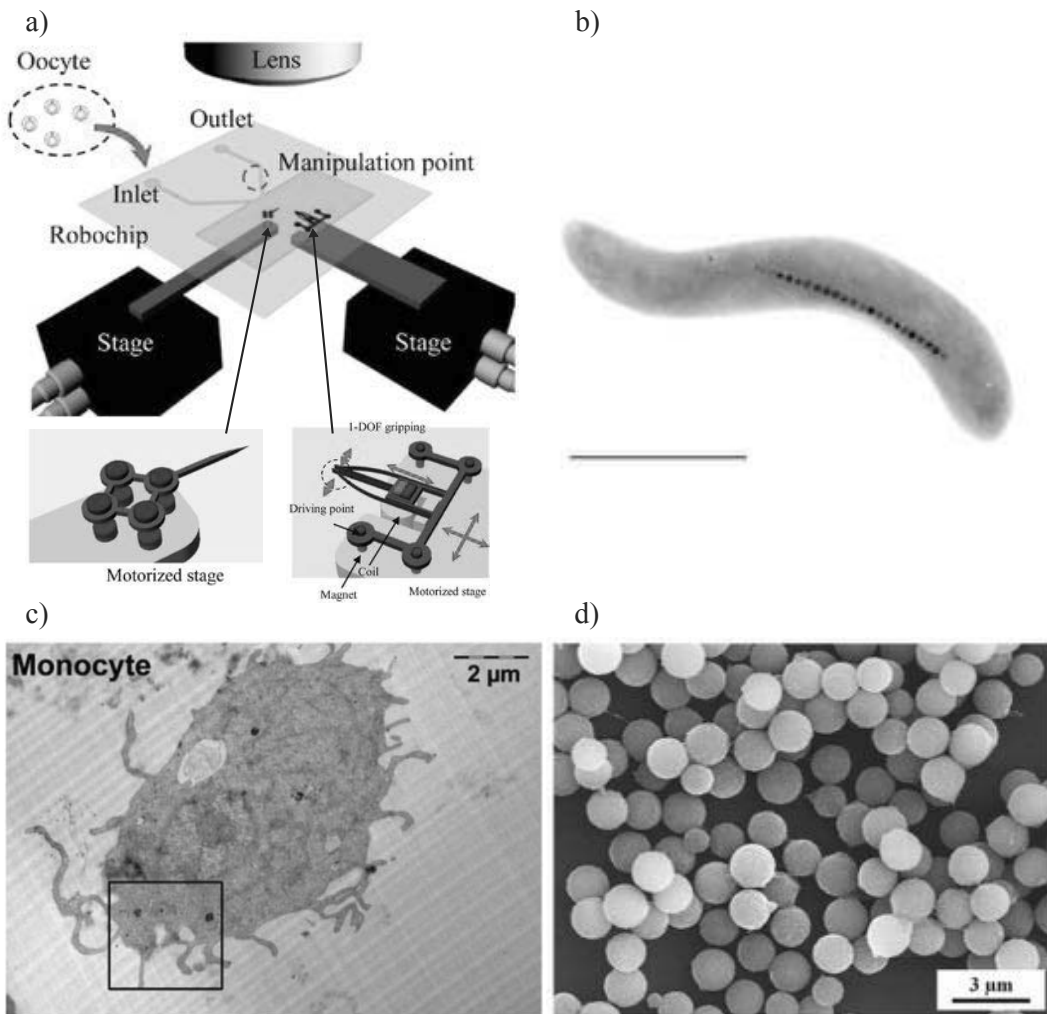


FIGURE 1.20 – Éléments manipulables en magnéto-microfluidique. a) Micro-robots pour l'énucléation d'ovocytes [111]. b) Bactérie magnétotactique avec ses magnétosomes (*Magnetospirillum magnetotacticum*), Richard B. Frankel, Cal Poly State University. Bar d'échelle : 1 μm. c) Monocyte ayant phagocyté des nanoparticules magnétiques [117]. d) Synthèse de micro-billes magnétiques [118].

### 1.3.5.2 Différentes approches pour les systèmes

Les systèmes microfluidiques magnétiques permettent d'actionner des éléments comme des aimants (microrobots), des cellules aux propriétés magnétiques particulières (bactéries, globules rouges), et des nano et microparticules, qui peuvent être liées de manière très sélective à une cible (cellules particulières, pathogènes, protéines, matériel génétique...). Depuis les années 2000 des articles de revues sont accessibles sur la magnéto-microfluidique. Certains traitent essentiellement de la synthèse des particules [118, 119], d'autres d'applications spécifiques [120, 121], des systèmes magnétiques [122, 123, 124], ou encore de la détection magnétique [125]. Citons également des revues de référence, plus généralistes, qui traitent à la fois de la synthèse, des systèmes, des applications et pour partie de la détection : Pamme (2006) [126], et Gijs *et al.* (2004 et 2010)[127, 115].

L'objectif dans cette partie est de présenter quels sont les moyens de générer des champs magnétiques (et les gradients associés) dans une puce microfluidique. Différentes classifications peuvent être abordées pour les systèmes, on peut se placer du point de vue applicatif, mais aussi fonctionnel (mélange, séparation, amplification de détection, transport...), discriminer les cas où un flux est présent ou lorsque le liquide est statique, et enfin distinguer les composants permettant la génération du champ magnétique. C'est cette dernière solution qui est retenue pour décrire les dispositifs microfluidiques magnétiques. Le tableau 1.1 présente par ailleurs un récapitulatif des références pour les architectures considérées.

**Aimants permanents externes** Une solution pour disposer d'un champ magnétique est le recours aux aimants. On précise ici aimants externes pour désigner des aimants macroscopiques, qui ne sont pas intégrés dans le système microfluidique. Les aimants sont adaptés pour un usage sur des systèmes petits, ils mesurent quelques millimètres (en général plusieurs centimètres) et présentent une aimantation à saturation de l'ordre du Tesla à température ambiante (> 1.5 T pour le matériau Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B par exemple). Il s'agit de matériaux magnétiques durs, présentant une forte anisotropie magnéto-cristalline.

L'utilisation d'aimants est courante pour la séparation magnétique "macroscopique" réalisée en tubes (type falcon et eppendorf), mettant en jeu des microbilles magnétiques (les nanobilles nécessitant en général une technique MACS avec un matériau ferromagnétique additionnel). En microfluidique, de nombreux systèmes sont basés sur une approche de fractionnement de flux par un champ (ici magnétique) extérieur (FFF<sup>1</sup>) : le flux s'écoule dans une canalisation rectiligne, et un aimant permanent applique une force attractive de manière perpendiculaire à l'écoulement.

Vu les distances mises en jeu pour les déviations (en comparaison d'un tube), on peut procéder à des séparations avec des nanoparticules. Robert *et al.* arrivent ainsi à séparer des populations de monocytes et de macrophages en se basant sur leur capacité endocytotique de nanoparticules (diamètre = 8.7 nm, voir Fig. 1.20 c) [117]. Le système est composé d'une entrée (avec les deux populations), un aimant au voisinage du dispositif, permettant de séparer les cellules latéralement par rapport au flux, et de cinq sorties pour la récupération des populations

---

1. Flow field Fractionnation.

## Chapitre 1. Introduction et contexte de l'étude

---

séparées. Dans le canal,  $\|\nabla\mathbf{B}\| = 80 \text{ T m}^{-1}$ , et la vitesse moyenne du flux permettant d'obtenir une séparation est comprise entre 2 et 4  $\text{mm s}^{-1}$ .

La séparation de cellules basée sur des marqueurs de surface est plus fréquente. Un exemple est donné par Kang *et al.* qui réalisent la séparation de CTCs avec des microbilles (diamètre de 2.8  $\mu\text{m}$ , avidine en surface, couplée à des anticorps anti-EpCAM biotinylés) et un aimant permanent [128]. La géométrie des canaux est en peigne : les billes et cellules séparées sont arrêtées et stockées dans des cavités le long d'un canal principal.

Ce principe de fractionnement de flux peut être couplé avec un phénomène de diffusion comme le montrent Forbes *et al.*, afin de réaliser une détection d'antigènes par fluorescence suite à leur réaction avec des nanoparticules (portant les anticorps correspondant) [129]. En entrée d'un canal en T sont injectés d'un côté les antigènes, de l'autre les particules, et la compétition entre le transport diffusif et la magnétophorèse est observée (Fig. 1.21 a). On peut en déduire la concentration en antigène, le dispositif est donc un capteur en T permettant de réaliser des tests immunologiques. Le même type de séparation latérale peut être obtenu en écoulement diphasique, par exemple pour récupérer, après mélange, des microbilles magnétiques présentes dans une goutte : dans le dispositif de Lee *et al.* (2012), les billes sont attirées d'un côté de la goutte avant que celle-ci ne soit divisée en deux [130].

Une utilisation originale des aimants permanent, montrée par Tabnaoui *et al.*, est la création d'un lit fluidisé magnétique (avec des micro-billes de diamètre 2.8  $\mu\text{m}$ ). Pour contrer les forces de traînée, les forces d'attraction dues à l'aimant dans le microsystème remplacent les forces de gravité qui s'appliquent usuellement pour les lits fluidisés macroscopiques. Le dispositif comprend un aimant placé en bout d'une canalisation où un flux (dont la direction est contraire au sens de la force magnétique) est appliqué, des tests immunologiques peuvent ainsi être réalisés (avec des billes fonctionnalisées), par éluions séquentielles, en utilisant une détection par fluorescence [131, 132].

Les ferrofluides (suspensions de nano particules magnétiques) permettent de réaliser des opérations de magnétophorèse inverse : le liquide porteur (tampon) est le ferrofluide alors que les éléments à séparer sont en solution et ne possèdent pas de propriétés magnétiques particulières, ils sont donc repoussés par le champ de l'aimant. Zhu *et al.* utilisent ce principe pour séparer des particules de propriétés magnétiques différentes : si elles présentent des magnétisations inférieures et supérieures à celle du ferrofluide utilisé, ces microparticules se déplaceront dans des sens opposés par rapport à la position de l'aimant [133]. D'autres travaux basés sur la magnétophorèse inverse sont dédiés à la focalisation de particules. Liang et Xuan parviennent à focaliser des microbilles fluorescentes en polystyrène (diamètres de 5 et 10  $\mu\text{m}$ ) en combinant une injection en T et l'action d'un aimant [134]. Zeng *et al.* étendent cette application à la 3D en utilisant une structure de 8 aimants disposés au dessus, au dessous et sur les côtés de la canalisation : une focalisation 3D de particules de 1 et 5  $\mu\text{m}$  est obtenue à une vitesse moyenne de flux de 400  $\mu\text{m s}^{-1}$  [135].

Il existe également de nombreux systèmes dans lesquels les aimants sont mobiles. Pour continuer avec la magnétophorèse inverse, Kim *et al.* étudient un dispositif combinant la filtration hydrodynamique et l'action d'un aimant permanent pour aiguiller les particules en fonction

de leur taille et de la position de l'aimant [136]. Des fonctions originales de transport sont présentes dans la littérature : PCR en gouttes chargées de particules magnétiques et déplacées le long d'un gradient de température [137], ou encore déplacement de particules perpendiculairement à différents flux laminaires (contenant échantillon, fluorophore et tampons de rinçage) pour la détection de protéine C-réactive [138].

Enfin Chang *et al.* proposent un dispositif 3D pour la capture de CTCs reposant sur une membrane dont les pores sont plus petits que les cellules mais laissant passer les microbilles magnétiques utilisées. Un premier aimant procède à la capture des CTCs et des billes magnétiques. Un deuxième aimant, placé au dessus du dispositif, est agité pour déplacer latéralement les billes magnétiques restées en amont de la membrane et faire tomber celles-ci un étage plus bas (Fig. 1.21 b). Les CTCs peuvent alors être observées et comptées par microscopie de fluorescence [139].

Les critères relatifs à l'utilisation des aimants permanents sont l'aimantation rémanente (dépend de la composition), la taille, le nombre d'aimants employés, ainsi que leur position, qui peut dépendre du temps. Le champ magnétique à proximité des aimants NdFeB sont d'environ 0.5 T, et le gradient de l'ordre de  $10^2 \text{ T m}^{-1}$ . Les forces appliquées sur les microparticules sont dans les meilleurs cas de l'ordre d'une centaine de pN.

**Aimants permanents externes et micro-structures magnétiques** Les aimants permanents seuls génèrent un champ magnétique non homogène. La force exercée étant dépendante à la fois du champ et de son gradient (équations 1.3), il est intéressant de pouvoir perturber le champ localement afin de créer de forts gradients. Dans les matériaux magnétiques doux (comme les alliages Fer-Nickel), il suffit d'appliquer un champ d'excitation (même faible) pour modifier localement l'aimantation. Ainsi la combinaison d'aimants permanents et de matériaux possédant une perméabilité magnétique élevée peut conduire à des gradients (donc des forces magnétiques) élevés localement. On appellera par la suite "structures magnétiques" les structures réalisées avec des matériaux doux.

La séparation de type MACS utilise ce principe : une colonne ferromagnétique est placée dans l'entrefer d'un aimant pour la séparation. Cette colonne est constituée de billes ferromagnétiques (250 à 500  $\mu\text{m}$  de diamètre) permettant d'amplifier localement l'action du champ magnétique [108]. En microfluidique, cette même combinaison est employée, ce qui diffère essentiellement la taille, la géométrie et la composition des structures magnétiques employées. Dans la littérature sont présents des micro-peignes en FeNi [140], des micro-piliers en Nickel [40] (voir Fig. 1.21 c), des grilles en Nickel (en dessous desquelles se situe une rangée d'aimants, dont la direction de l'aimantation est alternée) [141]. Khashan *et al.* suggèrent par ailleurs en 2014, à travers leur étude numérique, d'intégrer ces structures au sein du flux (et non pas en bord de canalisation) pour augmenter l'efficacité de capture [142].

Une structure innovante est présentée par Earhart *et al.*, il s'agit d'un tamis magnétique qui est un réseau de pores (carrés de 40  $\mu\text{m}$  de côté) réalisé dans une membrane de nitrure de silicium, recouverte d'une couche de Permalloy<sup>1</sup> de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur [143]. Le tamis est

1. Permalloy : alliage en général composé de 20% de Fer et 80% de Nickel, dont la perméabilité relative  $\mu_r = 1 + \chi$  est de l'ordre de  $10^5$



positionné dans l'entrefer d'un aimant, comme pour la séparation MACS, mais ici les cellules marquées (CTCs) peuvent être piégées individuellement.

Des lignes (en Nickel) sont également employées pour dévier des particules, on note leur mise en place pour de la séparation multi-cibles (2 tailles de billes : 2.8 et 5  $\mu\text{m}$  en fonction de l'angle des lignes avec la direction du flux, voir Fig. 1.21 d) [144], ou encore pour de la focalisation avant détection [145].

Les matériaux magnétiques doux sont le plus souvent composés de Nickel ou alliages Fe-Ni, mais comme dans le cas des colonnes de Miltenyi, il est possible d'utiliser des billes ou des particules pour réaliser des matrices magnétiques. Le PDMS magnétique est ainsi réalisé : on dispose, dans du PDMS (avant réticulation), des particules d'oxyde de Fer de taille micrométrique. Il est possible d'obtenir plusieurs types de structures (piliers de diverses formes) pour la séparation de microparticules magnétiques et de cellules marquées [146], ou de construire des cônes magnétiques, positionnés dans une canalisation, permettant le mélange de solutions lorsqu'un aimant permanent (placé en dehors du dispositif) est agité [147].

L'introduction de micro-structures magnétiques permet de travailler avec des champs magnétiques élevés (aimants permanents) et d'augmenter la valeur du gradient. Pour les forces appliquées, on est de l'ordre du nN soit une augmentation environ d'un facteur 10 par rapport à un aimant permanent seul.

**Micro-aimants** Les aimants permanents couramment utilisés sont de taille "macrométrique". Il existe cependant des cas où des éléments de taille micrométrique peuvent générer un champ magnétique. Coudron *et al.* décrivent par exemple l'utilisation de bandes magnétiques (présentes sur les cartes magnétiques que nous utilisons quotidiennement) [148]. Ainsi les pistes magnétiques de nos cartes bancaires ne sont autre qu'une séquence de bandes formées de micro particules ferromagnétiques ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), contenues dans une matrice polymère. Ces bandes sont dotées d'une aimantation rémanente, et si des bandes voisines ont des directions d'aimantation opposées, un gradient de champ important est créé à leur limite. En reprogrammant une carte et en y ajoutant un canal microfluidique en PDMS, l'étude montre qu'il est possible de capturer des microbilles (superpara)magnétiques, une efficacité de piégeage de 85% est obtenue pour une vitesse moyenne de flux de  $125 \text{ mm s}^{-1}$ . Une autre option, qui demande un équipement bien plus important qu'un encodeur de cartes magnétiques, est de fabriquer et magnétiser de "vrais" aimants permanents. Pivetal *et al.* fabriquent ainsi un réseau d'aimants NdFeB (sur les derniers travaux, chaque aimant est un carré de  $7.5 \mu\text{m}$  de côté et  $5 \mu\text{m}$  d'épaisseur) [149, 150]. La génération de forts gradients permet le piégeage de bactéries marquées par des nanoparticules magnétiques (diamètre = 50 nm). Les forces magnétiques mises en jeu sont semblables à ce qu'on trouve pour des aimants permanents macroscopiques : de l'ordre de  $10^2$  pN.

**Aimants externes et micro-bobines : systèmes hybrides** Nous avons vu jusque là les possibilités offertes par les aimants permanents (macro et micro) et par les micro-structures en matériau magnétique doux. La deuxième manière d'obtenir un champ magnétique est de le générer à partir d'un courant électrique. Ce courant traverse un milieu conducteur, en général

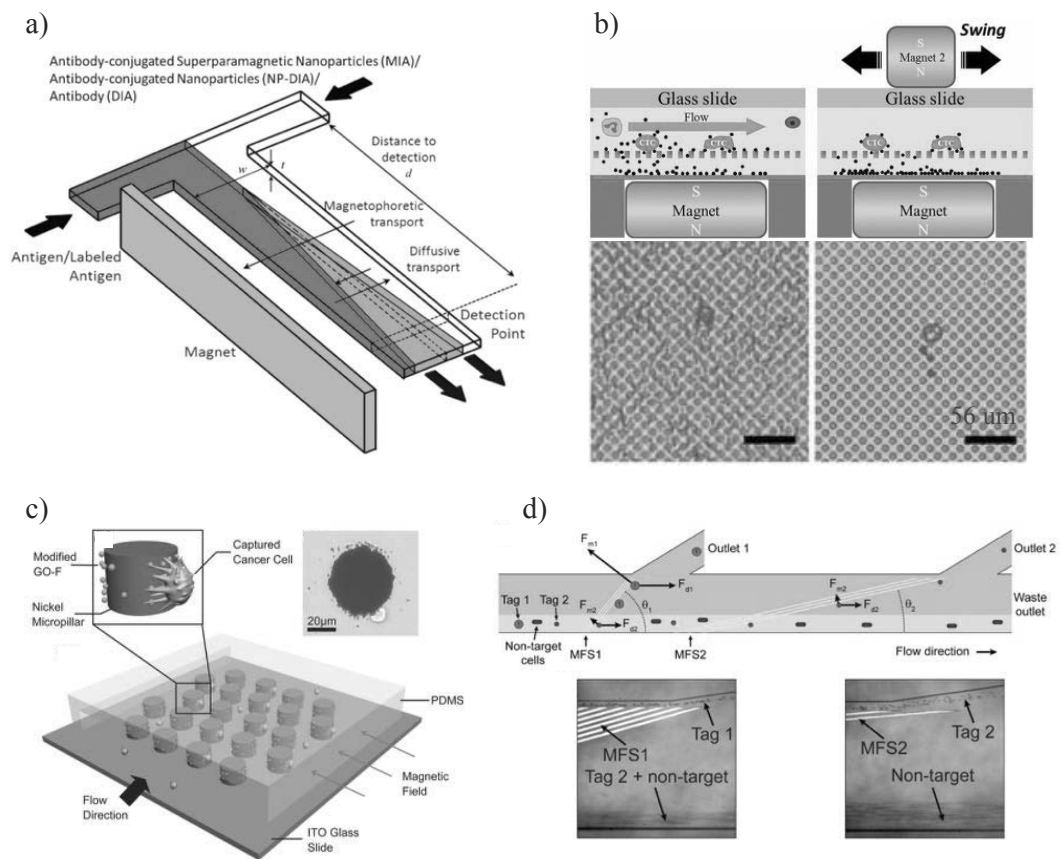


FIGURE 1.21 – Aimants permanents externes (a) et b) et micro-structures magnétiques (c) et d). a) Compétition entre diffusion et magnétophorèse pour la détection d'antigènes [129]. b) Piégeage de CTCs et nettoyage de surface avec un aimant mobile [139]. Piégeage de cellules sur des piliers en Nickel recouverts de billes magnétiques marquées [40]. Lignes en Nickel pour la séparation différentielle de particules aux propriétés magnétiques différentes [144].

une bobine (appelée aussi électroaimant). Dans le but de disposer à la fois d'un fort champ magnétique, et d'un fort gradient de champ, il est judicieux de combiner aimants permanents (créant un champ homogène puissant), et des microbobines (ou microfils conducteurs) pour modifier localement le champ et obtenir un gradient. Cette approche hybride est utilisée en microfluidique, et permet d'introduire le contrôle (électrique, et le plus souvent numérique) de la force magnétique appliquée. Il est également nécessaire de souligner que cette force peut être attractive ou répulsive selon le sens du courant appliqué.

Dès 2003, Rida *et al.* montrent qu'il est possible de magnétiser des microbilles (celles-ci forment alors des colonnes) et de les déplacer grâce à deux matrices de bobines planaires (superposées en quinconce) présentes sur un PCB [151]. Un champ permanent de 50 mT est créé par 2 aimants permanents, les bobines génèrent des champs de 1 à 4 mT, permettant de transporter des colonnes et paquets de billes à une vitesse de l'ordre de  $1 \text{ mm s}^{-1}$ . Le courant électrique appliqué est de 1 A et les bobines sont des spires de 3.5 mm de diamètre, soit entre 4 et 10 enroulements de pistes de cuivre de 35 et 100  $\mu\text{m}$  de hauteur et de largeur respectivement. De nombreuses autres publications reposent sur des systèmes hybrides, pour des applications telles que le transport selon un axe d'une goutte de ferrofluide [152], le transport et l'extraction de billes magnétiques au sein de gouttes pour la purification et la détection d'ADN [153], et de même le transport, l'extraction et le mélange de billes, toujours dans des gouttes, pour la préparation d'échantillon, l'extraction d'ADN et PCR sur puce [154] (voir Fig. 1.22 a). Toutes ces références sont basées sur une technologie PCB pour les bobines (qui sont plus de taille milli que micrométrique). L'échauffement provoqué par l'effet Joule est identifié comme une limitation, des solutions de refroidissement (dissipateur de chaleur) sont proposées dans certains cas [154].

D'autres technologies sont employées pour la réalisation de bobines plus compactes, Chang *et al.* conçoivent par exemple des bobines spirales d'un diamètre de 100  $\mu\text{m}$ , obtenues par évaporation (2 couches de Ti/Au 10/200 nm séparées par une couche de 200 nm de  $\text{SiO}_2$ ) [155]. Chaque bobine possède un puits (chambre de réaction) en son centre et est associée à une bille magnétique de 90  $\mu\text{m}$  de diamètre, un aimant permanent est placé de l'autre côté de la bobine (attirant la bille), le tout formant une micro-vanne magnétique. Les courants appliqués sont de 10 nA pour des forces appliquées de l'ordre de la dizaine de nN.

Il n'est pas nécessaire de construire des bobines spirales (nécessitant plusieurs niveaux de métallisation) pour intégrer un actionnement magnétique, des lignes dans lesquelles du courant circule sont suffisantes. Pekas *et al.* montrent que des lignes en Aluminium plongées dans un champ magnétique homogène (apporté par 2 aimants permanents) permettent une séparation magnétique au niveau d'une jonction fluide en Y [156]. Sur un dispositif sans flux, Stateikina *et al.* présentent des lignes (fils) électriques (10  $\mu\text{m}$  de hauteur et largeur) sous forme de boucle (30  $\mu\text{m}$  de diamètre), qui associées à un aimant externe permettent un transport de microbilles magnétiques [157]. Pour limiter la chauffe (limite fixée à 37°C), un courant maximal de 300 mA est appliqué pendant au plus 3 minutes. Des électrodes fonctionnalisées sont présentes en surface de chacune des boucles, et les billes (porteuses de l'analyte d'intérêt) sont attirées puis éjectées au niveau du centre de ces boucles (Fig. 1.22 b). Cet actionnement permet ainsi une meilleure efficacité et sensibilité de détection.

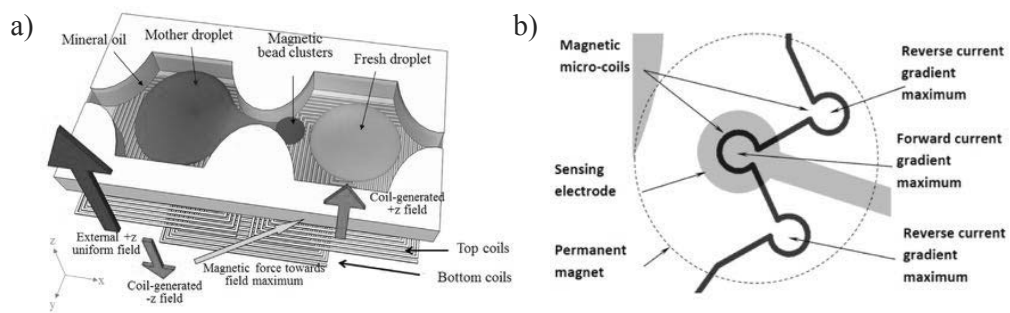


FIGURE 1.22 – Systèmes hybrides : aimants externes et micro-bobines. a) Deux niveaux de micro-bobines spirales planaires baignant dans un champ magnétique homogène vertical pour l'actionnement et le déplacement de billes magnétiques en gouttes [154]. b) Micro-bobines filaires dans un champ magnétique homogène pour l'attraction et répulsion de billes marquées en vue de leur détection [157].

Les systèmes hybrides constituent une solution intéressante car ils bénéficient de champs magnétiques importants (aimants permanents) permettant de saturer l'aimantation des microparticules, et de l'aspect de contrôle et automatisation (micro-bobines). L'actionnement, en terme de force, est limité par l'échauffement dû aux bobines, et les technologies nécessaires pour l'élaboration de microbobines intégrées s'étendent du PCB aux techniques de microfabrication classiques (en général plus coûteuses).

**Bobines externes et micro-structures magnétiques** Les dispositifs microfluidiques peuvent être soumis à un champ magnétique créé par des bobines externes, et intégrer des micro-structure magnétiques pour l'amplification du gradient du champ. Dans certains cas, l'entrefer ou le circuit magnétique lié à la bobine externe peuvent atteindre des dimensions micrométriques, mais dans la mesure où ces éléments ne sont pas intégrés à la partie fluide, nous considérons qu'ils forment un ensemble avec la bobine et traitons ces cas plus bas.

Les résultats de Shields *et al.* montrent le piégeage de paires de cellules seules en magnétisant des micro plaques de cobalt déposées au fond de puits. Le champ externe est fourni soit par des aimants soit par des électroaimants, ces derniers permettant d'étudier plus simplement la force du champ nécessaire au piégeage [158].

L'équipe de Viovy *et al.* a mis au point la technologie "Ephesia" : il s'agit d'un dispositif de séparation cellulaire basé sur un réseau de colonnes de billes magnétiques fonctionnalisées. De l'encre magnétique (points de  $10\ \mu\text{m}$  arrangés de manière hexagonale) est déposée en fond de canalisation et permet d'obtenir un fort gradient de champ magnétique, formant des points d'accroche pour les billes (voir Fig. 1.25 a). Le champ magnétique vertical, généré de manière externe par une bobine (30 mT), magnétise les billes qui s'organisent en colonnes spontanément (48 rangées de 1000 colonnes) [159, 41, 160, 161]. Un principe similaire est utilisé pour le guidage de gouttes contenant des microbilles magnétiques (diamètre  $1\ \mu\text{m}$ ), du PDMS magnétique forme des rails et est magnétisé avec une bobine externe (intensité électrique jusqu'à 3 A, soit un champ magnétique de 45 mT) [162].

Katsikis *et al.* publient en 2015 une étude sur un système magnétofluidique permettant de

réaliser des opérations logiques. Des champs magnétiques horizontal (tournant) et vertical (fixe) entraînent l'aimantation d'éléments (formes en "I" ou en "T"), et des gouttes de ferrofluides se déplacent sur ces éléments en fonction des puits de potentiel magnétique, comme le montre la Fig. 1.25 b). Les champs magnétiques sont créés à l'aide de 3 bobines externes (2 bobines de Helmholtz pour les champs tournant planaires, jusque 10 mT, et une 1 bobine pour la direction verticale, jusque 40 mT), alors que les éléments magnétiques sont des dépôts (lignes) de Permalloy de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La taille des gouttes (diamètres de 300 à 1000  $\mu\text{m}$ ) et des dispositifs, la fréquence de rotation du champ sont étudiés, et de nombreuses fonctions logiques (portes AND, OR, XOR, NOT, NAND, flip-flop...) sont réalisées [163].

Les champs magnétiques créés avec des bobines externes sont de l'ordre de quelques dizaines de mT, et l'utilisation de micro-structures permet une amplification locale des champs et des gradients. Les forces estimées, pour les microparticules, sont de l'ordre de quelques  $10^2$  pN.

**Bobines externes, micro-structures magnétiques et micro-bobines** Certaines études vont encore plus loin en terme d'intégration et de contrôle des fonctions. Dans leur système, Lim *et al.* combinent des bobines externes (fournissant un champ magnétique tournant), ainsi que des éléments magnétiques doux et des lignes de conducteurs (micro fils) pour le contrôle local du gradient. Les micro-structures (film de permalloy de 100 nm d'épaisseur) sont organisées en réseaux de demi-cercles et permettent de diriger et contenir dans un espace fermé des micro-billes et des cellules (marquées) uniques (voir Fig. 1.25 c). Une impulsion (100 mA dans les bobines (micro fils, lignes d'or de 200 nm d'épaisseur) permet aux particules/cellules de passer d'un circuit magnétique à un autre (modification locale du champ) [164].

**Micro-bobines** L'utilisation de micro-bobines seules est également possible et est synonyme d'une plus grande flexibilité, le champ magnétique étant créé localement, là où il est nécessaire. Une bobine est simplement un conducteur (ou enroulement de conducteur), ici nous considérons également que le noyau (en matériau ferromagnétique) fait partie intégrante de la micro-bobine, nous le distinguons donc des "micro-structures magnétiques" introduites précédemment.

Les bobines spirales planaires (deux niveaux de conducteurs nécessaires) permettent d'obtenir une intensité et un gradient du champ magnétique généré plus élevés que pour des bobines sans enroulement. Comme pour les combinaisons aimant externe et microbobines, une technologie PCB peut être utilisée. Poesio *et al.* utilisent par exemple des bobines (12 mm de côté, largeur de fil de 200  $\mu\text{m}$ ) sur deux niveaux, pour tester en fréquence le déplacement d'une goutte de ferrofluide et caractériser des surfaces superhydrophobes [165]. La plupart des systèmes utilisés en microfluidique dans la littérature sont néanmoins plus compacts.

Pour des applications de séparation et de détection en microfluidique, dès 2001, Choi *et al.* réalisent des micro-bobines en cuivre (enroulement de 12 tours, épaisseur 25  $\mu\text{m}$ , largeur du fil 50  $\mu\text{m}$ , espacement entre les fils 30  $\mu\text{m}$ , avec un coeur en permalloy). La fabrication est basée sur une technologie verre-silicium, et les résultats montrent le piégeage de microbilles (1  $\mu\text{m}$  de diamètre) en injectant 300 mA de courant électrique. Un modèle de la valeur de l'inductance en fonction du taux de recouvrement (par les billes) de la bobine est également proposé [166].

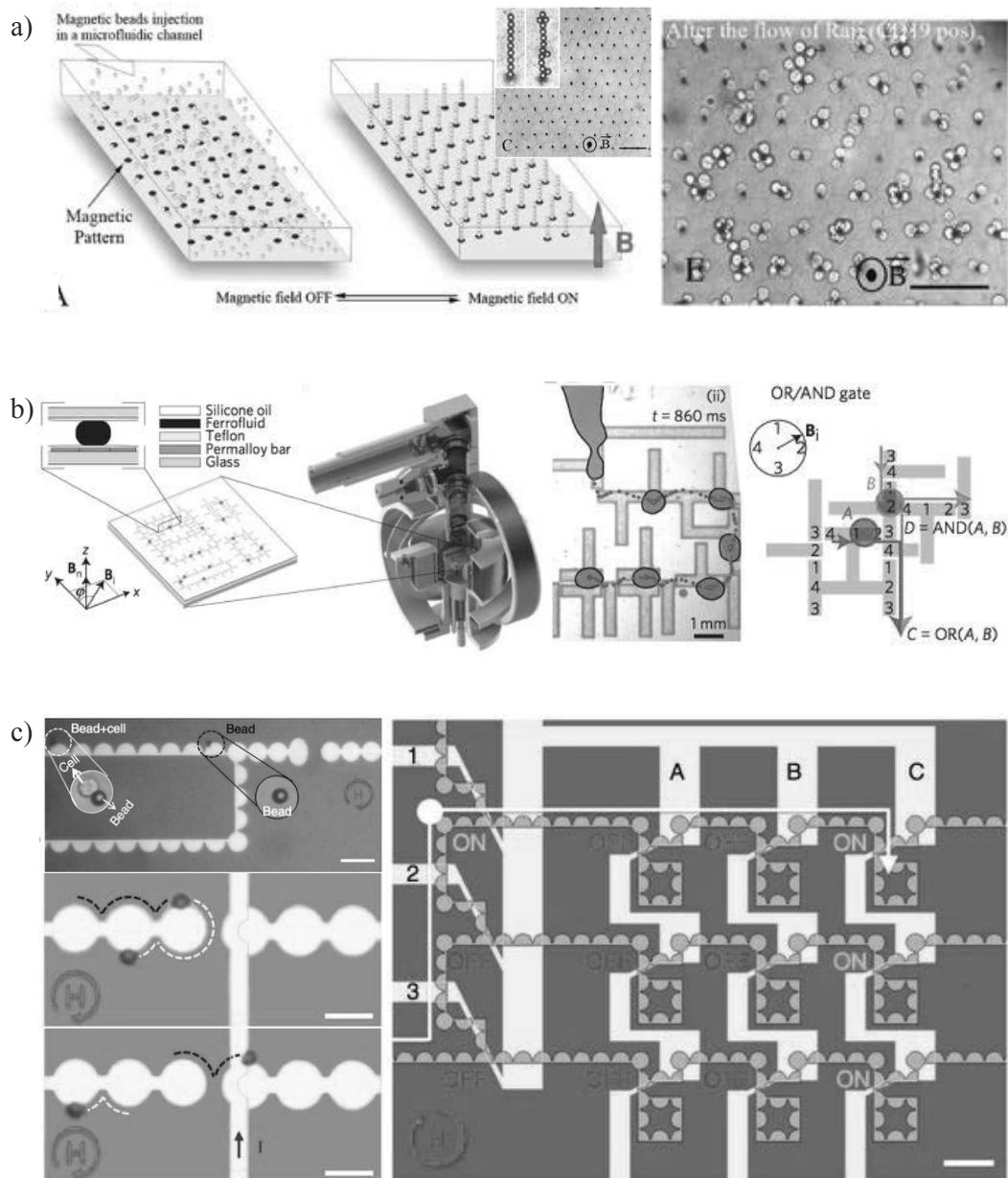


FIGURE 1.23 – Bobines externes, micro-structures (a) et b) ainsi que micro-bobines (c). a) Système "Ephésia" pour le piégeage de cellules par un réseau de colonnes de micro-billes [41]. b) Calcul booléen avec des gouttes de ferrofluides en utilisant des champs magnétiques tournant planaire et vertical. Exemple de génération de goutte et de porte logique OU/ET [163]. c) Déplacement de billes et cellules marquées le long de structures magnétiques avec un champ tournant, et contrôle du passage de structures (transistor) par injection de courant dans une micro-bobine de type fil. Image de cellules de stockage [164].

Ramadan *et al.* analysent de nombreux designs de micro-bobines : fils, méandres, boucles, spirales avec noyau (plot magnétique) ou non, présence de plaques magnétiques... La Figure 1.24 a) présente quelques dispositifs. Dans tous les cas elles sont réalisées avec des fils de 3 et 10  $\mu\text{m}$  de largeur et épaisseur respectivement. Les billes ont des tailles comprises entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ , et les forces appliquées sont de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  pN [167, 168, 169, 170].

De même Zheng *et al.* étudient des matrices de 16 bobines planaires pour la séparation (1.24 b). Les micro-bobines sont en Nickel (fils de hauteur et largeur 20 et 8  $\mu\text{m}$  respectivement, espacement inter-fils de 8  $\mu\text{m}$ ) et la largeur totale d'une bobine est de 450  $\mu\text{m}$ . Le système fonctionne avec des unités de 4 bobines voisines ( $2 \times 2$ ) qui peuvent être actionnées indépendamment. Un courant de 40 mA permet d'obtenir des taux de piégeage supérieurs à 80% si 2 ou 3 des bobines (sur 4) sont alimentées [171].

Des systèmes très différents des micro-bobines planaires existent également, Rong *et al.* proposent des micro-circuits magnétiques, formés chacun de 2 micro-bobines, enroulées autour d'un coeur (NiFe), ce coeur se terminant par des aiguilles magnétiques placées à proximité de canaux (voir Fig. 1.24 c). La fabrication est délicate (enroulement non pas planaire, mais dans l'épaisseur du matériau) et la taille des bobines et des circuits magnétiques limitent l'intégration. La séparation de particules de 8  $\mu\text{m}$ , d'un côté ou de l'autre d'une jonction en Y, est obtenue en injectant un courant de 500 mA [172].

Des technologies simples peuvent être employées pour la réalisation de micro-bobines. Li *et al.* proposent un piège électromagnétique en réalisant un fil conducteur dont la largeur diminue, pour atteindre 6  $\mu\text{m}$  au minimum (épaisseur Ti/Au 20/280 nm). Des billes (diamètre 2.8  $\mu\text{m}$ ), marquées pour se fixer à des bactéries E. coli, viennent se piéger au centre du dispositif, et sont détectées avec un capteur magnéto-résistif à effet tunnel. Le fil conducteur, avec un courant de 30 mA, permet d'attirer et de piéger les billes jusqu'à une distance de 60  $\mu\text{m}$  (pas de flux présent) [173]. D'autres applications comme le mélange peuvent être obtenues en utilisant de simples fils conducteurs : par exemple Suzuki *et al.* se basent sur l'activation séquentielle de bobines pour créer des repliements et étirements d'un liquide chargé de billes magnétiques au niveau de chicanes [174].

Les micro-bobines doivent assurer la génération du champ magnétique et de son gradient. L'ajout de structures magnétiques (piliers, plaque arrière) constituant le noyau de la bobine permet d'obtenir un champ plus important. Différentes échelles sont représentées pour les micro-bobines : de quelques dizaines de microns à quelques millimètres de côté, soit un facteur 100. De même pour la taille des fils des bobines, en épaisseur et largeur (entre les fils micro-fabriqués, dont la section est inférieure à 10  $\mu\text{m}$ , aux technologies PCB où l'on dépasse  $10^3$   $\mu\text{m}$ ). Les géométries spirales planaires sont privilégiées et permettent d'atteindre des champs d'au plus 100 mT et des forces (sur microparticules) de l'ordre de  $10^2$  pN dans des conditions optimales de fonctionnement (donc des températures compatibles, l'échauffement étant une limite omniprésente).

**Bobines externes** Tout comme les aimants permanents, les bobines (ou électroaimants) externes permettent d'appliquer un champ magnétique à l'ensemble du dispositif. Le contrôle (temporel et de l'intensité du champ) est rendu possible avec les bobines, on peut aussi

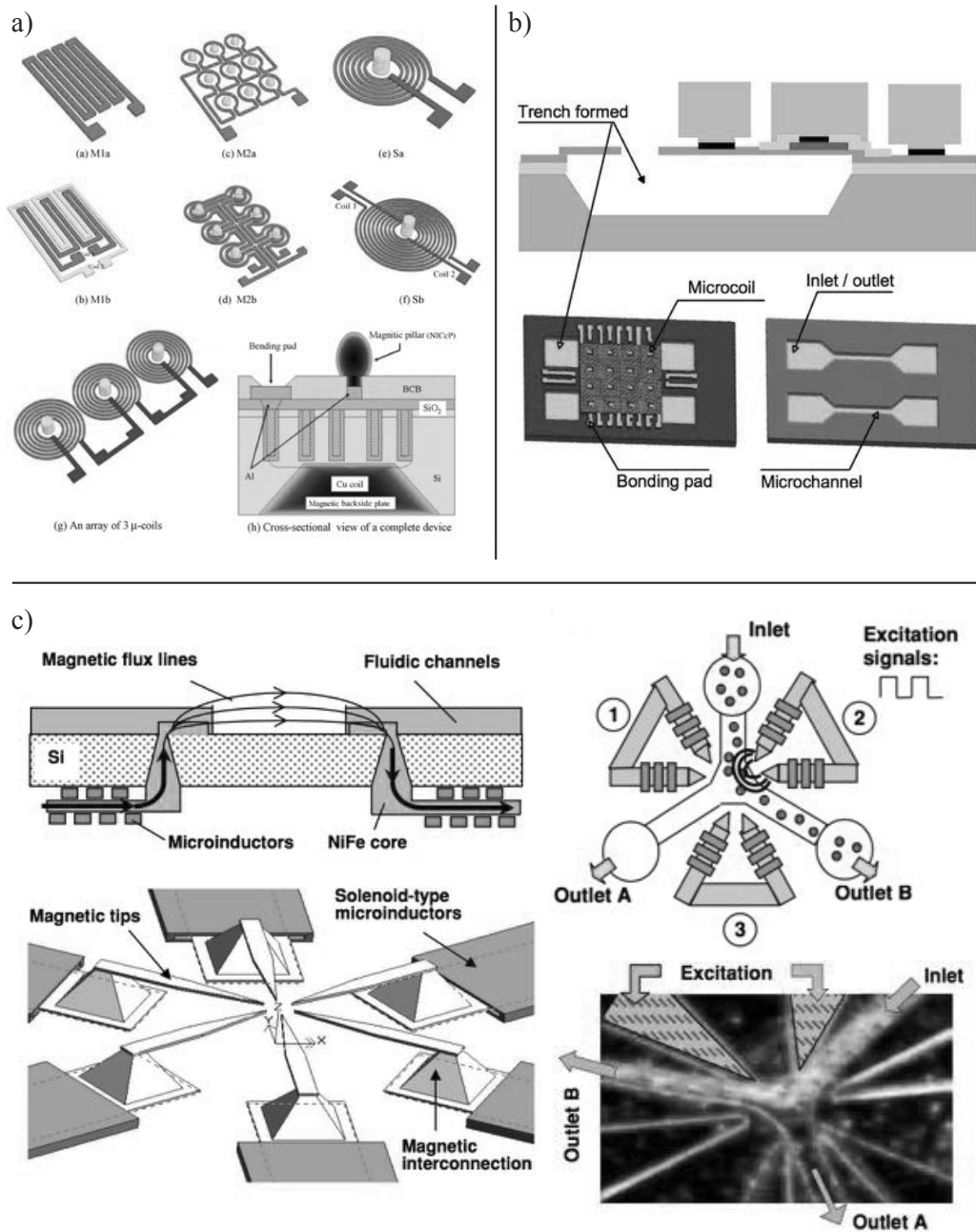


FIGURE 1.24 – Micro-bobines. a) Différents designs de bobines, avec double-bobines et plots magnétiques (noyau de la bobine) [167]. b) Schéma de fabrication pour une matrice de bobines spirales planaires et microcanaux [171]. c) Micro-électroaimants et circuits magnétiques permettant l'attraction de billes magnétiques [172].



facilement obtenir un champ homogène avec des bobines de Helmholtz.

Le noyau des bobines externes n'est pas intégré dans le dispositif, mais peut atteindre des tailles micrométriques (en général de l'ordre de la centaine de microns). C'est le cas du micromanipulateur proposé par Yapici *et al.*. Il s'agit d'une pointe en tungstène recouverte de permalloy par électro déposition et entourée de fils conducteurs. Le déplacement de gouttes (sphères) d'alginate de diamètre 172  $\mu\text{m}$  contenant des billes magnétiques est obtenu en appliquant une intensité de 0.3 à 0.4 A, soit une excitation magnétique  $\|\mathbf{H}\|$  de 2150  $\text{Am}^{-1}$  et une force estimée sur la goutte de 7 pN [175].

Des pinces magnétiques, également basées sur des bobines externes, un noyau et un circuit magnétique de faibles dimensions sont proposées par Ali-Cherif *et al.* et Teste *et al.*. Des pointes magnétisées à proximité d'un capillaire permettent l'extraction et la resuspension de microbilles magnétiques contenues dans une goutte confinée (plug), voir Fig. 1.25 a). La caractérisation du système repose sur la force magnétique nécessaire pour vaincre les forces capillaires, et repose entre autres sur l'intensité du courant électrique, la quantité de micro-billes par goutte, le débit de liquide. . . Des tests immunologiques (multi étapes et agglutination) sont réalisés [176, 177].

Malgré l'utilisation de bobines externes, il est possible de piéger localement des particules. Schotter *et al.* combinent par exemple une bobine de Helmholtz (champ homogène), avec des millibobines (enroulement de 600 tours avec un fil de cuivre de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et un noyau en fer de 1 mm de diamètre) pour positionner des microbilles magnétiques sur des micro-capteurs à magnétorésistance géante [178].

Les études portant sur la rotaphorèse et phénomènes associés nécessitent des champs magnétiques tournant. Bien que certains approches reposent sur des aimants permanents (agitateur magnétique [179]), une instrumentation comprenant de nombreuses bobines est souvent rencontrée (par exemple 5 bobines générant un champ de 20 mT et un gradient de 4  $\text{Tm}^{-1}$  [180]), comme l'indique la Figure 1.25 b).

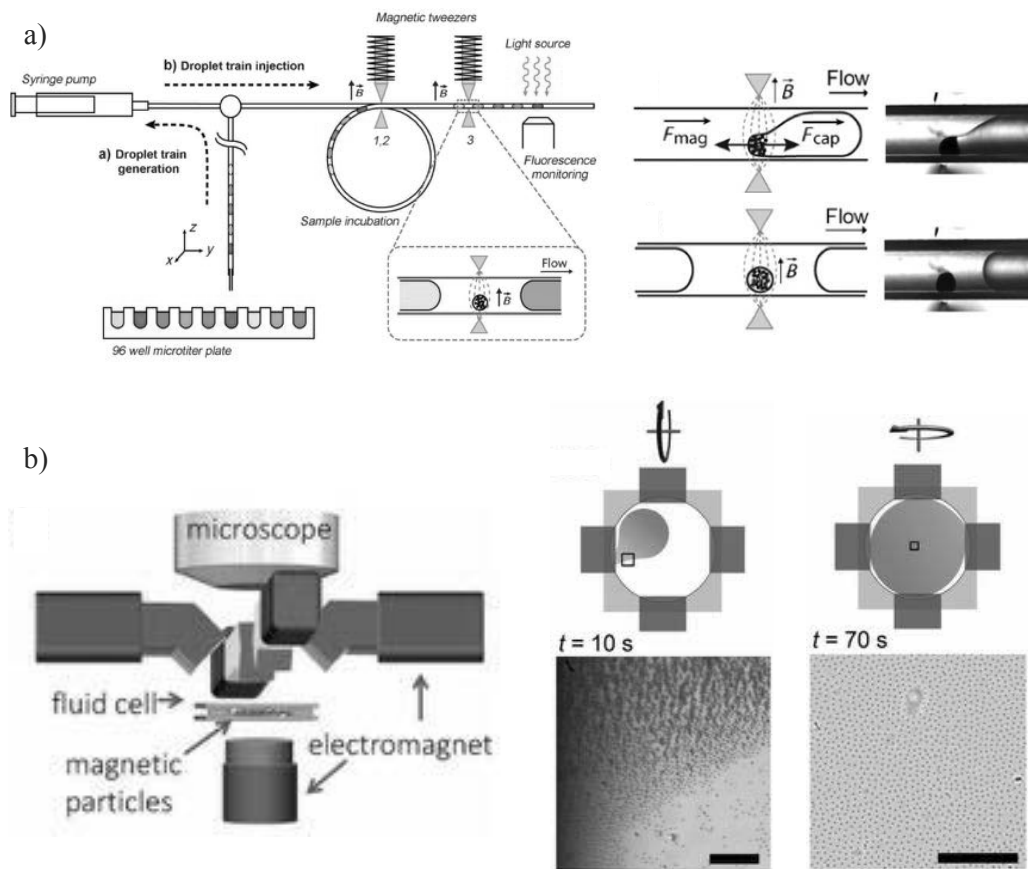


FIGURE 1.25 – Bobines externes. a) Dispositif de pinces magnétiques autour d'un capillaire permettant l'extraction de micro-billes magnétiques d'une goutte et leur réinjection dans une goutte suivante [176]. b) Set-up expérimental pour l'étude de la rotaphorèse interfaciale et dispersion d'un liquide contenant un grand nombre de particules [180].

	Approche intégrée Approche Hybride						
	Aimants externes	$\mu$ -Aimants	Aimants externes + $\mu$ -Structures	Aimants externes + $\mu$ -Bobines	Bobines externes + $\mu$ -Structures	$\mu$ -Bobines	Bobines externes
Mélange			[147]	[154] [155]		[174]	
Séparation	[117] [128] [130] [133] [139]	[148] [149, 150]	[108] [140] [40] [141] [143] [144] [146]	[156]	[158] [159]	[166] [167] [171] [172]	[176] [178]
Détection				[157]		[173]	
Transport			[145]	[151] [152] [153] [154]	[162] [163] [164]	[165]	[175] [180]

TABLEAU 1.1.1 – Tableau récapitulatif des références. On décrit par "approche intégrée" les systèmes présentant au moins un élément intégré dans la puce et de taille comparable à celle des canaux (micrométriques), et par "approche hybride" les dispositifs dotés à la fois d'aimants permanents et de bobines.

**Conclusion** Cet aperçu de la séparation magnétique en microfluidique nous a permis de voir que ce procédé est applicable à différents éléments (particules, cellules...), et fait appel à divers types de dispositifs. Les bobines ainsi que les aimants permanents sont le cœur de ces systèmes et de l'actionnement magnétique. L'évaluation de l'efficacité des dispositifs de tri n'est pas triviale. Les paramètres clefs qui reviennent dans la littérature sont le champ d'excitation (**H**) ou d'induction (**B**) magnétique appliqués (inclus les gradients), la force magnétique exercée sur l'objet que l'on considère, et éventuellement la vitesse des objets. Toutes ces valeurs ne sont pas toujours disponibles, d'autre part les propriétés des particules (taille et susceptibilité magnétique) entrent également en compte. Le caractère technologique est un point important, notamment en termes d'encombrement, de puissance électrique nécessaire et d'échauffement dans le système (effet Joule), qui fixe souvent la limite de courant appliqué dans les bobines. La compatibilité avec les échantillons biologiques utilisés (température, exposition aux micro et nanoparticules, structures invasives en matériaux magnétiques tels le Nickel...) doit en effet être assurée. Du type d'application découleront des critères et des choix pour les systèmes. L'un des plus importants est la présence de flux ou non (transport essentiellement induit par le fluide ou par une force magnétique). Le tableau 1.1 montre que la plupart des systèmes présentés ici, incorporant un actionnement magnétique, sont dédiés à de la séparation. Le transport d'objets et de particules est important, ainsi que les applications de détection. Le mélange par systèmes magnétiques ne représente qu'une faible part de l'activité. Les aimants permanents (systèmes passifs) permettent d'appliquer des champs magnétiques importants, les bobines (systèmes actifs) génèrent des champs moins élevés mais peuvent présenter des gradients de champ élevés lorsque leur taille est très réduite, elles sont d'autre part contrôlables. Les micro-structures magnétiques (matériau à forte perméabilité comme le Permalloy) sont des concentrateurs de champ magnétique et induisent de forts gradients, qu'elles soient utilisées avec des aimants ou des bobines. Enfin les systèmes hybrides (utilisation d'aimants et de bobines) combinent des champs magnétiques élevés, qui amènent les microparticules proches de la (ou à) saturation, et les micro-bobines qui peuvent être contrôlées.

### 1.3.6 Vers une application biologique

Les parties précédentes font apparaître de nombreuses applications aux systèmes microfluidiques, dont la plupart traite un aspect biologique (préparation d'échantillon, séparation, manipulation, culture, détection...). Depuis quelques années, le LAAS avec ses partenaires au laboratoire PharmaDev à Toulouse, étudie la séparation et la détection de monocytes. Cette partie introduit ces cellules particulières et l'intérêt de leur étude.

#### 1.3.6.1 Les monocytes : cellules du système immunitaire

L'ensemble des éléments de défense du corps humain face aux pathogènes constitue notre système immunitaire. Celui-ci est composé de barrières physiques et chimiques (couches épithéliales, notamment la peau), et de cellules. On distingue le système immunitaire inné du système adaptatif (bien qu'ils soient complémentaires et communiquent en continu), qui

Type de cellule	Concentration (cellules. $\mu\text{L}^{-1}$ )	Leucocytes (%)
Globules rouges	$5 \cdot 10^6$	
Plaquettes	$2.5 \cdot 10^5$	
Leucocytes	$7.3 \cdot 10^3$	100
Neutrophiles	$3.7\text{--}5.1 \cdot 10^3$	50-70
Lymphocytes	$1.5\text{--}3.0 \cdot 10^3$	20-40
Monocytes	$1\text{--}4.4 \cdot 10^2$	1-6
Eosiniphiles	$1\text{--}2.2 \cdot 10^2$	1-3
Basophiles	$<1.3 \cdot 10^2$	<1

TABLEAU 1.2 – Concentration des cellules dans le sang humain [181].

font intervenir différents types de cellules. La ligne de défense contre les pathogènes ayant franchi la barrière endothéliale est un ensemble de cellules, appelées cellules phagocytiques, qui font partie de l'immunité innée.

Dans les tissus, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques<sup>1</sup>, ainsi que les monocytes dans le sang sont les types de cellules principaux qui procèdent à la phagocytose (ingestion cellulaire et destruction des pathogènes). Les macrophages et certaines cellules dendritiques sont issus des monocytes. Ces derniers et les neutrophiles circulent dans le sang, avec d'autres cellules sanguines (toutes issues de cellules souches hématopoïétique, voir Fig. 1.26). Les leucocytes (ou globules blancs) sont les cellules du système immunitaire, leur composition dans le sang est indiquée dans le tableau 1.2. Les signaux inflammatoires (cytokines et chemokines) incitent les phagocytes (tels que monocytes et neutrophiles) à s'accrocher aux parois des vaisseaux sanguins et à les traverser (extravasation). Ils se dirigent ensuite vers le site de l'infection où ils phagocytent et tuent les micro organismes infectieux.

Les monocytes sont formés dans la moelle épinière, par un progéniteur granulo-monocytaire. Ils circulent quelques jours dans le sang, où ils seront les plus grosses cellules (de 15 à 25  $\mu\text{m}$  de diamètre, parfois plus). Ils se dirigeront ensuite dans les tissus, où ils pourront se différencier, par exemple en macrophages dans les tissus conjonctifs, en macrophages alvéolaires dans les poumons, en microgliocytes dans le système nerveux central, ou encore en ostéoclastes dans les tissus osseux. Leur durée de vie atteint plusieurs mois.

### 1.3.6.2 Différentes sous-populations de monocytes

Avec l'utilisation de marquage (immunofluorescence) et de la cytométrie en flux, des études ont montré qu'il n'existe pas une population homogène de monocytes, mais plusieurs sous-populations. En 1993, chez les patients atteints de sepsis (septicémie selon l'ancienne appellation) [182], on montrait par exemple la distinction entre deux groupes de monocytes,

1. Les macrophages restent en général dans les tissus et jouent le rôle de sentinelles, qui réagissent en cas d'agression. Les neutrophiles sont recrutés (signaux inflammatoires) et dépêchés sur le site de l'infection. Quant aux cellules dendritiques, elles peuvent aussi phagocytiser et permettent le recrutement de la réponse immunitaire adaptative.

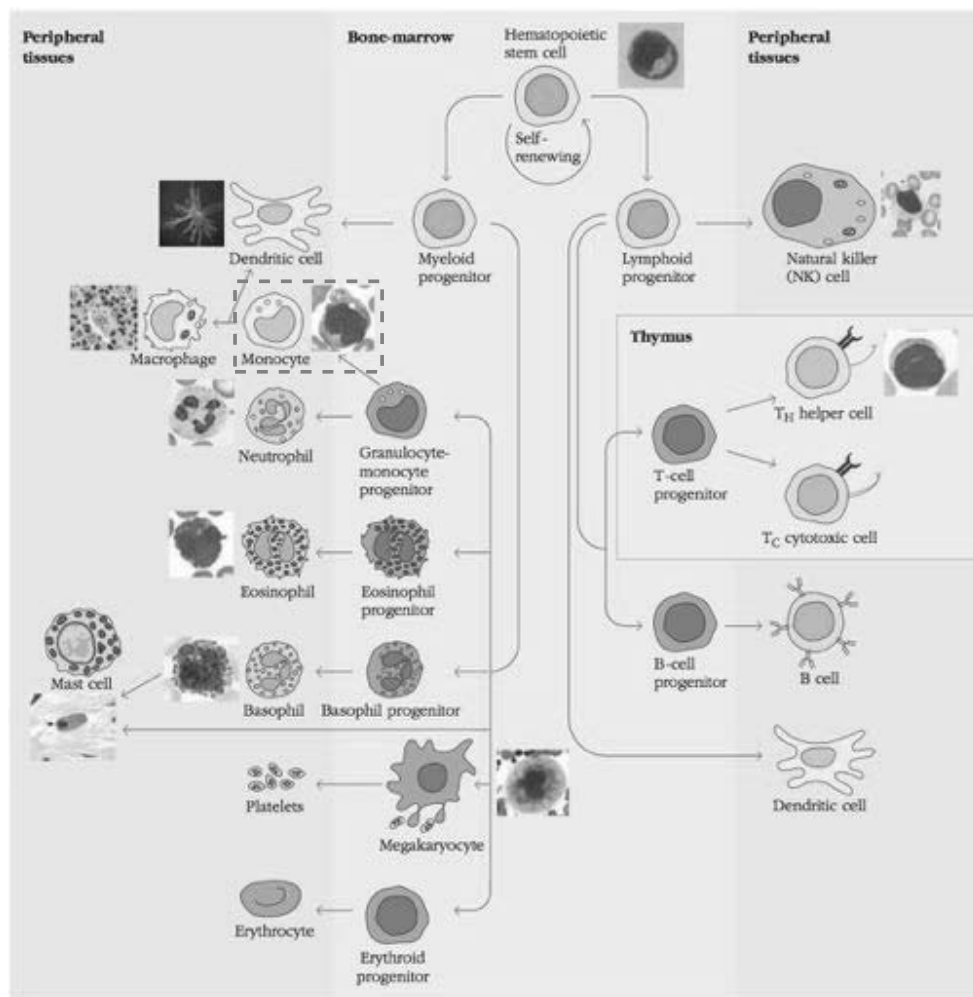


FIGURE 1.26 – Schéma de l'hématopoïèse (reproduit de [181]). La maturation de la plupart des cellules du système immunitaire a lieu dans la moelle épinière (partie bleue), avant que les cellules ne se dirigent vers les tissus périphériques (en rouge). Les monocytes (encadrés en rouge pointillés) sont issus d'un progéniteur granulo-monocytaire et peuvent engendrer des macrophages et des cellules dendritiques.

## Chapitre 1. Introduction et contexte de l'étude

---

différenciés par les niveaux d'expression :

- des antigènes récepteurs aux lipopolysaccharides (LPS), **CD14**,
- des récepteurs aux immunoglobulines Fc $\gamma$  de type III, **CD16**.

Une population majoritaire de monocytes ordinaires exprimant les antigènes CD14 (CD14<sup>++</sup>), et une population exprimant les antigènes CD16, et une plus faible proportion de CD14 (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>).

Une autre étude (1998), réalisée chez des patients dialysés (les infections étant des complications fréquentes pour les patients en insuffisance rénale chronique), montre que la majorité des monocytes est de type CD14<sup>++</sup>, et étudie la présence de sous population CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> chez différents patients [183]. Cette fraction représente 8%  $\pm$  4% des monocytes chez les patients sains (contrôle), 14%  $\pm$  3% chez les patients stables sous hémodialyse, et enfin près de 24% des monocytes pour les patients dialysés souffrant d'infections chroniques. Le nombre de monocytes CD14<sup>++</sup> n'a en revanche pas évolué, ce qui montre qu'il s'agit d'une augmentation de la sous-population CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>. Par ailleurs, ces monocytes montrent un taux de phagocytose plus élevé pour E. Coli que les monocytes "ordinaires", et expriment des niveaux plus élevés d'antigènes MHC-II (HLA-DR, -DP et -DQ) et des niveaux comparables d'antigènes MHC-I (HLA-ABC). La sous-population CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> permet une phagocytose accrue, exerce toujours les fonctions de présentation d'antigènes, et se trouve en expansion lors des infections chroniques et aiguës.

Des études montrent l'existence de deux sous-population de monocytes chez la souris [184] ainsi que le rat [185], expliquant les similitudes entre l'homme et le modèle animal pour ces cellules. La sous-population CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> est labellisée "pro-inflammatoire", et son rôle dans les mécanismes d'infection et d'inflammation est abordé [186], avant une évolution de la classification, plus récente, faisant intervenir une troisième sous-population.

Cette classification, communément admise, fait donc intervenir trois sous-populations [187] :

- Monocytes classiques (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>)
- Monocytes intermédiaires (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>)
- Monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>).

Notons l'appellation monocytes non classiques (et non "inflammatoires" ou "pro inflammatoires" pour éviter la confusion). D'autre part, en ce qui concerne la notation pour la concentration des antigènes CD16, il faut compter environ un facteur 10 entre CD16<sup>-</sup> et CD16<sup>+</sup>, et de même entre CD16<sup>+</sup> et CD16<sup>++</sup> [187].

Les monocytes intermédiaires formeraient une population à part entière (plutôt que juste un état transitoire) en raison de l'expression élevée des récepteurs impliqués dans les processus de réparation, en outre cette population est spécifiquement enrichie dans la moelle épinière. Les monocytes intermédiaires se trouvent en faible quantité, possèdent des caractéristiques uniques et se développent par traitement à la cytokine et lors du processus d'inflammation.

L'athérosclérose correspond à l'épaississement de la paroi d'une artère, dû à l'invasion et l'accumulation de macrophages, plaquettes, fibrinogène, lipides et calcium, formant une plaque d'athérome. Cette plaque diminue le diamètre de l'artère et peut entraîner une chute du débit sanguin. L'athérosclérose est au centre des maladies coronariennes et plus gravement

de l'infarctus du myocarde, ce qui en fait une des causes de décès les plus importantes dans le monde (1 mort sur 3)<sup>1</sup>.

Ghattas *et al.* proposent en 2013 une revue sur le rôle des monocytes et de leurs différentes sous-populations dans l'athérosclérose, les syndromes coronaires aigus et la récupération cardiaque [188]. Des études montrent que les populations de monocytes classiques comme non classiques jouent un rôle dans l'athérogénèse. En revanche les monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) présenteraient des propriétés de "surveillance" des tissus sains (patrouille permanente de longue portée le long de l'endothélium). La population intermédiaire serait celle qui présente le plus de récepteurs de surfaces impliqués dans les processus de réparation et auraient aussi des liens plus directs avec l'angiogénèse. Il est d'autre part proposé d'ajouter la présence du récepteur aux chimiokines (cytokines chimiotactiques) CCR2<sup>+</sup> (les monocytes non classiques étant CCR2<sup>-</sup>) pour mieux différencier les sous-populations.

Une revue de 2014 (Yang *et al.* [189]) attribue des propriétés différentes aux trois types de monocytes, prêtant essentiellement des fonctions phagocytiques et de reconstructions aux monocytes classiques, une caractérisation de l'inflammation pour les monocytes intermédiaires, et une activité de patrouille pour les monocytes non classiques. Bien que le rôle des différentes sous-population, ni leur éventuelle différenciation spécifique en cellules dendritiques ou macrophages, ne soient pas encore très bien compris, ces populations évoluent et pourraient servir de marqueur pour de nombreuses pathologies. Ainsi, des études montrent des variations pour l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale chronique, l'arthrite rhumatoïde, l'anévrisme de l'aorte abdominale, l'infarctus du myocarde, le sepsis, le HIV, l'hépatite B, la dengue et la tuberculose. La revue conclut par ailleurs que "la sous-population de monocytes inflammatoires [comprendre non classiques, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>] est un biomarqueur de qualité pour les maladies inflammatoires chez l'Homme, maladies cardiovasculaires incluses" [189].

Un système d'analyse se basant sur les marqueurs CD14 et CD16 permettrait donc d'une part le diagnostic et le suivi des patients atteints de maladies ayant une composante inflammatoire (via la détection des monocytes non classiques), et d'autre part fournirait un moyen d'approfondir les connaissances actuelles sur les fonctions des ces sous-populations.

Le test communément appliqué aux monocytes à l'heure actuelle, hors fins de recherche, consiste simplement à leur comptage lors d'une numération sanguine. Les différentes sous-populations évoquées dans cette partie ne sont donc pas connues. Il est habituel, lors des études sur ces monocytes, d'utiliser des anticorps fluorescents, la microscopie de fluorescence et la cytométrie en flux pour les caractérisations. De nombreux kits sont disponibles dans le commerce (Miltenyi, Invitrogen, BD Biosciences...) pour le marquage avec des nano et microparticules dont la surface est fonctionnalisée avec les anticorps anti CD14 et CD16. La caractérisation des sous-populations, leur séparation et leur manipulation est donc possible avec des systèmes magnétiques, notamment en microfluidique.

---

1. Environ 17.5 millions de décès dus aux maladies cardiovasculaires chaque année, soit 31% des décès dans le monde, notamment dans les pays en voie de développement (source OMS : [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/))



### 1.4 Conclusion

Le travail de recherche pour cette thèse vise d'une manière générale la préparation des échantillons biologiques : extraction des cellules d'intérêt d'un milieu plus complexe sur des critères de taille ou immunologiques. Elle s'articule autour de deux axes : les outils de séparation et de manipulation de cellules, les outils de marquage sur puce, ainsi que le développement de l'intégration en microfluidique, notamment via les dispositifs 3D. Dans ce chapitre, les différents éléments intervenant dans ces problématiques ont été présentés : tri cellulaire, mélange, technologies pour la microfluidique 3D, intégration, actionnement magnétique, et exemple concret d'application avec les sous-populations de monocytes.

L'organisation de ces différents points d'étude au sein de micro-systèmes présente des difficultés, et l'étude bibliographique facilite l'identification de quelques verrous particuliers :

- la taille des cellules et particules contenues dans les échantillons d'origine biologique (sang...) est très dispersée (inférieure à 1  $\mu\text{m}$  pour des particules sanguines et jusqu'à 15–30  $\mu\text{m}$  pour les monocytes) ;
- le mélange de microparticules magnétiques avec des cellules est commun sur pailleasse mais compliqué et assez peu documenté en systèmes microfluidiques. La sédimentation des microparticules doit être prise en compte ;
- l'apport d'architectures 3D est synonyme de fonctions avancées, mais les techniques de fabrication multi-niveaux sont complexes et parfois lentes. Les attentes que nous avons en terme de microfabrication sont élevées : motifs  $< 10 \mu\text{m}$ , procédé robuste et peu coûteux menant à une possible industrialisation. D'autre part les procédés utilisés pour la construction de canaux microfluidiques doivent être compatibles avec les procédés utilisés pour l'intégration d'actionneurs (par exemple bobines) et de capteurs (électrodes) ;
- l'intégration (interface de la puce microfluidique et de l'instrumentation) doit être également robuste mais laisser une certaine flexibilité pour les designs (compatibilité avec une activité de recherche) ;
- le dispositif doit s'inscrire dans une logique de portabilité (éviter le plus possible une instrumentation lourde).

Parmi toutes les options présentes pour la réalisation des différentes fonctions, des choix ont été faits (en se basant sur des critères technologiques et de connaissances).

Ainsi, qu'il s'agisse de tri ou de marquage, des solutions actives et passives ont été proposées. Néanmoins les systèmes actifs font intervenir des technologies non triviales et plus complexes à mettre en œuvre, la plupart du temps, que le dimensionnement de structures et canaux. Même en se restreignant aux solutions passives, laquelle choisir parmi la filtration, le fractionnement en flux pincé, la filtration hydrodynamique, le DLD, la séparation inertielle, ou les techniques biomimétiques ? Le tri par taille est intéressant pour nos applications, les types d'échantillon à traiter pouvant être différents (sang, cellules, particules...). Les techniques inertielle et biomimétiques, qui ne reposent pas exclusivement sur la taille mais sur la plasticité et la présence de marqueurs ne sont donc pas pertinentes. Le point faible de la filtration (même tangentielle) est le colmatage des filtres et par conséquent la faible tolérance aux

particules/cellules de grandes tailles et aux écarts de tailles conséquent. Le fractionnement en flux pincé est une technique élégante et puissante, mais fait intervenir deux entrées (dont un tampon), compliquant ainsi le setup expérimental, et dilue l'échantillon à traiter. La filtration hydrodynamique est polyvalente mais montre une efficacité de traitement en général assez faible, le dimensionnement de nombreux canaux peut alors s'avérer nécessaire. Le DLD est limité pour les petites particules aux résolutions des motifs que l'on peut obtenir en fabrication, en outre le design n'est pas non plus trivial, et la largeur des canaux requise est importante (encombrement des puces élevé). C'est finalement la filtration hydrodynamique qui sera retenue comme solution intéressante pour la séparation de microparticules, par ailleurs en combinant cette technique avec un schéma plus complexe, en 3D, nous pourrions également obtenir une alternative pour des fonctions de mélange. Pour réaliser les opérations de marquage (cellules et microparticules), nous introduirons donc une nouvelle solution, basée sur la filtration hydrodynamique. Dans l'idée d'apporter des éléments de comparaison, une autre technique (qui d'après la littérature semble performante) : la transformée du boulanger, sera utilisée.

Devant les options proposées pour la microfabrication de canaux microfluidiques en 3D, les technologies permettant d'obtenir les résolutions souhaitées (l'impression 3D et les empilements de couches structurées réalisés sans machine d'alignement sont donc exclus), des coûts de procédé raisonnables (exit lithographie dure), des temps de production adaptés (pas de lithographie laser), et surtout offrant une compatibilité avec les autres procédés standards de microfabrication (dépôts métalliques, croissance électrochimique...) sont réduites à l'unité : il s'agit du laminage de films secs photosensibles. Le laboratoire ayant déjà développé des connaissances dans cette technique, la fabrication de films à base de SU-8 sera employée, ainsi que les tests d'autres films commerciaux.

L'option tri immunologique sera abordée par séparation magnétique : il s'agit de récupérer les cellules marquées et de les diriger vers un étage de détection. La miniaturisation et la portabilité des dispositifs (éventuellement dédiés au diagnostic) sont des concepts importants à nos yeux, les systèmes faisant intervenir des bobines externes (nécessitant une alimentation et possible refroidissement externes) sont donc écartés. Les aimants permanents seuls sont intéressants mais nous cherchons ici à contrôler les champs appliqués afin de balayer différentes conditions d'utilisation et obtenir des systèmes dynamiques. Ce sont donc des dispositifs utilisant des micro-bobines, seules ou en combinaison avec un champ homogène créé par des aimants permanents (systèmes hybrides) qui seront étudiés. Des axes complémentaires faisant intervenir des micro-structures magnétiques sont également attirants mais demandent un développement supplémentaire (techniques, investissement en temps...) qui ne peuvent les inclure dans ces travaux de thèse.

En ce qui concerne l'intégration des puces microfluidiques, un travail consistant à améliorer la robustesse et à diminuer l'encombrement des connexions (électriques et fluidiques) sera mené, en combinant l'utilisation de supports de puces et de connecteurs à ressorts. Ils remplaceront des connectiques fluidiques en PDMS collées sur la puce et des connecteurs assemblés sur chaque puce avec une colle conductrice.

## Chapitre 1. Introduction et contexte de l'étude

---

Les principales fonctions et caractéristiques techniques qui sont à l'étude étant définies, un schéma représentant les dispositifs les intégrant est proposé (Fig. 1.27). Le chapitre suivant se consacre aux systèmes de tri et de mélange, et le chapitre 3 traitera de l'actionnement magnétique (séparation et piégeage), on montre également, du point de vue de la microfabrication, l'association des fonctions de mélange et de séparation magnétique sur la même puce microfluidique.

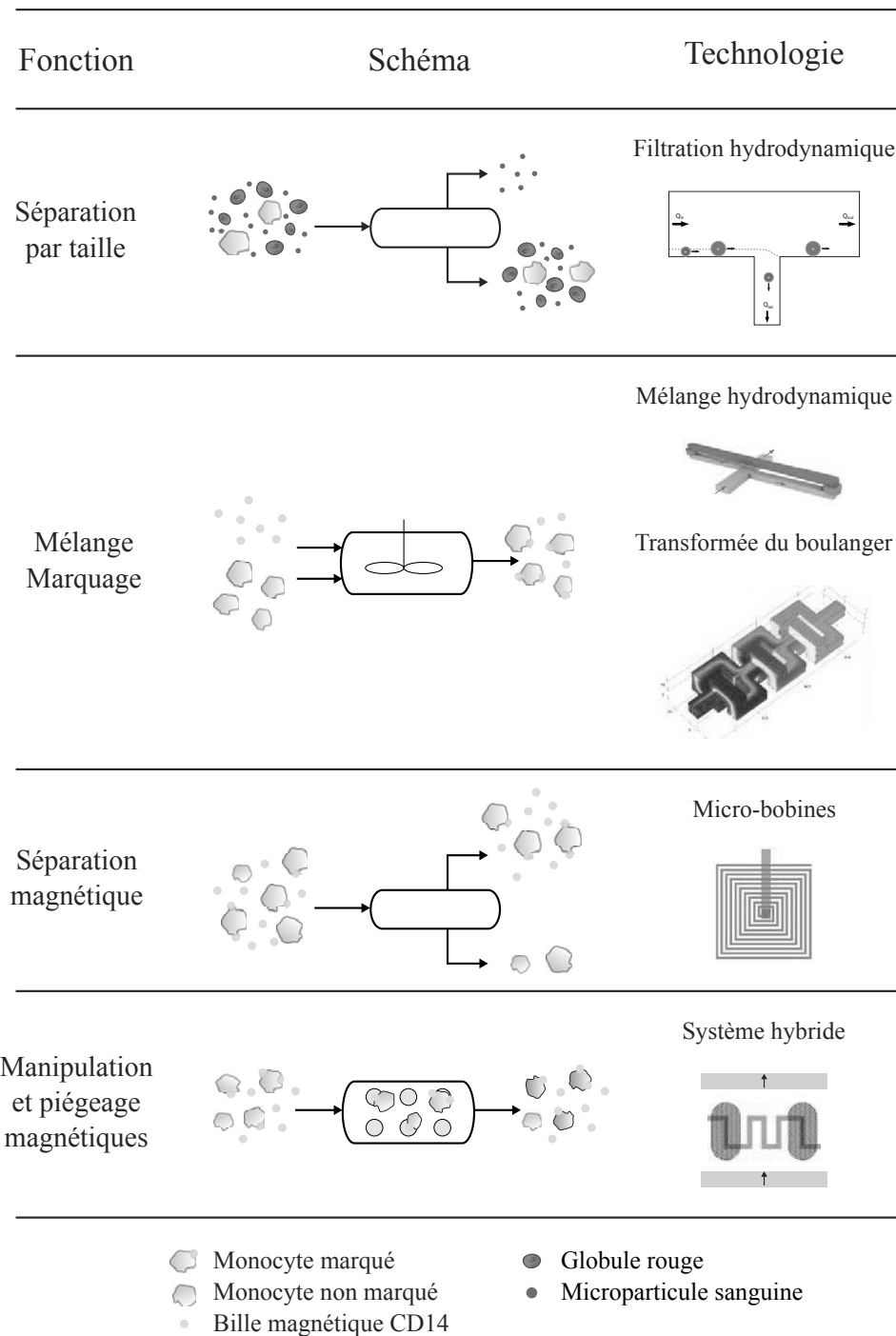


FIGURE 1.27 – Systèmes microfluidiques et fonctions associées. Ce schéma présente les 4 opérations abordées dans ces travaux. La séparation par taille permet par exemple le tri de microparticules sanguines, et repose sur le principe de la filtration hydrodynamique. Le mélange, dédié au marquage de monocytes par des microparticules magnétiques, est réalisé par des structures en 3D (bypass) faisant également intervenir la filtration hydrodynamique, mais aussi par la transformée du boulanger. La séparation magnétique, pour isoler ou caractériser une population de monocytes marqués par exemple, fait appel aux micro-bobines. Enfin le piégeage (manipulation) de billes et de cellules est mise en œuvre avec un système hybride (combinant des aimants permanents, en gris sur le schéma) et des micro-bobines filaires.



## 2 La microfluidique 3D pour la préparation d'échantillons

Le concept de laboratoire sur puce implique la réalisation d'opérations visant à préparer l'échantillon directement dans un dispositif microfluidique. La distribution des liquides (parallélisation éventuelle des procédés), les opérations de mélange, de filtration (tri par taille), d'émulsification sont quelques exemples de pré-traitements réalisables sur puce. En adoptant la vue global d'un système de séparation et de détection de monocytes (test immunologique et comptage), il nous faut dans un premier temps concevoir un étage permettant de récolter les cellules d'intérêt : la filtration hydrodynamique peut être utilisée pour extraire les leucocytes ou d'autres cellules du sang. Un autre étage dédié au marquage des cellules par des billes magnétiques est nécessaire. Deux approches ont été étudiées pour celui-ci, l'une est fondée sur l'utilisation d'une structure de mélangeur classique et performante, l'autre introduit un concept permettant de mélanger des particules et cellules de tailles différentes en se basant sur le tri hydrodynamique.

Ce chapitre est consacré à la démonstration de ces opérations de préparation (filtration et mélange / marquage) avec des systèmes microfluidiques réalisés en trois dimensions, par empilement de films secs photosensibles. Les premières parties traitent des dispositifs et de leur principe de fonctionnement (mélange par étirements-repliements, filtration hydrodynamique et application à une structure particulière). La microfabrication des systèmes 3D est ensuite abordée, suivie de la description des techniques expérimentales.

### 2.1 Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

Le mélange (homogénéisation de la concentration locale d'une espèce) en microfluidique se fait le plus souvent par diffusion (faible nombre de Reynolds dû aux petites dimensions, synonyme d'absence de turbulence). Parmi les différentes techniques de mélange passif en microfluidique (voir section 1.3.2.3 de l'introduction), celles reposant sur l'augmentation du nombre de fronts de diffusion sont particulièrement efficaces [54]. En séparant et recombinant les flux de manière répétée, la transformation du boulanger permet une multiplication rapide du nombre d'interfaces ; une puce microfluidique basée sur son implémentation a ainsi été étudiée pour le mélange moléculaire (eau / fluorescéine), particulière (tampon / particules de 500 nm), et le marquage de cellules (monocytes / billes de 5  $\mu\text{m}$ ).

### 2.1.1 Principe et étude numérique

#### 2.1.1.1 Principe

La transformation du boulanger consiste, en partant d'un état ou une distribution initiale, à étirer puis replier cette distribution, de manière analogue à un boulanger pétrissant une pâte (d'où le nom). La Fig. 2.1 a) montre ce principe appliqué à un canal microfluidique de largeur  $w$  où deux solutions sont initialement mises en contact (1 interface). Après  $k$  étages d'un mélangeur basé sur la transformation du boulanger,  $2^{k+1} - 1$  interfaces sont obtenues. On pourrait imaginer qu'un tel mélangeur à  $N$  étages permette d'homogénéiser des solutions comportant des molécules ou particules de diamètre  $\Phi$  lorsque  $\frac{w}{2^N} < \Phi$ . Pour une largeur de canal de  $50 \mu\text{m}$ , il faudrait un minimum de 7 étages théoriques pour mélanger des particules de  $500 \text{ nm}$ , et 19 étages théoriques pour une molécule de  $10^{-10} \text{ m}$ .

Heureusement, la diffusion moléculaire (due à l'agitation thermique) intervient également et permet d'homogénéiser les espèces d'autant plus rapidement. Dans un canal (largeur  $w$ ) où sont mises en contact deux solutions comportant des concentrations différentes d'un soluté (dont le coefficient de diffusion est  $D$ ), et où la vitesse moyenne de l'écoulement est  $\langle v \rangle$ , on peut considérer, après une longueur  $L$ , que les espèces auront diffusé sur une distance caractéristique  $d$  telle que :

$$d = \sqrt{\frac{DL}{\langle v \rangle}}. \quad (2.1)$$

En introduisant le nombre de Péclet (rapport entre le transport dû à l'advection et celui dû à la diffusion),  $Pe = \frac{w\langle v \rangle}{D}$ , on peut écrire :

$$\frac{d}{w} = \sqrt{\frac{L}{w} \frac{1}{Pe}}. \quad (2.2)$$

Par ailleurs, afin de calculer les coefficients de diffusion de particules, la relation de Stokes-Enstein-Sutherland sera employée :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu r}, \quad (2.3)$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température (sauf indication contraire, prise à  $25^\circ\text{C}$ ),  $\mu$  est la viscosité dynamique (calculs avec celle de l'eau :  $10^{-3} \text{ Pas}^{-1}$ ), et  $r$  est le rayon de la particule. Soit, pour avoir un ordre de grandeur,  $D = 4.37 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  pour une particule de diamètre  $\Phi = 1 \mu\text{m}$ .

Afin de réaliser les applications numériques pertinentes, il est souhaitable de se baser sur les géométries des systèmes utilisés. Le dispositif microfluidique qui a été fabriqué correspond à la répétition d'un motif basé sur la transformation du boulanger (voir Fig. 2.2). La largeur des canalisations est de  $45 \mu\text{m}$  (choisie pour obtenir une section carrée, avec une hauteur des canaux dépendante de l'épaisseur des films secs utilisés, initialement prévue à  $45 \mu\text{m}$ ).

## 2.1. Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

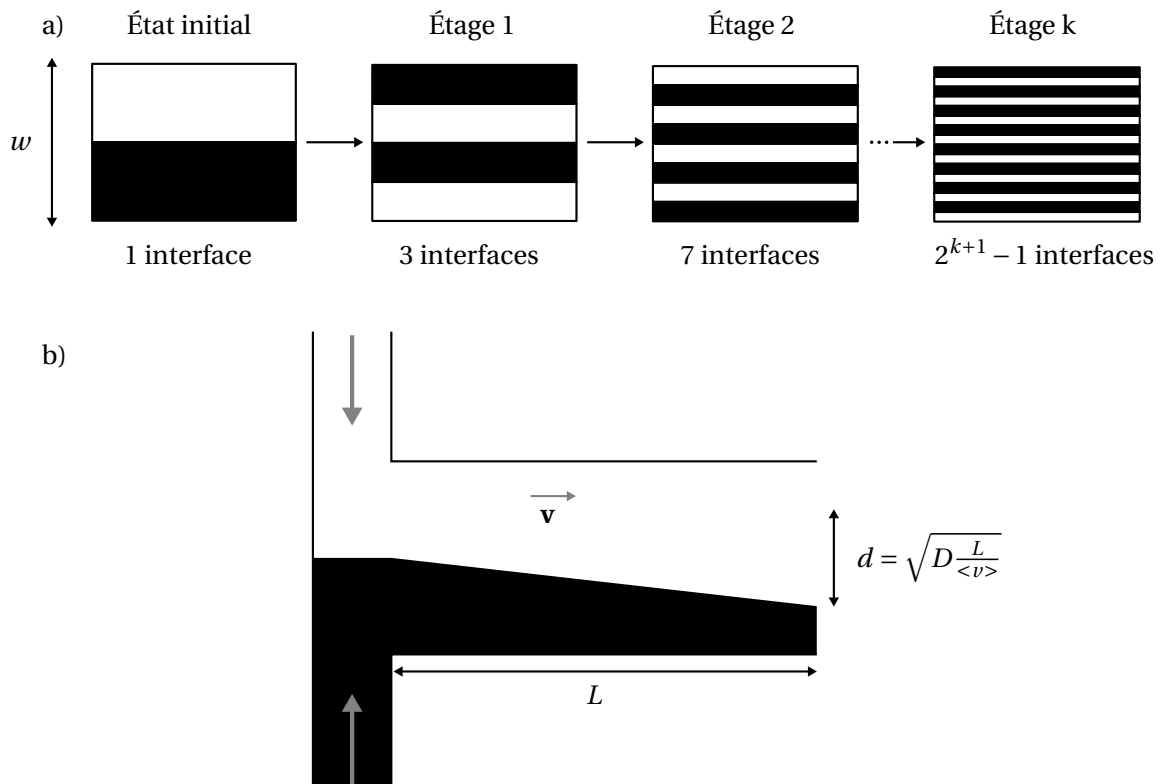


FIGURE 2.1 – Principe de la transformation du boulanger et de la diffusion dans un microcanal. a) Séparation et combinaison de flux pour obtenir  $2^{k+1} - 1$  interfaces (ou fronts de diffusion) au  $k$ -ième étage du mélangeur. b) Diffusion de deux espèces introduites dans un canal sur une distance  $L$ , où  $\langle v \rangle$  est la vitesse moyenne de l'écoulement.  $d$  est la distance caractéristique de diffusion et dépend du coefficient de diffusion  $D$ .

Pour se convaincre de l'utilité d'un mélangeur, on peut calculer la longueur de canal nécessaire à l'homogénéisation de deux solutions ( $d = w$ ), en prenant  $w = 45 \mu\text{m}$ , et  $\langle v \rangle = 165 \text{ mm s}^{-1}$  (ce qui correspond aux expériences réalisées avec notre dispositif).

	Fluorescéine	Particules ( $\Phi = 500 \text{ nm}$ )
$D \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	$3 \cdot 10^{-10}$ [190]	$8.74 \cdot 10^{-13}$
Pe	$2.5 \cdot 10^4$	$8.5 \cdot 10^6$
$L \text{ (m)}$	1.1	$> 380$

On trouve ainsi des longueurs de  $L = 1.1 \text{ m}$  et  $L > 380 \text{ m}$  pour de la fluorescéine et des particules de diamètre 500 nm respectivement ! Une longueur de l'ordre du mètre compliquerait vraiment le design et la fabrication, et au delà ce n'est pas envisageable.

### 2.1.1.2 Première approximation

Le micromélange s'appuyant sur la transformation du boulanger consiste en la création de nouvelles interfaces, ou fronts de diffusion en l'occurrence. Les Fig. 2.1 et 2.2 permettent de visualiser la structure 3D et les profils de concentration (sans diffusion) aux différents étages.



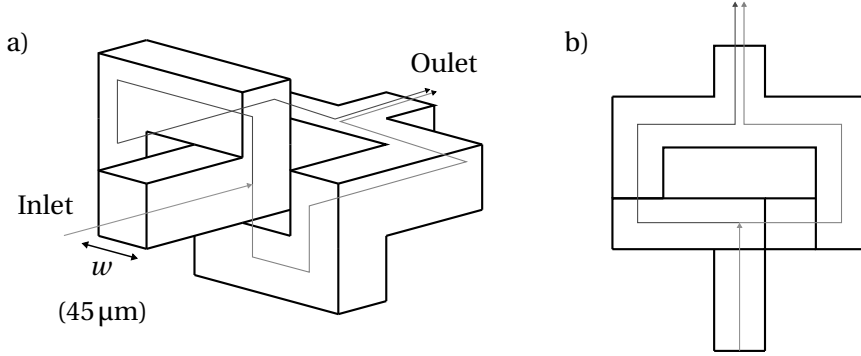


FIGURE 2.2 – Schéma d'un étage de micromélangeur. a) Vue 3D, les flèches rouge et bleue représentent les deux chemins qu'empruntent le liquide après séparation et qui fusionnent en sortie. b) Vue de dessus.

À chaque étage, les interfaces situées sur les bords de la canalisation se retrouvent sur les bords opposés et une nouvelle interface est formée au centre du canal. Les autres interfaces éventuellement déjà présentes sont démultipliées (par 2). En considérant que le chemin parcouru par le flux, à chaque étage, correspond à une longueur  $L$ , la distance caractéristique de diffusion obtenue après  $k$  étages est  $d_k = \sqrt{\frac{DLk}{\langle v \rangle}}$ . Dans le mélangeur proposé, la longueur  $L$  vaut  $L = 8w + 2h$ .

Une première estimation de l'importance de la diffusion peut être calculée avec la somme des distances de diffusion de toutes les interfaces, pour un nombre d'étages  $N$ .

$$d_{\Sigma} = \sum_{i=1}^N 2^i d_i = \sum_{i=1}^N 2^i \sqrt{\frac{DLi}{\langle v \rangle}} \quad (2.4)$$

Afin de comparer la somme de ces distances de diffusion à la largeur du canal  $w$ , nous pouvons introduire le rapport :

$$d_{\Sigma}^* = \frac{d_{\Sigma}}{w} = \sqrt{\frac{L}{w} \frac{1}{Pe}} \sum_{i=1}^N 2^i \sqrt{i}. \quad (2.5)$$

Néanmoins, ce rapport présente le gros inconvénient de ne pas tenir compte, pour chaque interface, de la diffusion due à l'interface voisine. Ainsi après un certain nombre d'étage la distance caractéristique totale de diffusion  $d_{\Sigma}$  peut être supérieure à  $w$ . Il est possible "d'encadrer" cette évaluation en proposant de définir une somme où les distances de diffusion ne peuvent être supérieure à la largeur d'une interface :  $d_k = \min\left(\sqrt{\frac{DLk}{\langle v \rangle}}, \frac{w}{2^{k+1}}\right)$ . Soit :

$$d_{\sigma}^* = \frac{d_{\sigma}}{w} = \sum_{i=1}^N 2^i \min\left(\sqrt{\frac{iL}{w} \frac{1}{Pe}}, \frac{1}{2^i}\right). \quad (2.6)$$

## 2.1. Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

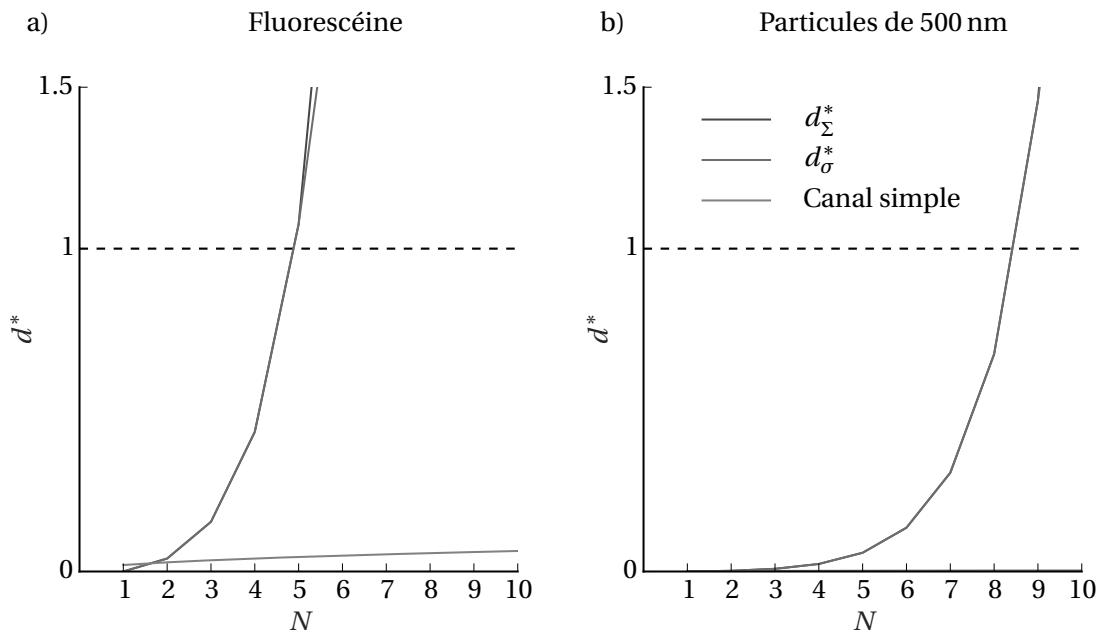


FIGURE 2.3 – Tracés des distances caractéristiques de diffusion adimensionnalisées (par  $w$ ) pour le mélangeur 3D proposé pour a) de la fluorescéine et b) des particules de 500 nm. Le cas du canal simple correspond à la diffusion d'un seul front de diffusion pris le long de la géométrie 3D. La légende est commune aux deux graphes, les courbes bleue et verte sont superposées sur b).

La Fig. 2.3 présente les tracés de  $d_\Sigma^*$  et  $d_\sigma^*$ , ainsi que  $\frac{d}{w} = \sqrt{\frac{NL}{wPe}}$  où  $L$  est la distance parcourue dans l'une des branches le long d'un étage du mélangeur. D'une part on observe que l'ajustement opéré ci-dessus est négligeable puisque  $d_\Sigma^* \approx d_\sigma^*$ . Pour la fluorescéine, un mélangeur à 5 étages devrait être suffisant alors que 8 étages sont nécessaires pour les particules de 500 nm d'après ce modèle. Même pour des particules de taille plus importantes (diamètre 5  $\mu\text{m}$ ), l'influence du coefficient de diffusion est faible comparée à l'effet de recombinaison, seuls 10 étages suffiraient à obtenir une somme des distances caractéristiques de diffusion de l'ordre de  $w$ .

Ce modèle extrêmement simple permet d'apprécier l'utilité d'un mélangeur 3D et l'impact du  $Pe$  sur l'efficacité, mais est loin d'être satisfaisant pour dimensionner et vérifier la fonction de mélange.

### 2.1.1.3 Modèle simplifié, diffusion 1D

Une approche plus rigoureuse et permettant d'obtenir des résultats quantitatifs est la résolution de l'équation de diffusion - advection. On cherche à connaître le profil de concentration d'espèces introduites dans le micromélangeur (décrit Fig. 2.2), en appliquant de nombreuses hypothèses pour simplifier le problème.

La Fig. 2.4 permet de visualiser le problème traité et **spécifie les notations, qui dans cette partie sont différentes** (dues à la méthode de résolution).

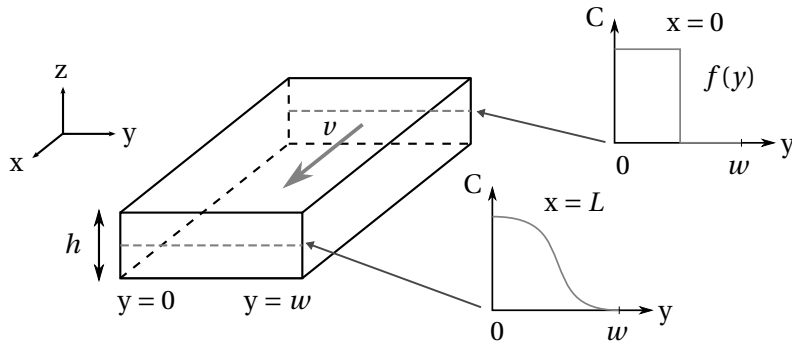


FIGURE 2.4 – Schéma pour la géométrie et la notation du problème de diffusion.

L'équation de diffusion-advection dans le cas général s'écrit :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) - \nabla \cdot (\vec{v} c) + S \quad (2.7)$$

où  $c(x, y, z, t)$  est la concentration que l'on cherche à déterminer,  $D$  est le coefficient de diffusion,  $\vec{v}$  la vitesse du flux et  $S$  un terme de production/consommation de l'espèce considérée.

Les hypothèses suivantes sont adoptées (simplification et choix des conditions aux limites) :

- régime (écoulement, flux de matière) stationnaire,
- le fluide est un liquide Newtonien incompressible,
- l'écoulement est unidimensionnel,
- la vitesse est uniforme ( $\vec{v} = v_x \vec{e}_x$ ),
- la diffusion est normale (coefficient de diffusion  $D$  constant),
- le gradient de concentration (flux de matière) aux parois est nul,
- aucune production ou consommation de l'espèce (réactions chimiques...) n'est envisagée,
- la diffusion moléculaire dans le sens de l'écoulement est négligée par rapport à l'advection.

Ces hypothèses permettent d'obtenir une équation aux dérivées partielles simplifiée :

$$\frac{\partial c(x, y)}{\partial x} = \frac{D}{v} \frac{\partial^2 c(x, y)}{\partial y^2}. \quad (2.8)$$

Dans l'annexe B.2, de plus amples explications et le détail de la résolution sont fournis. Après application d'une méthode de séparation des variables et une décomposition en séries entières, on obtient la solution suivante :

$$c(x, y) = C_0 + \sum_{n=1}^{\infty} C_n e^{-\lambda_n \delta x} \cos(\lambda_n y) \quad (2.9)$$

avec :

$$\lambda_n = \frac{n\pi}{w} \quad (2.10)$$

$$C_0 = \frac{1}{w} \int_0^w f(y) dy \quad (2.11)$$

$$C_n = \frac{2}{w} \int_0^w f(y) \cos\left(\frac{n\pi}{w} y\right) dy. \quad (2.12)$$

Cette solution s'exprime sous une forme mathématique simple mais nécessite une implémentation numérique pour estimer la concentration avec une condition initiale  $c(0, y)$  quelconque. Un programme en Python (2.7) a été conçu pour ce calcul. La condition initiale est un échelon de concentration (moitié du canal à  $c = 2C_0 = 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , l'autre moitié à  $c = 0$ ), et le programme exécute une boucle pour que la concentration obtenue en sortie après la distance  $L$  devienne la condition initiale de l'étage suivant. L'écart type relatif (coefficient de variation)  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle}$  est utilisé pour caractériser la dispersion du profil de concentration. Cette valeur est 0 pour une solution parfaitement homogène et doit donc tendre vers 0 lorsqu'on atteint un nombre d'étages de mélange satisfaisant. Normalement, avec le mélangeur employé, les profils de concentrations sont "inversés" un étage après l'autre (on voit sur la Fig. 2.1 que les valeurs au centre et sur les bords changent d'un étage au suivant), cependant, pour un souci de lisibilité (cela ne change en rien les résultats), le modèle ne présente pas ici ce renversement des valeurs.

Le traitement numérique de l'équation (2.9) présente quelques obstacles. Tout d'abord cette équation contient une somme infinie, il faut donc définir un nombre limite d'itérations. Dans les conditions décrites (échelon), un nombre faible ( $n_{max} \sim 15$ ) ne représente pas avec précision le profil, et un nombre plus élevé ( $n_{max} \sim 50$ ) induit des instabilités. Une valeur de  $n_{max} = 30$  a ainsi été choisie arbitrairement en tenant compte de ces critères. D'autre part la solution de considérer le profil de concentration comme une liste de valeurs, plutôt que d'appeler une fonction de manière récursive, a été retenue pour des raisons de temps de calcul. Les aberrations visibles sur les Fig. 2.5 a) et c) sont dues pour partie à l'intégration numérique intervenant dans le calcul des  $C_0$  et  $C_n$ , et également à l'imprécision introduite par la série entière tronquée.

Les résultats de ce modèle sont présentés sur la Fig. 2.5, toujours pour le même exemple : fluoréscéine et particules de diamètre 500 nm, avec une vitesse de flux  $\langle v \rangle = 0.165 \text{ ms}^{-1}$ . Le premier constat (outre les variations de la concentration dues aux imprécisions numériques) est qu'on observe bien la transformation du boulanger (nombre de fronts de diffusion augmentant en  $2^N$ ) et la décroissance de ces oscillations lorsque le nombre d'étages augmente.

Par ailleurs, en observant les écarts types relatifs  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle}$ , on constate que le résultat du nombre d'étages nécessaires à un bon mélange est voisin de nos prédictions avec le modèle très simple décrit plus haut. On lit sur les Fig. 2.5 b) et d) respectivement qu'il faut  $N > 5$  et  $N > 8$  pour obtenir des  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle} < 10\%$ .

Ce modèle "1D" permet ainsi de vérifier l'ordre de grandeur du nombre d'étages nécessaires

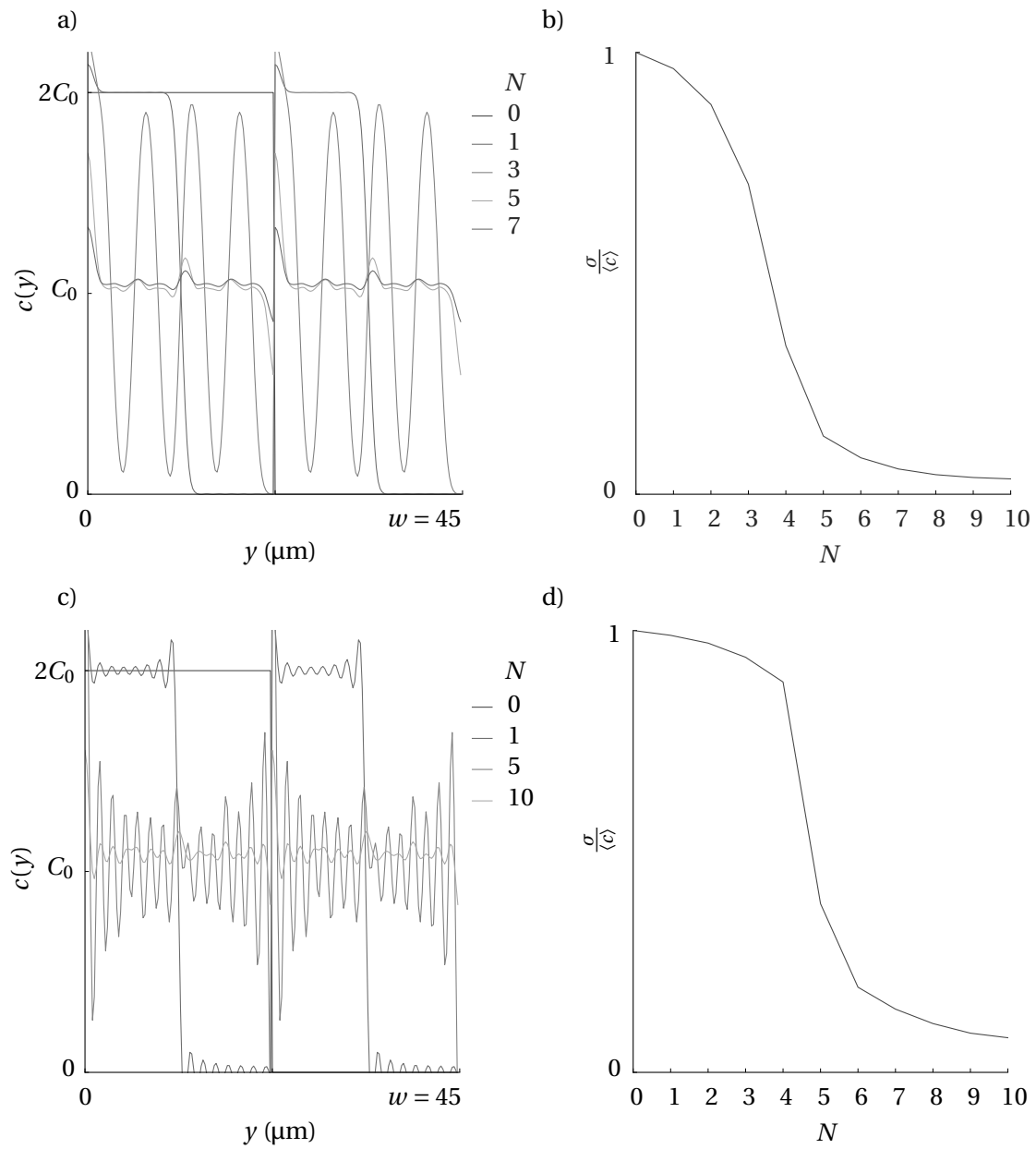


FIGURE 2.5 – Étude du profil de concentration "1D" dans un mélangeur pour de la Fluorescéine (a-b) et des particules de 500 nm (c-d). Les graphes a) et c) représentent le profil de concentration sur la largeur du canal  $c(y)$  à différents étages  $N$  du mélangeur (couleurs précisées). Sur les courbes b) et d) est tracé le coefficient de variation en fonction du nombre d'étages  $N$ .

## 2.1. Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

pour le design de mélangeur proposé afin d'obtenir un mélange satisfaisant. De nombreuses hypothèses ont cependant été posées (notamment concernant l'écoulement, sur la nature du profil de vitesse). Une résolution plus fine du problème d'advection-diffusion apporterait plus d'informations (sur le profil de concentration sur toute la section du canal par exemple) et une validation des modèles simples décrits ci-dessus.

### 2.1.1.4 Éléments finis

Les écoulements de liquide dans un microcanal de section carrée ne présentent pas, en toute rigueur, de profil de vitesse "plat". La partie suivante et l'annexe B apportent plus de détails sur l'expression de la vitesse en fonction de la géométrie des canaux, mais le fait que la vitesse, en régime laminaire, admette un profil parabolique selon la plus faible dimension caractéristique est un résultat connu (écoulement de Poiseuille). La résolution de l'équation de Stokes en régime permanent permet d'accéder aux champs de vitesse et de pression :

$$\nabla p = \mu \vec{\Delta} \vec{v}. \quad (2.13)$$

Une résolution par la méthode des éléments finis de l'équation de Stokes (2.13) et de l'équation d'advection-diffusion (2.7) a ainsi été entreprise pour une série de 10 motifs de mélangeurs. Le logiciel Comsol Multiphysics a été utilisé (modules de résolution d'écoulements rampants et de transports d'espèces diluées).

Les champs de vitesse et pression sont résolus pour un motif de mélangeur (conditions de flux périodiques aux entrée/sortie), en appliquant une perte de charge de  $10^{-3}$  Pa soit 10 mbar le long du mélangeur, correspondant à une vitesse moyenne d'environ  $0.35 \text{ ms}^{-1}$  et un débit de  $40 \mu\text{L min}^{-1}$ . Un premier calcul à  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ , comme précédemment, a été fait et montre un mélange très rapide, par conséquent les résultats pour un débit doublé sont montrés afin de visualiser le mélange sur au moins quelques étages. Les valeurs obtenues pour les vitesses sont prises à l'identique pour chacun des mélangeurs. La résolution de l'équation d'advection-diffusion est ensuite appliquée aux 10 mélangeurs. Les propriétés de l'eau ont été adoptées pour le liquide, et la résolution a été effectuée avec en entrée un échelon de concentration ( $c = 0$  pour  $y < 0$  et  $c = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pour  $y > 0$ , ce pour de la fluorescéine et des particules de 500 nm. Le maillage consiste essentiellement d'éléments tétraédriques, le nombre d'éléments est d'environ 2.6 millions, la taille maximale d'un élément est de  $4.6 \mu\text{m}$ , la taille minimale est de  $0.3 \mu\text{m}$ , le volume moyen est d'environ  $1.5 \mu\text{m}^3$  et une couche limite a été définie.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Fig. 2.6. Seul le mélange eau/fluorescéine est montré, les résultats pour les particules de 500 nm étant très voisins. On observe que le nombre d'étages nécessaires pour obtenir un écart type relatif  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle}$ , aussi appelé coefficient de variation (CV), inférieur à 10% est de 4. Malgré la vitesse moyenne doublée, il semblerait que l'efficacité de ce type de mélangeur soit plus élevée en tenant compte de la géométrie en 3D. Le profil de vitesse (Fig. 2.6 f) n'est effectivement pas plat et on peut en voir l'effet sur les vues en coupe de la concentration (Fig. 2.6 b) : on n'obtient pas des bandes verticales pour la

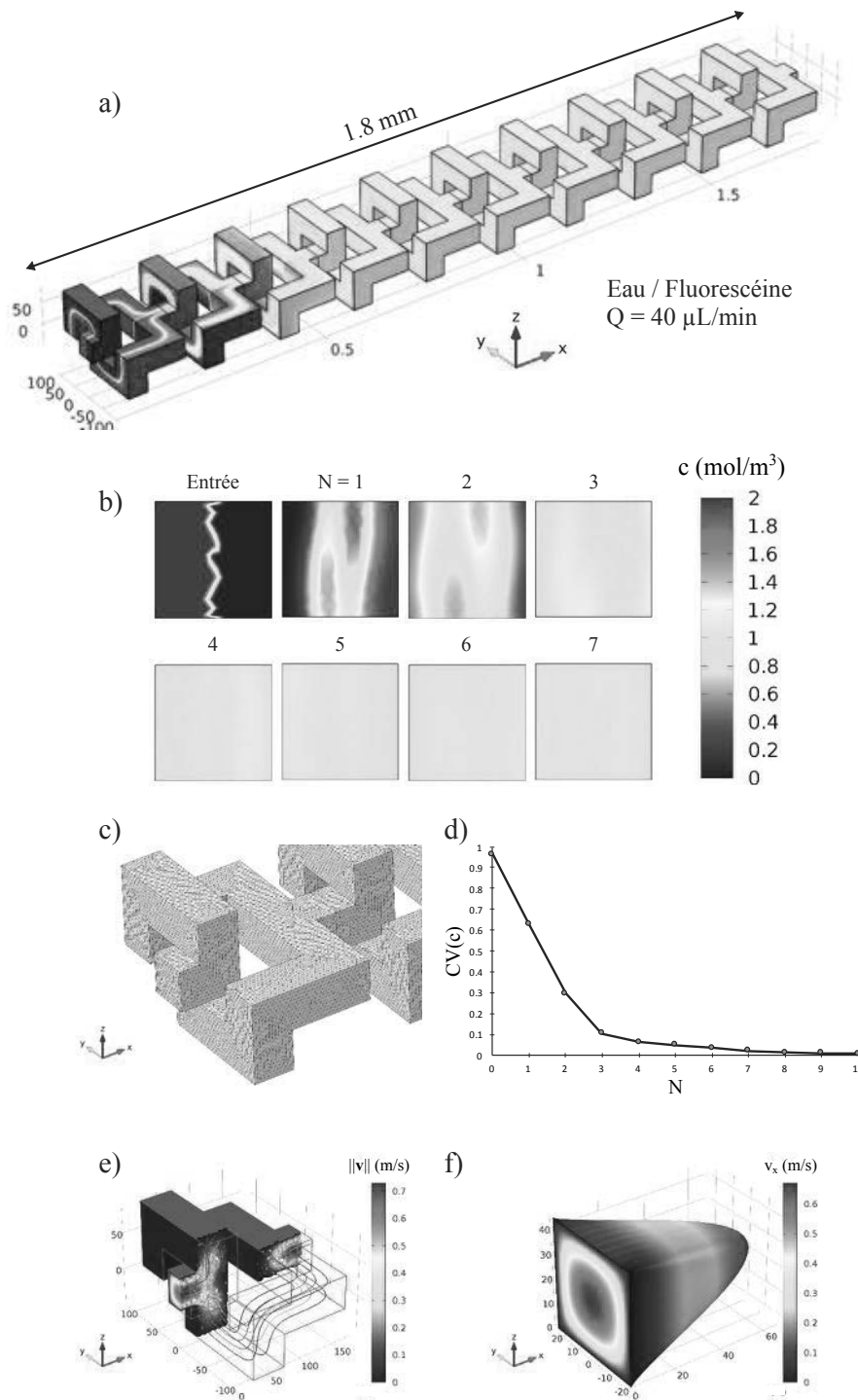


FIGURE 2.6 – Résultats de la résolution par la méthode des éléments finis pour le mélange eau/fluorescéine. a) Concentration (aux parois) pour un ensemble de 10 mélangeurs. Voir b) pour l'échelle couleur. b) Vues en coupe (sections droites) des valeurs de la concentration aux entrées/sorties des 10 mélangeurs (échelle de 0 à 2 mol m<sup>-3</sup>). c) Maillage employé pour la simulation. d) Tracé de l'écart type relatif (Coefficient de Variation) en fonction du nombre d'étages N. e) Vue en coupe ( $y = 0$ ) de la norme de la vitesse et lignes de courant (la couleur représente la vitesse). f) Profil de vitesse à l'entrée du dispositif, la couleur et l'axe  $x$  représentent la composante de la vitesse selon  $x$ .

concentration, une variation sur la hauteur est également visible.

Les modèles simples présentés dans les parties précédentes donnent un nombre d'étages nécessaires au mélange plus élevé que ce qu'on obtient par la méthode des éléments finis.

### 2.1.2 Approche expérimentale

Les études analytiques et numérique de la partie précédente ont permis la réalisation d'une première estimation de la géométrie à choisir (par rapport au nombre d'étages employés) et de constituer une référence pour l'efficacité d'homogénéisation. La présente partie décrit la mise en place expérimentale (conception et test de puces microfluidiques) pour différents types de mélange.

#### 2.1.2.1 Design des dispositifs

L'unité de base des dispositifs microfluidiques décrits ci-après correspond à un motif de mélange accomplissant une transformation du boulanger, comme le décrit la Fig. 2.2 dans la partie précédente. Dans le but de mélanger des solutions à base d'eau, de fluorescéine et de particules de 500 nm (voire 1  $\mu\text{m}$ ), il a été montré que 10 unités de mélangeurs devraient permettre l'homogénéisation. L'approche autour de ces dispositifs est d'une part de caractériser le mélange, et au-delà et de démontrer le marquage de cellules avec des microparticules de 5  $\mu\text{m}$ .

La partie mélangeur des puces comprend 30 étages (organisés en 10 groupes de 3 unités), ce qui donne une marge par rapport aux estimations réalisées (moins de 10 étages nécessaires). D'autres puces avec un nombre supérieur d'étages (150 et 300 étages) ont également été fabriquées (plus dans une visée de marquage). La Fig. 2.7 présente l'organisation d'une puce de mélange. Il est possible de placer deux mélangeurs de 30 étages sur une même puce d'une surface de 15  $\times$  20 mm<sup>2</sup>. Chaque mélangeur dispose de deux entrées (une pour chaque solution à mélanger) et d'une sortie. Le nombre de connexions fluidiques par puce est donc de 6.

Les puces microfluidiques sont fabriquées en utilisant les techniques de laminages de films secs photosensibles et de photolithographies, sur des wafers en verre de 4". Les premières puces ont été réalisées avec un film sec de 45  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, le TMMF. La largeur des canalisations a été choisie pour correspondre à cette hauteur. Un autre type de film sec photosensible, le DF (pour Dry Film, commercialisé par la société EMS<sup>1</sup>), a ensuite été préféré pour la fabrication. Des épaisseurs de 20, 40 et 50  $\mu\text{m}$  ont été employées (DF-2020, DF-1040 et DF-1050 respectivement)<sup>2</sup>. Les différents procédés de fabrication sont détaillés dans la partie 2.4.

Les dimensions (largeur, hauteur) des canaux sont caractérisés pendant la fabrication (profilomètre, imagerie optique et MEB). Les Fig. 2.7 b) et c) montrent le dispositif obtenu après

---

1. Engineered Materials Systems, Inc.

2. Il est important de noter que si les hauteurs modifient les sections droites et par conséquent la vitesse pour un même débit, la diffusion ne devraient pas être impactée grandement (pour une même vitesse) en considérant qu'elle se fait essentiellement selon l'axe  $y$ .



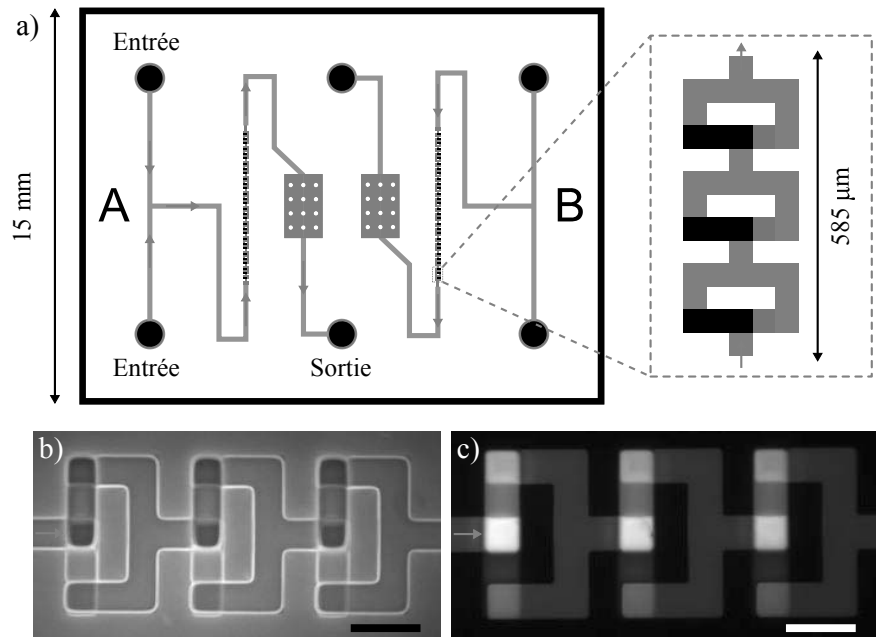


FIGURE 2.7 – Design d'une puce microfluidique disposant de deux mélangeurs, chacun comprenant 30 étages. a) La puce est divisée en deux sections symétriques (A/B). Chaque mélangeur possède 2 entrées, un Té où les solutions sont mises en contact, un ligne (verticale, au centre) de  $10 \times 3$  motifs de mélangeurs, puis une zone de visualisation et une sortie. b) Image en microscopie optique d'un groupe de 3 motifs de mélange. c) Image au microscope en fluorescence du même mélangeur rempli avec de la fluorescéine. Les barres d'échelle sont de  $100 \mu\text{m}$ .

## 2.1. Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

fabrication et le test du mélange de solutions eau/fluorescéine (on note pour cette dernière figure le signal de fluorescence plus important sur les 3 piliers d'interconnexion, où une hauteur de liquide de  $2h$  et  $3h$  est présente).

### 2.1.2.2 Tests de mélange

Dans le but de réaliser les différentes expériences de mélange et marquage, un dispositif expérimental a été mis en place. Il comprend tout d'abord la puce microfluidique ainsi qu'un support de puce, fournissant l'interface et l'étanchéité avec la connectique habituelle (capillaires). Une source d'actionnement pour les fluides est employée (essentiellement un pousse-seringues pour ces expériences, mais également un contrôleur de pression). Enfin un microscope inversé, une caméra (EmCCD ou sCMOS) et une source lumineuse (LED et filtres) sont utilisés pour l'observation en fluorescence et la capture d'images. Les détails concernant le dispositif expérimental sont fournis dans la partie 2.5.3.

Une particularité due aux dispositifs microfluidiques comprenant des bifurcations (c'est particulièrement le cas pour les designs 3D présentés) est le remplissage des canalisations : si deux chemins sont possibles, l'un est d'abord rempli et une bulle (d'air présent à l'origine dans la puce) est formée dans l'autre. Cette difficulté étant commune aux autres dispositifs, elle est également abordée dans la partie expérimentale.

Les premiers tests sont réalisés avec une solution de fluorescéine ( $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) et de l'eau désionisée (DI), pour des puces de hauteurs différentes (20 et  $50 \mu\text{m}$ ) et à des débits différents.

La Fig. 2.8 montre les résultats obtenus pour les différentes conditions. Le profil de concentration (le signal de fluorescence est "intégré" sur toute la hauteur, la mesure se faisant en 2D) aux niveaux des entrées/sorties des 3 premiers mélangeurs permettent de vérifier le bon fonctionnement des unités de mélange, la transformation du boullanger est bien réalisée (doublement du nombre de fronts de diffusion et inversion). Aux débits employés (de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{L min}^{-1}$ ), un profil de concentration en échelon est obtenu au niveau du Té (dès la rencontre des deux solutions, Fig. 2.8 c), mais on constate que la fluorescéine a déjà diffusé au niveau de cette interface avant d'atteindre les mélangeurs (Fig. 2.8 a et b). Néanmoins, pour un débit de  $35 \mu\text{L min}^{-1}$ , la valeur du CV de la concentration (pour le profil selon  $y$ ) est très proche de 1 (0.96) à l'entrée du mélangeur, on peut donc considérer que les solutions ne sont pas homogénéisées.

Après le 3ème motif, pour  $35 \mu\text{L min}^{-1}$ ,  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle} \simeq 0.56$ , ce qui est compris entre les valeurs prévues par le modèle "1D" ( $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle} \simeq 0.79$  pour un débit de  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  - non montré), et les valeurs obtenues par simulation FEM ( $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle} \simeq 0.1$ ). On notera l'écart important entre ces deux prévisions, les résultats expérimentaux sont plus proches du modèle 1D mais ne permettent pas de trancher pour le choix du modèle. À un débit plus faible ( $10 \mu\text{L min}^{-1}$ ), on est plus efficace :  $\frac{\sigma(c)}{\langle c \rangle} \simeq 0.61$  (non montré).

En utilisant un autre dispositif (canaux de  $50 \mu\text{m}$  de haut) et un débit du même ordre de grandeur, on observe qu'il faut un peu moins de 10 unités de mélange pour homogénéiser les

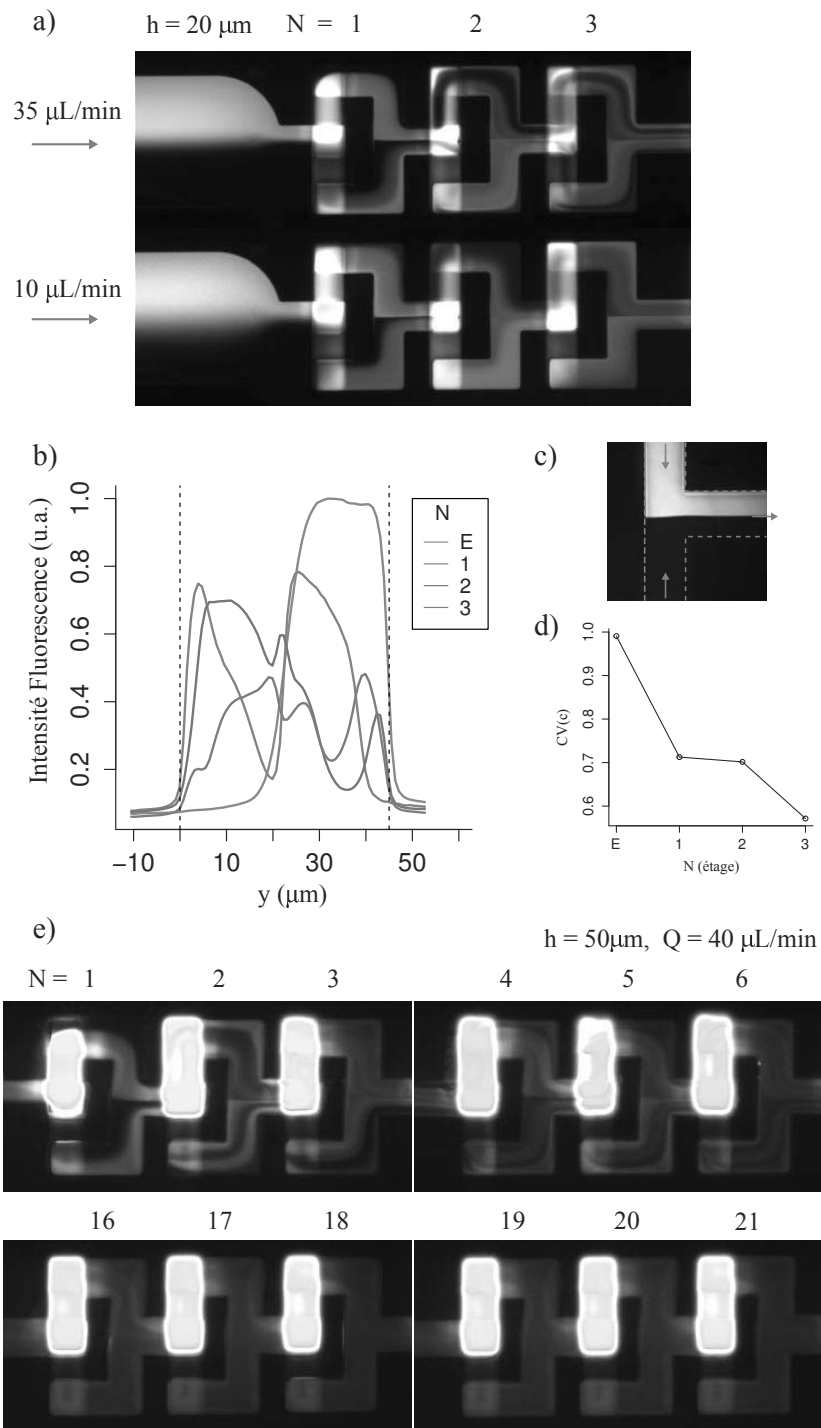


FIGURE 2.8 – Expériences de mélange eau/fluorescéine. a) Images en microscopie de fluorescence d'un groupe de 3 unités de mélangeur à différents débits. b) Profils de concentration  $c(y)$  aux entrées/sorties des 3 premiers motifs du mélangeur pour le débit de  $35 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . c) Té à l'entrée de la puce (mise en contact des solutions à mélanger). d) Écart types relatifs (CV) correspondant aux profils de concentration en b). e) Images de fluorescence de différents étages d'un mélangeur à un débit de  $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et d'une hauteur de canaux de  $40 \mu\text{m}$ .

## 2.1. Vers le marquage de particules avec un mélangeur 3D

solutions. La Fig. 2.8 e) montre une concentration quasi homogène après 6 mélangeurs, et une concentration homogène après  $N = 10$ . La partie haute de la bifurcation apparaît saturée, la dynamique de signal de l'image était trop importante pour pouvoir capturer le canal de niveau intermédiaire autrement.

Le mélange (moléculaire) d'une solution de fluorescéine étant possible même à des vitesses importantes ( $0.3 \text{ m s}^{-1}$ ,  $\text{Re} = 15$ ), il est intéressant d'explorer s'il en est de même pour des particules voire applicable à du marquage cellulaire. Des particules fluorescentes magnétiques de 500 nm ont été utilisées (Chemicell, screenMAG-Carboxyl Green,  $\lambda_{ex} = 502 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ ) à une concentration de  $1.8 \cdot 10^3$  billes/ $\mu\text{L}$ . L'autre solution consistait de PBS (pH 7.4).

La Fig. 2.9 a) montre des micrographes en fluorescence pour le mélange effectué dans des canaux de hauteur  $20 \mu\text{m}$  à un débit de  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ . En premier lieu on notera que la qualité d'image n'est pas idéale, ceci est dû au faible signal de fluorescence reçu des particules par rapport à l'autofluorescence du matériau (DF-2020) dans cette gamme de longueurs d'onde (filtres FITC). Une mesure quantitative n'est pas envisageable, en revanche on peut constater qu'après 15 étages la solution obtenue est homogène.

Le nombre de mélangeurs nécessaires pour le mélange est voisin pour la fluorescéine ( $N \approx 10$ ) et pour les particules ( $N \approx 15$ ) à des vitesses moyennes similaires, et semble plus élevé que les prédictions analytiques et numériques. Les erreurs dues à l'alignement et au laminage lors du procédé de fabrication (exactitude de la géométrie) peuvent en partie expliquer ces écarts. Une autre source d'erreur possible est que pour le mélange de particules, nous considérons l'hypothèse simplificatrice qu'une particule suit exactement les lignes de courant du liquide, en négligeant certaines forces (inertie, pesanteur, Saffman, Stokes, et Basset).

Enfin un test de marquage de cellules (monocytes de culture, lignée THP-1) avec des microbilles magnétiques (Invitrogen Dynabeads CD14, diamètre  $4.5 \mu\text{m}$ ) a été réalisé sur puce. La difficulté essentielle réside dans l'injection des solutions car les particules comme les cellules sédimentent. Plusieurs solutions ont été mises (voir partie 2.5.3) en place mais pour le moment aucune ne convient à l'injection des billes de  $4.5 \mu\text{m}$  qui sont particulièrement lourdes (densité voisine de 2). Un gradient de densité peut être utilisé pour ajuster la masse volumique de la solution contenant les monocytes afin que ces derniers ne sédimentent pas. Une concentration en Optiprep (Iodixanol<sup>1</sup>, fourni par Axis-shield) de 12% (w/v) a été employée.

Pour limiter l'adhésion des cellules et des microparticules aux parois, une faible concentration (0.1%) de PolyVinylPyrrolidone (PVP) a été introduite dans les solutions. Le marquage des cellules par les billes CD14 a été dans un premier temps validé en tubes (1.5 mL) en suivant les recommandations du fabriquant.

Quelques résultats de la réaction de marquage après 10 unités de mélange sont montrés sur la Fig. 2.9 b). L'observation en fluorescence n'est pas possible car les microparticules ne sont pas marquées pour. Les images sont obtenues en lumière blanche, le fond a été enlevé. Il est

1. Molécule contenant 6 atomes d'iode, de masse molaire  $1550 \text{ g mol}^{-1}$ , utilisée comme gradient de densité mais aussi en tant qu'agent de contraste pour les angiographies (nom commercial Visipaque, GE.)

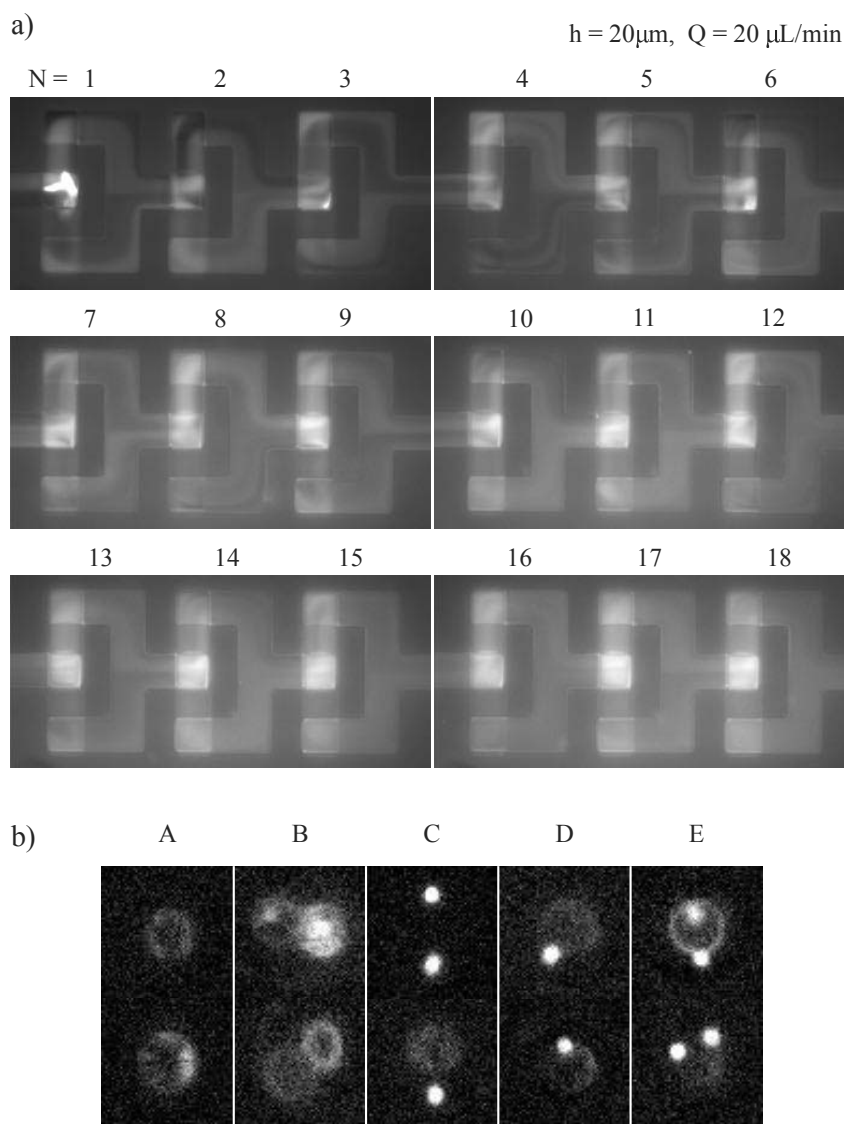


FIGURE 2.9 – Expériences de mélange de particules et de marquage de cellules. a) Images de fluorescence de différents étages d'un mélangeur (solutions : eau et particules de diamètre 500 nm) à un débit de  $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et d'une hauteur de canaux de 20 μm. b) Images de microscopie en champ clair de monocytes, billes (diamètre 5 μm), et cellules marquées. A : cellules seules, B : cellules attachées ou en division, C : billes isolées et cellule proche d'une bille mais non marquée, D : cellules marquées (1 bille), E : cellules marquées (2 billes).

possible d'observer différentes "configurations" : des cellules seules, en réplique, des billes seules, et des cellules marquées (avec 1 ou 2 billes). Contrairement aux essais hors puce, de nombreuses cellules ne sont pas marquées (rendement d'environ 20%). On peut attribuer cela à plusieurs causes : d'une part la concentration locale en réactifs (billes) n'est pas contrôlée du fait de la sédimentation ; d'autre part, il est probable que les produits ajoutés pour palier à la sédimentation et à l'adhésion (Optiprep et PVP) perturbent la réaction.

### Conclusion

Au delà des limites que présentent la puce microfluidique (autofluorescence, adhésion possible sur les surfaces) et l'intégration autour de celle-ci (élimination des bulles, sédimentation des réactifs...), nous avons pu démontrer le mélange d'espèces moléculaires et particulaires en utilisant un mélangeur 3D, dans des dimensions et volumes réduits (1.55 nL par unité de mélange), à des débits intéressants (de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

## 2.2 Tri de particules par taille

Une des opérations élémentaires de préparation d'un échantillon est le tri (par taille, forme, propriétés mécaniques, densité...). Dans la partie 1.3.2.2 du chapitre d'introduction, plusieurs méthodes de séparations passives ont été présentées. Pour ces travaux de thèse, la filtration hydrodynamique a été choisie : il s'agit d'une technique permettant de traiter l'échantillon en continu, sans recours à des objets (piliers, pores) de taille semblable aux particules à séparer, évitant ainsi les phénomènes d'occlusion. Dans cette section le principe de la filtration hydrodynamique sera détaillé à travers un modèle puis appliquée à la séparation de particules de 1 et 2  $\mu\text{m}$  avec un dispositif microfluidique 3D.

### 2.2.1 Principe et modèle

La filtration hydrodynamique a été introduite en 2005 par Yamada et Seki [28] (voir section 1.3.2 pour un aperçu de leurs travaux). Le principe de cette séparation repose sur l'exclusion de particules (d'une taille déterminée) au voisinage d'un mur d'une canalisation, au niveau d'une intersection de canaux où les flux sont laminaires. Comme le montre la Fig. 2.10, le plus proche qu'une particule peut être du bord d'un canal est son rayon. Un canal latéral aspire un flux de liquide dans un canal principal, dont l'ensemble des lignes de courant forment une surface "séparatrice". La distance de cette séparatrice par rapport au bord de la canalisation correspond à un rayon critique : les particules possédant leur centre d'inertie entre cette séparatrice et le bord du canal principal sont aspirées dans le canal secondaire, les autres particules continueront leur trajet dans le canal principal. Les particules dont le rayon est supérieur au rayon de coupure (distance mur-séparatrice) sont donc exclues.

Dans la littérature, la filtration hydrodynamique a été traitée avec différents modèles : simplifié (Yamada et Seki [28] : profil de la vitesse admis parabolique, avec un rapport d'aspect hauteur/largeur de 1), ou encore analytique (similaire à ce qui sera présenté par la suite), mais

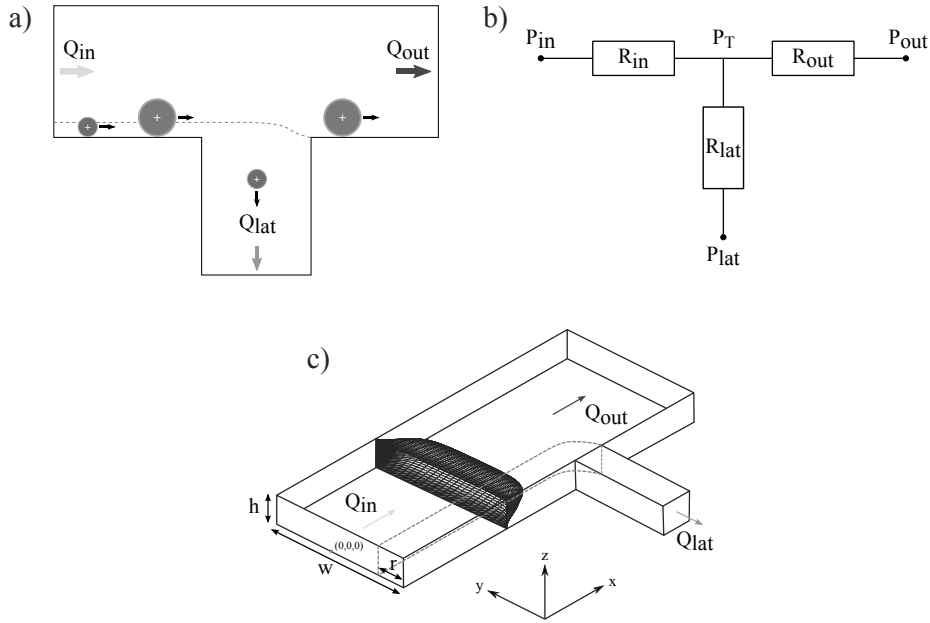


FIGURE 2.10 – Principe de la filtration hydrodynamique et notations. a) Principe de tri : canalisations principale (horizontale) et latérale (verticale), la bande rouge en pointillés représente la séparatrice. b) Schéma simplifié de la configuration des canaux (notations des résistances hydrodynamiques). c) Vue en perspective avec représentation du profil de vitesse, introduction de la géométrie (notamment de l'origine  $O$ ).

directement appliqué à un type de géométrie [29]. Cette partie présente un modèle analytique plus précis, accompagné d'une analyse pour le choix des tailles (rapports d'aspect) optimales des canalisations pour la séparation.

La première étape est de déterminer les caractéristiques du flux (profil de vitesse) dans un canal de section rectangulaire, pour un liquide Newtonien non compressible en régime permanent soumis à un gradient de pression. La géométrie utilisée est représentée Fig. 2.10 (l'origine du repère est différente de la partie précédente sur le mélange !). Le calcul est proposé dans l'Annexe B.1.2, ainsi nous obtenons l'expression du profil de vitesse (l'écoulement est unidimensionnel) :

$$v_x(y, z) = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \mu L} \sum_{n, \text{imp.}} \frac{1}{n^3} \left[ 1 - \frac{\cosh\left(n\pi \frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} \right] \sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right) \quad (2.14)$$

où "imp." indique une somme sur les impairs,  $\Delta P$  est la différence de pression appliquée,  $\mu$  est la viscosité dynamique, et  $w$ ,  $h$ ,  $L$  sont respectivement les largeur, hauteur et longueur du canal considéré.

Le débit à travers cette canalisation peut être obtenu en intégrant l'expression de la vitesse sur toute la section droite du canal :

$$Q = \frac{h^3 w \Delta p}{12 \mu L_{in}} \left[ 1 - \sum_{n, \text{imp.}} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \right]. \quad (2.15)$$

La formule s'adapte quelle que soit la canalisation, ainsi le débit entrant dans le séparateur est obtenu pour  $\Delta P = P_{in} - P_T$ , et  $L = L_{in}$ .

Le débit est proportionnellement lié à la différence de pression appliquée, il est alors classique d'introduire la notion de résistance hydrodynamique (analogie avec un circuit électrique), comme le montre la Fig. 2.10 b). On obtient ainsi la résistance  $R$ , dépendant uniquement des dimensions du canal considéré, telle que  $\Delta P = RQ$  :

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w} \left[ 1 - \sum_{n,imp.}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \right]^{-1}. \quad (2.16)$$

En considérant la géométrie indiquée Fig. 2.10, soit une intersection simple où l'échantillon arrive de la partie "in" et sort des parties "out" (résidu) et "lat" (filtrat), la conservation de la matière permet d'écrire  $Q_{in} = Q_{out} + Q_{lat}$ . On définit alors  $Q^* = \frac{Q_{lat}}{Q_{in}}$  soit le rapport du débit de liquide dans les canaux latéral et d'entrée. Ce ratio de débit dépend des pressions appliquées et des résistances des canalisations (liées aux géométries). En utilisant la loi d'Ohm et en injectant le théorème de Millman dans la conservation de la masse, on peut exprimer  $Q^*$  :

$$Q^* = \frac{R_{out} + R_{in}(1 - \Delta P^*)}{R_{out} + R_{lat}\Delta P^*}, \text{ avec } \Delta P^* = \frac{P_{in} - P_{out}}{P_{in} - P_{lat}}. \quad (2.17)$$

De manière générale,  $Q^*$  est ainsi entièrement déterminé par  $R_{in}$ ,  $R_{out}$ ,  $R_{lat}$ , et  $\Delta P^*$ . Dans la plupart des cas, les deux sorties du système seront fixées à la même pression (atmosphérique), ainsi  $\Delta P^* = 1$  et l'expression de  $Q^*$  se simplifie :

$$Q^* = \frac{Q_{lat}}{Q_{in}} = \frac{R_{out}}{R_{out} + R_{lat}}. \quad (2.18)$$

L'expression de  $Q^*$  ne dépend plus que de la valeur des résistances de sorties  $R_{out}$  et  $R_{lat}$ .  $Q^*$  est un paramètre important, car au-delà du ratio de débit qui le définit, on peut le considérer comme l'efficacité du système en terme de quantité traitée.

Par ailleurs, le débit dans le canal latéral est identique au débit dans le canal principal contenu entre le mur et la séparatrice. En faisant l'hypothèse que le profil de la séparatrice ne dépend pas de  $z$  (surface verticale droite), et que sa position en  $y$  est  $r$  (rayon de coupure), ce débit s'écrit :

$$Q(r) = \int_{z=0}^h \int_{y=-\frac{w}{2}}^{-\frac{w}{2}+r} v(y, z) dy dz \quad (2.19)$$

En introduisant l'équation de la vitesse (équation (2.14)) on obtient :

$$Q(r) = \frac{h^3 w \Delta P}{12\mu L} \frac{r}{w} \left[ 1 - \sum_{n,imp.}^{\infty} \frac{96}{(n\pi)^5} \frac{h}{r} \left[ \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \left(1 - \cosh\left(\frac{n\pi r}{h}\right)\right) + \sinh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right] \right]. \quad (2.20)$$



En raisonnant en terme de ratio de débit  $Q^*$ , l'expression se simplifie :

$$Q^* = \frac{r}{w} \frac{1 - \sum_{n,imp}^{\infty} \frac{96}{(n\pi)^5} \frac{h}{r} \left[ \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \left(1 - \cosh\left(\frac{n\pi r}{h}\right)\right) + \sinh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right]}{\left[ 1 - \sum_{n,imp}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \right]} \quad (2.21)$$

On remarque alors que  $Q^*$  ne dépend que de deux rapports adimensionnels :  $\frac{r}{w}$  et le rapport d'aspect  $\frac{h}{w}$ .

Au laboratoire, le tri hydrodynamique a été étudié sur différents systèmes [191]. Des travaux expérimentaux ont été effectués sur des dispositifs de tri en 2D, présentant une géométrie telle que  $w = 50 \mu\text{m}$  et  $h = 5 \mu\text{m}$  (rapport d'aspect de 0.1), pour le tri de particules submicrométriques (diamètres de 200 nm à 1.2  $\mu\text{m}$ ). Par ailleurs une approche tridimensionnelle a été proposée dans l'objectif de trier des microparticules sanguines. Un premier objectif était de réaliser un dispositif filtrant le plasma (en excluant donc les plaquettes, d'une taille d'environ 2 à 4  $\mu\text{m}$ ), ainsi le diamètre de coupure désiré était de 2  $\mu\text{m}$ . Le dispositif réalisé présente un rapport d'aspect de 15, soit  $w = 20 \mu\text{m}$  et  $h = 300 \mu\text{m}$  d'après les notations définies précédemment (voir Fig. 2.10 et 2.12). Pour les rapports d'aspect élevés ( $\frac{h}{w} \gg 1$ ), le profil de vitesse peut être considéré comme parabolique :

$$v_{para}(y) = \frac{\Delta P}{3\mu L} w^2 \left( 1 - \left( \frac{2y}{w} \right)^2 \right) \quad (2.22)$$

et le ratio de débits (ou efficacité)  $Q^*$  s'exprime plus simplement :

$$Q_{para}^* = \left( \frac{r}{w} \right)^2 \left( 3 - \frac{2r}{w} \right). \quad (2.23)$$

La question principale est alors le dimensionnement du système pour un rayon de coupure donné, afin d'obtenir une efficacité (proportion d'échantillon traité) maximale. Une condition "sans filtre" est également à prendre en compte, si l'on souhaite définir une taille minimale au delà de laquelle on considère le risque de colmatage plus important par exemple. Une limite située à un ordre de grandeur au dessus du rayon de la particule est fixée :  $r \leq 0.1 \min(h, w)$ . Les tracés de  $Q^*$  en fonction des différents paramètres ( $\frac{h}{w}$ ,  $\frac{r}{w}$  ou une combinaison des deux), voir Fig. 2.11 a-c), permettent cette analyse.

En premier lieu, on remarque que les cas de forts rapports d'aspect ( $\frac{h}{w} \gg 1$ ), mais également le cas  $\frac{h}{w} = 1$  se rapprochent de l'approximation "profil de vitesse parabolique". En fixant le diamètre de coupure et en prenant en compte le critère "sans filtre", il reste deux degrés de liberté au système. Ce sont les conditions pour une efficacité  $Q^*$  maximale, les possibilités technologiques (en terme de fabrication) et des choix d'architecture (parallélisation possible pour augmenter le débit traité total) qui fixeront la géométrie.

Sur les Fig. 2.11 b) et c), il est aisé de voir que c'est pour un rapport d'aspect  $\frac{h}{w} = 1$  que l'on obtient les efficacités les plus importantes. Ainsi pour un dispositif avec un rayon de coupure de 1  $\mu\text{m}$ , la taille de canal optimale (pour les conditions filtres et l'efficacité) est  $h = w = 10 \mu\text{m}$ . Dans notre cas, l'utilisation des films secs conduit à une épaisseur fixée de 20  $\mu\text{m}$ , ainsi  $w =$

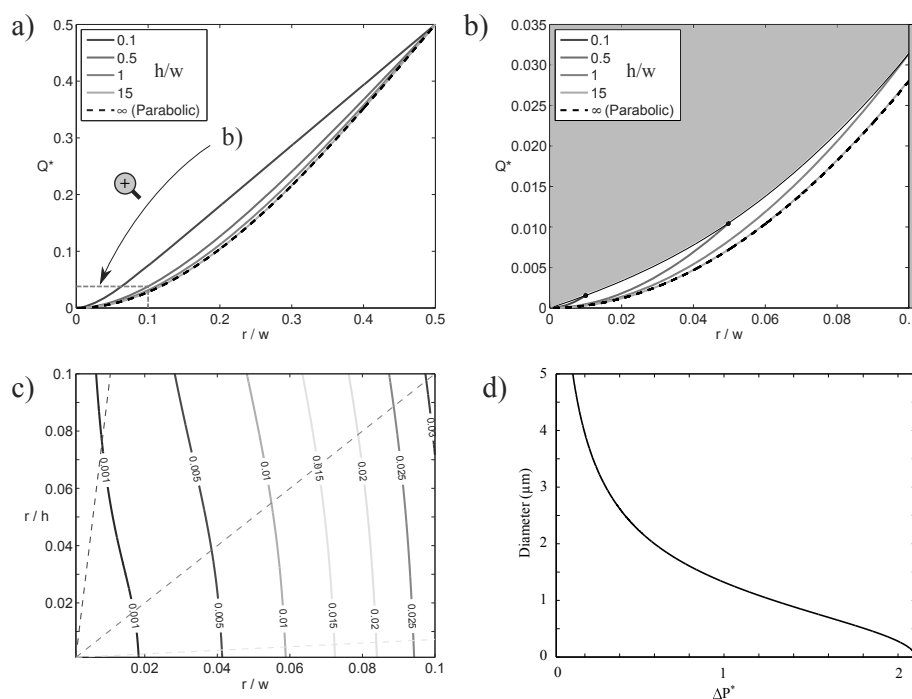


FIGURE 2.11 – Tracés pour l'étude du modèle analytique. a) Tracé de  $Q^*$  en fonction du rapport  $\frac{r}{w}$  pour différents rapports  $\frac{h}{w}$ . b) Vue zoomée de a), avec la zone grisée représentant les domaines "filtres", soit  $r \leq 0.1 \min(h, w)$ . c) Tracé de  $\frac{r}{h}$  en fonction de  $\frac{r}{w}$  pour différents  $Q^*$ . d) Variation du diamètre de coupure du dispositif 3D en fonction de  $\Delta P^*$ .

20  $\mu\text{m}$ . Le choix optimal est alors  $h = 20 \mu\text{m}$  si l'on veut privilégier l'efficacité. En terme de débit total, les possibilités pour l'augmenter est d'augmenter la pression, ou de paralléliser le système fluide. La première solution se heurte à une contrainte technologique : si les puces réalisées en lithographie dure peuvent supporter une pression élevée, les puces en couches de polymères empilées ne supportent pas plus de 3 - 3.5 bar. La deuxième solution pose un problème d'optimisation de l'espace disponible : afin de paralléliser, il faut doubler toutes les canalisations (principale et secondaire) en gardant ce design. Il est en revanche possible de se tourner vers les hauts rapports d'aspect, en notant que la limite fixée pour l'efficacité  $Q^*$  lorsque  $\frac{h}{w} \rightarrow \infty$  est proche du cas  $\frac{h}{w} = 1$  (moins de 15% de différence). En construisant une puce en 3D, le procédé de laminage permet d'atteindre une hauteur maximale de  $h = 300 \mu\text{m}$ . Afin de tirer le maximum des possibilités offertes par une approche 3D, cette hauteur a donc été choisie, pour un rapport d'aspect  $\frac{h}{w} = 15$ . La canalisation de sortie latérale présentera en revanche un rapport d'aspect de 1 (respectant toujours ainsi les contraintes "sans filtre"), permettant ainsi d'augmenter la résistance hydrodynamique et de limiter la longueur de cette canalisation.

### 2.2.2 Approche expérimentale

Les résultats concernant les systèmes 2D et 2.5D obtenus pour cette étude sont présentés dans la littérature [191], seul le cas 3D est présenté dans cette section. Le dispositif 3D proposé (disposition, notations) est présenté dans la Fig. 2.12. Les dimensions adoptées sont résumées

dans le tableau suivant.

	Largeur $w$ ( $\mu\text{m}$ )	Hauteur $h$ ( $\mu\text{m}$ )	Longueur $L$ (mm)
Entrée	20	300	3
Sortie Principale	20	300	3.3
Sortie Latérale	20	20	30

Comme précisé sur la Fig. 2.12, les notations (largeur, hauteur) ne sont pas forcément d'un usage évident avec la représentation employée mais suivent en toute logique les notations définies plus haut pour les systèmes en 2D (simple intersection). Il faut voir que cette bifurcation est réalisée "sur la tranche", ce qui permet de dépasser des limitations en terme de dimensions, par l'utilisation des technologies 3D pour la microfluidique (ces rapports d'aspects et tailles de canaux sont difficilement accessibles par des procédés standards).

Le procédé de fabrication consiste en la superposition de 4 couches de film sec photosensible de type DF-1020 (résine négative époxy) d'une épaisseur de  $20\mu\text{m}$ . La puce est de même dimension que pour la partie précédente ( $15\text{mm}^2 \times 20\text{mm}^2$ ), avec 6 connexions fluidiques et deux dispositifs de tri par puce (Fig. 2.12 d). En réalisant une découpe à la scie diamantée centrée sur la canalisation principale, des observations en coupe au MEB ont été possibles, s'assurant ainsi du respect de la géométrie et des dimensions (Fig. 2.12 e). De plus amples détails sur le procédé de fabrication sont disponibles dans la partie 2.4.

La caractérisation des dispositifs microfluidique a été effectuée avec des billes fluorescentes en polystyrène (FluoSpheres, Invitrogen) de diamètres  $1\mu\text{m}$  et  $2\mu\text{m}$  (vertes et rouges respectivement). La concentration en billes de l'échantillon (eau DI) est fixée à  $10^5$  billes/ $\mu\text{L}$  pour chaque type de bille. L'observation en fluorescence est réalisée avec un microscope inversé, une source de lumière LED (Lumencor), et deux cubes différents (un pour chaque couleur).

Un support de puce est utilisé pour assurer les connexions et l'étanchéité entre les capillaires et la puce microfluidique (voir partie 2.5.3). La canalisation secondaire est remplie en première, un flux est ensuite appliqué dans la canalisation principale. L'écoulement des liquides est assuré avec un contrôleur de pression (Fluigent). Deux conditions de pression sont appliquées afin de tester deux rayons de coupures différents en utilisant le même dispositif :  $d_c = 1.3\mu\text{m}$  pour  $\Delta P^* = 1$ , et  $d_c = 2.9\mu\text{m}$  pour  $\Delta P^* = 1/3$  (voir équation (2.17) et Fig. 2.11 d).

La Fig. 2.13 présente les résultats obtenus pour la caractérisation des dispositifs de tri. Pour les images en fluorescences (Fig. 2.13 a et b), le plan focal de l'objectif est placé dans le plan de la canalisation secondaire. La condition  $d_c = 1.3\mu\text{m}$  est représentée par ces images, avec les particules de  $2\mu\text{m}$  passant au-dessus de la canalisation secondaire, et les particules de  $1\mu\text{m}$  étant aspirées.

Le bon fonctionnement du dispositif est ainsi vérifié pour ces tailles de particules et diamètres critiques. Avec cette géométrie, des débits importants peuvent être obtenus :  $Q_{in} \simeq 180\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et  $Q_{lat} \simeq 0.6\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour  $\Delta P = 1$  bar. Les temps de séjour sont de l'ordre de la seconde pour le parcours d'une particule entre l'entrée et la sortie latérale, et d'environ 10 ms

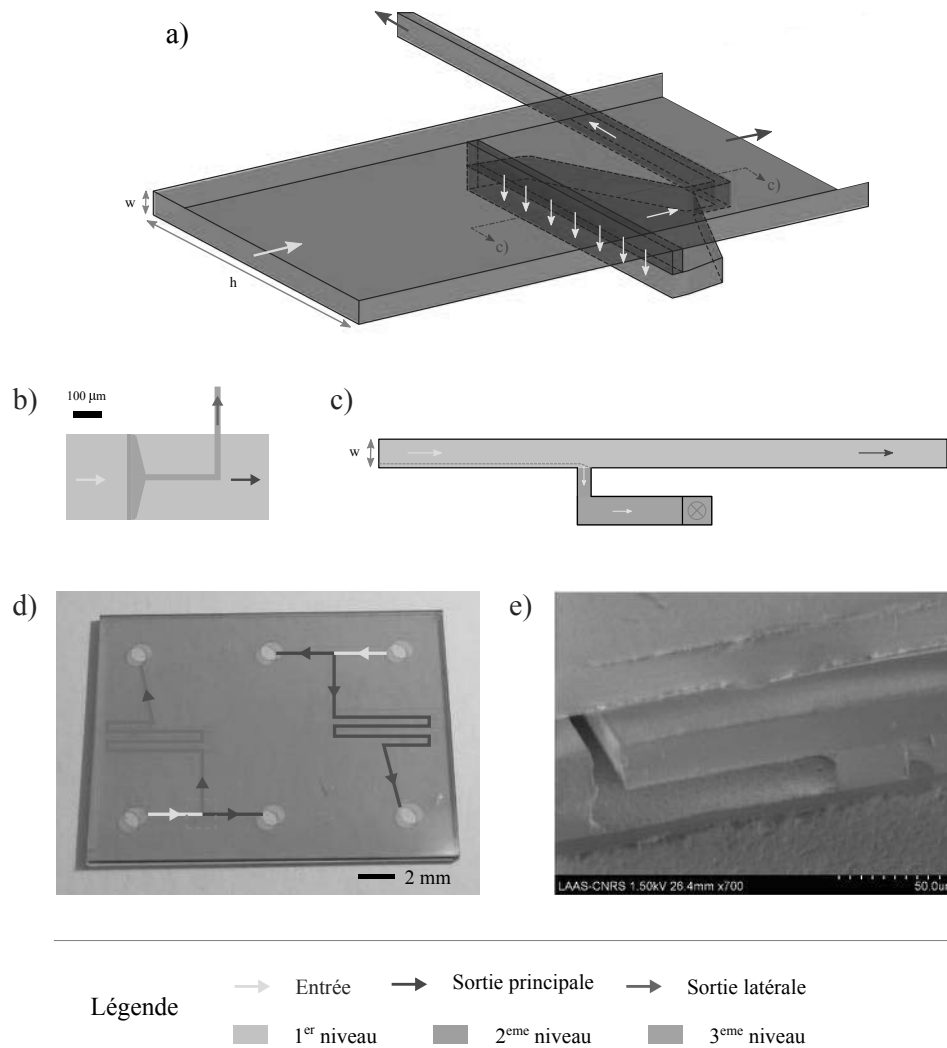


FIGURE 2.12 – Design et réalisation des dispositifs de tri 3D. a) Vue en perspective du dispositif, et notations (correspondant à une géométrie "2D"). b) Vue de dessus. c) Vue de profil. d) Puce microfluidique réalisée en films secs, sur laquelle deux dispositifs de tri sont présents. e) Image MEB recolorée (les couleurs sont uniquement faites pour distinguer les niveaux, pas de code particulier) du dispositif au niveau de l'intersection.

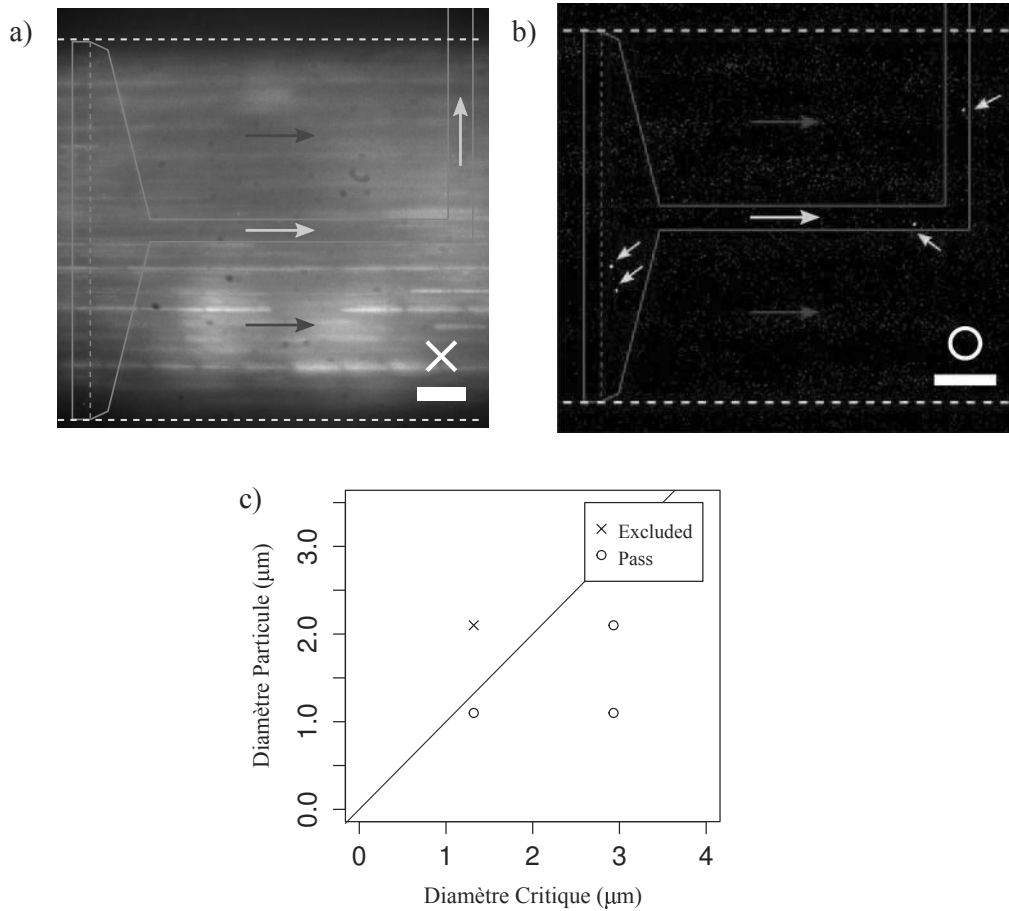


FIGURE 2.13 – Résultats expérimentaux de tri de particules. a) Image en fluorescence (vue de dessus) de particules rouges de diamètre  $2\ \mu\text{m}$  exclues du canal latéral. b) Image dans les mêmes conditions ( $d_c = 1.3\ \mu\text{m}$ ) montrant des particules vertes de diamètre  $1\ \mu\text{m}$  passant dans le canal latéral (signal de fond retiré). Les barres d'échelle sont de  $50\ \mu\text{m}$ . c) Résumé des deux conditions testées ( $d_c = 1.3\ \mu\text{m}$  et  $d_c = 2.9\ \mu\text{m}$ ) avec deux tailles de particules ( $1\ \mu\text{m}$  et  $2\ \mu\text{m}$ ). Si les particules sont aspirées dans le canal latéral ou exclues de ce dernier, la condition est notée "o" ou "x" respectivement.

entre l'entrée et la sortie principale.

Bien qu'aucune anomalie n'ait été observée avec les dispositifs microfluidiques 3D, des écarts aux prévisions ont été remarqués avec les dispositifs 2D (simple bifurcation) pour les petites tailles de particules ( $d_c \approx 150$  nm et particules de 100 nm). Deux causes possibles à ces écarts ont été identifiées :

- l'influence du champ de vitesses réel (on a négligé la résistance due à la bifurcation et admis l'hypothèse que le profil de la séparatrice était indépendant de  $z$ ),
- l'agitation thermique des particules (diffusion) lors du passage devant la canalisation latérale peut y pousser des particules qui ne devraient pas être aspirées.

Pour déterminer le profil de la séparatrice dans un cas particulier, la méthode des éléments finis a été utilisée (résolution d'un écoulement rampant - équation de Stokes - avec Comsol Multiphysics). La géométrie utilisée correspond à celle des dispositifs 2D réalisés au laboratoire (croisement de canalisations en "T",  $h = 5$   $\mu\text{m}$ ,  $w = 50$   $\mu\text{m}$  dans le canal principal et  $w = 5$   $\mu\text{m}$  dans le canal latéral). Les longueurs des canalisations principale et latérale ont été réduites à 200  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  respectivement pour la modélisation, les pressions ont été ajustées en utilisant la loi d'Ohm, les conditions de pression et de longueurs correspondent à un rayon de coupure de 250 nm et l'écoulement est établi à toutes les entrées/sorties. Une symétrie est établie (plan de symétrie ( $z = 0$ )), et des distributions en suites géométriques ont été utilisées afin d'avoir un maillage très fin près des murs d'intérêt. La taille des éléments varie de 15 nm à 8.5  $\mu\text{m}$ , et le nombre d'éléments est de 278000.

Le profil de la séparatrice est alors obtenu à partir des lignes de courant (elle même tirées de l'intégration du champ des vitesses), en déterminant les valeurs des positions initiales (départ des lignes) pour lesquelles ces lignes de courant sont aspirées dans le canal latéral. Une fois le profil extrait, il est approché par un polynôme du 3ème degré (en  $z$ ). Les résultats obtenus à partir de la simulation et de l'extraction du profil de la séparatrice sont indiqués sur la Fig. 2.14.

Une comparaison de la simulation et du modèle analytique est effectuée en terme de débits : pour le débit d'entrée, une variation d'environ 1% est notée (acceptable). Par ailleurs, l'intégration du débit compris entre le mur et la séparatrice (définie par le polynôme du 3ème degré) avec les valeurs obtenues par FEM ou les valeurs obtenues avec le modèle analytique présentent un écart relatif  $< 1\%$ . En revanche, un écart relatif de -5.8% est observé au niveau des ratio de débit  $Q^*$  entre la simulation et le calcul analytique. Ceci peut être attribué au fait que la bifurcation introduit une résistance dont on n'a pas tenu compte dans le modèle "simple" (analogie électrique). Elle peut être due au profil de vitesse non conforme à celui décrit par le modèle, comme en attestent les recirculations observées à l'entrée du canal latéral (voir Fig. 2.14 c).

La différence entre l'hypothèse admise (profil droit, pointillés rouges) et la séparatrice calculée (ligne bleue) semble non négligeable. Effectivement, si l'on calcule le rayon maximal d'une particule pouvant être aspirée dans le canal latéral au vu de ce profil de séparatrice, on obtient  $r_{max} = 403$  nm, au lieu du rayon critique  $r_c = 250$  nm. Par ailleurs, le calcul du débit correspondant à des particules de tailles supérieures à la taille critique calculée (zone gris

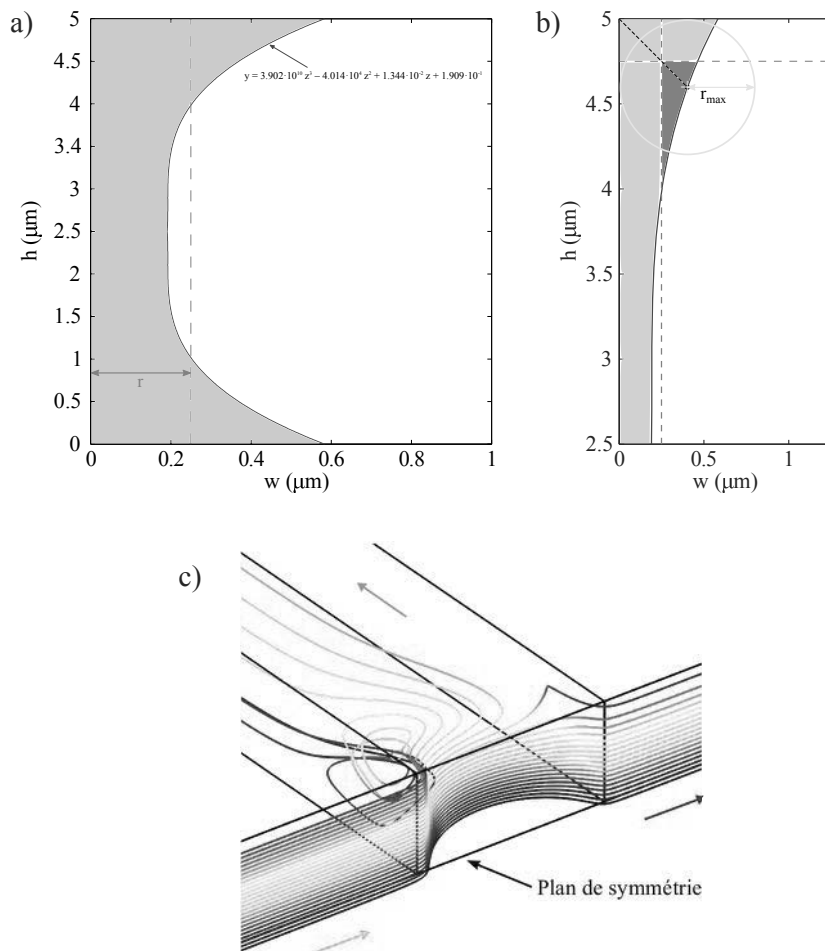


FIGURE 2.14 – Étude numérique du profil de la séparatrice. a) Tracé du profil de la séparatrice : profil numérique (en bleu) et approximation du profil (en rouge). La zone en gris représente la portion de liquide aspirée dans le canal latéral. b) Zoom de a), avec une représentation du diamètre maximal des particules pouvant être aspirées. La zone en gris foncé montre la portion de particules aspirées ayant un diamètre supérieur au diamètre de coupure (calculé avec l'hypothèse de la séparatrice droite). c) Géométrie et lignes de courant de la résolution numérique.

## 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

foncé dans la Fig. 2.14 b) est de  $16\%Q_{lat}$ . Cet écart est non négligeable et le calcul permet d'identifier une des causes de non idéalité pour la filtration hydrodynamique.

Une autre explication pour les écarts observés implique la diffusion des particules, notamment pour les petits diamètres. Il a été établi, à partir de la formule de Stokes-Enstein-Sutherland, que l'erreur sur le rayon de coupure dépend essentiellement du rayon de la particule  $r$ , de la largeur du canal latéral  $w_{lat}$ , du gradient de pression appliqué  $\nabla P$  et de la hauteur  $h$  :

$$\Delta r \simeq \sqrt{\frac{2kT}{3\pi r^2} \frac{w_{lat}}{\nabla P h}}. \quad (2.24)$$

### Conclusion

Le travail effectué sur la filtration hydrodynamique a permis d'établir un modèle, de l'appliquer à la conception de puces dans le souci de la proportion d'échantillon traité (efficacité et débit total), et d'identifier les limites de ce modèle et de cette technique de séparation (champ de vitesse complexe, diffusion latérale des particules). La conception et le test de dispositifs microfluidiques 3D montrent des possibilités de tri pertinentes (tailles micrométriques intéressantes, absence de colmatage). Dans le but de se diriger vers des dispositifs encore plus efficaces, d'autres puces avec une dizaine de canaux latéraux, présentant à chaque intersection la même efficacité  $Q^*$  (et par conséquent le même rayon de coupure), ont été conçues. Selon ce principe, avec  $N$  sorties latérales, on augmente l'efficacité totale du dispositif de tri :  $Q_{tot}^* = 1 - (1 - Q^*)^N$ . De manière complémentaire, d'autres solutions tirant profit de la microfluidique 3D, comme l'aspiration sur tout le tour d'une canalisation (au lieu d'un seul ou deux côtés) sont actuellement à l'étude.

## 2.3 Opérations sur des particules avec une structure en bypass

Dans la continuité des deux parties précédentes, sur le mélange par la transformée du boudinage (2.1), et la filtration hydrodynamique (2.2), le troisième volet de ces travaux dédiés à la microfluidique 3D est consacré à une structure particulière, en bypass, permettant des opérations de mélange, de tri et de concentration d'objets (particules ou cellules). L'augmentation de la concentration locale de cellules (monocytes) sur un bord du dispositif, et le balayage de ces cellules par des billes fonctionnalisées (de taille inférieure) ouvrent la voie vers un concept de réacteur pour marquage de cellules.

### 2.3.1 Principe

La filtration hydrodynamique consiste à aspirer une portion de flux provenant d'un canal principal dans un canal latéral, en excluant les particules dont le centre se situe hors de la zone définie par le bord du canal principal adjacent au canal latéral et la séparatrice (limite définie par le débit dans le canal latéral) ; le principe a déjà été détaillé au paragraphe 2.2.1.

Si le canal latéral, au lieu de disposer d'une sortie, est connecté au canal principal, en aval et



du côté opposé à la première bifurcation, un bypass (ou boucle, ou pont) est obtenu. Cette géométrie est impossible à réaliser avec une technologie 2D, pour laquelle la seule option est de reconnecter du même côté que pour l'extraction (pas de croisement sans contact envisageable). Avec un seul bypass, le système a *a priori* peu d'intérêt : seul le débit correspondant à la portion de flux aspiré (définie par le rayon de coupure  $r$ ) est traité et réinjecté dans le canal principal. En revanche, en combinant assez d'éléments de bypass pour traiter tout le flux, on peut réaliser plusieurs types d'opérations : séparation par taille, concentration, mélange, comme le montre la Fig. 2.15.

Le principe de fonctionnement de dispositifs "bypass" est décrit sur les Fig. 2.15 a) et 2.16 a-b). L'approche pour établir un modèle analytique est très similaire à ce qui a été fait pour la partie sur le tri hydrodynamique, et la plupart des équations sont identiques. La vitesse du liquide dans une canalisation rectangulaire est décrite par l'équation (2.14) (ou (B.23), avec la démonstration en Annexe B.1.2). Pour obtenir le débit traversant une section donnée, il faut intégrer ce profil de vitesse entre les bornes voulues, l'équation est également fournie en Annexe (équation (B.24)).

Le rayon de coupure  $r_c$  est déterminé par le rapport de deux débits : le débit passant à travers la section de canalisation principale (en entrée) comprise entre le mur et la séparatrice (située à une distance  $r$  du mur en considérant un profil de séparatrice droit), c'est également le débit de liquide traversant le bypass, et le débit total en entrée. On définit ainsi (comme précédemment) le rapport des débits traité (débit dans le bypass) et débit d'entrée,  $Q^*$ . Ce rapport dépend de deux paramètres adimensionnels :  $Q^* = f\left(\frac{r}{w}, \frac{h}{w}\right)$ , comme spécifié dans l'équation (2.21).

Il a été montré dans la partie précédente que le choix d'un rapport d'aspect égal à l'unité maximisait le rapport des débits  $Q^*$  (efficacité). Les tracés de  $Q^*$  en fonction de  $\frac{r}{w}$  et  $\frac{h}{w}$  sont présentés dans la Fig. 2.16 c-d). Les différents systèmes conçus pour le tri de particules de 3, 6, 8.1 et 13  $\mu\text{m}$  ont des rapports d'aspect  $\frac{h}{w}$  de 0.4, 0.4, 0.57 et 1 respectivement, les efficacités  $Q^*$  atteignent  $3.08 \cdot 10^{-3}$ ,  $1.66 \cdot 10^{-2}$ ,  $2.87 \cdot 10^{-2}$  et  $1.08 \cdot 10^{-1}$ .

Ce qui change avec la filtration hydrodynamique "classique", et qui rend intéressant l'utilisation de bypass, est l'application des pressions. Alors que précédemment, des pressions différentes pouvaient être fixées en entrée et aux deux sorties (latérale et principale) - on avait défini le rapport  $\Delta P^* = \frac{P_{in} - P_{out}}{P_{in} - P_{lat}}$  - la boucle sur la canalisation impose que seules deux pressions sont fixées (en entrée et en sortie), la différence de pression de part et d'autre du bypass étant déterminées par la géométrie (résistances hydrauliques) de la canalisation principale et du bypass. Un schéma des résistances hydrauliques et notations pour les pressions est indiqué Fig. 2.16 b).

Le rapport de débits  $Q^*$  (efficacité) est donc indépendant des pressions d'entrée et de sortie, il est défini directement par la géométrie du système :

$$Q^* = \frac{Q_b}{Q_{in}} = \frac{R_p}{R_p + R_b}. \quad (2.25)$$

### 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

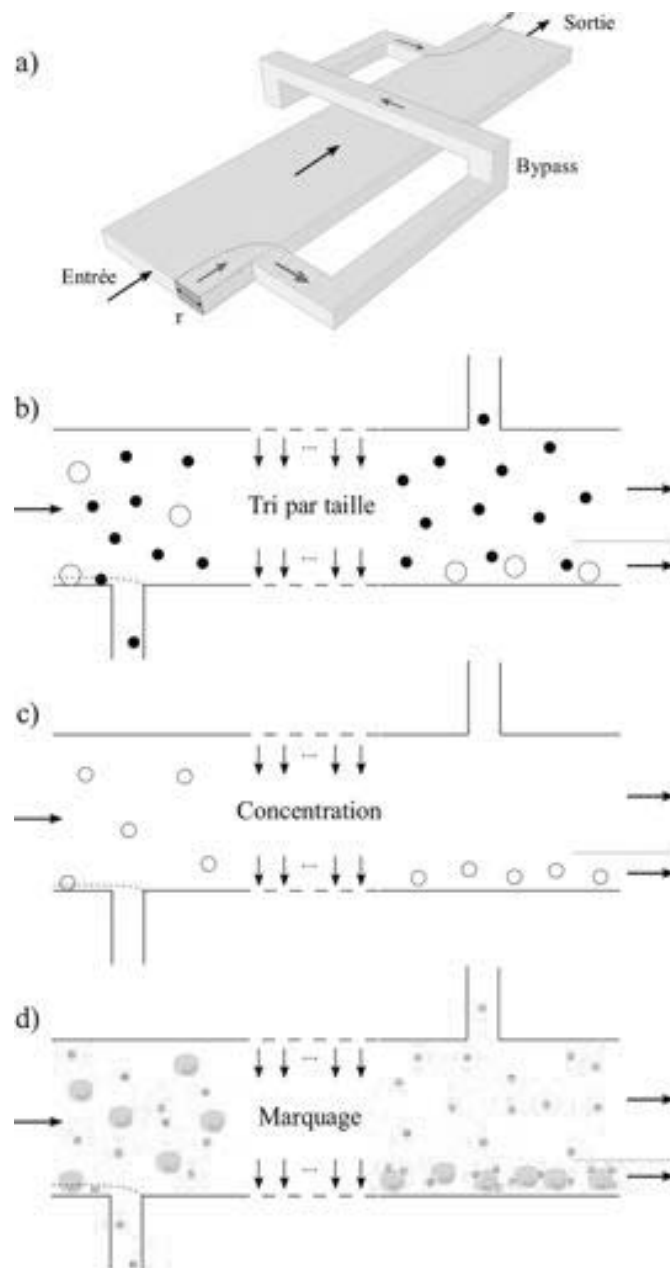


FIGURE 2.15 – Principe et applications du dispositif de mélange et filtration hydrodynamique par bypass. Les points de suspension au centre des schémas signifient qu'un nombre suffisant de motifs a été parcouru pour traiter tout le flux entrant. a) Schéma d'une structure de bypass : le fluide entre le mur et le rayon critique (séparatrice) est prélevé du canal principal et réinjecté sur le côté opposé. b-c) La filtration hydrodynamique peut être utilisée pour séparer ou concentrer des populations de particules. c) Avec des objets de tailles différentes, une opération de mélange (marquage) peut être réalisée.

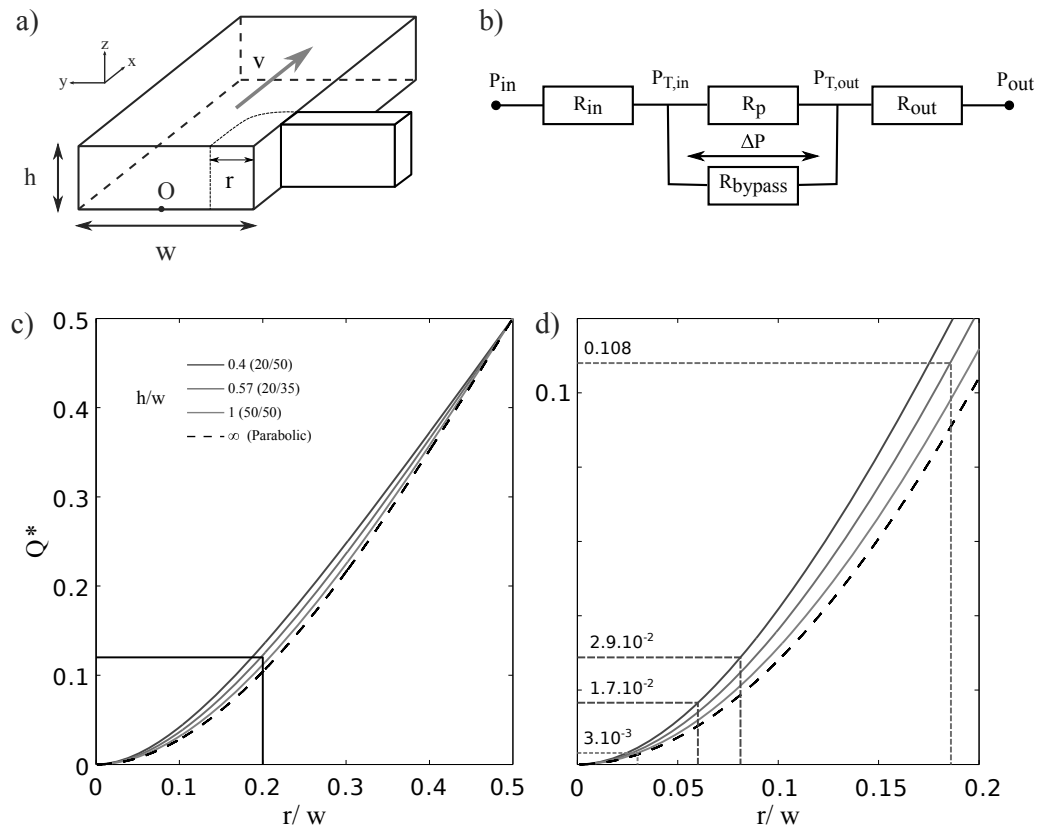


FIGURE 2.16 – Notations et calculs du ratio de débit traité/entrant. a) Dessin du système : canal principal et entrée du canal de bypass. Le  $O$  indique l'origine de la géométrie,  $r$  est le rayon critique (limite d'aspiration). b) Résistances hydrauliques, notations des pressions et analogie électrique. c) Variation du ratio de débit traité (aspiré dans le bypass)/entrant en fonction du rapport  $\frac{r}{w}$  pour différents rapports d'aspect  $\frac{h}{w}$ . d) Portion agrandie de c) avec les points de fonctionnement pour les 3 systèmes présentés.

### 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

Ainsi, même en ne connaissant pas avec précision les pressions (ou débits) appliqués, tant que le régime est laminaire (c'est tout le temps le cas en tenant compte des tailles de canaux et des gammes de fonctionnement des puces en pression), ce rapport, qui définit le rayon de coupure souhaité  $r_c$ , est inchangé.

En disposant des bypass en série, il est aisé d'augmenter le débit total traité : si  $N$  motifs sont présents, l'efficacité totale est donnée par  $Q_{tot}^* = NQ^*$ . Il est donc possible d'une part de traiter tout le flux entrant. Si par ailleurs on place davantage de motifs, alors les particules dont la taille est supérieure à  $d_c$  restent en bord de canal et leur environnement est continuellement renouvelé. Le dispositif devient ainsi un réacteur que l'on peut utiliser pour du marquage par exemple.

Ce type de système étant destiné à fonctionner avec des particules ou cellules, la question suivante est alors de connaître les trajectoires d'objets évoluant dans la puce microfluidique. Une hypothèse simplifiant grandement l'approche sera adoptée pour ce faire : il est supposé que les objets suivent les lignes de courant du liquide ( $v_{particule} = v_{particule\ fluide}$ ), d'autre part les profils de séparatrice sont supposés indépendants de  $z$ , les trajectoires seront donc étudiées uniquement selon l'axe  $y$ .

Pour calculer le déplacement d'une particule, nous considérons une position initiale  $y_0$  (avant le bypass) et une position finale (à la sortie de l'étage)  $y_1 = y_0 + \Delta y$ . Le schéma sur la Fig. 2.18 a) représente le problème traité. En considérant une particule dont la taille est inférieure à  $d_c$ , on distingue deux situations.

Pour  $y_0 \geq -\frac{w}{2} + r_c$  :

$$\int_{y_0}^{y_1} \int_0^h v_x(y, z) dy dz = \int_{\frac{w}{2} - r_c}^{\frac{w}{2}} \int_0^h v_x(y, z) dy dz = Q_b \quad (2.26)$$

Pour  $y_0 \leq -\frac{w}{2} + r_c$  (la particule traverse le bypass et se retrouve de l'autre côté du canal) :

$$\int_{-\frac{w}{2}}^{y_0} \int_0^h v_x(y, z) dy dz + \int_{y_1}^{\frac{w}{2}} \int_0^h v_x(y, z) dy dz = \int_{\frac{w}{2} - r_c}^{\frac{w}{2}} \int_0^h v_x(y, z) dy dz = Q_b \quad (2.27)$$

Après intégration, on obtient l'équation suivante :

$$0 = \sum_{n, imp}^{\infty} \frac{1}{n^4} \left[ y_0 - y_1 - r_c + \alpha w - \frac{h}{n\pi \cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \left( \sinh\left(\frac{n\pi y_0}{h}\right) - \sinh\left(\frac{n\pi y_1}{h}\right) \right) + \sinh\left(\frac{n\pi\left(\frac{w}{2} - r_c\right)}{h}\right) - (-1)^\alpha \sinh\left(\frac{n\pi\frac{w}{2}}{h}\right) \right] \quad (2.28)$$

où  $\alpha = 0$  si  $y_0 < -\frac{w}{2} + r_c$ .

La résolution de cette équation permet de calculer la déviation de la particule  $\Delta y$  en fonction de la position initiale  $y_0$ . Ce calcul a été réalisé numériquement (algorithme implémenté avec R) pour 6 éléments de bypass. Une autre méthode par éléments finis (écoulement rampant

résolu avec le logiciel Comsol Multiphysics) a été employée pour obtenir  $\Delta y = f(y_0)$ . Ces résultats sont tracés et comparés sur la Fig. 2.18 b-c). La déviation est plus importante aux bords du canal, ce qui est cohérent étant donné que l'aspiration et le refoulement se font aux bords également. Les courbes obtenues, qu'elles relatent la déviation de particules ayant été aspirées dans le canal latéral ou non, montrent une très bonne correspondance des modèles. Au lieu de résoudre l'écoulement par la méthode des éléments finis, puis d'intégrer la vitesse pour obtenir les trajectoires, nous pourrions donc directement utiliser le modèle simplifié, basé sur l'intégration du profil de vitesse pour un écoulement unidimensionnel. Un des objectifs de la partie expérimentale, développé plus loin, a été de visualiser la déviation de billes et de vérifier la validité de ce modèle.

### 2.3.2 Designs

Pour les applications ciblées (séparation par taille, concentration, mélange), le rayon de coupure  $r_c$  est le premier paramètre à prendre en considération, les tailles (particules, cellules) étant imposées. Il convient ensuite de concevoir un dispositif présentant une efficacité intéressante, et réalisable (il faut tenir compte des contraintes de fabrication). L'efficacité  $Q^*$  est dépendante de  $r_c$  et de la géométrie de la structure considérée.

Un autre paramètre qu'il est intéressant de regarder est le temps de passage des particules (ou cellules) : si les objets parcourent le canal principal et le bypass dans un temps comparable, le système est idéal pour le mélange, mais aussi la visualisation (caractérisation). En revanche, si ces temps sont très différents, le système présente une dynamique lente (régime transitoire plus long lors de l'injection. . .). On définit  $T^*$ , le rapport des temps de passage dans le bypass et dans le canal principal. En se basant sur le temps moyen (vitesses moyennes des écoulements), on obtient :

$$T^* = \frac{V_b}{V_p} \left( \frac{1}{Q^*} - 1 \right). \quad (2.29)$$

Le ratio des temps de parcours varie de manière inverse avec  $Q^*$ , et est essentiellement ajustable avec le rapport des volumes du canal principal et du bypass.

La première génération de dispositifs (notés A1, A2, A3) a été conçue pour un  $d_c$  de 12  $\mu\text{m}$ , le diamètre moyen des populations de cellules ciblées - monocytes THP-1 - étant de 15  $\mu\text{m}$ . Un  $T^*$  proche de 1 est souhaité, et des contraintes technologiques sont imposées (taille des murs  $\geq 30 \mu\text{m}$ , épaisseurs des couches de 10 ou 25  $\mu\text{m}$ ). Des calculs d'optimisation faisant intervenir la surface totale du dispositif (footprint), avec comme objectif la minimisation de  $T^*$  ont été réalisés (module optimset du logiciel Matlab) et ont conduit aux géométries décrites dans la Fig. 2.17 a).

Des systèmes pour des tailles de tri différentes ont également été réalisés. Les dispositifs de type B (notés B1 à B3) sont les plus simples : le canal principal présente une largeur  $w = w_{in} = w_c$  constante, et selon les épaisseurs le diamètre de tri peut être de 3, 6 ou 8.1  $\mu\text{m}$ . Leur particularité est un  $T^*$  élevé (de  $10^2$  à  $10^4$ ). Les géométries ont été choisies pour obtenir les  $r_c$  voulus, en respectant les contraintes technologiques, et sans optimisation.

### 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

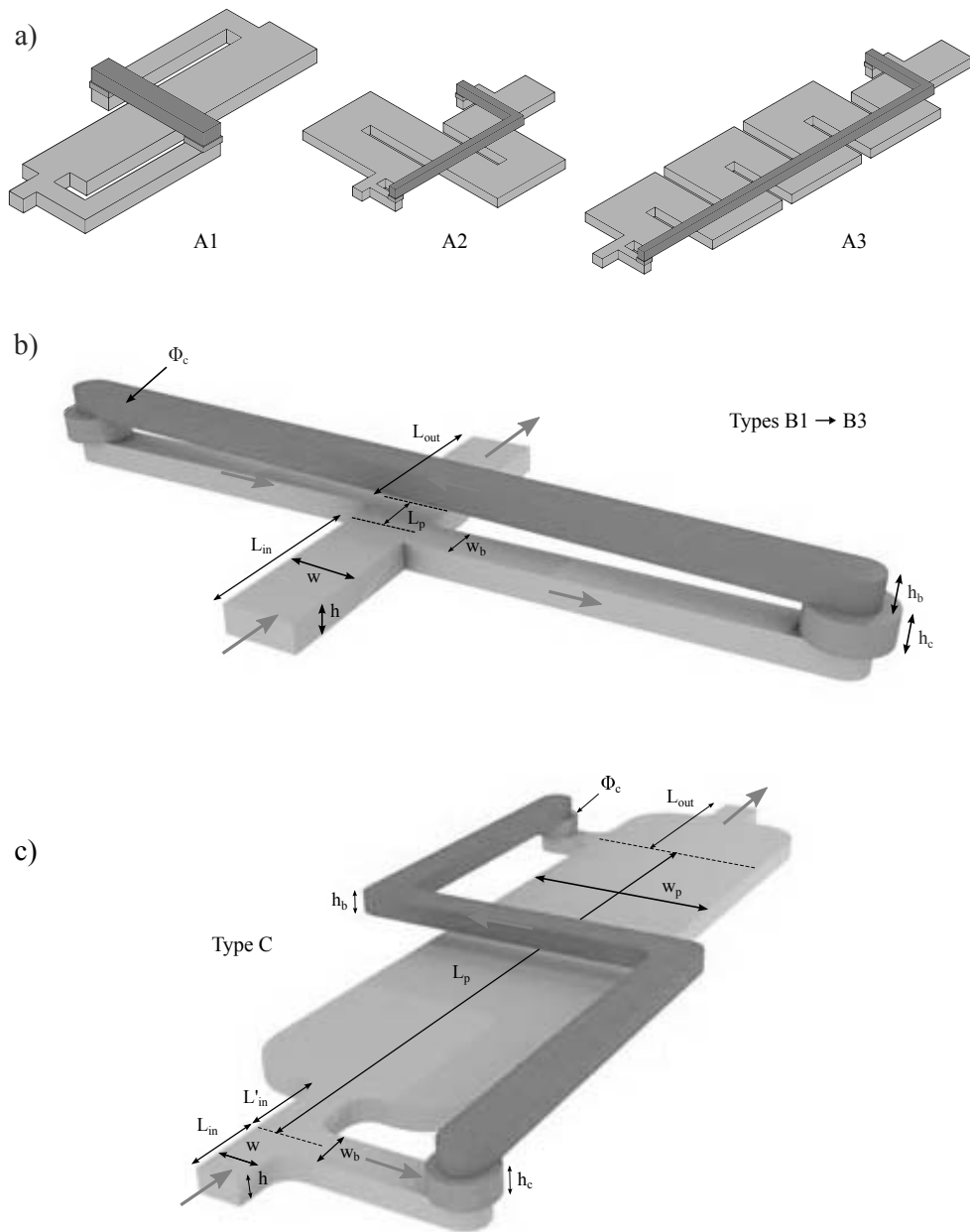


FIGURE 2.17 – Designs et notations des dimensions. Les couleurs (violet, vert et bleu) sont utilisées pour différencier les 3 étages des dispositifs. Les flèches rouges (b-c) représentent la direction du flux. a) Designs de bypass pour la preuve de concept (types A1 à A3), avec  $r_c = 6\mu\text{m}$ . b) Bypass simple pour  $r_c \approx 1.5, 3$  ou  $4.05\mu\text{m}$  (designs de types B1 à B3 respectivement). c) Bypass avec une variation de largeur pour le canal principal,  $r_c \approx 6.5\mu\text{m}$ .

Enfin le dernier type de géométrie (C) est très similaire au design A1, et a été obtenu de la même manière, avec quelques conditions différentes (épaisseurs, bords arrondis pour améliorer le remplissage). Le  $d_c$  est de  $13\ \mu\text{m}$  et  $T^* \simeq 2.5$ .

Il faut également préciser la conséquence d'un élément de géométrie, à savoir la variation de largeur  $w_p$  de la canalisation principale. Comme Yamada *et al.* le montrent dans leur publication sur le fractionnement en flux pincé [26], une particule tangente à un bord de canalisation, après un élargissement de cette canalisation, ne sera plus tangente au bord du canal, mais sera placée sur une position limite. Cette limite correspond à la ligne de flux passant par le centre de la particule avant le rétrécissement. En réalité, le rapport d'aspect  $\frac{h}{w}$  a une importance sur la position de cette limite, et il faut prendre en compte d'autres forces s'appliquant sur la particule. Mais en pratique, Yamada *et al.* caractérisent cette limite sur une seule dimension ( $y$  dans notre cas), et cette approximation reste valable dans nos expériences. Soient  $w_{in}$  la portion étroite de canal principal et  $w_p$  une portion élargie, la position d'une particule de rayon  $r_c$  dans la portion élargie sera donnée par :

$$y = r_c \frac{w_p}{w_{in}} - \frac{w_p}{2}. \quad (2.30)$$

Ce cas d'élargissement de canalisation est également présent pour les dispositifs de type B pour lesquels des "fenêtres" de visualisation  $w = 200\ \mu\text{m}$  en forme de "citron" ont été placées tous les 6 étages pour pouvoir caractériser le système.

Les données géométriques principales des dispositifs sont répertoriées dans le tableau 2.1.

### 2.3.3 Approche expérimentale et résultats

Après avoir établi les géométries des dispositifs, les étapes suivantes, expérimentales, consistent en la fabrication et la caractérisation. Les procédés utilisés pour la microfabrication sont détaillés dans la partie 2.4.

Les expériences de caractérisation ont été conduites autour de trois approches, qui seront exposées successivement :

- le suivi de positions d'objets individuels ou de population d'objets, pour valider le modèle présenté un peu plus haut,
- la vérification de la gamme du rayon de coupure par "encadrement" avec des tailles de particules différentes,
- et le mélange réactif avec une application au marquage de cellules par des particules magnétiques.

Le setup expérimental est détaillé au paragraphe 2.5. Un support de puce microfluidique et un contrôleur de pression sont utilisés, ainsi qu'un ensemble comprenant un microscope inversé, un diviseur de faisceau et une caméra pour la l'imagerie de billes et cellules en fluorescence.

Deux expériences sont présentées pour le suivi d'objets et la détermination de la déviation due à la recirculation, une incluant des billes calibrées de  $15\ \mu\text{m}$ , et l'autre avec des cellules (dont le diamètre moyen est d'environ  $15\ \mu\text{m}$  également).

### 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

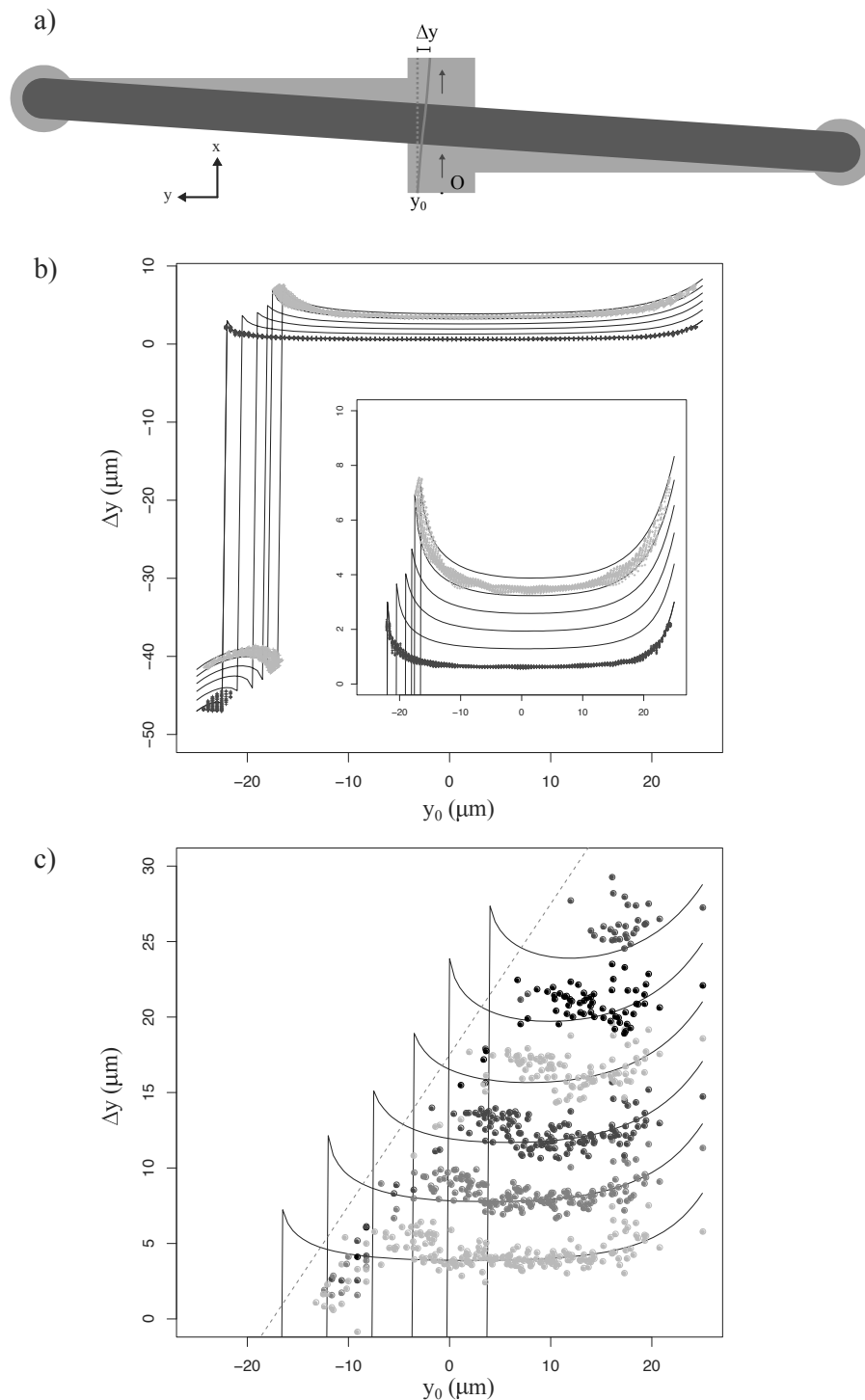


FIGURE 2.18 – Étude de la déviation de particules pour une géométrie de bypass type B2 ( $r_c = 3\mu\text{m}$ ). a) Schéma du dispositif, de la déviation  $\Delta y$  étudiée et notations. b) Tracés de  $\Delta y = f(y_0)$  obtenus par méthodes numériques (lignes noires continues : dichotomie, points bleus et verts : éléments finis pour les étages 1 et 6). Une portion agrandie du graph pour les déviations positives est contenu dans le graph général. c) Tracés de  $\Delta y = f(y_0)$  obtenus par méthode numérique (lignes noires, dichotomie) et par expérience avec des billes de  $15\mu\text{m}$  (points colorés, une couleur par étage). La ligne rouge en pointillés indique la limite de déviation pour une taille de particules de  $15\mu\text{m}$ .



## Chapitre 2. La microfluidique 3D pour la préparation d'échantillons

	<b>A1</b>	A2	A3	<b>B1</b>	<b>B2</b>	B3	<b>C</b>
$d_c$ ( $\mu\text{m}$ )	12	12	12	3	6	8.1	13
$Q^*$	0.114	0.114	0.114	$3.08 \cdot 10^{-3}$	$1.66 \cdot 10^{-2}$	$2.87 \cdot 10^{-2}$	0.108
$T^*$	5.05	1.06	1.06	$1.37 \cdot 10^4$	$1.01 \cdot 10^3$	$2.30 \cdot 10^2$	2.49
$h$	25	25	25	20	20	50	20
$h_c$	10	10	10	20	20	20	20
$h_b$	25	25	25	50	20	20	20
$w_{in}$	30	30	30	50	50	50	35
$L_{in}$	45.5	35	60.25	30	30	30	120
$L'_{in}$	35	30	40.25	0	0	0	70
$w_p$	100	92.4	95.6	50	50	50	200
$L_p$	500	1255	2056	40	40	40	685
$L_{out}$	40.5	107.6	129.65	30	30	30	133.2
$w_b$	36	20	20.5	30	30	30	35
$L_b$	906	791	1310	1131	1131	1131	1180.4
$V_p$ (nL)	1.250	2.899	4.914	0.040	0.040	0.100	2.740
$V_b$ (nL)	0.841	0.404	0.680	1.775	0.757	0.757	0.877

TABLEAU 2.1 – Principales caractéristiques et dimensions des différents systèmes mentionnés. Toutes les distances (de  $h$  à  $L_b$ ) sont en  $\mu\text{m}$ , les volumes sont en nL. Les designs (A1 à C) sont représentés Fig. 2.17, les noms en gras (A1, B1, B2, C) interviennent dans la partie expérimentale.

La déviation de billes de  $15\mu\text{m}$  est réalisée dans un dispositif de type B2 comprenant  $6 \times 6 = 36$  étages de bypass ( $d_c = 6\mu\text{m}$ ). Le  $Q^*$  pour un tel système est de  $1.66 \cdot 10^{-2}$ , il faudrait donc 61 étages pour obtenir un renouvellement du flux total. D'autres dispositifs ont été conçus avec plus d'étages (100 et 300) mais ne présentent pas de fenêtres de visualisation (dédiées à la caractérisation) et sont plus délicats à utiliser en terme de remplissage. Les billes sont injectées uniquement d'un côté de la canalisation (opposé à l'aspiration), et la déviation est observée tous les 6 bypass. Chaque particule est suivie lors de l'acquisition, et sa position est relevée lors des passages élargis de la canalisation principale.

Le schéma de l'expérience et les résultats sont présentés sur la Fig. 2.19 c-d). La première observation est que le déplacement limite (ligne horizontale sur le graph d) à droite) n'est pas atteint, ce qui est normal (tout le flux n'est pas traité après 36 étages). La distribution des billes ne montre pas de changement de concentration locale : ceci est cohérent avec l'injection des billes d'un seul côté de la canalisation.

Ces résultats sont ensuite analysés en considérant chaque groupe de 6 bypass (positions initiales et déviées  $y_0$  et  $y_1$  pour chaque groupe), et comparés avec le modèle établi précédemment, voir la Fig. 2.18 c). On observe deux points importants : pour commencer, chaque groupe de points décrivant un étage est placé sur la courbe correspondante. Ensuite on voit que la limite théorique de déplacement en fonction de la position, pour une bille de  $15\mu\text{m}$  (droite en pointillés rouge), est également respectée avec les résultats expérimentaux. Ainsi le modèle, bien que simple, décrit très bien la déviation des particules.

### 2.3. Opérations sur des particules avec une structure en bypass

L'autre expérience de caractérisation de la déviation est réalisée avec des monocytes THP-1, dans des dispositifs de type C ( $d_c = 13\mu\text{m}$ ). Le  $Q^*$  est de 0.108 pour ces bypass, ainsi seulement 10 étages sont nécessaires pour traiter tout le flux. Les cellules sont injectées en entrée sur toute la canalisation (position moyenne  $\langle y \rangle \approx 0$ ), et sont déviées progressivement vers le bord d'aspiration. L'acquisition est réalisée dans le canal principal, avant la réinjection, pour tous les étages : la position de chaque cellule dans cette zone est relevée (schéma Fig. 2.19 a).

Les résultats sont regroupés dans les deux graphiques Fig. 2.19 b). On voit tout d'abord (graphique de droite) que la limite de déviation (due à l'élargissement de la canalisation principale) est atteinte, à la valeur prédite par la théorie (droite horizontale). Les cellules se focalisent donc peu à peu vers le bord d'aspiration, et la dispersion de la population diminue également le long du dispositif (graphique de gauche). Un point à noter (qui diffère de l'expérience précédente), est que la concentration locale au niveau du bord d'aspiration augmente, pour atteindre environ 6 fois la concentration moyenne d'entrée.

Ces deux expériences permettent de valider le modèle théorique, aussi bien pour le déplacement que pour les valeurs de position et déplacement limites. La focalisation et la concentration (locale) de cellules ont été démontrées. En terme d'efficacité, bien qu'ayant utilisé les mêmes tailles de billes et particules, une comparaison n'est pas possible car les diamètres de coupure des systèmes ne sont pas les mêmes ( $6\mu\text{m}$  contre  $13\mu\text{m}$ ). En revanche un détail non négligeable est la position finale limite, qui est liée aux dimensions des canaux à l'endroit de l'aspiration et après agrandissement pour l'observation ou la séparation. Pour le dispositif de type C, une faible largeur ( $w_{in} = 35\mu\text{m}$ ) permet une efficacité importante mais limite la position de sortie à environ  $-57\mu\text{m}$ , alors que pour les dispositifs types B ( $w_{in} = 50\mu\text{m}$ ), cette limite est de  $-70\mu\text{m}$ . Cette limite n'a pas d'importance pour une réaction de marquage, mais impacte l'efficacité d'une opération de tri par taille, si l'on souhaite récupérer uniquement la portion de flux la plus proche de l'aspiration.

La vérification du bon fonctionnement et des rayons de coupure des systèmes en "bypass" a également été traitée. Pour les premiers dispositifs, il a fallu, après fabrication, s'assurer de leur bon remplissage et que des billes puissent emprunter les deux chemins possibles (canal principal / bypass). L'injection de billes fluorescentes de  $2.3\mu\text{m}$  dans des bypass type A1 ( $d_c = 12\mu\text{m}$ ) a permis cette vérification (Fig. 2.20 a).

Il est plus délicat de caractériser avec précision les rayons de coupure en utilisant des particules. L'étude de la déviation de particules peut apporter cette mesure de manière indirecte. Une autre méthode est de procéder à un encadrement avec deux tailles de particules, ainsi des particules fluorescentes (Invitrogen FluoSpheres) de  $5\mu\text{m}$  (vertes) et  $2\mu\text{m}$  (rouges) ont été injectées dans un dispositif de type B1 ( $d_c = 3\mu\text{m}$ ), voir Fig. 2.20 b-c). Seules les particules de  $2\mu\text{m}$  sont aspirées dans les bypass.

La même expérience est réalisée avec des tailles différentes pour les systèmes type B2 ( $d_c = 6\mu\text{m}$ , où des particules de  $5\mu\text{m}$  (vertes) et de  $15\mu\text{m}$  (bleues) sont injectées. La Fig. 2.20 d) montre la trajectoire d'une particule de  $15\mu\text{m}$  traversant le système alors que des particules de  $5\mu\text{m}$  sont présentes dans les bypass.

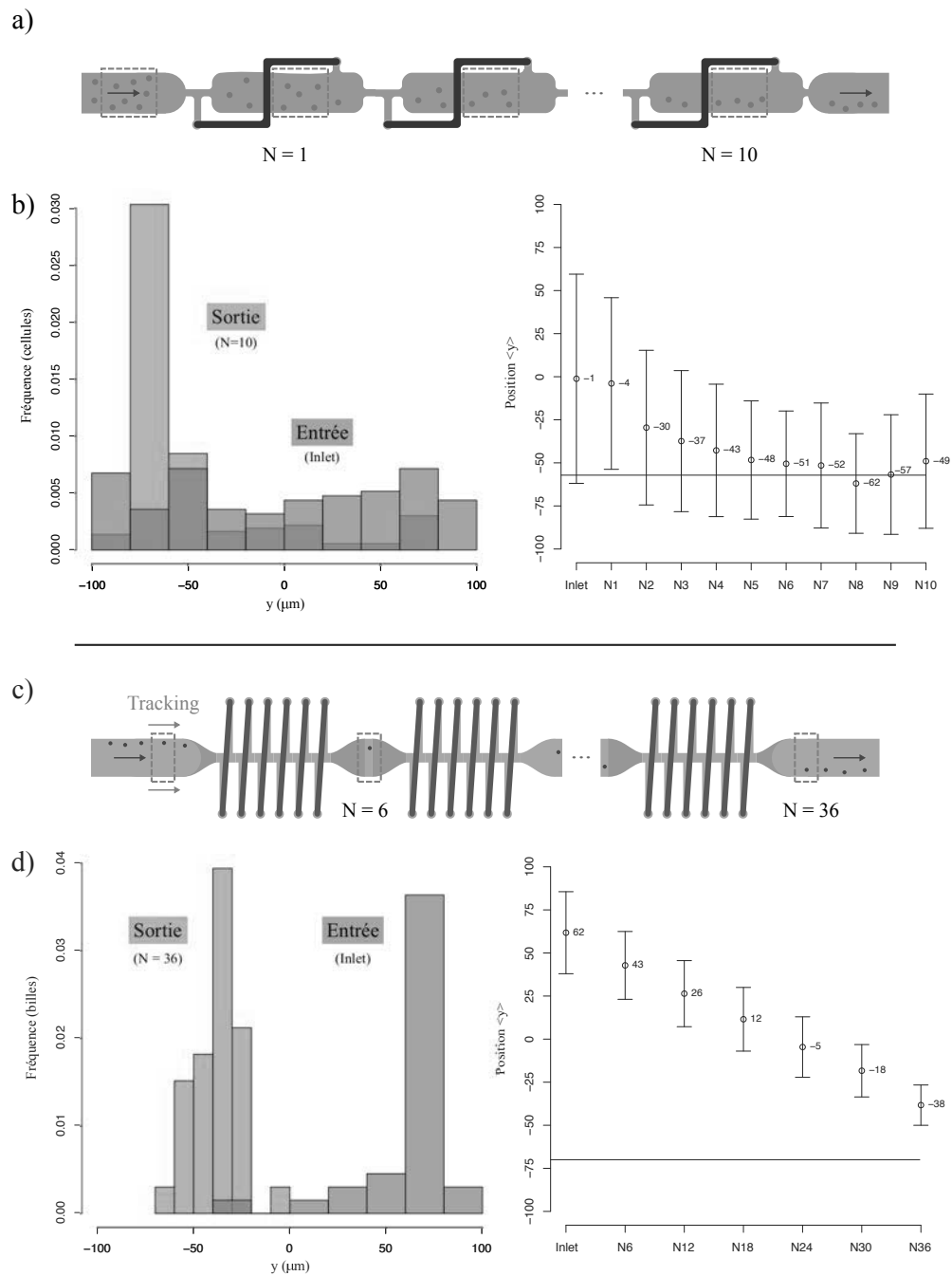


FIGURE 2.19 – Expériences de caractérisation : trajectoires d’objets. a-b) Caractérisation de la distribution en  $y$  d’une population de cellules (monocytes THP-1) pour 10 étages (bypass type C), avec une répartition homogène en entrée. b) Histogramme en fréquence des cellules en fonction de  $y$  (nombre de cellules pour la population = 126 en entrée, 183 en sortie), et tracé de  $\langle y \rangle \pm \sigma$  pour chaque étage. c-d) Caractérisation de la position d’une bille de  $15\mu\text{m}$  pour  $N = 36$  étages (observations tous les 6 bypass), dispositifs de type B2. d) Histogramme en fréquence pour la position de chaque bille (nombre total de billes observées = 33), et tracé de  $\langle y \rangle \pm \sigma$  pour chaque groupe de 6 étages. Les fenêtres rouges schématisent l’acquisition (fixe pour un ensemble de cellules, ou suivi d’une bille). Les lignes noires horizontales sur b-d) à droite montrent la limite en position due aux élargissements de canalisations.

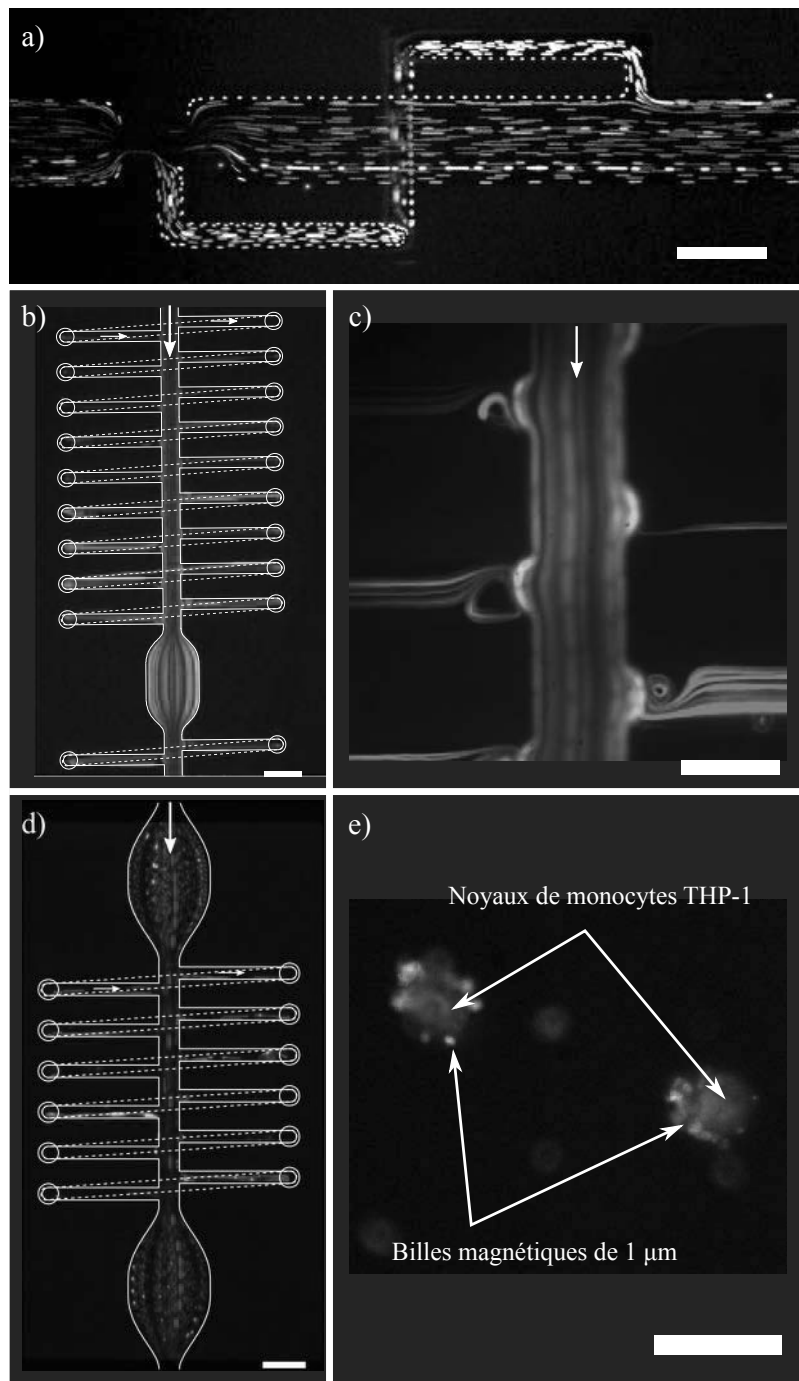


FIGURE 2.20 – Images de microscopie de fluorescence pour la séparation par taille, l’analyse de trajectoires et le marquage cellulaire. Sur b) et d) les murs des canalisations (lignes blanches) ont été ajoutées pour plus de lisibilité. a) Démonstration de fonctionnement pour un dispositif type A (SU-8) avec des billes fluorescentes de  $2.3\ \mu\text{m}$  ( $d_c \approx 12\ \mu\text{m}$ ). b) Tri par taille de particules de  $5\ \mu\text{m}$  (vertes) et  $2\ \mu\text{m}$  (rouges). c) Vue agrandie pour la même expérience (même dispositif) que pour b). d) Trajectoire (déviation) d’une bille de  $15\ \mu\text{m}$  (bleue) dans une solution avec des billes de  $5\ \mu\text{m}$  (vertes). e) Monocytes (noyaux marqués en fluorescence à l’Hoechst 33342) marqués avec des billes magnétiques (vertes) de  $1\ \mu\text{m}$ . Les barres d’échelle sont de  $100\ \mu\text{m}$  pour a), b) et d), et de  $50\ \mu\text{m}$  pour c) et e).

Enfin une expérience de marquage a aussi été réalisée avec ces dispositifs de type B2. Des cellules THP-1 (dont les noyaux ont été marqués à l'Hoechst) sont mélangées avec des billes magnétiques fluorescentes de diamètre  $1\ \mu\text{m}$ . Les dispositifs disposent de deux entrées ( $P_{in} = 100\ \text{mbar}$  et une sortie ( $P_{out} = 0\ \text{mbar}$ ). Une solution de billes marquées avec des anticorps anti-CD14 ( $5.4 \cdot 10^8$  billes/mL) et une solution de cellules THP-1 ( $5 \cdot 10^5$  cellules/mL) sont injectées à chaque entrée. Le marquage n'a pu être observé directement sur puce, dû essentiellement à la vitesse de flux élevée pour éviter la sédimentation des particules dans les bypass, et à un signal de fluorescence faible comparé à l'autofluorescence du matériau. La solution à la sortie a été prélevée et placée sur une lame de verre. Des cellules marquées (voir Fig. 2.20 e) ont ainsi été observées.

### Conclusion

Cette partie dédiée aux systèmes à dérivation (bypass) est fortement liée aux travaux consacrés à la filtration hydrodynamique. En introduisant une structure 3D simple, il est possible de rendre un procédé plus efficace ( $Q_{tot}^* = NQ^*$ ) mais aussi d'apporter de nouvelles fonctions. Au delà de la fabrication des puces, une cohérence entre le modèle proposé pour la déviation (trajectoire) des particules et les résultats obtenus expérimentalement a été montrée. Divers géométries ont permis d'avoir accès à une gamme de diamètres de coupure comprise entre 3 et  $13\ \mu\text{m}$ , ce qui a été confirmé avec différentes tailles de particules. Enfin la preuve de concept pour le marquage de cellules sur puce avec cette technique a été présentée.

## 2.4 Microfabrication de dispositifs 3D

En introduction, les principales solutions existantes pour la fabrication de puces microfluidiques en 2.5D et 3D ont été revues. Les avantages que confèrent les technologies de report de couches polymères, notamment par laminage, ont conduit à leur utilisation et leur développement au LAAS. Dans cette section, les procédés dédiés à la fabrication de dispositifs microfluidiques 3D (voir parties précédentes 2.1, 2.2 et 2.3) seront détaillés, à travers les différents matériaux employés (SU-8, TMMF et DF), et les limitations rencontrées seront abordées.

### 2.4.1 Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication utilisé est générique de tout type de film photosensible, qu'il soit disponible commercialement (TMMF, DF) ou fabriqué en interne au laboratoire (SU-8). Il repose sur le laminage successif des films et sur leur structuration couche à couche, après report, par photolithographie (voir paragraphe 1.3.3).

Les puces sont réalisées sur un support (substrat) rigide, sur lequel des films polymères formant les canalisations sont déposés. Afin de faciliter l'observation au microscope et le branchement des connexions fluidiques, tous les dispositifs ont été réalisés sur des substrat de verre. Des galettes (le terme anglais wafer sera également employé) de  $4''$  en verre (Schott

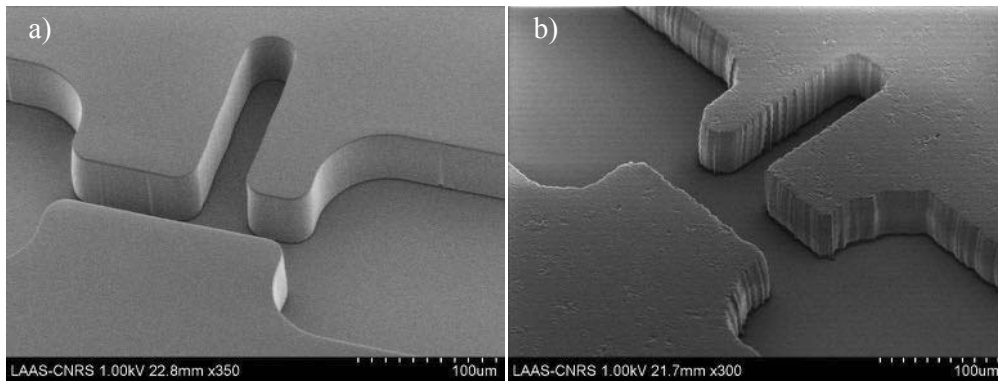


FIGURE 2.21 – Différences entre masques dur et souple pour les étapes de photolithographie. Couches de TMMF de  $45\ \mu\text{m}$ , intersection pour un dispositif de type bypass (design 2, premier niveau), obtenues avec a) un masque dur et b) un masque souple.

AF32, épaisseur  $500\ \mu\text{m}$ ) ont été utilisées.

Les étapes de photolithographie nécessitent que les designs souhaités soient reportés sur des masques. Deux solutions ont été envisagées :

- la première consiste en l'utilisation de masques souples, obtenus après insolation de films photosensibles (DigiDot HND, Agfa) avec un phototraceur, puis révélation. La résolution obtenue est au mieux de  $30\ \mu\text{m}$  (pas de motifs ou canaux en deçà de cette taille), et le coût unitaire avoisine  $5\ \text{€}$  pour un masque de  $5''$ .
- La seconde option est la réalisation de masques "durs", en verre avec motifs en chrome. Le masque comprend une couche de chrome couverte d'une résine photosensible positive, qui est insolée avec une machine d'écriture laser (DWL, Heidelberg Instrument), développée, puis le chrome est gravé et la résine est retirée. Les résolutions sont de l'ordre du micron, et le coût par masque atteint plusieurs centaines d'euros.

La Fig. 2.21 présente la différence de résolution obtenue pour le même dessin (dispositif bypass, design de type 2) et le même film sec (TMMF). Etant donné la taille des motifs souhaités pour les travaux de thèse, l'ensemble des puces microfluidiques seront fabriquées à partir de masques "dur" (chrome / verre).

Les alignements et insolations sont réalisés avec des machines d'alignement (indifféremment des SUSS MicroTec MA6 et MA150, ou une EVG 620). Selon le degré de réflexion du wafer (différent entre verre et silicium), et la puissance de la source lumineuse, les temps d'insolation varient. Les protocoles qui suivent indiquent plus simplement la dose (énergie) que doit recevoir la couche insolée.

En fin de procédé, une fois tous les étages en polymère réalisés, le wafer est le plus souvent découpé, pour obtenir des puces individuelles, avec une machine de découpe à scie diamantée.

Enfin, dans le but de clarifier au mieux les protocoles qui vont suivre, il est opportun de préciser deux points. Les opérations de laminage sont réalisées avec des laminoirs (Shipley 3024, dureté des rouleaux Shore D), et font appel à 3 paramètres : vitesse au bord des rouleaux

(v), pression appliquée (P) et température (T), cette dernière étant la température ambiante si rien n'est précisé.

D'autre part, lors des étapes de photolithographie, les recuits et/ou recuits après exposition (notés PEB pour Post Exposure Bake) peuvent être réalisés avec ou sans rampe de température. Si la mention "rampe" est précisée, alors le recuit est démarré à une température de 65 °C (plateau de 1 min), puis atteint la température indiquée ( $T_R$ ) en suivant un gradient de 10 °Cmin<sup>-1</sup>. S'ensuit un plateau de la durée indiquée dans le protocole, puis le refroidissement suit alors une rampe de 5 °Cmin<sup>-1</sup> jusqu'à atteindre une température de 25 °C. Si une rampe de température n'est pas utilisée, le wafer est simplement déposé sur une plaque chauffante à la température indiquée, pendant le temps du recuit.

### 2.4.2 Films photosensibles

#### 2.4.2.1 SU-8

Plusieurs options sont disponibles pour l'utilisation ou la réalisation de films secs photosensibles. Une technique de fabrication (et de laminage) de films de SU-8 à partir de résine liquide a été mise en place au LAAS depuis une dizaine d'année, elle a ainsi été utilisée lors de ces travaux pour la conception de dispositifs 3D de type bypass (design 1).

Le procédé, dont le schéma est présenté Fig. 2.22, peut être découpé en deux parties : la fabrication du film sec (colonne de gauche) et la fabrication des dispositifs à proprement parler (colonne de droite). Au final la puce microfluidique comprend 4 ou 5 épaisseurs, les niveaux s'enchaînent ainsi : substrat (verre) / (couche 800 nm) / couche 25 µm / couche 10 µm / 2× couche 25 µm, soit environ 85-90 µm d'épaisseur pour la partie fluide. La couche optionnelle de 800 nm permet d'avoir le même matériau partout dans la canalisation (mêmes propriétés de surface). Les dispositifs terminés correspondent à la Fig. 2.22 m) et m').

**Réalisation d'un film sec.** Le protocole décrit ci dessous concerne la fabrication d'un film sec de SU-8 de 25 µm d'épaisseur. La Fig. 2.22 est utilisée en référence.

Étape	Schéma	Description
1	a)	<b>Nettoyage substrat (Si)</b> - Bain H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 min). Déshydratation, 15 min.
2	b)	<b>Laminage adhésif double face</b> - P = 2.5 bar, v = 0.5 m/min.
3	c)	<b>Laminage tricouche PET / adhésif</b> - P = 2.5 bar, v = 0.5 m/min.
4	d)	<b>Dépôt SU-8 25 µm</b> - Nettoyage film PET à l'éthanol (sur tournette). Dépôt d'une couche de SU-8 (3025) de 25 µm, $v_{rot} = 3800$ rpm. Recuit (rampe) : 95 °C, 27 min.
5	e)	<b>Pelage du film</b> - Le film sec obtenu est retiré du wafer, puis reporté sur une autre surface par un procédé de laminage.

Le film tricouche PET/Adhésif/PET provient de Polytec (PET AR Clear, DEV-8796). Le recuit de la couche de SU-8 est plus long que ce que le fabricant recommande : afin d'obtenir un

## 2.4. Microfabrication de dispositifs 3D

Étape	Schéma	Description
1	f)	<b>Nettoyage substrat (verre)</b> - Bain H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 min). Plasma O <sub>2</sub> , 800 W, 15 min.
(2)	-	<b>Dépôt SU-8 800 nm</b> - Dépôt pleine plaque SU-8 (2000.5), $v_{rot} = 1000$ rpm. Recuit : 105 °C, 1 min. Insolation : 200 mJ cm <sup>-2</sup> , puis PEB : 105 °C, 1 min.
3	g)	<b>Dépôt SU-8 25 µm</b> - Plasma O <sub>2</sub> , 800 W, 2 min. Dépôt d'une couche de SU-8 (3025) de 25 µm, $v_{rot} = 3800$ rpm. Recuit (rampe) : 95 °C, 15 min. Détourage (acétone).
4	h)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : Masque niveau 1, $\lambda = 365$ nm, dose de 200 mJ cm <sup>-2</sup> . PEB (rampe) : 95 °C, 3 min.
	i)	Développement : bain de "développeur SU-8" (PGMEA), pendant 9 min, puis rinçage (isopropanol) et séchage.
5	j)	<b>Laminage film sec</b> - Report d'un film de SU-8 d'épaisseur 10 µm. Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 30 s. Laminage : P = 2 bar, v = 1 m/min, T = 65 °C.
6	k)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : Masque niveau 2, alignement et insolation à travers le liner, $\lambda = 365$ nm, dose de 200 mJ cm <sup>-2</sup> . PEB (rampe) : 95 °C, 3 min. Retrait du liner (PET).
	l)	Développement : bain de PGMEA pendant 5 min (ou jusqu'à la révélation souhaitée), rinçage et séchage.
...10	-	<b>Laminage / Photolitho</b> - Répétition (×2) des étapes 5 et 6 pour des films secs d'épaisseur 25 µm. À la dernière étape le temps de développement était doublé (9 + 9 min).
(11)	-	<b>Hard bake</b> - Recuit final (rampe) : 125 °C, 2 min.

TABLEAU 2.2 – Protocole pour la réalisation de dispositifs microfluidiques (SU-8). Les lettres (f-l) se réfèrent à la Fig. 2.22. Le "+" entre deux durées pour une étape de développement indique que le bain a été renouvelé.

film sec nous enlevons plus de solvant. Ainsi pour une résine d'épaisseur 25 µm, le temps de recuit est celui normalement effectué pour une résine de 50 µm. On obtient au final un film sec photosensible, aux dimensions du wafer employé, qui peut être reporté sur un autre wafer.

**Réalisation des dispositifs microfluidiques.** Les étapes inscrites dans le tableau 2.2 décrivent la fabrication des dispositifs microfluidiques, en utilisant les films secs en SU-8 précédemment obtenus.

Le procédé de fabrication, une fois pris en compte les deux aspects de réalisation et utilisation des films secs de SU-8, se révèle assez long. Une des limites observées concerne la taille du film sec fabriqué : elle est celle du substrat utilisé. Ainsi, pour les étapes de laminage, il faut aligner un film sec de 4" sur un substrat de 4". Une alternative a été de fabriquer ce film sur un substrat de 6", mais d'une part cela consomme beaucoup plus de résine, relativement couteuse (> 2000 €/L), et d'autre part cela nécessite de réaliser une découpe qui peut s'avérer délicate étant donné la faible adhérence du film sec après le laminage.

L'utilisation de ces procédés à base de SU-8 a permis la fabrication et le test de quelques dispositifs "bypass" (design A1 seulement, les designs A2 et A3 n'ayant pu être développés



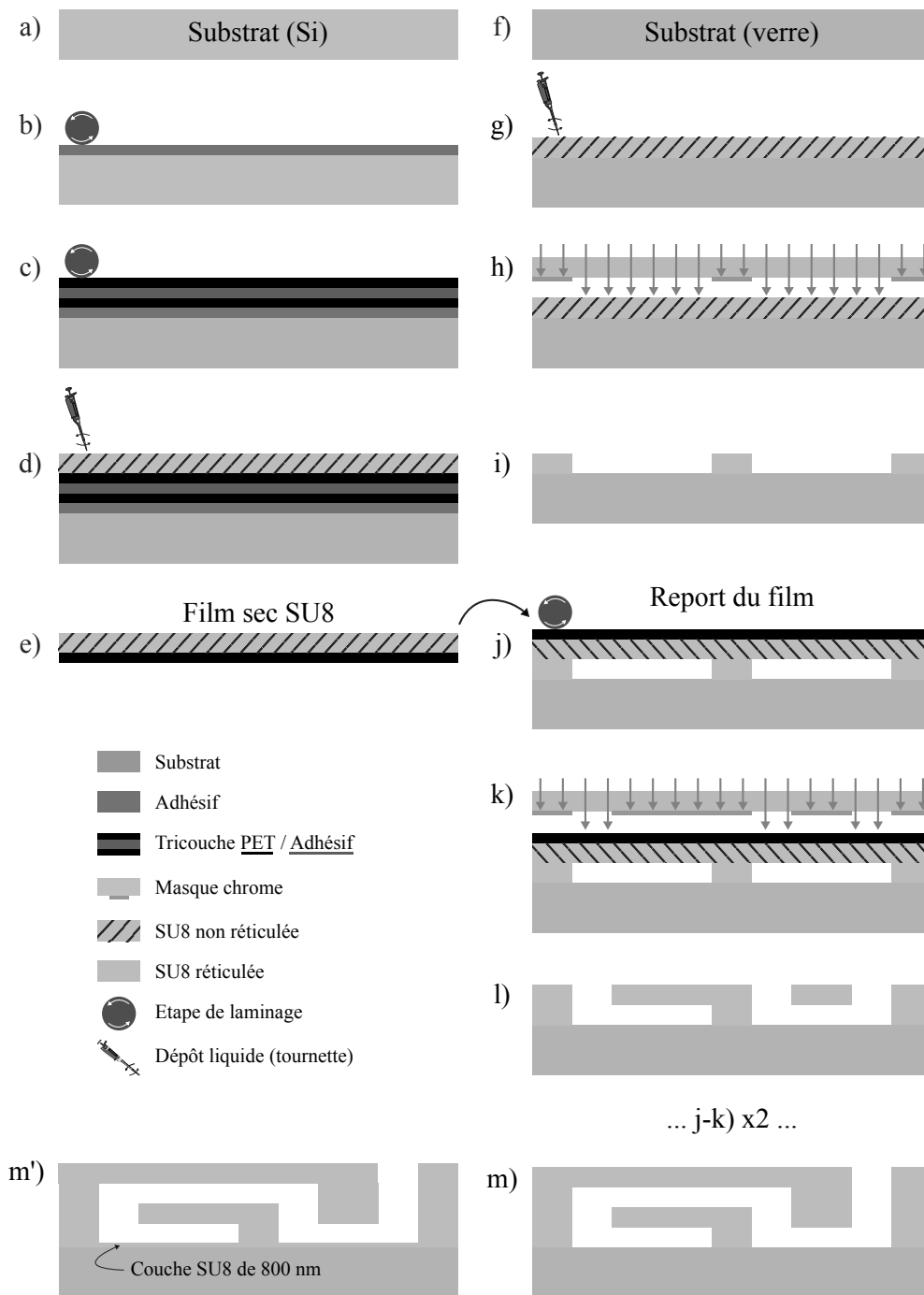


FIGURE 2.22 – Procédés de fabrication d'un film sec de SU-8 (a-e), et d'un dispositif microfluidique 3D obtenu à partir d'opérations de laminage de tels films secs (f-m). Les deux derniers schémas correspondent aux dispositifs finaux avec (m') ou sans (m) couche initiale de 800 nm. Les différentes étapes sont détaillées dans le texte (protocole).

et/ou alignés de manière satisfaisante). Une découpe transversale de dispositif type A1 et une visualisation au MEB ont été réalisées, on a ainsi pu observer la bonne position du canal latéral, du bypass et des connexions ; en revanche certains systèmes semblent présenter des canalisations bouchées ou mal développées (Fig. 2.27 f). La SU-8 possède de nombreux atouts, elle est très adaptée pour réaliser de fortes épaisseurs ( $\geq 500\mu\text{m}$ ) et obtenir des rapports d'aspect élevés ( $> 10$  dans la littérature). Cependant la volonté de développement d'un procédé plus rapide, plus robuste et à des coûts inférieure a conduit à l'utilisation de films secs commerciaux.

### 2.4.2.2 TMMF

Le TMMF est un film sec photosensible négatif (Tokyo Ohka Kogyo Co., Ltd.) dont les propriétés sont très proches de la SU-8. Il est vendu en "sandwich" : le film (résine) est compris entre deux couches de PET. Une épaisseur de  $45\mu\text{m}$  était disponible, nous avons donc réalisé des dispositifs comprenant 4 couches de ce film (4 niveaux) directement sur le substrat (verre), soit une épaisseur totale d'environ  $180\mu\text{m}$ .

Étape	Description
1	<b>Nettoyage substrat (verre)</b> - Bain $\text{H}_2\text{O}_2$ / $\text{H}_2\text{SO}_4$ (2 min). Plasma $\text{O}_2$ , 800 W, 15 min.
2	<b>Laminage TMMF <math>45\mu\text{m}</math></b> - Laminage premier niveau : $P = 3$ bar, $v = 1$ m/min, $T = 80^\circ\text{C}$ . Retrait du liner (avant insolation) et découpe.
3	<b>Photolithographie</b> - Insolation : $\lambda = 365\text{nm}$ , dose = $200\text{mJ cm}^{-2}$ . PEB : $90^\circ\text{C}$ , 5 min. Développement : PGMEA, 6 min.
4	<b>Laminage TMMF <math>45\mu\text{m}</math></b> - Laminage niveau supérieur : $P = 2$ bar, $v = 1$ m/min, $T = 60^\circ\text{C}$ . Retrait et découpe liner.
5	<b>Photolithographie</b> - Insolation : $\lambda = 365\text{nm}$ , dose = $200\text{mJ cm}^{-2}$ . PEB : $90^\circ\text{C}$ , 7 min. Développement : PGMEA, 3 + 3 min.
...9	<b>Répétition (<math>\times 2</math>) des étapes 4 et 5</b> - PEB à 10 min, et temps de développement de 3 + 3 + 3 min, puis 6 + 6 min pour le dernier niveau.

La première chose que l'on peut remarquer est que l'adhérence entre les différentes couches du film sec, lors du laminage, est telle qu'aucun traitement de surface (Plasma, Ozone...) n'est nécessaire pour le procédé. Le temps de fabrication du film est bien sûr "économisé", par ailleurs les étapes de PEB ne nécessitent pas de rampe de température. Une autre différence est le retrait du film de protection (liner) juste après le laminage (et non plus après le PEB), ce qui permet une meilleure proximité entre masque et résine lors des alignements et de l'insolation. En revanche la formation de bouchons de résines dans les canaux a été récurrente avec ce matériau (voir partie sur les limitations du laminage 2.4.3). Après fabrication de 3 wafers, le TMMF n'a pas été retenu pour le procédé, d'autres films aux propriétés similaires et meilleur marché étant disponibles.

### 2.4.2.3 DF

L'évaluation des performances d'un panel de résines et films secs photosensibles, réalisée par Rémi Courson lors de ses recherches au LAAS, a permis d'identifier un film sec de la société Engineered Material Systems, Inc. (EMS) aux propriétés intéressantes. Le film (nommé DF pour dry film) est décliné en 3 séries selon les critères de taille, de résolution et d'hydrophobicité. Il est basé sur une résine négative (epoxy, comme la SU-8), est disponible en différentes épaisseurs (5 à 50  $\mu\text{m}$ ), et présente un avantage économique non négligeable puisque le prix est d'environ 1/14<sup>ième</sup> celui de la SU-8.

Une particularité de ce film est sa coloration (absorbe dans le visible), orange ou verte selon les séries. Un test pour caractériser l'autofluorescence, en comparaison avec un film de SU-8 et du PDMS, dans des longueurs d'onde correspondant aux excitations/émissions de la fluorescéine, a montré une autofluorescence légèrement supérieure à celle de la SU-8 (et bien supérieure à celle du PDMS...) [10]. Lors des expériences avec visualisation en fluorescence, l'utilisation de fluorescéine, de billes fluorescentes, et de marquage cellulaire (Hoechst) ont été validées avec ce film sec, mais il faut garder à l'esprit que des signaux de fluorescence très faibles peuvent être problématiques, notamment pour des  $\lambda_{ex} \approx 480 \text{ nm}$ .

Le procédé de fabrication utilisant les films DF est détaillé dans le tableau 2.3 et schématisé Fig. 2.23. Les puces sont réalisées sur substrat de verre, avec un "sol" (premier niveau pleine plaque) d'une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$ , sur lequel sont laminés et structurés 4 niveaux de 20  $\mu\text{m}$ .

Lors des premiers tests, il est arrivé qu'en fin de procédé, après un recuit final (hard bake) ou étape de découpe, les puces microfluidiques se délaminent du substrat de verre, trahissant un problème d'adhérence de la première couche. Le fait de réaliser un sol (couche sur toute la surface) permet de garder un dispositif fonctionnel (les canalisations sont fermées). Mais la caractérisation, et notamment la mise en pression des puces n'est pas identique sous la forme d'un dispositif souple. L'ajout d'un traitement de surface (autre qu'un nettoyage / traitement au plasma  $\text{O}_2$ ) était une solution possible. Le MCC Primer 80/20 (MicroChem) est composé de 20% HMDS, qui permet d'améliorer l'adhérence des résines photosensibles sur différentes surface, et de 80% de Pm Acetate (acétate de phényl mercure), qui est un agent mouillant et retarde l'évaporation. L'utilisation du MCC Primer (formation d'une "couche d'accroche") a permis de réduire nettement le phénomène de délaminage.

Toujours en ce qui concerne l'adhésion du film sec, mais entre les couches elles mêmes cette fois ci, une activation de la surface est nécessaire (Plasma  $\text{O}_2$  ou Ozonateur). Le DF est donc plus similaire à la SU-8 que le TMMF sur ce point.

Le liner (film PET) de protection doit être enlevé juste après le laminage, avant l'insolation. Pour des couches de 5  $\mu\text{m}$ , le retrait du film de protection peut être délicat (la résine peut rester sur le film au lieu d'adhérer sur le wafer), mais après une activation de la surface (Plasma) ou dépôt d'une couche d'accroche sur le substrat, cette limite est résolue.

Les dispositifs obtenus avec les films DF (voir les résultats, Fig. 2.27) respectent les dimensions des géométries souhaitées, et leurs fonctions ont put être testées de manière satisfaisante.

## 2.4. Microfabrication de dispositifs 3D

Étape	Schéma	Description
1	-	<b>Nettoyage substrat (verre)</b> - Bain H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 min). Plasma O <sub>2</sub> , 800 W, 15 min.
2	a)	<b>Traitement de surface</b> - Dépôt MCC Primer 80/20 : $v_{rot} = 3200$ rpm, 30 s. Recuit : 105 °C, 1 min.
3	b)	<b>Laminage DF 5 µm</b> - Laminage premier niveau : P = 2.5 bar, v = 0.5 m/min, T = 100 °C. Découpe et retrait du liner (avant insolation).
4	-	<b>Photolithographie</b> - Insolation : $\lambda = 365$ nm, dose = 200 mJ cm <sup>-2</sup> . PEB : 105 °C, 5 min. Pas de développement (pleine plaque).
5	c)	<b>Laminage DF 20 µm</b> - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Laminage niveau supérieur : P = 2 bar, v = 1 m/min, T = 65 °C. Découpe et retrait du liner.
6	d)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : $\lambda = 365$ nm, dose = 250 mJ cm <sup>-2</sup> .
	e)	PEB (rampe) : 100 °C, 5 min. Développement : cyclohexanone, 2 + 2 min.
7	f)	<b>Laminage DF 20 µm</b> - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Laminage niveau supérieur : P = 2 bar, v = 1 m/min, T = 65 °C. Découpe et retrait du liner.
8	g)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : $\lambda = 365$ nm, dose = 250 mJ cm <sup>-2</sup> .
	h)	PEB (rampe) : 100 °C, 6 min. Développement : cyclohexanone, 3 + 3 min.
...12	-	<b>Répétition (×2) des étapes 7 et 8</b> - PEB à 7 min, et temps de développement jusque 3 + 3 + 3 min (selon la qualité de la révélation).
(13)	i)	<b>Hard bake</b> - Recuit final (rampe) : 125 °C, 2 min.

TABLEAU 2.3 – Protocole pour la réalisation de dispositifs microfluidiques (DF). Les lettres (a-i) se réfèrent à la Fig. 2.23.

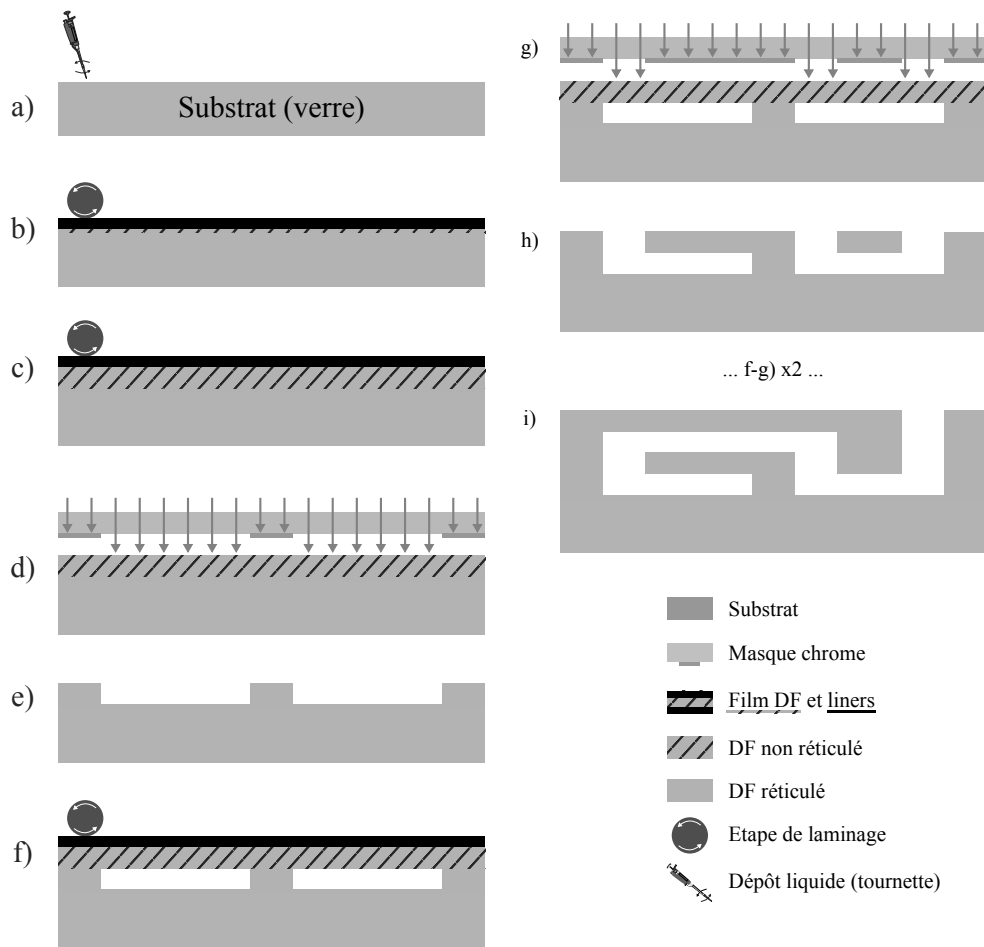


FIGURE 2.23 – Procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique 3D obtenu à partir d'opérations de laminage et photolithographie de films secs photosensibles DF. Cette géométrie comprend une couche de  $5\mu\text{m}$  et 4 couches de  $20$  ou  $50\mu\text{m}$ . Les différentes étapes sont détaillées dans le texte (protocole).

### 2.4.3 Structures multi-niveaux : limitations spécifiques et solutions

#### 2.4.3.1 Laminage

L'étape de laminage fait intervenir plusieurs paramètres : les conditions de la machine (température des rouleaux, vitesse de rotation, et pression appliquée entre les rouleaux), mais également la topologie de la couche support (profondeur, écartement des murs, angles...). L'optimisation des paramètres pour le laminage de la SU-8 avait été réalisée lors de précédents travaux au LAAS. Pour l'utilisation de film DF, ces paramètres ont été légèrement ajustés (notamment pour le laminage du premier niveau, sur le substrat). Concernant les "règles de construction", il est observé que pour des couches de 20  $\mu\text{m}$ , le capotage d'un canal d'une largeur > 300  $\mu\text{m}$  aboutira à un effondrement du capot dans le canal lors du laminage.

Pour les trois résines différentes, un phénomène de bouchage de canalisation est observé régulièrement (voir détails et Fig. 2.26). Pour la SU-8, la résine non insolée (et moins réticulée) reste la plupart du temps collée au liner en PET, ainsi le retrait du liner enlève également la résine et facilite le développement. Malgré cet aspect positif, il est possible qu'une partie de la résine non insolée coule ou soit aspirée dans les canalisations pendant le PEB, ce qui peut être problématique par la suite et créer des "bouchons" ne partant pas au développement. Ce phénomène a été décrit dans des précédents travaux au laboratoire (Abgrall, Cargou...). Les films de TMMF utilisés ont une épaisseur de 45  $\mu\text{m}$ , ce qui amplifie le phénomène en comparaison à de plus faibles épaisseurs (20-25  $\mu\text{m}$ ). Pour les films en DF ces effets sont moins fréquents et prononcés que pour la SU-8 ou le TMMF.

Les bouchons observés sont systématiquement situés à proximité des ouvertures. Les entrées / sorties pour les connexions fluidiques étant des cercles d'environ 1 mm de diamètre, les films ont tendance à tomber au fond des motifs lors du laminage. Ce n'est pas visible après développement (car la résine est dissoute), mais pourrait amplifier le phénomène d'obstruction des canalisations observé.

Une solution simple est le placement de structures de support (piliers ou autres formes), organisées de telle manière que les espaces "vides" soient distants de moins de 300  $\mu\text{m}$ , comme le montre la Fig. 2.24. Des structures en piliers ont été réalisées, ainsi que des formes de "roue". Le support est ainsi réalisé, sans toutefois former de filtres : les cellules ou billes d'une taille proche de celle de la canalisation ne sont pas bloquées.

#### 2.4.3.2 PEB : une étape critique

Le gonflement des canalisations (forme de "voute" pour la partie haute des canaux - ou de tout espace ouvert, de manière générale) a été observé avec tous les types de film sec. Cette déformation peut avoir plusieurs origines. On peut en premier lieu supposer que les contraintes mécaniques résiduelles provoquent ces effets. La solution classique est d'appliquer des rampes de températures (aussi bien en montée qu'en descente) afin que les couches de résine ne retiennent qu'un minimum de contraintes.

Cette déformation peut également être due à la dilatation de gaz emprisonné dans les struc-

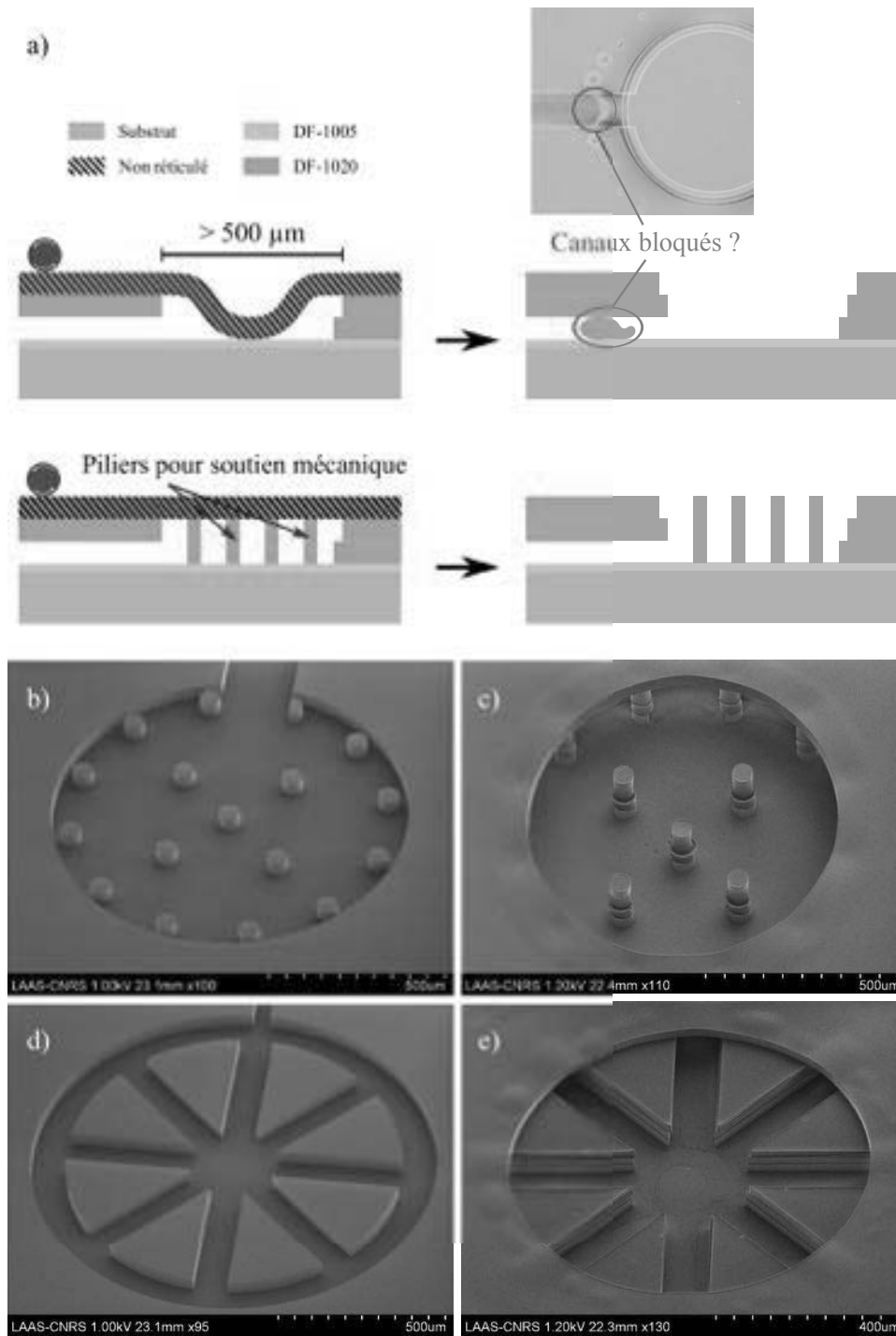


FIGURE 2.24 – Limite du procédé de laminage pour les grandes ouvertures. a) Schéma de l'effondrement d'un capot lors du laminage (facilite potentiellement la formation de bouchons), et solution de support mécanique proposée. b-c) Images MEB de piliers de soutien mécanique pour le laminage avant et après ajout d'un capot (formation d'une ouverture). d-e) Images MEB d'un autre type de structure de soutien.

tures lors du laminage d'une nouvelle couche, pendant le recuit après insolation (PEB). La Fig. 2.25 schématise le mécanisme, et montre les déformations observées (après développement) pour des structures différentes. On notera les différences de déformation selon la variation du volume de gaz piégé et la surface de la dernière couche laminée en contact avec les ouvertures des étages inférieurs.

En appliquant très simplement la loi des gaz parfaits (le gaz emprisonné est de l'air),  $PV = nRT$ , on sait qu'en augmentant la température lors du PEB, on dilate et on comprime le gaz. Le côté du wafer en contact avec la plaque chauffante est le substrat, on peut supposer que l'air contenu dans les structures est mis à température en même temps (sinon avant) que la dernière couche ajoutée. Cette couche n'est pas encore réticulée, ainsi si la température est trop importante, une déformation importante sera observée.

En appliquant une rampe de température, on commence à faire réticuler la dernière couche alors que le gaz est moins dilaté/sous pression.

Quel que soit le film utilisé, l'obstruction de canaux microfluidiques par de la résine a été observée et a soulevé de nombreux questionnements. Si l'élévation de température lors du PEB rend la résine non insolée moins visqueuse, et que celle-ci "tombe" (s'étale) sur le dispositif par gravité, quel effet lui permet de rentrer à l'intérieur des canaux (comme on peut le voir Fig. 2.26 e-f) ? Une hypothèse est que lors du PEB, l'ensemble du système / des canaux sont mis en température. Une légère déformation de l'ensemble (résine non encore réticulée) est envisageable. Lorsque la température est maximale, la pression / le volume le sont également, on peut imaginer que les parties non réticulées (non insolées, comme les ouvertures) sont fortement déformées (b). Lors de la descente en température,  $PV$  décroît également, aussi il faut compenser éventuellement le gain en volume provoqué par la réticulation de la résine après une légère déformation. La résine non réticulée peut encore se déformer, et est aspirée par la diminution de pression à l'intérieur du canal. Les forces capillaires entrent probablement en jeu également.

Une solution qui permettrait de s'affranchir de ces deux limitations serait de réaliser un PEB en plaçant le wafer à l'envers (la résine non réticulée coulerait "en dehors" du wafer par gravité). La première étape serait de trouver un support (substrat) qui ne soit pas suffisamment adhérent à la dernière couche laminée pour pouvoir retirer ce support après l'étape de PEB, sinon cette méthode impliquerait l'utilisation d'équipement non standard.

Enfin de nombreux systèmes dans la littérature présentent des géométries d'entrée / sortie fluidiques en forme de "goutte", avec une pente progressive. Une modification du design (afin de diminuer les forces capillaires par exemple) semblent une solution simple à mettre en œuvre.

### 2.4.3.3 Conclusion

En récapitulatif, la Fig. 2.27 est proposée pour présenter les différents résultats obtenus en terme de microfabrication employant le laminage de films secs. L'utilisation de la SU-8 a



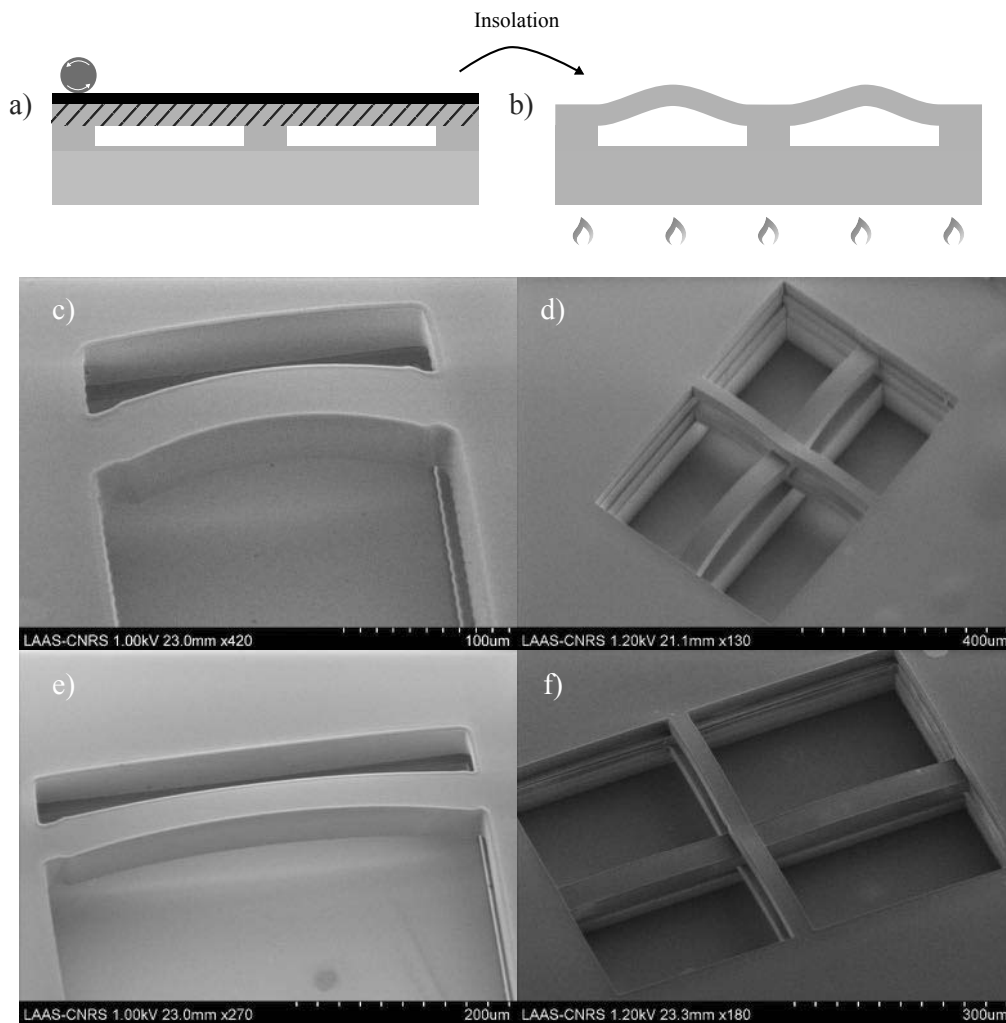


FIGURE 2.25 – Déformation d’espaces fermés lors de l’étape de PEB. a) Laminage d’un capot de film sec, suivi d’étapes de photolithographies et de b) PEB : mise en température, dilatation et mise en pression du gaz (air) emprisonné. c-e) Soulèvement de poutres de longueurs différentes pour le même ratio  $S_{\text{contact}}/V_{\text{emprisonné}}$ . d-f) Soulèvement de poutres entrecroisées pour une même surface de contact mais des volumes de gaz emprisonné différents (supérieur dans d).

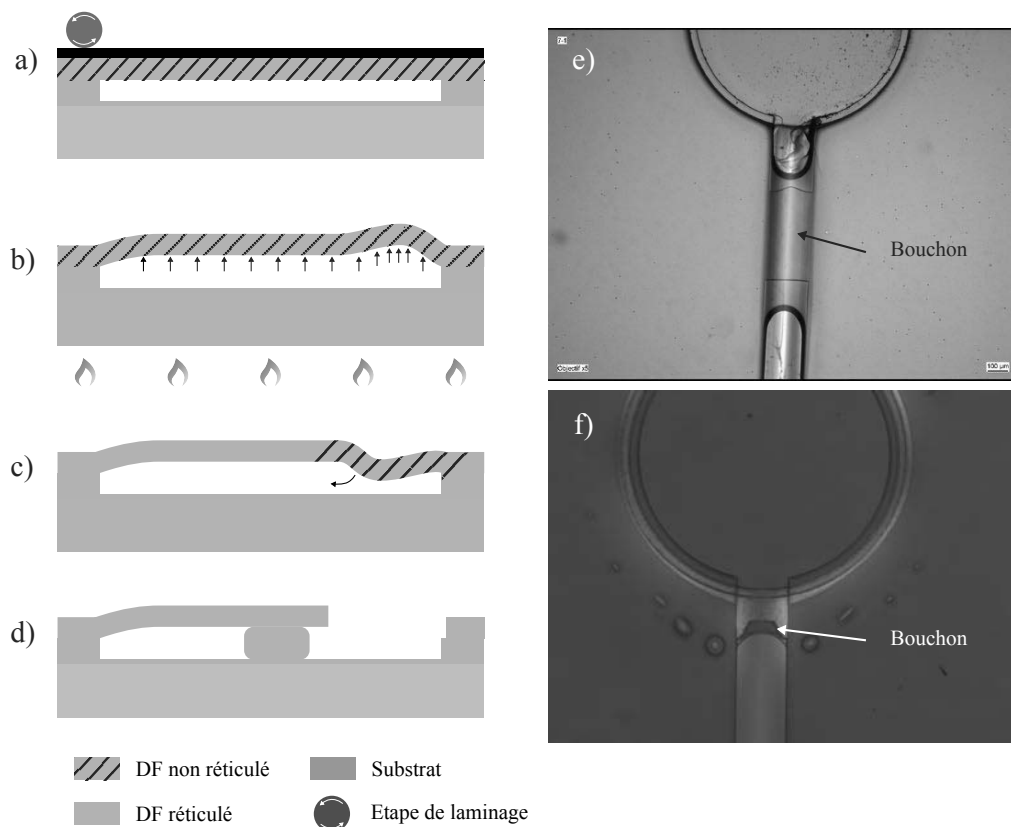


FIGURE 2.26 – Phénomène de déplacement de résine formant des bouchons dans les canalisations. a-d) Mécanisme hypothétique de formation des bouchons, dûs à la coulée et l’aspiration de résine non insolée et non réticulée au moment du PEB. e) Exemple de bouchon (niveau 2, TMMF 45 μm). f) Autre exemple, niveau 3, film DF (20 μm).

permis d'obtenir des dispositifs fonctionnels, mais n'a pas donné la même satisfaction que les autres matériaux (procédé long, coûteux, moindre efficacité). Les films TMMF n'ont permis de réaliser aucun dispositif fonctionnel, la limitation principale étant l'obstruction des entrées / sorties des puces. L'essentiel de la Fig. 2.27 montre ainsi des dispositifs réalisés avec les films DF : dispositifs de mélange, de tri, et illustrations de structures plus complexes (ou moins conventionnelles...).

La photolithographie associée aux méthodes de laminage de films secs forme une technique de fabrication multicouches puissante, adaptée à la réalisation de dispositifs microfluidiques 3D. L'utilisation de films DF a montré une réduction à la fois en temps et en coûts de procédé, comparé au gold standard de la SU-8 (qui garde bien entendu sa grande utilité de résine liquide, notamment pour les forts rapports d'aspect et épaisseurs, ainsi que pour ses propriétés planarisantes). Des tests de biocompatibilité du DF ont révélé que ce film est également utilisable pour des études à caractère biologique (cellulaire, bactériologique...). La partie fabrication pour les actionneurs magnétiques (3.4) montre qu'il est possible de laminer des couches de DF sur d'autres résines (SU-8), ce qui confirme la bonne compatibilité et intégration de ce procédé avec les techniques standards de microfabrication.

## 2.5 Mise en œuvre des dispositifs et instrumentation associée

Les précédentes parties et exposés des résultats font appel à des équipements et procédures expérimentales qui n'ont jusque là pas été détaillés. Les montages optiques, microfluidiques ainsi que les stratégies de marquage seront abordés dans cette section.

### 2.5.1 Visualisation - Microscopie de fluorescence

Les techniques de visualisation optique utilisées pour les tests microfluidiques nécessitent le plus souvent la distinction entre deux "couleurs" de fluorescence, pour deux types de marqueurs (particules, fluorophores...). Une solution est l'utilisation séquentielle de deux cubes (ensemble filtre d'excitation / filtre d'émission / miroir dichroïque), chacun adapté à un fluorophore. Cela ne permet pas l'acquisition d'images des deux marqueurs de manière simultanée. La fréquence d'intervention de cubes est de l'ordre de la demi-seconde. Cette fréquence peut être augmentée avec l'utilisation d'une roue à filtres, dispositif particulier permettant la rotation de filtres (et non cubes) en un temps proche de 50 ms.

Une autre alternative est la mise en place d'un système de microscopie à fluorescence multicolore. Ce qui change fondamentalement est le cube utilisé, où chaque filtre (excitation / émission) et miroir dichroïque permet le passage ou la séparation de plusieurs longueurs d'ondes, choisies en fonction des fluorophores à observer. Afin de pouvoir visualiser ces différentes longueurs d'onde d'émission avec une caméra sensible (en "noir et blanc"), un diviseur de faisceau (miroir dichroïque et plusieurs miroirs combinés) est placé en amont du capteur. Ce système rend possible la visualisation simultanée de plusieurs fluorophores.

La Fig. 2.28 représente le montage mis en place pour les expériences réalisées avec les systèmes

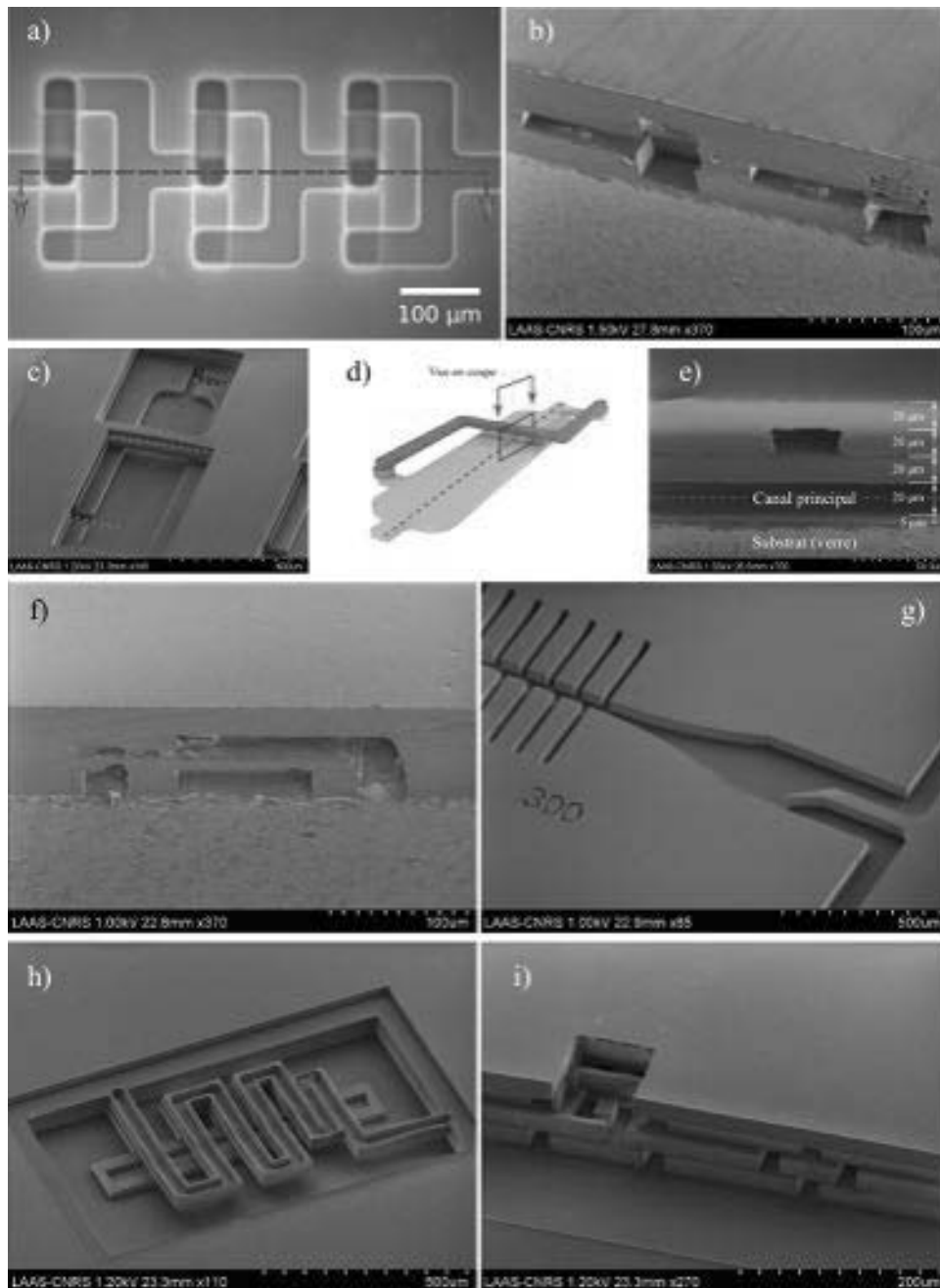


FIGURE 2.27 – Résultats principaux de microfabrication. a-b) Micro-mélangeurs (transformée du boulanger), vue de dessus (microscope optique, a) et vue en coupe au MEB (b), la ligne en pointillés rouge en a) indique le plan de coupe, les flèches sur b) le sens de l'écoulement du fluide. c-e) Dispositif bypass de type C (réalisé en film DF) : c) vue MEB illustrative pour la visualisation du dispositif (canal principal / bypass) ; d) Schéma reprenant la vue de c) et précisant le plan de coupe pour e) ; e) vue en coupe (MEB) du bypass traversant perpendiculairement le canal principal, les différentes épaisseurs de film sont visibles. f) Vue en coupe (MEB) d'un dispositif bypass type A1 réalisé en SU-8. g) Premier niveau d'un dispositif bypass type B, avec 300 motifs et 2 sorties. h-i) Illustrations de ce qui peut être obtenu en multicouche par technique de laminage : deux canaux superposés (h), et de multiples ouvertures / connexions fluidiques (i).

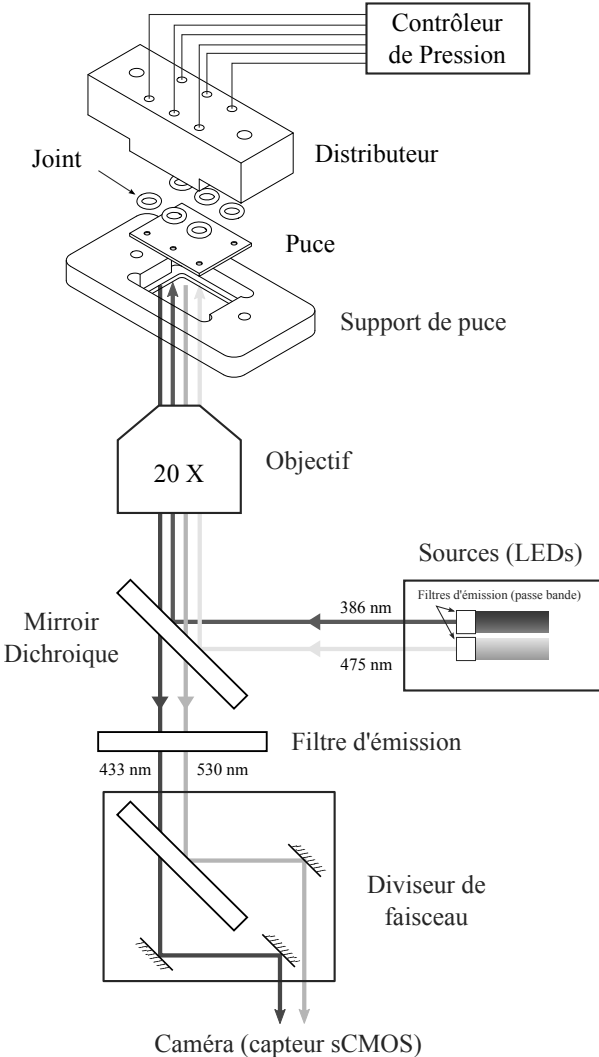


FIGURE 2.28 – Dispositif expérimental pour la microscopie de fluorescence 2 couleurs simultanées.

bypass (observation de billes vertes et bleues, ou de billes vertes et de cellules marquées à l'Hoechst - couleur bleu -). Un microscope inversé est utilisé : la puce, le support et les arrivées fluidiques sont situées au-dessus de l'objectif. Le séparateur de faisceau employé est "l'OptoSplit II LS Image Splitter" (CAIRN Research), combiné avec des caméras Andor (EmCCD et sCMOS). Les résultats obtenus avec ce système sont présentés Fig. 2.20 d-e).

### 2.5.2 Marquage de cellules

Des particules fluorescentes et des monocytes ont été utilisés dans la plupart des expériences décrites dans ce manuscrit. Certaines expériences de mélange concernaient le marquage de monocytes par des microparticules magnétiques (afin de réaliser un étage "préparatif" avant un deuxième étage de séparation de ces cellules). Différentes stratégies pour le marquage ont ainsi été étudiées et vérifiées à échelle macroscopique avant leur emploi dans des dispositifs microfluidiques : la Fig. 2.29 a-e) les répertorie.

Parmi les microparticules commerciales, il est aisé d'en trouver avec une surface couverte de groupements carboxyles ou amines. L'utilisation d'EDC et de NHS conduisent au couplage avec la fonction complémentaire (amine / carboxyle) pour former une liaison peptidique. Des anticorps CD14 (Invitrogen) ont été greffés sur des billes NH<sub>2</sub> de 1 µm (Chemicell), et le marquage de monocytes a été réalisé (en tube à essai). Des taux de marquage<sup>1</sup> d'environ 75% ont été observés.

Le greffage d'anticorps sur la surface de particules par la voie EDC/NHS donne de bons résultats, cependant il est possible que l'attache d'une partie des anticorps mène à une orientation non désirable de l'anticorps (paratopes non ou peu accessibles). Pour améliorer l'orientation, et ainsi la densité "utile" de greffage, une solution est l'utilisation d'une deuxième biomolécule qui se lie à la base (fragment Fc) de l'anticorps. Des billes fonctionnalisées avec un anticorps secondaire (Chemicell, 1 µm) ou une protéine G (Invitrogen, 2.8 µm) ont été choisies pour cela. Des tests ont montré que la concentration en anticorps (CD14) utilisée influençait directement le taux de marquage, alors que la concentration initiale en billes par cellules (10 et 20 pour l'étude) n'importait pas (aux valeurs étudiées). La Fig. 2.29 g) montre les résultats obtenus avec la protéine G, et les Fig. 2.29 i) et j) présentent des monocytes marqués par des billes fonctionnalisées avec un anticorps secondaire (taux de marquage près de 100%).

Enfin des billes magnétiques commerciales sont directement disponibles pour la séparation des cellules d'intérêt (monocytes) qui présentent le marqueur CD14 en différentes proportions selon les populations. Ces billes (Invitrogen, 5 µm) ne sont pas fluorescentes, ce qui rend la caractérisation plus complexe. La Fig. 2.29 h) représente une image en microscopie optique (champ clair). Les meilleurs taux de marquage obtenus avec les monocytes THP-1 sont proches de 60%.

---

1. Le taux de marquage est ici confondu avec le "taux de séparation". Il s'agit du rapport de concentration en billes avant et après séparation magnétique, réalisée avec un aimant permanent puissant, sur paillasse (DynaMag, Invitrogen).

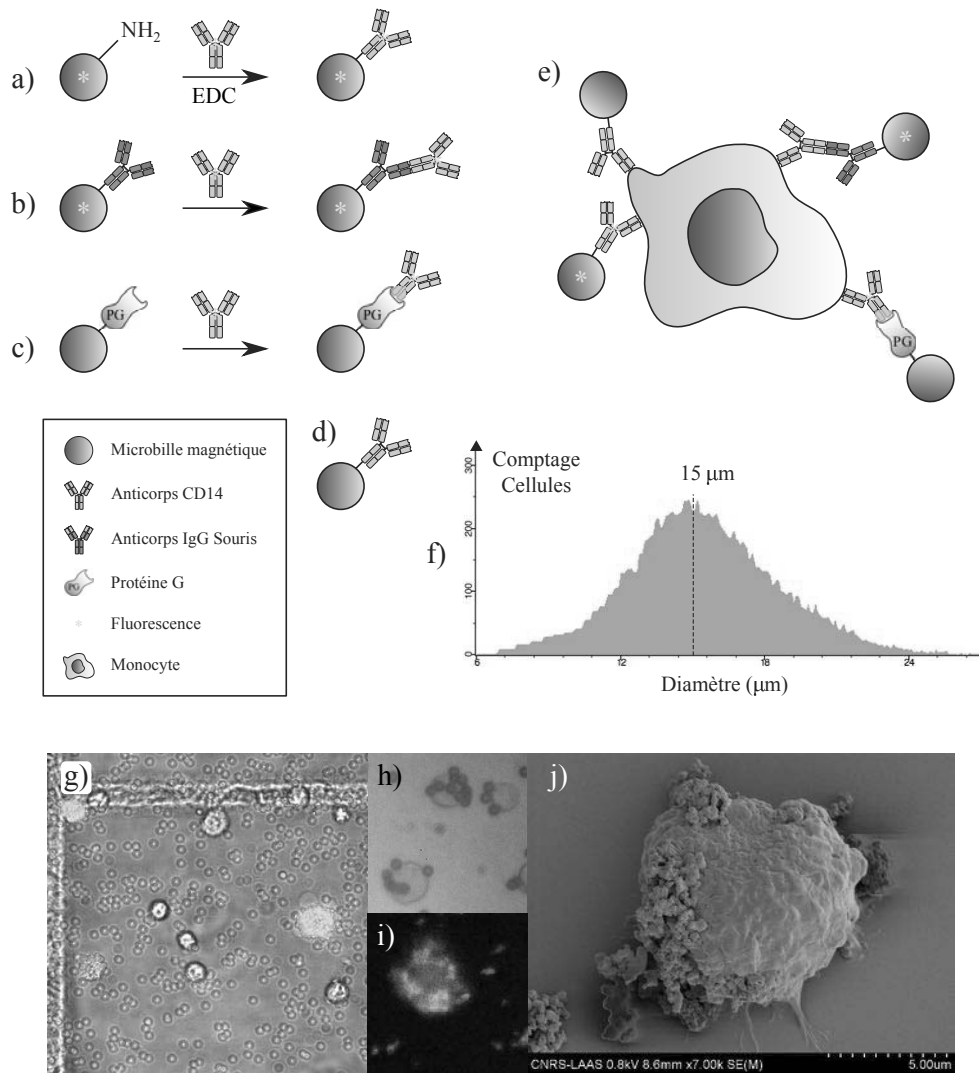


FIGURE 2.29 – Techniques de fonctionnalisation de microparticules magnétiques et marquage de monocytes. a) Greffage d'anticorps sur une particule fonctionnalisée amine. b) Utilisation d'un anticorps secondaire. c) Ajout d'anticorps sur bille fonctionnalisée avec des protéines G. d) Particule commerciale déjà fonctionnalisée CD14. e) Monocyte dont le noyau est marqué en fluorescence (Hoechst 33342) et billes s'attachant aux récepteurs de surface. f) Distribution en taille d'une population de monocytes THP-1. g) Marquage de monocytes par des billes protéine G - CD14 (c). h) Marquage par des billes CD14 (d). i-j) Images de fluorescence et MEB de monocyte marqué par des billes CD14 avec anticorps secondaire (b).

### 2.5.3 Microfluidique

#### 2.5.3.1 Connexion des puces

La structure de puces microfluidiques qui a été la plus utilisée durant ces travaux est indiquée Fig. 2.7, il s'agit d'une puce de  $15 \times 20 \text{ mm}^2$ , avec 6 entrée / sorties. La question de la connexion du système microfluidique à des équipements extérieurs (contrôleur de pression, pousse seringue, tubes à essai. . .) n'est pas sans importance pour la plupart des expériences de ce domaine.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la connexion de puces à des capillaires (diamètre externe de  $1/16$  " le plus souvent). La première a été mise en place au LAAS depuis plusieurs années, elle consiste en la fabrication de plots de PDMS qui maintiennent le capillaire en face d'une entrée/sortie fluidique, par compression (voir Fig. 2.30 a). Les plots sont obtenus par moulage (moule en aluminium) puis cuisson.

La partie délicate est le collage des plots sur la puce : ils sont d'abord nettoyés (bain d'isopropanol et ultrasons), puis les surfaces des plots et des puces (ou du wafer) d'intérêt sont traitées au plasma  $\text{O}_2$  (200 W, 30 s). Une colle photosensible est alors apposée sur la base des plots, puis ces derniers sont centrés sur les ouvertures. L'ensemble est insolé (UV) puis recuit sur plaque chauffante (5 min à  $90^\circ\text{C}$ ).

Le collage des plots est délicat, la colle (liquide) pouvant facilement boucher des ouvertures en cas de mouvement ou de mauvais positionnement. Cette méthode est limitée également par la pression applicable en entrée de puce microfluidique. A partir de 1 bar, des fuites entre le plot et le capillaire sont souvent constatées. Au delà de 2.5 bar, le capillaire n'est plus maintenu et s'éjecte du plot. Lors du remplissage des puces, il est pratique de pouvoir travailler à des pressions de cet ordre pour dissoudre le gaz piégé dans les dispositifs 3D. Enfin ces plots sont particulièrement utiles pour les branchements rapides, mais peuvent être fragiles, les volumes morts ne sont pas connus, et l'intégration (visualisation) n'est pas facilitée.

Pour éviter les phases de fabrication et de collage de plots, et travailler avec des connexions plus robustes, des supports de puce ont été conçus. Il s'agit d'un distributeur en matériau polymère (Teflon, Delrin noir, PEAK), sous lequel sont placés des joints toriques (EPDM) qui assurent l'étanchéité avec la puce. Le distributeur est maintenu en compression par une base en aluminium (située sous la puce) et des vis, voir Fig. 2.28 et 2.30 b-c). Des pressions supérieures à 10 bar peuvent être appliquées avec ce type de support (les puces 3D utilisées ne supportent en général pas plus de 3 -4 bar de pression. Enfin, en plus de pouvoir être connecté à des capillaires, les distributeurs peuvent également faire office de réservoir mis en pression.

Un premier design de support utilise des joints toriques de 1 mm de diamètre de tore et 5 mm de diamètre de joint. Une deuxième version, plus compacte et présentant moins de volumes morts a été mise en place avec des joints toriques de 0.8 mm de diamètre de tore et de joint.



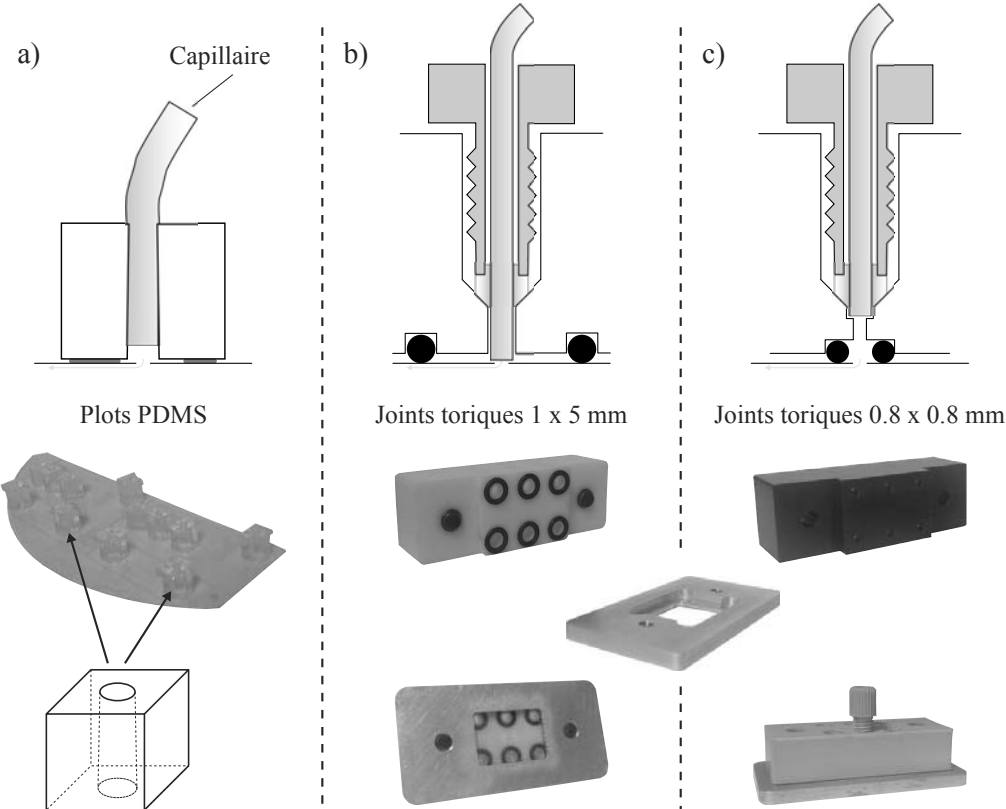


FIGURE 2.30 – Connectiques utilisées pour l’interface fluide des puces. a) Plots en PDMS. b) Premier design de support de puce. c) Deuxième design de support de puce.

### 2.5.3.2 Remplissage

Après microfabrication, les canaux dans les puces microfluidiques sont remplis d'air. L'étape de remplissage consiste en l'évacuation de cet air et son remplacement par un liquide (eau, éthanol, solution pour réaliser un traitement de surface des canalisations). Il est possible, pour des designs en 2D, de contenir des ramifications qui conduisent à l'isolation de bulles d'air. Il en va de même pour les designs 3D conçus lors de ces travaux, qu'il s'agisse des mélangeurs ou de trieurs à bifurcation (bypass). Le temps de dissolution représente un délai pour le début d'expériences, mais est aussi un inconvénient pour les possibilités d'intégration et automatisations.

Afin de mieux évaluer ce temps de dissolution et de remplissage, un modèle simple est posé. Il est basé sur les designs de type "bypass" soumis à un écoulement (remplissage), et plus particulièrement en considérant une analogie divisant la canalisation du bypass en deux parties, où du gaz est présent entre un "mur" (en réalité connecté à l'autre côté du bypass) et une interface gaz / liquide (ménisque), comme le schématise la Fig. 2.31 a).

#### Hypothèses

- Les ponts, lorsqu'ils sont remplis de gaz et vont être imbibés d'eau, sont assimilables à deux impasses positionnées en vis à vis dont la longueur est celle de la moitié du pont.
- Pour les calculs de volume de gaz, la courbure du ménisque gaz/liquide est négligée, on prendra la section de la canalisation.
- Le débit de liquide (eau) dans la canalisation principale est suffisamment grand de sorte que les conditions aux limites pour la concentration en gaz dissous en entrée de pont est la même pour tous les ponts.

Le modèle cherche à établir la position d'un ménisque, qui se déplace jusqu'à atteindre le centre du bypass (il n'y a alors plus de gaz). Le flux de gaz (diffusion) dissout du ménisque vers la canalisation principale s'écrit :

$$\vec{j}_{g,l} = -D_{g,l} \vec{\nabla} c_{g,l} \quad (2.31)$$

où  $D_{g,l}$  est le coefficient de diffusion du gaz dans le liquide, et  $c_{g,l}$  la concentration en gaz dans le liquide. Afin d'obtenir un débit volumique et de faire intervenir la position du ménisque, on injecte l'équation des gaz parfaits, et on obtient l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dX(t)}{dt} + \frac{1}{X(t)} D_{g,l} \Delta c_{g,l} \frac{RT}{P_g} = 0 \quad (2.32)$$

où  $X(t)$  est la position du ménisque en fonction du temps,  $\Delta c_{g,l} = c_{g,i} - c_{g,e}$  la différence de concentration en gaz dans le liquide à l'interface et à l'entrée (concentration limite), et  $P_g$  la pression en gaz dans la bulle (située dans le bypass). La solution est de la forme :

$$X(t) = \sqrt{2 D_{g,l} \Delta c_{g,l} \frac{RT}{P_g} \times t}. \quad (2.33)$$

Par ailleurs, la loi de Henry pour connaître la concentration en gaz dissout<sup>1</sup>  $c_{g,l} = k_H p_g$ , ainsi que la loi de Laplace exprimant la différence de pression de part et d'autre de l'interface  $P_{g,i} - P_{l,i} = \gamma_{l,g} \left( \frac{2}{h} + \frac{2}{w} \right)$  permettent de faire intervenir la constante de Henry et la tension de surface directement dans l'équation :

$$X(t) = \sqrt{2 D_{g,l} k_H RT \left( 1 - \frac{x_g P_{inj}}{P_{l,h} - \gamma_{l,g} \left( \frac{2}{h} + \frac{2}{w} \right)} \right)} \times t \quad (2.34)$$

avec  $x_g P_{inj}$  la pression partielle du gaz à l'interface gaz/liquide au niveau de (ou avant) l'injection. En établissant cette expression, on se rend compte que le temps de remplissage dépend :

- du gaz utilisé ( $D_{g,l}$ ,  $k_H$ ,  $\gamma_{l,g}$ , et éventuellement composition du gaz en contact avec le liquide à/avant l'injection),
- du liquide utilisé ( $D_{g,l}$ ,  $\gamma_{l,g}$ ),
- de la pression du liquide dans la puce (canal principal par exemple),
- du mode d'injection de liquide : avec un pousse-seringue et une seringue remplie en conditions atmosphériques,  $x_g P_{inj}$  devient alors  $x_{g,atm} P_{atm}$ , alors qu'un contrôleur en pression utilisant un gaz modifiera la concentration en gaz dissout (en faisant l'hypothèse d'un état à l'équilibre où la diffusion du gaz dans le réservoir sera terminée).

L'utilisation de  $CO_2$ , dont la constante de solubilité est bien plus importante que l'azote ou l'air, permettrait de minimiser le temps de remplissage. Le calcul suivant compare le remplissage par de l'eau d'une puce pré remplie au  $CO_2$  ou au  $N_2$ .

Coefficients de diffusion [192] :

$$D_{N_2, eau} = 1.88 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$D_{CO_2, eau} = 1.92 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}.$$

Tension de surface :

$$\gamma_{eau/air} = 72.8 \text{ mN m}^{-1}.$$

La tension de surface eau/air est voisine de celles de eau/ $N_2$  et eau/ $CO_2$ .

Composition de l'air :

$$x_{N_2} = 0.7808$$

$$x_{CO_2} = 0.000399.$$

Constantes de Henry  $\left( k_H = \frac{c_{g,l}}{p} \right)$  [193] :

$$k_{N_2} = 6.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$$

$$k_{CO_2} = 3.4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}.$$

En appliquant le modèle et données ci-dessus à un design bypass de type B, on trouve, pour une pression relative de liquide dans la puce de 0.7 bar, en remplissant avec un pousse

1. La loi de Henry s'applique normalement pour une fraction molaire de gaz  $< 0.03$  et pour des solutions dans lesquelles le solvant ne réagit pas avec le gaz. Par exemple, le  $CO_2$  forme de l'acide carbonique avec l'eau :  $H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3$ . Le  $CO_2$  étant consommé, on va surestimer le temps de remplissage avec le modèle utilisant la loi de Henry.

## 2.5. Mise en œuvre des dispositifs et instrumentation associée

---

seringue, que les temps de remplissage sont d'environ 15 minutes pour un canal rempli de  $N_2$ , et 10 secondes pour un canal rempli de  $CO_2$ , soit un ratio supérieur à 100 à cette pression. Mais rappelons que ce modèle ne tient pas compte de la courbure du ménisque, qui modifie la surface d'échange entre gaz et liquide (considérée à  $wh$  dans le modèle) et par conséquent le temps de remplissage.

Des expériences d'imbibition avec de l'eau DI d'une puce (bypass, design de type B) pré remplie avec du  $CO_2$  et du  $N_2$  ont été menées et ont montré un temps de remplissage inférieur avec du  $CO_2$ , mais bien supérieur à 10 s. De même, pour le premier remplissage, on obtient un temps inférieur en injectant de l'éthanol pur plutôt que de l'eau DI.

C'est cette seconde solution qui aura été retenue pour l'ensemble des expériences, la mise en place de l'injection de  $CO_2$  étant plus contraignante en terme d'équipement. Lors de l'utilisation de seringues (et pousse-seringues) pour l'injection, un dispositif a été mis en place afin de pouvoir changer les solutions injectées dans une puce microfluidique sans avoir à déconnecter celle-ci, et par conséquent y faire de nouveau pénétrer de l'air. Les seringues sont exclusivement remplies d'eau, la solution à injecter dans la puce est d'abord pré-chargée dans un capillaire (boucle d'injection), puis injectée dans un second temps. Chaque circuit d'injection possède ainsi 2 vannes 4 voies permettant le remplissage des seringues, le chargement et la purge de solutions à injecter dans la puce microfluidique.

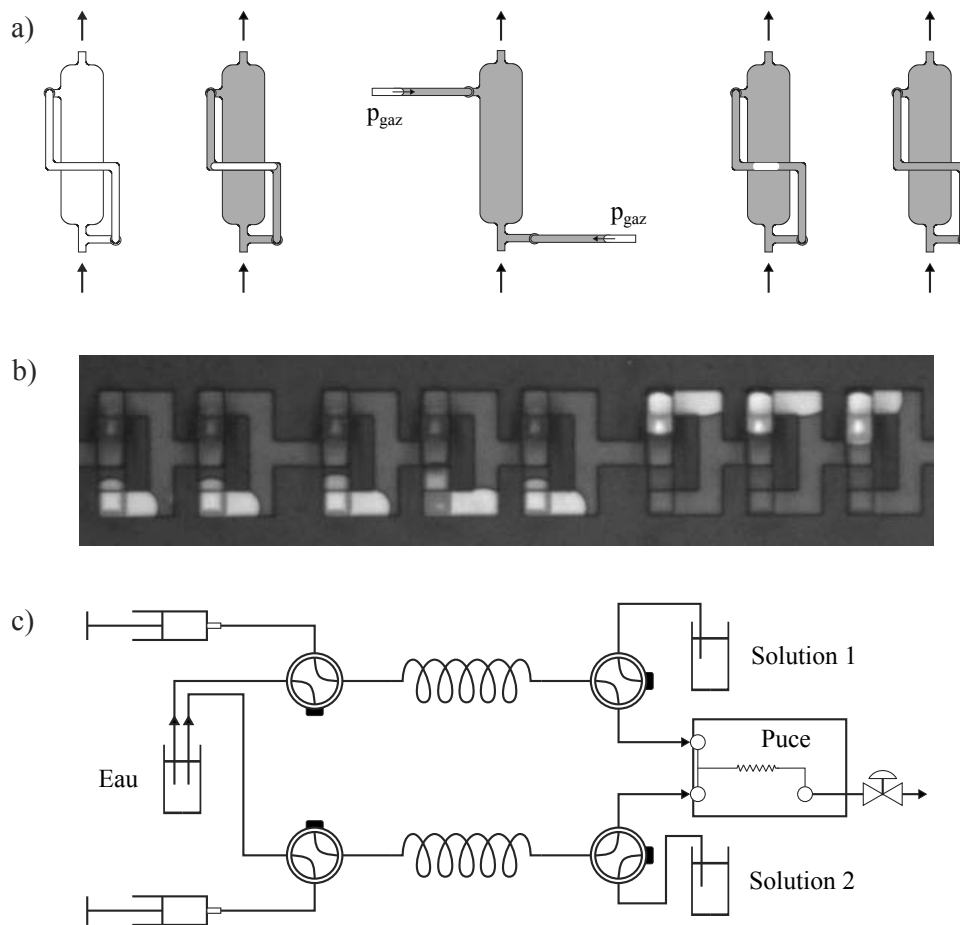


FIGURE 2.31 – Remplissage de dispositifs microfluidiques 3D. a) Dynamique de remplissage d'un dispositif bypass. Gauche : canaux remplis de gaz, formation d'une bulle. Milieu : schéma équivalent pour la dissolution de gaz. Droite : canaux remplis de liquide. b) Micro-mélangeurs en phase de remplissage/dissolution de gaz : une bulle a été formée à chaque étage. c) Dispositif expérimental d'injection de solutions pour éviter l'injection de gaz dans les dispositifs.

## 2.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la première opération à réaliser dans un laboratoire sur puce : le traitement de l'échantillon. La solution étudiée pour mettre en œuvre le tri par taille et la réaction de marquage de cellules repose sur la microfluidique 3D. Des structures originales de filtres et de réacteurs, en s'appuyant sur les avantages d'une approche 3D, ont été conceptualisées et réalisées.

Un réacteur dont le design avait déjà été décrit (application de la transformée du boulanger) a pu être fabriqué, avec une grande précision, à des dimensions jusqu'alors non décrites dans la littérature. Ces réacteurs ont permis de réaliser le mélange d'eau et de fluorescéine, ainsi que d'eau et de particules de  $500\ \mu\text{m}$ , et on a démontré que les résultats obtenus étaient en accord avec les modèles simples établis, faisant intervenir la diffusion de ces molécules ou particules. Le marquage de monocytes de culture par des billes magnétiques de  $5\ \mu\text{m}$  a pu également être observé en canalisation.

L'application de la filtration hydrodynamique à une structure en bypass a conduit à la réalisation d'un autre type de réacteur, permettant la séparation, la focalisation et la concentration de microparticules. Après avoir introduit un modèle théorique nécessaire au dimensionnement des dispositifs, le bon fonctionnement et la validité du modèle sont vérifiés à l'aide de différents systèmes. La déviation de billes et cellules a été étudiée, ainsi que les rayons de coupures, à l'aide de particules de plusieurs tailles. On notera que malgré des hypothèses très simplificatrices (trajectoire d'une particule suivant la ligne de courant du liquide passant par son centre, pas de prise en compte des forces de portance...), le modèle établi décrit bien les déviations et permet d'obtenir les bons rayons de coupure. Si deux types de particules (ou cellules) de tailles différentes sont injectées et montrent une affinité, il est possible de mettre en place une réaction de marquage. Des monocytes en présence de billes magnétiques de  $1\ \mu\text{m}$  ont ainsi pu être marqués, mais la réaction n'a pu être observée *in situ*.

Ces deux réacteurs peuvent être ainsi utilisés pour le marquage de particules, mais sont globalement dédiés à des usages différents. La transformée du boulanger est très efficace pour homogénéiser une solution et sert au mélange moléculaire comme particulaire. Les structures en bypass sont en général plus encombrantes, mais on peut d'une part contrôler plus de paramètres (diamètre de coupure) et elles donnent surtout la possibilité de trier par taille, et de concentrer des particules.

Une étude aboutissant à un modèle de filtration hydrodynamique plus précis que ce qui était proposé dans la littérature a également été portée. Les atouts de la microfluidique 3D nous ont permis d'atteindre des débits d'échantillon traités importants, ainsi le tri de particules avec un diamètre de coupure de l'ordre de  $1\ \mu\text{m}$  a été réalisé, une application simple étant la séparation de cellules du sang pour obtenir le plasma.

Nous avons détaillé le procédé de fabrication, développé autour de la lamination de films secs. Plusieurs résines ont été employées, parmi elles les films de DF ont été retenus comme les plus appropriés compte tenu de leur coût, du temps de fabrication et de l'application (microfluidique).

## Chapitre 2. La microfluidique 3D pour la préparation d'échantillons

---

De nombreux obstacles ont été rencontrés, à commencer par la microfabrication. Le blocage des canaux près des entrées/sorties des puces a été un problème récurrent, et la solution consistant à introduire des piliers (supports mécaniques) dans les zones sensibles a permis de diminuer considérablement le phénomène. La déformation des canalisations (dus aux contraintes et à l'air emprisonné) a également pu être traitée en appliquant des rampes de température pour les étapes de PEB.

La sédimentation des particules, notamment lors de l'injection dans la puce (plus que dans les microcanaux) a été un frein au contrôle des conditions expérimentales (concentrations des billes et cellules introduites). Cette limitation est toujours à l'étude. Enfin des solutions techniques ont pu être mise en place pour optimiser le remplissage des canalisations, afin d'une part de limiter le temps de remplissage, mais surtout d'éviter l'introduction de gaz dans les canaux au cours d'une expérience.

# 3

## 3 Systèmes microfluidiques et actionnement magnétique

En s'inscrivant dans une vue globale d'un système microfluidique intégré complet, ce dernier peut être décrit comme une succession d'étapes, chacun assurant une fonction distincte. Une approche classique est par exemple de considérer la continuité entre une étape de préparation de l'échantillon, son traitement, puis son analyse. Après avoir abordé les fonctions de mélange et de tri par taille de particules et de cellules (préparation de l'échantillon), ce chapitre adresse les opérations de tri et manipulation de microbilles magnétiques par des actionneurs. Ces microbilles permettent de marquer des cibles (cellules, matériel génétique...) avec une très bonne sélectivité, d'autre part l'actionnement magnétique interfère en général peu ou pas avec les éléments biologiques d'intérêt (contrairement aux champs électriques par exemple).

Dans le chapitre d'introduction (1.3.5), différentes méthodes d'actionnement magnétique ont été revues : passives, actives et systèmes hybrides. L'actionnement actif est intéressant car un contrôle transitoire et en intensité des électro-aimants est possible. Par ailleurs les dispositifs hybrides offrent également un contrôle temporel, des forces magnétiques plus grandes (champ magnétique plus intense avec les aimants permanents), et permettent la répulsion par rapport aux électro-aimants (et non uniquement l'attraction). Avec les moyens de fabrication dont dispose le LAAS, ces deux approches (systèmes actifs et hybrides) ont été associées avec des facultés d'intégration importantes et la possibilité de créer des électro-aimants miniaturisés (fils conducteurs à section carrée de  $5\ \mu\text{m}$  de côté). Des forces localisées, d'intensité et de direction variables, et avec un contrôle temporel, peuvent alors être générées.

L'étude est articulée autour de deux approches techniques principales : l'une étant basée sur des "bobines filaires" (un fil conducteur contenu dans un même plan), utilisées de manière couplée avec un aimant permanent externe pour former un système hybride ; l'autre reposant sur des bobines spirales (enroulement planaire de fil conducteur dont la connexion requiert un autre niveau de conducteur). La première partie de ce chapitre traite du calcul des champs d'induction et de force magnétiques, puis deux parties sont consacrées aux deux approches techniques mentionnées. La microfabrication des dispositifs est ensuite détaillée, suivie d'une partie articulée autour de l'intégration des puces et des montages expérimentaux.



### 3.1 Introduction

Dans ce chapitre l'intérêt se porte sur la conception d'un système pour l'actionnement magnétique de microparticules. Afin de choisir les sources de champ magnétique qu'il est judicieux d'employer, il faut en premier lieu comprendre et savoir calculer la force magnétique que l'on applique à une particule en fonction du champ. Une fois cette force connue, elle sera comparée aux autres forces s'exerçant typiquement sur une particule et les calculs de trajectoire seront abordés.

#### 3.1.1 Force magnétique

L'expression de la force magnétique appliquée à une particule a été donnée dans le chapitre d'introduction (1.3.5, eq. (1.3)), et son origine est décrite en annexe C.1. Les hypothèses admises pour établir cette équation sont rappelées ici :

- la force est appliquée sur un matériau magnétique de volume  $V$ ,
- la magnétisation et le champ magnétique sont considérés constants à l'échelle de l'objet considéré (particule).

L'expression de la force magnétique s'écrit alors :

$$\mathbf{F}_{\text{mag}} = \mu_0 V (\mathbf{M} \cdot \nabla) \mathbf{H}_i \quad (3.1)$$

Le volume considéré (particule) est noté  $V$ ,  $\mu_0$  est la perméabilité magnétique du vide,  $\mathbf{M}$  est la magnétisation, et  $\mathbf{H}_i$  est l'excitation magnétique présente avant l'introduction de la particule (indice  $i$  pour initiale).

On définit une grandeur  $\mathbf{G}$  appelée gradient du champ magnétique "efficace" [109], qui permet de comparer l'efficacité de différents systèmes (sources d'excitation magnétique) en terme d'actionnement en s'affranchissant des propriétés magnétiques ( $\chi$ ) des objets sur lesquels on souhaite appliquer une force.

$$\mathbf{G} = \mu_0 \left( \frac{\mathbf{H}_i}{H_i} \cdot \nabla \right) \mathbf{H}_i \quad (3.2)$$

$\mathbf{G}$  est exprimé en T/m, et on peut introduire une écriture simple de la force magnétique :

$$\mathbf{F}_{\text{mag}} = V M(H_i) \mathbf{G}. \quad (3.3)$$

Cette équation est particulièrement utile lorsque le champ magnétique appliqué est suffisant pour atteindre l'état de saturation de l'aimantation des particules, pour lequel on a alors  $\mathbf{F}_{\text{mag}} = V M_s \mathbf{G}$ .

La susceptibilité magnétique (volumique)  $\chi$  exprime (en physique classique) le rapport entre la magnétisation et l'excitation magnétique :  $\chi_{ij} = \frac{\partial M_i}{\partial H_j}$ . En considérant une réponse homogène, on peut écrire  $\mathbf{M} = \chi(H) \mathbf{H}$ . Plusieurs expressions sont disponibles pour la susceptibilité magnétique des matériaux superparamagnétiques (pas d'hysteresis), de provenance empirique

Type	Diamètre (µm)	CV (%)	$\rho$ (kg <sup>3</sup> m <sup>-1</sup> )	$\chi$	$M_s$ (kA m <sup>-1</sup> )
MyOne	1.05	1.9	1700	1.38	40.0
M-280	2.83	1.4	1400	0.76	15.1
M-450	4.40	1.2	1600	1.63	31.4

TABEAU 3.1 – Propriétés physiques des particules les plus utilisées lors des expériences. Les valeurs pour les microbilles provenant de chez Invitrogen (MyOne, M-280 et M-450) sont tirées des travaux de caractérisation de G. Fonnum *et al.* [194].

(Fröhlich, 1881 ; Kennelly, 1891) :

$$\chi(H) = \frac{\chi_0 M_s}{M_s + \chi_0 H}, \quad (3.4)$$

ou à partir de modèles, comme celui de Langevin (1905) :

$$\chi(H) = \frac{M_s}{H} \mathcal{L} \left( \frac{3\chi_0 H}{M_s} \right), \quad (3.5)$$

où  $\mathcal{L}(x) = \coth(x) - \frac{1}{x}$  est la fonction de Langevin. C'est cette dernière relation qui sera utilisée dans les calculs pour établir la force magnétique. Par ailleurs, les valeurs de  $\chi_0$  et  $M_s$  sont disponibles dans la littérature pour les microbilles qui ont été utilisées, le tableau 3.1 les récapitule.

### 3.1.1.1 Calculs par méthode des éléments finis

La force magnétique dépend directement du champ magnétique appliqué et des paramètres des microbilles. Les sources magnétiques utilisées sont des aimants permanents (voir calculs analytiques plus bas) et des microbobines. Afin de déduire le champ produit par des bobines, un modèle simplifié peut être établi (voir également la partie suivante), ou une résolution par la méthode des éléments finis peut être employée. C'est cette méthode qui a été historiquement choisie pour ce projet à travers une implémentation logicielle avec Maxwell, puis Comsol, ce dernier ayant fourni les résultats pour les présents travaux.

La démarche consiste, à partir des paramètres géométriques et physiques (conductivité électrique) de la bobine, et du courant injecté, à déterminer le champ magnétique. L'équation de Maxwell-Ampère est considérée, en régime permanent (pas de courant de déplacement de Maxwell), soit :

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J}_e \quad (3.6)$$

où  $\mathbf{J}_e$  est la densité de courant électrique présente dans la bobine. En réalité, Comsol ne résout pas le problème en terme d'excitation ou d'induction magnétique, mais de potentiel vecteur  $A$  habituellement défini tel que  $\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A}$ . L'accès à  $B$  ou  $H$  est alors simple, en revanche  $G$  fait appel à une dérivée seconde de  $A$ , ce qui produit des résultats assez bruités, malgré l'utilisation de maillage fins.

La Fig. 3.1 représente les résultats d'une simulation obtenue pour une microbobine spirale rectangulaire de 5 spires (fils de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ ). Un atout des éléments finis est de permettre l'étude de géométries complexes, ainsi sur cet exemple on peut voir (Fig. 3.1 a) et b) les connexions de la bobine (départ de la première spire et retour par le plot central). En revanche les temps de calculs sont importants, et la méthode nécessite la définition d'une "boîte d'air" pour délimiter les zones de calcul, les résultats n'étant plus valables au voisinage des limites de cette boîte.

### 3.1.1.2 Calculs analytiques

Une méthode plus simple pour le calcul des champs magnétiques générés par les sources (bobines, aimants permanents) est de modéliser ces sources, puis de s'en remettre aux expressions analytiques lorsqu'elles sont disponibles. Les microbobines, qu'elles soient "filaires" ou spirales, peuvent être considérées comme des successions de segments de courants ou un ensemble de boucles de courant : le principe de superposition est appliqué au champ magnétique (relation linéaire entre le champ magnétique, la densité de courant électrique et la variation temporelle de champ électrique dans l'équation de Maxwell-Ampère). La Fig. 3.2 montre des exemples de géométries étudiées par un calcul analytique.

**Segments de courant** Le champ généré par une microbobine pouvant être modélisée par une succession de segments de courant est calculé simplement avec la loi de Biot et Savart (ici donnée sous forme différentielle, en coordonnées cylindriques) :

$$d\mathbf{B} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{I d\mathbf{l} \times \hat{\mathbf{r}}}{r^2} \quad (3.7)$$

où  $I$  est l'intensité du courant électrique circulant dans un conducteur, considéré infinitésimal et orienté selon  $d\mathbf{l}$ . Le champ dû à cet élément de conducteur au point  $M$ , situé à une distance  $r$  (de manière orthogonale) du conducteur est noté  $d\mathbf{B}$ . Le calcul revient alors à intégrer ce champ pour un conducteur de longueur finie et à additionner plusieurs segments de conducteurs. Afin d'éviter les opérations vectorielles, des expressions sont aussi disponibles dans la littérature (coordonnées cartésiennes) pour la valeur de l'induction magnétique générée par un segment de courant [195, 196].

La Fig. 3.3 résume les résultats obtenus avec un modèle de bobine spirale rectangulaire à 5 tours. Les conditions sont les mêmes que pour le calcul par éléments finis pour permettre une comparaison. Les champs sont observés aux mêmes altitudes (à 7.5, 12.5, 22.5, 32.5 et 42.5  $\mu\text{m}$  du centre de la bobine, soit de 5 à 40  $\mu\text{m}$  du haut de la bobine pour une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$ . Jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  du haut de la bobine, les valeurs obtenues sont très proches ( $-408$  vs  $-403 \text{ T m}^{-1}$  pour  $G_{z,\text{min}}$  par exemple). Lorsqu'on s'approche ( $z = 5 \mu\text{m}$ ), on remarque des différences qui peuvent être dues à la simplification de la géométrie (pas de pistes d'arrivée / départ de courant) et à la finesse du maillage pour les éléments finis. Ces écarts (e.g. 9.8 vs 8 mT pour  $B_{z,\text{max}}$ ) restent raisonnables. Cette approche analytique, permettant par ailleurs d'obtenir des valeurs et courbes de meilleure résolution (au prix d'un modèle simplifié), est apparue suffisante pour la plupart des situations et géométries rencontrées.

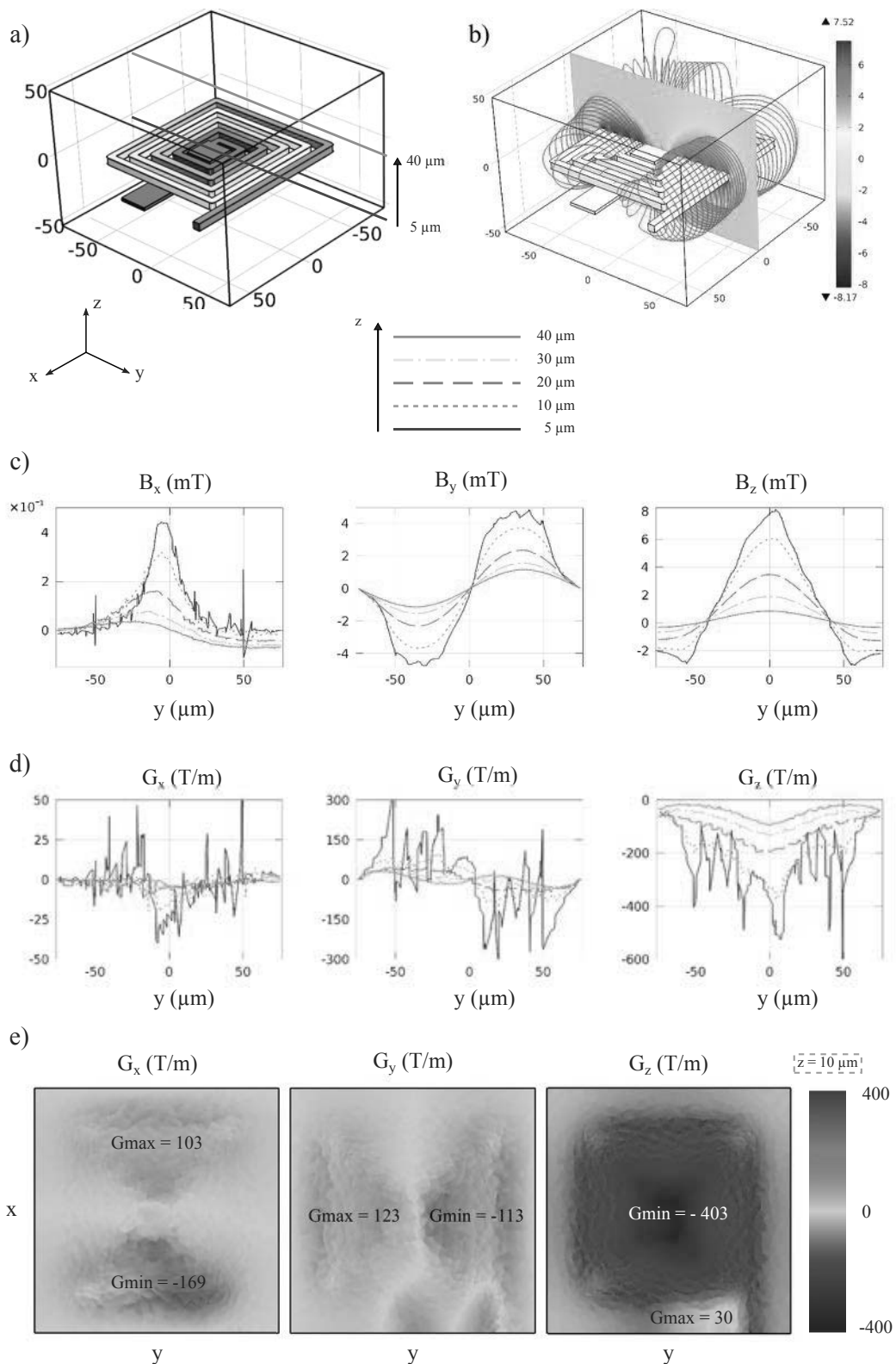


FIGURE 3.1 – Résultats de calculs par éléments finis (Comsol) pour une bobine spirale rectangulaire, avec  $I = 100$  mA. a) Géométrie de la bobine et représentation de l'altitude pour les tracés suivant. La couleur représente le potentiel (variation de 80 mV). b) Illustration des lignes de champ, ainsi que la projection de  $B_y$  sur le plan  $y = 0$ . c-d) Tracés de  $B$  et  $G$  à différentes altitudes (5, 10, 20, 30 et 40  $\mu\text{m}$ ). e) Représentation en 2D (plan  $z = 10$   $\mu\text{m}$ ) de  $G$ .

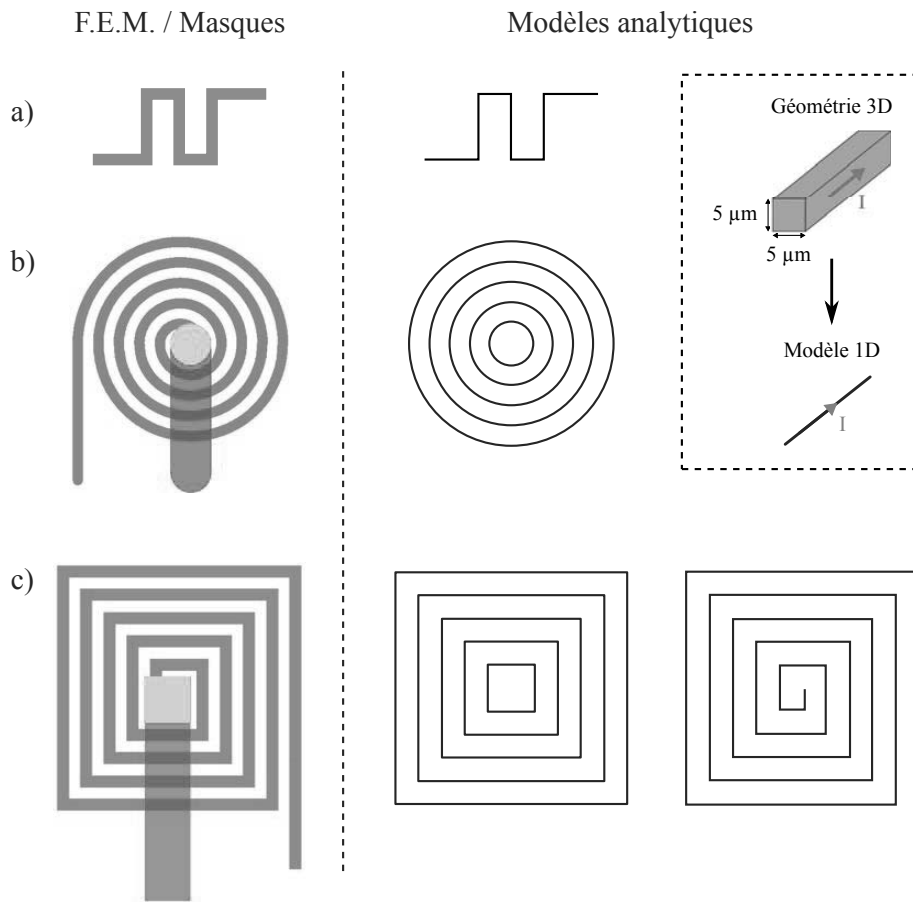


FIGURE 3.2 – Illustration de modèles analytiques à partir de géométries de bobines. La partie de gauche représente les masques sur un ou trois niveaux correspondant aux géométries réelles (épaisseur des fils de  $5\ \mu\text{m}$ ), les schémas de droite sont les équivalents analytiques. a) Bobine "filaire" planaire, le modèle revient à supprimer deux dimensions. b-c) Bobines avec enroulements, circulaire et rectangulaire respectivement, avec pistes sur deux niveaux et une connexion : le modèle ne garde que le niveau supérieur.

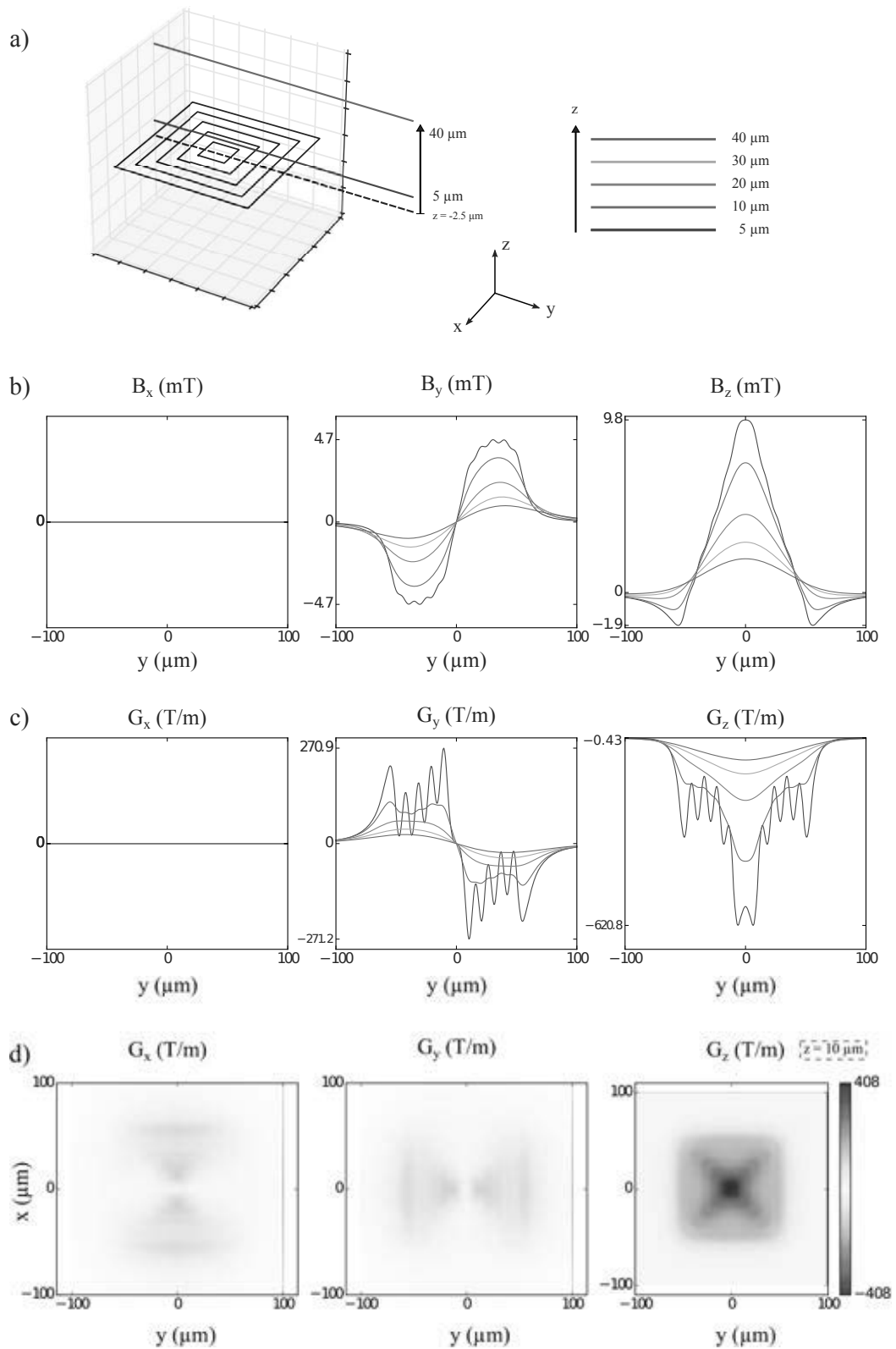


FIGURE 3.3 – Résultats de calculs analytiques pour un modèle de bobine spirale rectangulaire à 5 tours, avec  $I = 100 \text{ mA}$ . a) Géométrie de la bobine et représentation de l'altitude pour les tracés suivant. c-d) Tracés de  $B$  et  $G$  à différentes altitudes ( $5, 10, 20, 30$  et  $40 \text{ }\mu\text{m}$  du haut de la bobine, avec une épaisseur supposée à  $5 \text{ }\mu\text{m}$ ). e) Représentation en 2D (plan  $z = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ) de  $G$ .

**Boucles de courant** Pour les bobines spirales circulaires, on peut construire un équivalent à partir de plusieurs boucles de courant. L'application de la loi de Biot et Savart pour connaître la valeur de l'induction magnétique sur l'axe vertical d'une boucle de courant est un problème classique. En revanche son expression générale (en dehors de l'axe) est plus délicate à établir, la démonstration n'est pas incluse dans ce manuscrit mais est disponible dans un rapport de K. Kuns [197]. On considère (en coordonnées cylindriques) une boucle de courant de rayon  $a$ , et dont le centre est situé à une hauteur  $h$  selon l'axe  $z$ . En posant :

$$k = \sqrt{\frac{4ar}{(r+a)^2 + (z-h)^2}}, \quad (3.8)$$

et en définissant les intégrales elliptiques  $K$  et  $E$  telles que :

$$K(k) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \frac{d\alpha}{\sqrt{1 - k^2 \sin^2 \alpha}} \quad (3.9a)$$

$$E(k) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \sqrt{1 - k^2 \sin^2 \alpha} d\alpha, \quad (3.9b)$$

on peut alors exprimer l'induction magnétique en tout point :

$$\mathbf{B}(r, z) = \frac{\mu_0 I k}{4\pi \sqrt{ar^3}} \left[ -(z-h) \left( K - \frac{2-k^2}{2(1-k^2)} E \right) \hat{\mathbf{r}} + r \left( K + \frac{k^2(r+a) - 2r}{2r(1-k^2)} E \right) \hat{\mathbf{z}} \right]. \quad (3.10)$$

**Aimants permanents rectangulaires** Des aimants permanents sont également utilisés comme sources magnétiques. Le calcul du champ (induction) magnétique autour d'un aimant rectangulaire (parallélépipédique) est tiré de l'annexe d'un article de Yang *et al.* [198]. L'aimant est de dimensions  $2l \times 2h \times 2w$  selon  $x, y$  et  $z$  respectivement, portant un moment magnétique  $M$  selon l'axe  $x$ . Le champ rémanent noté  $B_r$  par la suite est équivalent à  $\mu_0 M$ . L'induction magnétique vaut alors :

$$B_x = -\frac{\mu_0 M}{4\pi} [F_1(-x, y, z) + F_1(-x, y, -z) + F_1(-x, -y, z) + F_1(-x, -y, -z) + F_1(x, y, z) + F_1(x, y, -z) + F_1(x, -y, z) + F_1(x, -y, -z)] \quad (3.11a)$$

$$B_y = \frac{\mu_0 M}{4\pi} \ln \left( \frac{F_2(-x, -y, z) F_2(x, y, z)}{F_2(-x, y, z) F_2(x, -y, z)} \right) \quad (3.11b)$$

$$B_z = \frac{\mu_0 M}{4\pi} \ln \left( \frac{F_2(-x, -z, y) F_2(x, z, y)}{F_2(-x, z, y) F_2(x, -z, y)} \right), \quad (3.11c)$$

où  $F_1$  et  $F_2$  sont les fonctions suivantes :

$$F_1(x, y, z) = \arctan \left( \frac{(h+y)(w+z)}{(l+x) \sqrt{(l+x)^2 + (h+y)^2 + (w+z)^2}} \right) \quad (3.12a)$$

$$F_2(x, y, z) = \frac{\sqrt{(l+x)^2 + (h+y)^2 + (w+z)^2} - w - z}{\sqrt{(l+x)^2 + (h+y)^2 + (w+z)^2} - w - z}. \quad (3.12b)$$

Au final, bien que limitant dans les géométries possibles, toutes ces expressions analytiques ont permis de calculer les champs d'excitation, d'induction et de force magnétiques produits par les sources des dispositifs envisagés.

#### 3.1.2 Calculs de trajectoires

Ce qui est intéressant est de pouvoir prédire et étudier la trajectoire d'une microbille magnétique afin de pouvoir dimensionner et déterminer les points de fonctionnement des microsystèmes. Un bilan des forces appliquées sur la particule doit en premier lieu être effectué. Pour fixer les idées, les valeurs des forces seront indiquées pour une particule de type M-450 (4.4  $\mu\text{m}$  de diamètre, voir tableau 3.1).

**Force de gravité et poussée d'Archimède** Dans de nombreuses applications microfluidiques, le poids des particules (souvent en polystyrène) est négligé. Avec un fort contenu en fer, les particules magnétiques utilisées sédimentent et on doit tenir compte de ces forces.

$$\mathbf{F}_g + \mathbf{F}_a = V_p(\rho_{\text{flu}} - \rho_p)\mathbf{g} \quad (3.13)$$

L'indice "p" désigne la particule, et "flu" le fluide (liquide en l'occurrence). Avec les données pour une particule M-450, on obtient (module) :  $F_g + F_a \approx 2.6 \cdot 10^{-13} \text{ N} \approx 0.3 \text{ pN}$ .

**Force de traînée** Le liquide environnant une particule (en mouvement relatif), exerce une force de traînée sur la particule. En considérant que l'on se situe dans le régime de Stokes (écoulement rampant) et que la particule se situe loin de toute paroi, on a :

$$\mathbf{F}_t = 6\pi r_p \mu_{\text{flu}} (\mathbf{v}_{\text{flu}} - \mathbf{v}) \quad (3.14)$$

où  $\mu_{\text{flu}}$  est la viscosité dynamique,  $\mathbf{v}_{\text{flu}}$  la vitesse du liquide, et  $\mathbf{v}$  la vitesse de la particule. Pour l'ordre de grandeur, avec une particule à l'arrêt et une vitesse de liquide à  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ , on a  $F_t \approx 4.1 \text{ pN}$ .

**Force magnétique** L'expression de la force magnétique en fonction du champ d'excitation a été donnée dans la partie précédente (équation (3.1)). Les forces devront être supérieures aux autres forces en compétition pour pouvoir piéger ou séparer les particules. Le design des sources et l'intensité du courant électrique circulant dans les bobines ont été choisis en conséquence.

**Autre forces** Il existe d'autres forces qui s'appliquent sur une particule en mouvement dans un fluide (force de Basset, effets des parois...) mais ne seront pas prises en compte étant donné les simplifications admises (géométrie, fluide newtonien...). Par ailleurs l'agitation thermique (mouvements browniens) est faible relativement aux autres forces, et dans l'ordre de grandeur des vitesses et positions observée, pour des particules d'une taille supérieure au micron.



Matériau	$\kappa$ [Wm <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$\rho$ [kg <sup>3</sup> m <sup>-1</sup> ]	$c_p$ [Jkg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	$D_{th}$ [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]
Eau	$6.0 \cdot 10^{-1}$	$1.0 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^3$	$1.4 \cdot 10^{-7}$
Pyrex	1.1	$2.2 \cdot 10^3$	$7.8 \cdot 10^2$	$6.3 \cdot 10^{-7}$
SU-8	$2.0 \cdot 10^{-1}$	$1.2 \cdot 10^3$	$1.5 \cdot 10^3$	$1.1 \cdot 10^{-7}$
Silicium	$1.5 \cdot 10^2$	$2.3 \cdot 10^3$	$7.1 \cdot 10^2$	$9.2 \cdot 10^{-5}$

TABLEAU 3.2 – Propriétés physiques thermiques des matériaux utilisés dans les puces microfluidiques.  $\kappa$  est la conductivité thermique,  $\rho$  est la masse volumique,  $c_p$  est la capacité calorifique à pression constante, et  $D_{th} = \frac{\kappa}{\rho c_p}$  est le coefficient de diffusion thermique. Valeurs tirées du livre de H. Bruus [199].

**Principe fondamental de la dynamique** Une fois toutes les forces établies, l'application de la deuxième loi de Newton permet d'écrire :

$$V_p \rho_p \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = V_p (\rho_{flu} - \rho_p) \mathbf{g} + 6\pi r_p \mu_{flu} (\mathbf{v}_{flu} - \mathbf{v}) + F_{mag}. \quad (3.15)$$

On remonte alors à la vitesse puis à la position de la particule par intégration numérique (méthode de Runge-Kutta d'ordre 4). Le programme Python (2.7) utilisé pour les calculs de force magnétique et de trajectoires fait appel à la librairie "integrate" (fonction odeint) du module Scipy.

### 3.1.3 Thermique

L'électro-aimant générant le champ magnétique pour dévier les microbilles est traversé par un courant électrique et est sujet à l'effet Joule. Celui-ci est responsable d'un dégagement de chaleur, transmis par conduction (diffusion) à la puce et par convection au liquide. Les conditions de fonctionnement avec des cellules de mammifères imposent une température d'environ 37 °C pour la viabilité des cellules et éviter la dénaturation des protéines. Les échauffements induits par les bobines et la température du liquide sont donc essentiels à prendre en compte.

La puissance émise par les bobines est  $P = RI^2$ , en considérant que les microbobines fabriquées présentent des résistances comprises entre 1 et 5  $\Omega$ , et une intensité les parcourant de l'ordre de 100 mA afin d'obtenir une force magnétique raisonnable, on peut atteindre des puissances de l'ordre de 50 mW.

Par analogie avec l'électronique, on peut définir en thermique des résistances de matériaux traversés par un flux de chaleur :  $R_{th} = \frac{e}{\kappa S}$ , où  $e$  et  $S$  sont les épaisseur et la section du matériau, et  $\kappa$  la conductivité thermique. En considérant l'épaisseur du substrat (verre) de 500  $\mu\text{m}$  et celle des couches de SU-8 séparant les microbobines du substrat et du liquide (3 et 5  $\mu\text{m}$  respectivement), on note que la résistance thermique côté substrat est bien plus élevée que du côté du liquide du fait de l'épaisseur (conductivités proches). Les propriétés thermiques des matériaux sont répertoriées dans le tableau 3.2.

Au laboratoire, des travaux antérieurs se sont penché sur l'analyse thermique des microbo-

bines pour la microfluidique. Un système comportant une bobine spirale carrée (10 spires, géométries identiques), sur un substrat souple (SU-8 et PET) et non capoté (canalisation ouverte en présence d'air) a été étudié. Une caméra infrarouge avait permis de mesurer la température à la surface en fonction des intensités appliquées : à 100 mA, la température atteignant 70 °C. En présence de liquide, d'un écoulement et avec un substrat (verre) presque 10 fois plus conducteur que le PET ( $\kappa_{\text{PET}} \approx 0.15 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), la température sera vraisemblablement moins élevée.

Une autre étude était basée sur la diminution de fluorescence de la rhodamine B avec une élévation de température. Avec un système similaire, mais un substrat en silicium (beaucoup plus conducteur), une intensité appliquée à 100 mA aboutissait à une augmentation de température de 10 °C. Par ailleurs cette augmentation n'était ni dépendante du débit de liquide, ni de la présence d'un flux d'air en surface de la puce (convection forcée), ce qui indiquait probablement un transfert par conduction via le substrat.

Enfin, une solution régulièrement adoptée pour les systèmes magnéto-fluidiques actifs est l'ajout de circuit de refroidissement ou de modules de régulation de la température (cellule Peltier). L'architecture de la puce devient alors plus complexe (entrées, sorties et canaux supplémentaires) mais autorise à dissiper une plus grande puissance thermique et à profiter de forces magnétiques plus importantes.

## 3.2 Électro-aimants filaires

Cette section traite de l'utilisation de microbobines filaires pour deux applications : la focalisation magnétique (comment amener des particules au centre d'un canal, selon un axe horizontal et perpendiculaire à l'écoulement) et le piégeage de particules. On entend par "bobines filaires" des électro-aimants constitués d'un seul plan de fils conducteurs successifs. Bien que le terme "bobine" soit utilisé pour caractériser un enroulement habituellement, il est employé ici comme un synonyme d'électro-aimant. On opposera pour plus de clarté les bobines filaires (enchaînement de segments de fils conducteurs sur un niveau) aux bobines spirales, qui présentent deux niveaux de conducteurs : un plan comprenant un enroulement (spiral), et un autre niveau où des pistes viennent connecter le centre de l'enroulement. Ces bobines spirales sont aussi dénommée planaires par comparaison aux bobines solénoïdes.

### 3.2.1 Principe des dispositifs hybrides

Lorsqu'un système magnétique comporte à la fois des composants passifs (aimants permanents) et actifs (microbobines), il peut être qualifié comme "hybride". Le cas le plus typique (c.f. partie 1.3.5.2 du chapitre d'introduction) est la génération d'un champ magnétique homogène à l'aide d'aimants permanents, et l'excitation locale de bobines qui génèrent un gradient de champ, et ainsi une force, de manière locale.

L'équation de la force magnétique (3.1) peut également être écrite sous forme développée en

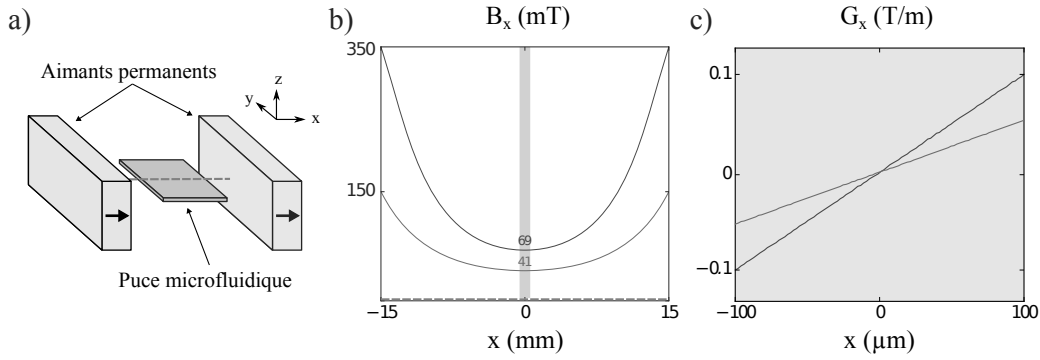


FIGURE 3.4 – Principe de fonctionnement d’un système hybride. a) Schéma du dispositif : deux aimants permanents magnétisés selon l’axe  $\hat{x}$  encadrent la puce microfluidique. b) Le champ magnétique  $B_x$  généré est considéré homogène au centre de la puce (zone grise), de 41 à 69 mT pour des écartements d’aimants de  $\Delta x = 35$  à 45 mm (centre à centre), courbes verte et bleue respectivement. c) Gradient efficace du champ magnétique  $G_x$  au niveau du centre de la puce (bande de 200  $\mu\text{m}$  de large), pour les mêmes écartements, compris entre 50 et 100  $\text{mT m}^{-1}$ .

coordonnées cartésiennes :

$$\mathbf{F}_{\text{mag}} = \mu_0 V \chi(H) \begin{pmatrix} H_x \frac{\partial H_x}{\partial x} + H_y \frac{\partial H_x}{\partial y} + H_z \frac{\partial H_x}{\partial z} \\ H_x \frac{\partial H_y}{\partial x} + H_y \frac{\partial H_y}{\partial y} + H_z \frac{\partial H_y}{\partial z} \\ H_x \frac{\partial H_z}{\partial x} + H_y \frac{\partial H_z}{\partial y} + H_z \frac{\partial H_z}{\partial z} \end{pmatrix}. \quad (3.16)$$

Si un champ magnétique est généré selon une direction préférentielle, par exemple  $H_x \gg H_y$  ou  $H_z$ , seuls les gradients du champ par rapport à cette même direction ( $\frac{\partial H_k}{\partial x}$ , où  $k$  est  $x$ ,  $y$ , ou  $z$ ) auront une importance. On comprend alors qu’un fil conducteur parallèle à l’axe  $\hat{x}$  n’aura aucune influence, alors qu’une force sera générée à son voisinage s’il est dirigé selon l’un (ou les deux) autres axes.

C’est ce principe qui sera utilisé pour les systèmes hybrides. Comme le montre la Fig. 3.4, deux aimants permanents sont positionnés de part et d’autre de la puce microfluidique, dans la même direction de magnétisation, afin de générer un champ que l’on peut considérer comme homogène au centre de la puce. Des matrices de Halbach, constituées de plusieurs aimants, ou d’autres structures de circuits incluant des matériaux magnétiques mous peuvent être employés pour obtenir des champs plus homogènes et plus intenses, mais un ensemble de deux aimants est simple à mettre en place et permet de magnétiser les billes à saturation. Les aimants utilisés sont choisis plus longs que la puce (évite les effets de bord) : 40 mm de longueur, 10 mm de hauteur et 5 mm d’épaisseur (magnétisation dans l’épaisseur), le matériau est du NdFeB de grade N52. L’écartement des deux aimants  $\Delta x$  (centre à centre) est variable de 35 à 45 mm.

Il est important de vérifier que les forces dues aux aimants seuls sont négligeables par rapport aux autres forces en jeu. La Fig. 3.4 donne les valeurs du champ  $B_x$  et du gradient  $G_x$  le long de l’axe  $\hat{x}$ . Concrètement, pour les forces (comme précédemment le calcul est pour le cas d’une

bille M-450), on atteint 0.15 pN à 100  $\mu\text{m}$  du centre de la puce, ce qui est négligeable. D'autant qu'en pratique les canalisations sont de 100  $\mu\text{m}$  de large (facteur 2), les forces sont donc de l'ordre de 75 fN. En revanche, en bord de puce, à 6.5 mm du centre (emplacement des entrées / sorties), on est à 14.5 pN, ce qui devient conséquent. Cela n'affecte pas les fonctionnalités des dispositifs si les opérations sont réalisées au centre, mais peut être gênant pour le transport des particules, le design doit donc se concentrer le plus près possible du centre de la puce, et le débit doit être éventuellement ajusté pour éviter les agrégats et le piégeage de particules.

#### 3.2.2 Focalisation magnétique

Un actionneur, pour effectuer une manipulation, ou un détecteur, pour une bonne reproductibilité, peuvent nécessiter un positionnement spécifique de l'objet avec lequel ils sont en interaction. C'est par exemple le cas d'un détecteur GMR décrit dans le chapitre d'introduction [145], avant lequel les particules magnétiques sont focalisées au centre de la canalisation microfluidique. La solution décrite repose sur l'aimantation de lignes de Nickel, mais on peut imaginer d'autres méthodes. En particulier, l'utilisation de bobines offre un contrôle local temporel (possibilité d'actionner aucune, une ou plusieurs bobines en fonction du temps) et en intensité.

Avec le système décrit précédemment, on perçoit simplement qu'un fil conducteur placé en travers (avec un angle non droit) d'une canalisation parcourant l'axe des  $\hat{y}$  au centre de la puce engendre une force de répulsion ou d'attraction, selon toutes les coordonnées, le long du fil. La Fig. 3.5 présente le principe de cette approche pour former des bobines qui décalent des particules magnétiques latéralement (selon  $\hat{x}$ ) le long du canal central. Deux designs sont proposés : l'un regroupe une simple bobine, et l'autre deux bobines actionnables séparément. L'angle de 45° formé avec le canal a été choisi arbitrairement, de même que le nombre d'unités d'actionnement ( $5 \times 2$  pour les doubles bobines et  $3 \times 2$  pour les simples). Les gradients efficaces du champ magnétique ont été calculés pour ces deux géométries (voir Fig. 3.5 b) et c).

Tous les calculs des sections bobines filaires 3.2 et spirales 3.3, sauf mention contraire, sont réalisés pour un espacement inter-aimants permanent  $\Delta x = 35 \text{ nm}$ , à mi hauteur en considérant un canal de 20  $\mu\text{m}$  de profondeur ( $z = 10 \mu\text{m}$ ), et pour une intensité parcourant les bobines de 100 mA.

Pour passer de la valeur du gradient efficace  $\mathbf{G}$  à la force magnétique appliquée à une particule magnétisée à saturation, on rappelle que d'après l'équation (3.3) on a :  $\mathbf{F}_{\text{mag}} = VM_s \mathbf{G}$ . Ainsi, pour des particules de type M-450, le ratio est de  $\frac{F_{\text{mag}}}{G} \approx 1.40 \text{ pN m T}^{-1}$ . Les bobines, à 100 mA, permettent d'atteindre des forces d'environ 60 pN. Ces forces sont le plus intense selon  $\hat{z}$ , à la verticale des fils (répulsion), et sont également importantes selon l'axe  $\hat{x}$  pour la focalisation. Sur les doubles bobines, les forces selon l'axe  $\hat{y}$  sont aussi conséquentes et donnent lieu à des phénomènes de ralentissement et d'accélération consécutifs à chaque passage d'unité.

Afin de prédire le comportement du système, les trajectoires pour des billes situées à différentes positions de départ ont été calculées et sont reportées sur la Fig. 3.6. Les billes sont

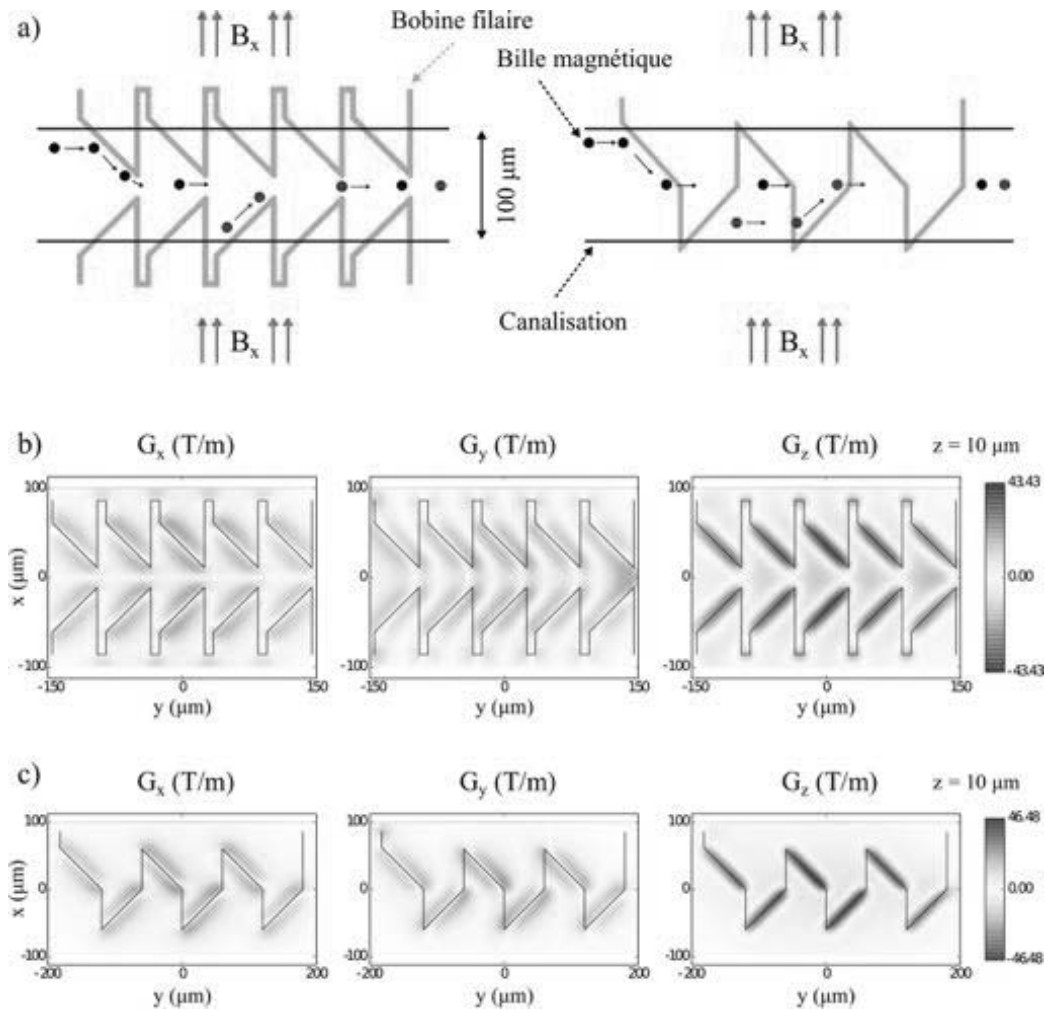


FIGURE 3.5 – Principe de la focalisation magnétique à une et deux bobines. a) Schéma du système représentant le canal microfluidique et les bobines induisant un déplacement des particules vers le centre du canal. b-c) Gradient efficace du champ magnétique  $\mathbf{G}$  en fonction de  $x$  et  $y$ , à une altitude  $z = 10 \mu\text{m}$  dans la canalisation, pour le système à deux bobines (b) et une bobine (c). L'intensité parcourant les bobines est de 100 mA, et l'écartement des aimants permanents  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ .

initialement situées au centre de la canalisation selon  $\hat{y}$  et  $\hat{z}$ , et à différents écartements du centre selon  $x$  :  $x_0 = 10, 20, 30$  ou  $40 \mu\text{m}$ . La vitesse moyenne du liquide est de  $2 \text{ mm s}^{-1}$  et l'intensité varie de 50 à 100 mA. Quelle que soit l'intensité, on observe une action de focalisation pour les billes situées à  $x_0 = 10, 20$  et  $30 \mu\text{m}$ , et au contraire une exclusion (rapprochement des bords) pour la bille située à  $40 \mu\text{m}$  du centre au départ. Comme on s'y attend, la focalisation est d'autant plus importante et rapide que l'intensité est élevée.

L'observation de l'altitude fait remarquer deux points intéressants : lors de la phase de focalisation (au niveau du piège), les billes étant situées au centre (selon  $\hat{x}$ ) des deux bobines sont plaquées au sol de la canalisation, alors que les billes traversant au-dessus des bobines sont repoussées vers le haut. D'autre part, lorsque les billes sortent des bobines, une force de répulsion selon  $\hat{z}$  les remet en suspension. A priori, d'après les calculs, ce système permet de focaliser la plupart des billes magnétiques selon l'axe  $\hat{x}$ , comme on le souhaite.

L'implémentation expérimentale a été réalisée avec les deux dispositifs, comme le montre la Fig. 3.7. Une des difficultés avec l'intégration du système réside dans l'observation des particules : elle se fait à travers le substrat, et les billes sont masquées par les bobines. Ce constat est le même pour des billes fluorescentes assez larges (Spherotech de  $8 \mu\text{m}$  de diamètre) ou pour des billes non fluorescentes (Invitrogen M-450 de  $4.4 \mu\text{m}$ ). Étant donné le faible contenu en fer et l'aimantation à saturation limitée des billes fluorescentes, et par cohérence avec les calculs précédents seuls les résultats obtenus avec les billes M-450 sont présentés. Les images obtenues par microscopie en champ clair peuvent être traitées pour isoler les particules (Fig. 3.7 a et c), mais ce n'est pas suffisant pour permettre un bon suivi automatique. Un suivi manuel a donc été fait sur un ensemble de particules isolées couvrant la largeur de la canalisation (b et d). Pour une intensité de 85 mA et un écart entre les aimants permanents de  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ , on observe que le système à double bobine permet de focaliser efficacement les particules, et ce jusqu'à de vitesses initiales de l'ordre de  $2.5 \text{ mm s}^{-1}$ . Ce n'est pas le cas pour la bobine unique, qui ne présente que 6 unités actives (contre 10 pour les double bobines).

En présence d'une forte concentration de billes magnétiques et d'un champ suffisant pour atteindre la saturation, des agrégats se forment : on observe des séries de deux, trois billes ou plus, s'attirant pour former une chaîne orientée selon la composante la plus forte du champ (voir la chaîne de trois billes Fig. 3.7 a). Ces chaînes sont plus réactives aux gradients de champ magnétique ; cet effet n'a pas été étudié plus avant dans cette thèse mais ouvre cependant d'intéressantes perspectives [41, 179].

En changeant la polarité des bobines, ces systèmes peuvent être utilisés afin de dépeupler le centre du canal de billes magnétiques, qui sont dirigées vers les parois. Avec les bobines doubles, il est *a priori* possible de diriger les billes d'un bord à l'autre du canal.

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de caractériser de manière quantitative les systèmes de focalisation (efficacité en fonction du débit, de l'intensité électrique injectée, variabilité de la vitesse en sortie...). Avec les observations effectuées, une preuve de concept a été apportée, notamment pour le système à deux bobines.

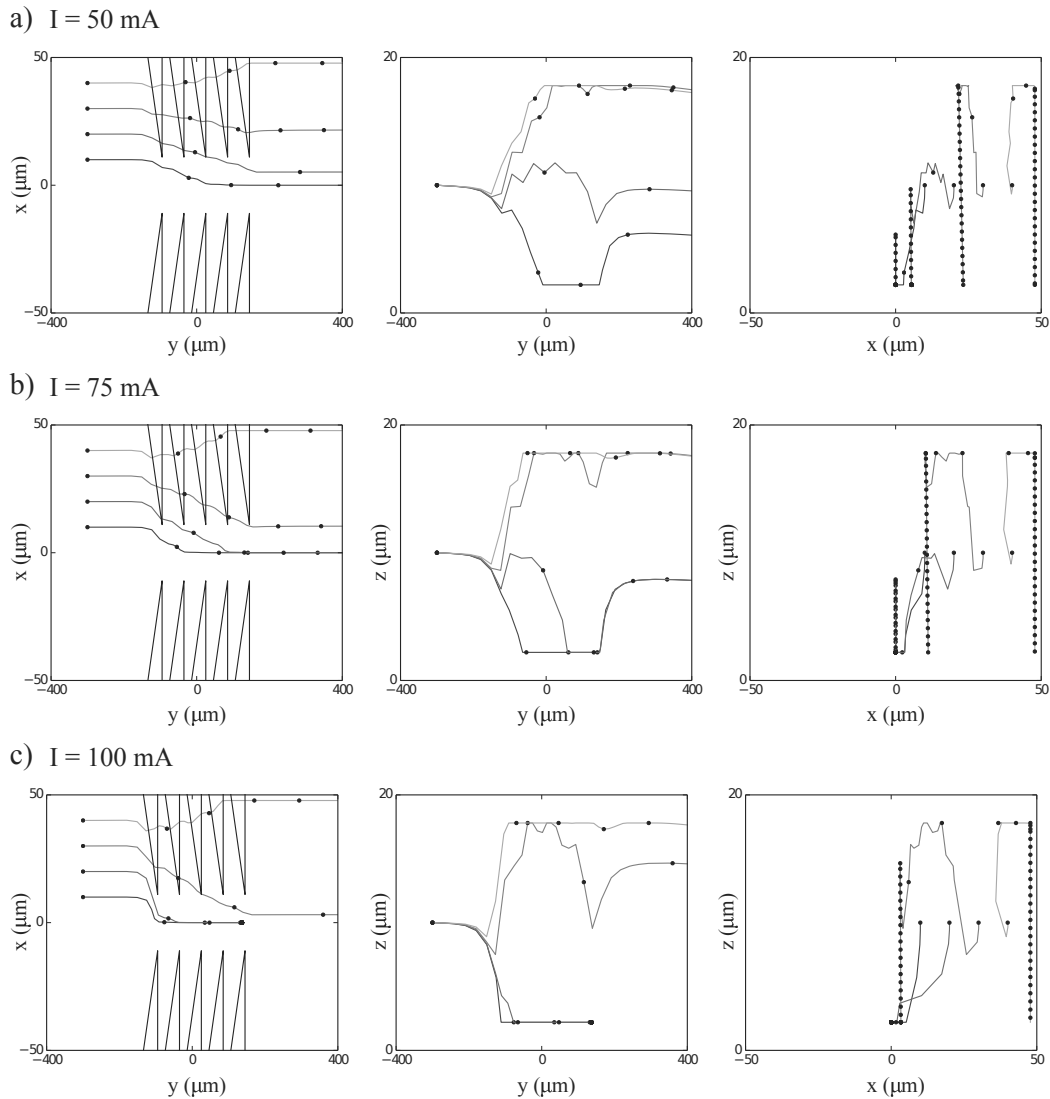


FIGURE 3.6 – Résultats de calculs de trajectoires pour un système de focalisation à deux bobines filaires. Les trajectoires de billes selon les coordonnées  $x$ ,  $y$  et  $z$  sont fournies pour trois intensités électriques différentes : a) 50 mA, b) 75 mA, et c) 100 mA. La vitesse moyenne du liquide est de  $2 \text{ mm s}^{-1}$  pour les trois cas. Les positions initiales sont  $x_0 = 10, 20, 30$  et  $40 \mu\text{m}$ ,  $y_0 = -300 \mu\text{m}$  et  $z_0 = 10 \mu\text{m}$ . Les points noirs représentés sur les trajectoires marquent des pas de temps de 0.1 s.

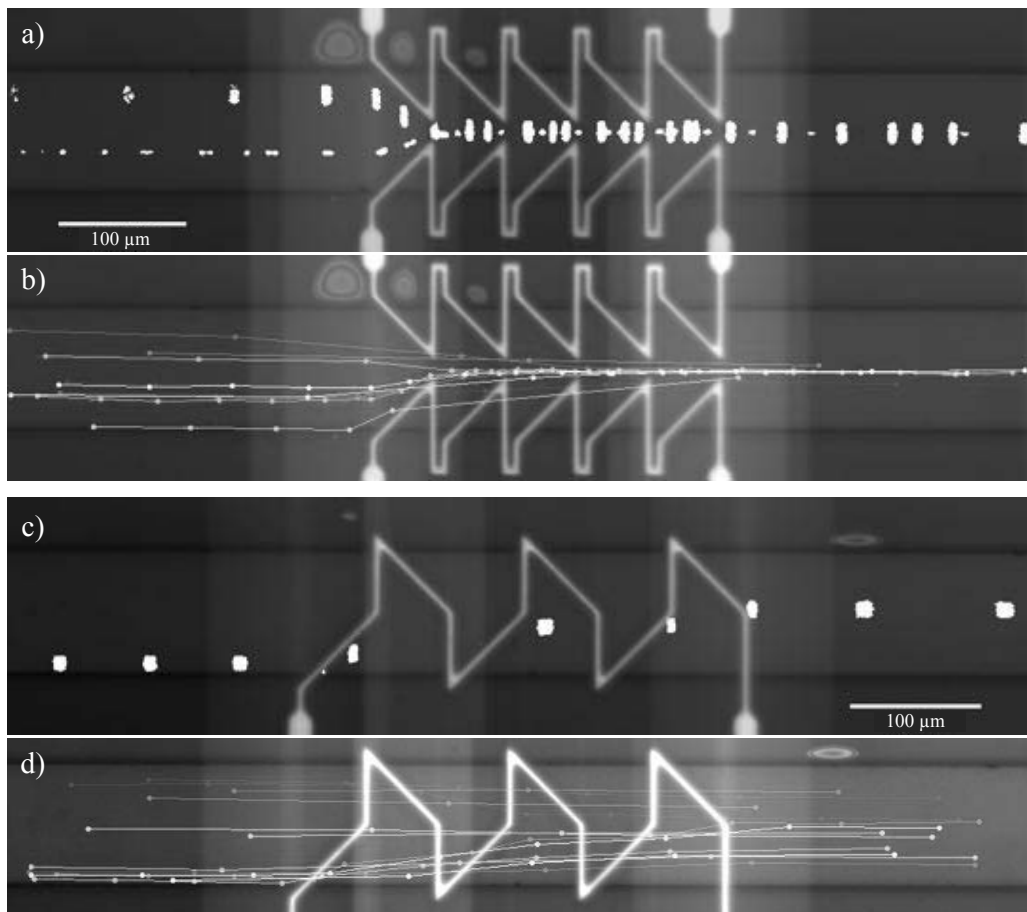


FIGURE 3.7 – Résultats expérimentaux pour les systèmes de focalisation. a-c) Images de microscopie optique en champ clair traitées et superposées pour illustrer les trajectoires de particules pour les systèmes à deux bobines (a) et bobine unique (c). Les images de (a) font apparaître la trajectoire d'un groupe de 3 billes (haut) et d'une bille unique (centre/bas). b-d) Extraction de trajectoires (suivi de particules manuel) pour les deux systèmes. L'intensité parcourant les bobines est de 85 mA. L'intervalle de temps entre deux images successives est  $\Delta t = 71$  ms.



### 3.2.3 Pièges adressables

Le contrôle d'objets micrométriques (robots, billes, cellules...) se concentre vers la manipulation d'un nombre d'objets grandissant, avec une taille de plus en plus réduite. Les études sur les cellules uniques sont légion, et les données qui en émergent (génomique, détection de cellules rares...) sont essentielles aux problématiques biologiques et médicales. Pour certains tests il est important de pouvoir immobiliser des cellules ou autres éléments biologiques, de réaliser une opération (injection d'une drogue par exemple), et de récupérer ces cellules non endommagées. Une immobilisation et une récupération sélectives accroissent les possibilités. De nombreuses techniques de manipulation existent (voir le chapitre d'introduction partie 1.3.2), mais peu de références font état de pièges magnétiques à l'échelle de la cellule étant capable de réaliser un traitement individuel. En employant le système hybride décrit plus haut avec une géométrie simple de bobines filaires, il a été possible de concevoir une matrice de pièges adressables.

La Fig. 3.8 a) explique le dispositif et la géométrie de bobine utilisée. Une matrice de  $10 \times 10$  bobines est parcourue par un large canal microfluidique. Deux canaux d'entrée servent à l'injection des billes et au rinçage ou à l'injection de marqueurs ou drogues. Chaque piège est une bobine en forme de S ( $30 \mu\text{m}$  de côté), avec un brin central attirant les particules et deux brins latéraux appliquant une force de répulsion. Afin de pouvoir aligner verticalement les pièges, un dernier brin sert à revenir au point initial du motif est isolé à l'aide de piliers qui délimitent ainsi dans le canal chaque piège. L'adressage se fait par colonne de dix pièges (et non pas unique pour le moment). À droite de la figure 3.8 a) est résumé la séquence de piégeage : la bille est attirée sur le piège, conservée, puis éjectée en inversant la polarité (ou simplement relâchée en arrêtant l'alimentation de la bobine).

Le gradient efficace du champ magnétique au centre de la canalisation, ainsi que la force magnétique appliquée à une particule (type M-450) sur la largeur d'un piège sont représentés Fig. 3.8 b et c). À une altitude de  $10 \mu\text{m}$ , pour un courant de  $100 \text{ mA}$  et un écartement d'aimants  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ , une force d'attraction verticale  $F_z \simeq 75 \text{ pN}$  est appliquée, ainsi qu'une force focalisant la bille vers le centre du piège (selon  $\hat{x}$ ), d'environ  $50 \text{ pN}$ .

La mise en œuvre expérimentale présente les mêmes limitations que pour les systèmes de focalisation : la visualisation des billes se fait uniquement au travers des bobines. Afin d'observer au mieux les trajectoires des particules, des billes fluorescentes Spherotech de  $8 \mu\text{m}$  de diamètre ont été injectées, mais présentent des caractéristiques magnétiques différentes (saturation plus faible) que les M-450. Deux configurations sont montrées dans la Fig. 3.9.

Dans la première (c) il s'agit simplement du piégeage de deux billes et d'un agrégat de deux autres billes qui viennent s'arrêter au niveau de pièges localisés sur la même colonne de bobines qui ont été activées (courant de  $120 \text{ mA}$ ). On valide ainsi la fonction de piège proposée.

Les Fig. 3.9 a) et b) montrent le piégeage et l'éjection d'une bille le long d'une ligne sur 4 pièges différents, activés de façon séquentielle. Le premier piège est d'abord activé en mode attraction, le second piège également, puis la polarité du premier piège est changée (répulsion). L'intensité électrique est de  $100 \text{ mA}$ . La bille est transportée et stoppée de manière contrôlée,

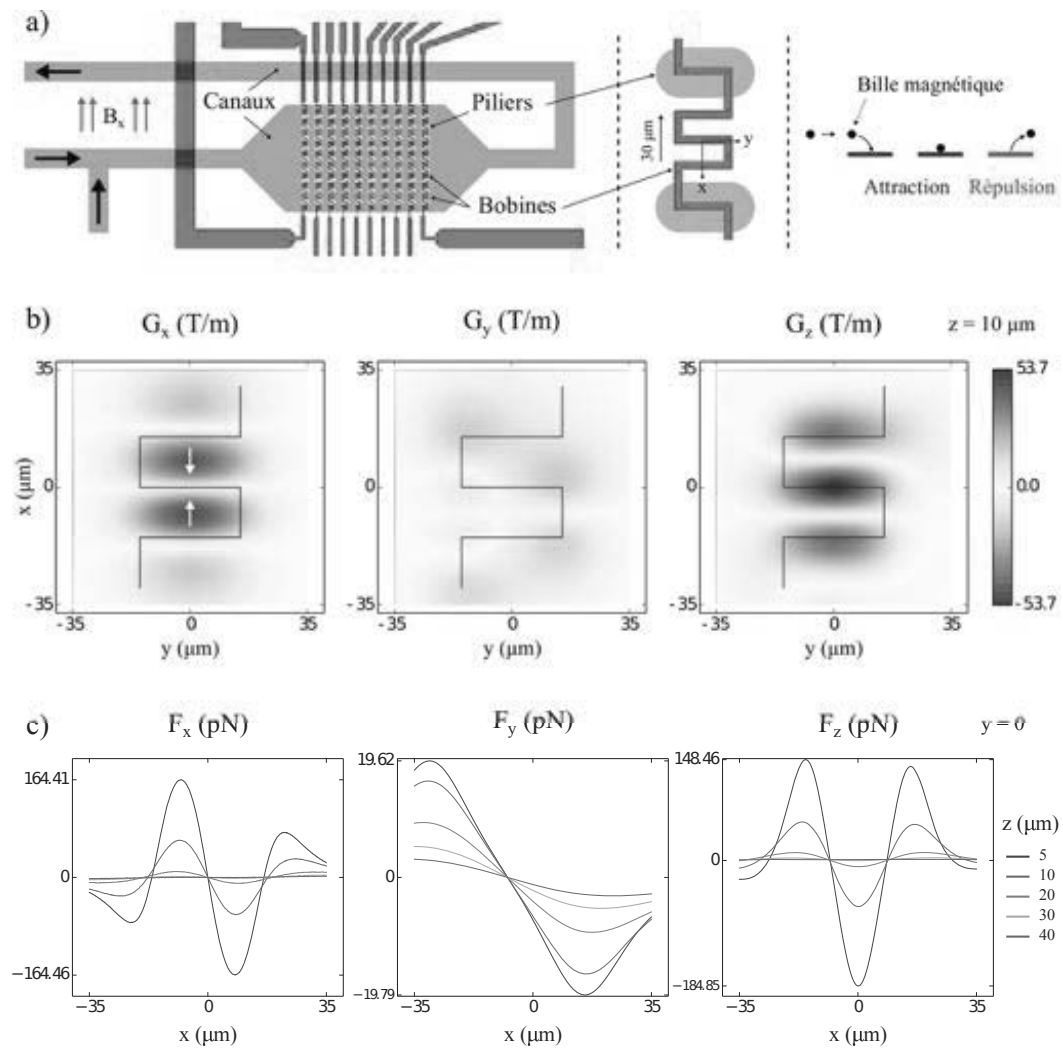


FIGURE 3.8 – Principe et caractéristiques d’une matrice de pièges adressables. a) Schéma du système représentant les canaux microfluidiques et la matrice de pièges (gauche), un piège isolé, bordé de piliers (centre), et la vue en coupe (plan  $yz$ ) d’un piège attirant puis expulsant une bille (3 actions séquentielles). b) Gradient efficace du champ magnétique  $\mathbf{G}$  en fonction de  $x$  et  $y$ , à une altitude  $z = 10 \mu\text{m}$  dans la canalisation. Les flèches blanches (gauche) indiquent le sens de la force générée. c) Force magnétique appliquée sur une particule au centre d’un piège ( $y = 0$ ) en fonction de  $x$ . L’intensité parcourant les bobines est de 100 mA, et l’écartement des aimants permanents  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ .

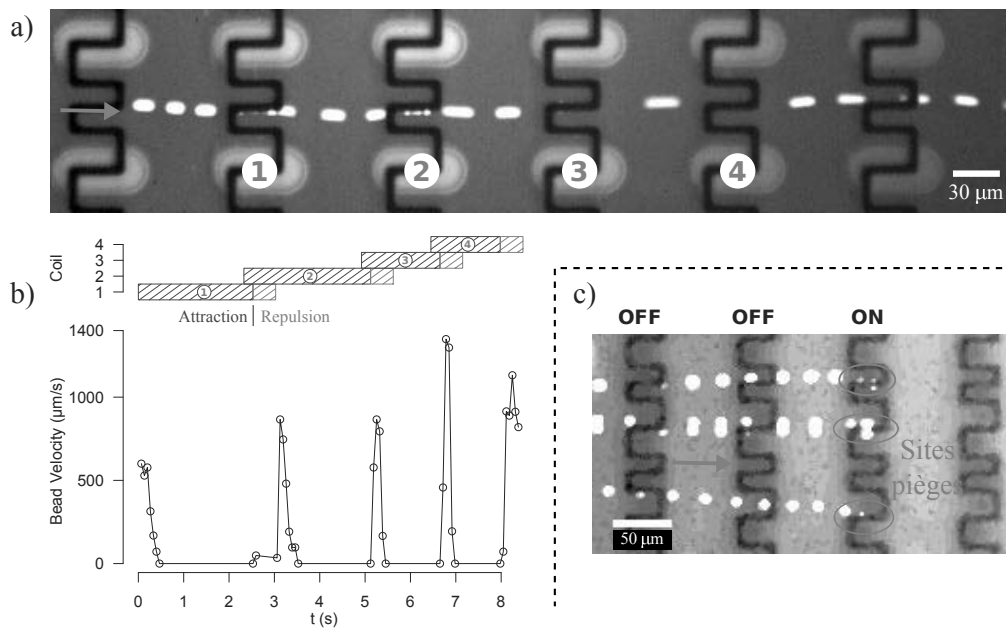


FIGURE 3.9 – Résultats expérimentaux pour les matrices de pièges adressables. a) Images en microscopie de fluorescence superposées pour montrer la trajectoire d’une particule fluorescente de 8 μm de diamètre piégée puis relâchée successivement sur 4 bobines différentes. Intensité de 100 mA b) Actionnement des bobines (attraction ou répulsion) et vitesse instantanée de la bille suivie en fonction du temps. c) Images en microscopie de fluorescence superposées montrant la trajectoires de 3 billes s’arrêtant sur des pièges (colonne de bobines allumée, avec une intensité de 120 mA). Les flèches rouges symbolisent la direction de l’écoulement.

à des vitesses de l'ordre de  $1 \text{ mm s}^{-1}$ . Ce test montre qu'il a été possible de manipuler (arrêt et récupération) un objet (à l'échelle d'une cellule) avec des pièges adressables dans le cadre d'un système hybride. L'utilisation de billes présentant de meilleures propriétés magnétiques, éventuellement couplées à des cellules (cela implique une force de trainée bien plus importante), à différentes intensités et débits seront les étapes logiques suivantes pour la caractérisation complète de ce système.

### 3.3 Microbobines spirales

Les bobines spirales sont constituées de deux étages de pistes conductrices (fils à section carrée de  $5 \mu\text{m}$  de large), avec une connexion centrale entre ces deux plans. L'intérêt d'un enroulement est que le champ magnétique produit par chaque spire s'additionne de manière constructive : une bobine peut générer un champ et un gradient de champ magnétique suffisamment élevés pour appliquer des forces conséquentes. Les géométries classiques sont les bobines rectangulaires ou circulaires, les designs retenus pour ces travaux font intervenir des bobines spirales carrées, dont les pics d'intensité de force magnétique sont plus localisés au centre et sur les diagonales, et qui sont plus appropriées pour une intégration avec des canalisations rectangulaires.

#### 3.3.1 Tri vertical

Certains types de capteurs nécessitent d'être en grande proximité ou en contact des objets analysés, c'est le cas pour les mesures d'impédance (basses et hautes fréquences). Pour réaliser un test immunologique visant à immobiliser et compter des cellules particulières, ces cellules doivent se trouver à quelques nanomètres des électrodes fonctionnalisées afin de se lier aux anticorps (ou autres éléments d'affinité) et d'obtenir un signal. Être capable d'attirer les cellules au plus proche de la surface des électrodes apporterait une amélioration de l'efficacité du capteur. Une méthode pour y parvenir est d'utiliser des microbilles magnétiques pour marquer les cellules, et disposer un actionneur sous les électrodes. Une fois la surface du capteur saturée, l'actionnement doit pouvoir s'arrêter afin de rincer et d'effectuer la détection.

Les bobines spirales planaires génèrent un gradient efficace intense selon l'axe vertical  $\hat{z}$ , ce qui en fait des actionneurs de choix pour appliquer une force d'attraction sur des particules pour les diriger vers le fond d'un canal microfluidique, où un capteur peut être placé.

Un exemple d'application biologique est la séparation et le comptage de monocytes sanguins : ceux-ci présentent tous une affinité pour les anticorps CD14, et a priori seuls les monocytes intermédiaires et non classiques possèdent une affinité pour les anticorps CD16 (voir section 1.3.6). Un premier tri doit être effectué pour séparer les monocytes du reste du sang, et une seconde étape de détection doit avoir lieu pour le comptage des deux sous-populations.

Un dispositif constitué d'une série de bobines spirales pour le tri vertical, puis d'autres bobines pour l'attraction vers les capteurs serait une solution, la Fig. 3.10 a) illustre ce principe de fonctionnement. Un échantillon (sang ou couche leucocytaire) dont les monocytes ont été

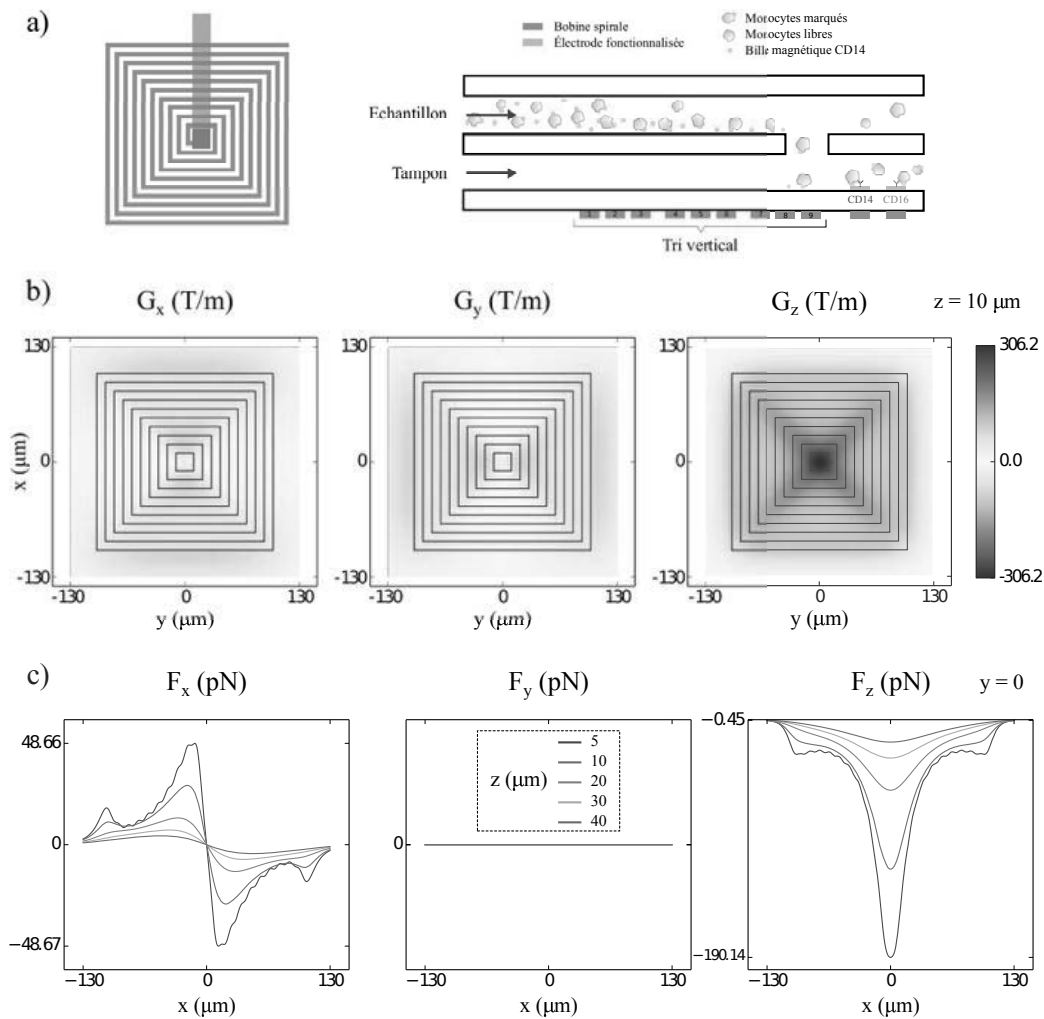


FIGURE 3.10 – Séparation magnétique verticale. a) Schéma des bobines spirales carrées à 10 tours employées (gauche), et du principe de séparation verticale (droite). b) Gradient efficace du champ magnétique  $\mathbf{G}$  en fonction de  $x$  et  $y$ , à une altitude  $z = 10\mu\text{m}$  dans la canalisation. c) Force magnétique appliquée sur une particule au centre d'une bobine ( $y = 0$ ) en fonction de  $x$  pour différentes altitudes  $z = 5$  à  $40\mu\text{m}$ . L'intensité parcourant les bobines est de 100 mA.

marqués par des billes magnétiques est introduit dans un canal supérieur. Les billes marquées sont dirigées vers le bas de ce canal dans un premier temps, puis sont attirées au travers d'une ouverture vers un canal inférieur, où un tampon est injecté. Les monocytes marqués se retrouvent donc dans le canal du bas, les autres cellules restant dans le canal supérieur. La couche polymère de séparation entre les deux canaux évite entre autres la sédimentation non souhaitée des cellules (marquées ou non). Les Fig. 3.10 b) et c) indiquent les gradients efficaces de champ magnétique et les force associées sur des particules M-450,  $F_z$  atteignant plus de 100 pN à une altitude de  $10\mu\text{m}$  et pour une intensité de 100 mA.

Lors de travaux précédents (S. Cargou [7]), un tel dispositif avait été réalisé et caractérisé, basé sur un substrat en silicium et sur de la résine SU-8. Une approche similaire a été adoptée, en choisissant d'intégrer les étapes de mélange / marquage décrites dans le chapitre précédent,

et en faisant évoluer les procédés technologique pour être basés sur un substrat de verre et des films secs type DF. Des résultats précédents sont rappelés Fig. 3.12 a) et b). La fonction de piégeage de monocytes marqués par des billes (similaires aux M-450) fonctionnalisées CD14 a été validée (a). De même pour des billes magnétiques seules, les fonctions de piégeage et de séparation verticale ont été validées pour des vitesses moyennes maximales du liquide de l'ordre de 1 et 3 mm s<sup>-1</sup> respectivement (intensité de 100 mA).

Pour les nouveaux dispositifs, seuls des tests de remplissage (éthanol et eau DI), et de fonctionnement des bobines (caractérisation électrique) ont été réalisés. L'essentiel des résultats concerne donc le procédé technologique (voir la partie 3.4), qui a permis de produire une structure fonctionnelle. Une telle architecture de tri vertical peut sembler complexe mais rend possible d'une part le contrôle avec précision de l'aiguillage de cellules marquées vers les capteurs, ainsi que l'attraction localisée au-dessus des électrodes. D'autre part elle procure une flexibilité importante dans la mesure ou des aimants permanents ne sont pas nécessaires : les canaux et bobines peuvent être placés librement sur toute la surface de la puce.

#### 3.3.2 Système d'aiguillage (hybride)

Étant donnés les forts gradients de champ magnétique que peuvent produire des bobines spirales, il est judicieux de pouvoir les associer avec des aimants permanents, malgré les contraintes de design. Des champs magnétiques et des gradients élevés génèrent ensemble des forces importantes.

En combinant la même structure de bobines spirales que précédemment avec des aimants permanents, on se rapporte au système hybride, et des fonctions de tri horizontal sont développées. La Fig. 3.11 a) montre le principe d'un tel dispositif : des billes magnétiques injectées dans un canal peuvent être dirigées de manière préférentielle d'un côté du canal tout en étant attirées vers le bas du canal. On obtient alors un aiguilleur, qui selon la polarité choisie place des billes d'un côté ou de l'autre (selon  $\hat{x}$ ), et à des altitudes faibles.

La Fig. 3.11 b) et c) regroupent les gradients de champ et forces magnétiques appliquées sur des particules M-450. À 10  $\mu\text{m}$  d'altitude et avec une intensité de 100 mA, on arrive à produire une force  $F_x$  de 215 pN au centre de la bobine, ce qui est la valeur maximale obtenue en comparaison de tous les systèmes présentés!

Cette approche a été validée en injectant des billes fluorescentes (Spherotech, 8.4  $\mu\text{m}$ ) et en observant leur déviation par une bobine spirale alimentée par un courant de 50 mA (avec un écartement entre aimants de  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ ). Comme précédemment, le suivi de trajectoires a été effectué manuellement. Des particules se déplaçant à des vitesses d'environ 1 mm s<sup>-1</sup> ont été déviées et/ou piégées (voir 3.12 c). En revanche la déviation observée pour d'autres particules n'est pas totale (partie basse du canal sur la figure). D'autres expériences à des intensités plus élevées permettront d'étudier plus en détail et de confirmer les propriétés de cet aiguilleur contrôlable.

Une seule configuration d'aimants (en face à face, magnétisés selon l'axe  $\hat{x}$ ) a été étudiée dans

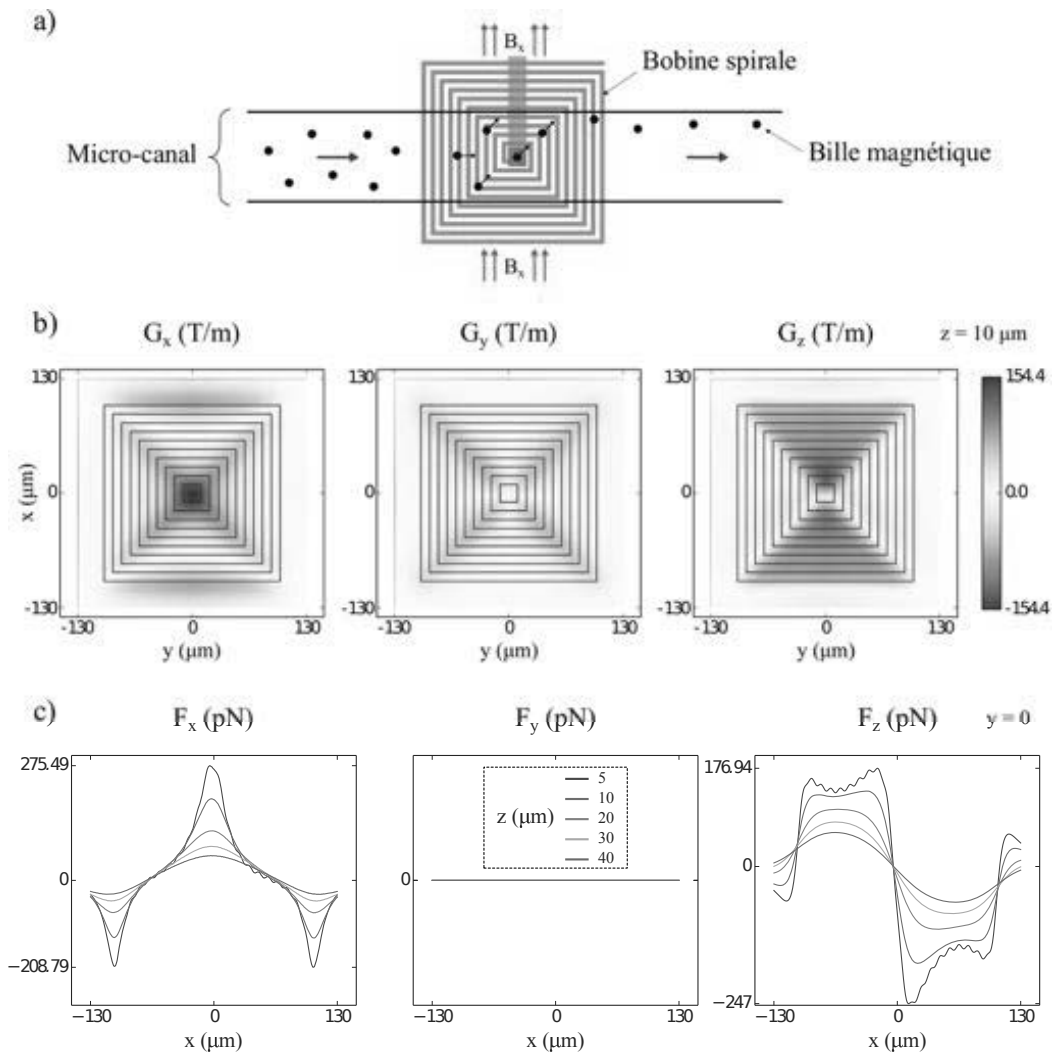


FIGURE 3.11 – Séparation magnétique hybride horizontale. a) Schéma du principe de séparation horizontale. b) Gradient efficace du champ magnétique  $\mathbf{G}$  en fonction de  $x$  et  $y$ , à une altitude  $z = 10 \mu\text{m}$  dans la canalisation. c) Force magnétique appliquée sur une particule au centre d'une bobine ( $y = 0$ ) en fonction de  $x$  pour différentes altitudes  $z = 5$  à  $40 \mu\text{m}$ . L'intensité parcourant les bobines est de 100 mA et l'écartement entre aimants de  $\Delta x = 35 \text{ mm}$ .

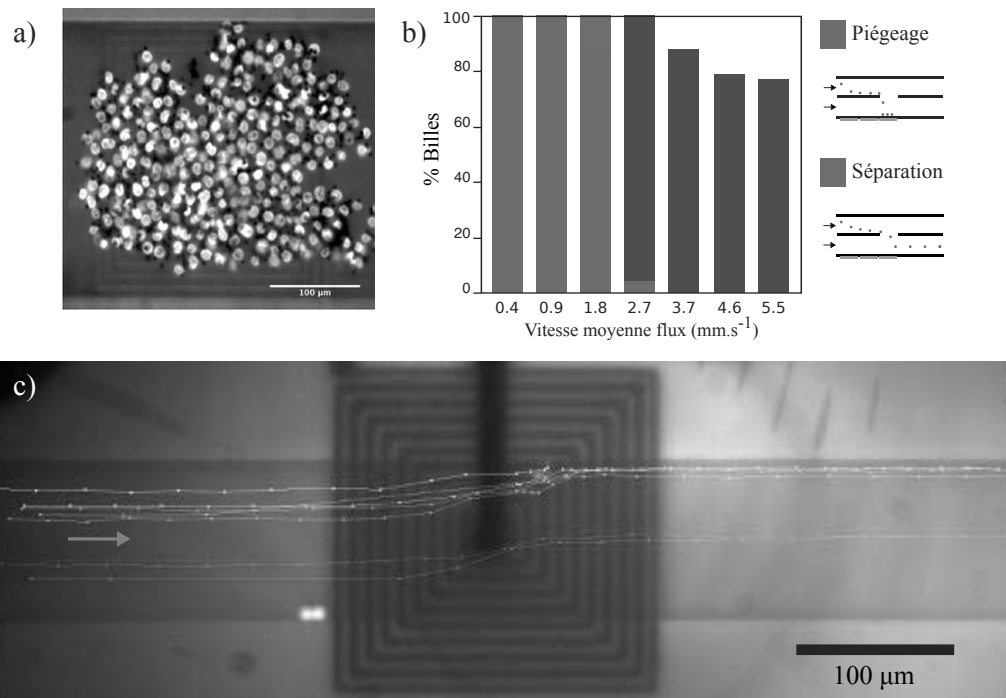


FIGURE 3.12 – Résultats expérimentaux pour les systèmes à bobines spirales. a-b) **Rappel** de résultats obtenus lors de travaux de thèse précédents (S. Cargou [7]). a) Piégeage de monocytes marqués (en fluorescence et par des billes magnétiques) sur une bobine (canalisation de  $25\ \mu\text{m}$  de hauteur, vitesse moyenne d'écoulement de  $200\ \mu\text{m}\ \text{s}^{-1}$ , et intensité de 100 mA). b) Étude du piégeage et de la séparation verticale de billes magnétiques en fonction du débit. c) Extraction de trajectoires (suivi de particules manuel) pour le système de séparation horizontale hybride. L'intensité parcourant les bobines est de 50 mA. L'intervalle de temps entre deux images successives est  $\Delta t = 50\ \text{ms}$ .



ces travaux. Il est possible, en orientant par exemple l'aimantation vers l'axe  $\hat{z}$ , ou en choisissant d'utiliser un nombre plus important d'aimants permanents, de proposer des fonctions supplémentaires en gardant les mêmes bobines et puces microfluidiques. On pourrait ainsi envisager une version amplifiée du tri vertical, des pièges plus efficaces, et de nombreuses autres opérations.

### 3.4 Microfabrication

Les procédés de fabrication de micro-bobines n'ont pas été abordés dans le chapitre d'introduction. Des méthodes classiques ont été utilisées (métallisation, croissance électrolytique...), les protocoles seront présentés plus en détails dans cette partie, qui est dédiée à la microfabrication des dispositifs d'actionnement magnétiques étudiés (voir sections précédentes 3.2 et 3.3). Les bobines sont intégrées sous des micro canalisations qui sont réalisées par laminage de plusieurs couches de film sec photosensible. Cette technique et la fabrication de canaux ont été abordés dans le chapitre précédent, se reporter à la section 2.4.

#### 3.4.1 Procédé de fabrication

Lors des chapitres précédents, les géométries et topologies de deux types d'actionneurs ont été mentionnées. Les bobines dites filaires sont une succession de segments de conducteur, sur un même plan, alors que les bobines dites spirales sont un enroulement de conducteurs, qui nécessitent une connexion centrale liée à un autre niveau de conducteur. Les deux protocoles sont détaillés par la suite, et outre la topologie et le nombre d'étapes, ils disposent d'une large base commune.

Le substrat est un wafer de verre Schott AF-32 de 4" et 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Par rapport au silicium habituellement utilisé, il permet d'une part la visualisation de part et d'autre du dispositif (utile pour la caractérisation en microscopie optique), et fait preuve d'une excellente isolation électrique (pas besoin d'étape de croissance d'oxyde).

Les conducteurs électriques formant les bobines sont des fils conducteurs de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ , qui nécessitent la présence de points de contact afin de pouvoir être alimentés. Ces contacts (pads carrés) seront présents sur la face supérieure du wafer, et seront connectés avec des connecteurs à ressort (voir partie sur l'intégration 3.5.1). Les bobines sont placées au plus près des canalisations fluidiques (écart de 5  $\mu\text{m}$ ). Elles sont intégrées en dessous des canaux, et non au dessus car il n'est pas possible d'atteindre les mêmes résolutions après plusieurs niveaux fluidiques, notamment à cause des contraintes qui n'offrent pas une bonne planéité du wafer et rendent les alignements plus difficiles.

Des couches de métaux sont déposées pour la fabrication de ces actionneurs. Différentes techniques sont possibles, et sont adéquates pour différentes gammes d'épaisseurs de métal à déposer. La métallisation par évaporation a été utilisée pour déposer des couches fines (de l'ordre de la centaine de nanomètres), et la croissance électrolytique permet d'obtenir la bobine en déposant plusieurs microns.

**Métallisation** Afin d'obtenir une bonne accroche d'un métal sur une surface de verre ou de polymère, certains métaux particuliers sont employés classiquement : le titane et le chrome par exemple. Une deuxième couche de métal, de nature proche de celle qui sera déposée par la suite par croissance électrochimique, est associée lors d'un deuxième passage. Lors du procédé, une couche de titane de 50 nm suivie d'une couche d'or de 50 nm également seront déposées. L'or est privilégié au cuivre (même lorsque du cuivre sera déposé par électrochimie) car ce dernier s'oxyde rapidement avec les traitements plasma  $O_2$  pour améliorer l'adhérence des résines et le mouillage lors de l'électrodéposition. Le couple Ti/Au (couche d'accroche / métal) sera déposé par une méthode d'évaporation par faisceau d'électron : dans un bâti sous vide, une cible de métal est bombardée et vaporisée par un faisceau d'électrons, le métal se dépose alors à la surface du wafer.

**Électrodéposition** L'épaisseur des microbobines dicte le choix technologique pour le dépôt du métal. La croissance électrolytique permet d'obtenir des épaisseurs variant entre moins d'un micromètre jusqu'à plusieurs centaines de micromètres, selon les métaux et paramètres utilisés. Une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  est tout à fait adaptée. L'électrodéposition consiste à venir déposer en phase aqueuse un métal sur des régions conductrices en surface du wafer. L'électrode de travail (wafer) et une contre électrode (composée du métal à déposer) sont plongées dans une solution contenant le métal à déposer sous forme ionique. L'application d'un courant entre les deux électrodes engendre la consommation de la contre-électrode et le dépôt du métal sur le wafer. Si un moule en résine photosensible est présent sur le wafer, des motifs (spires des bobines) sont alors formés.

À la suite de la formation des parties métalliques des actionneurs, les fils conducteurs ou spires sont encapsulés par une résine photosensible (SU-8), qui sert à la fois de protection, d'isolant électrique et à planariser le dispositif. Des couches de films secs DF peuvent alors être laminées pour former un réseau de canalisations. Ce montage permet la proximité des bobines et des canaux, tout en utilisant un procédé simple de laminage. Ceci est rendu possible par la bonne adhérence des films DF à la SU-8, qui sont tous deux des résines de type époxy.

#### 3.4.1.1 Bobines filaires

La réalisation de dispositifs combinant des bobines filaires (un seul niveau de métallisation) et un niveau de canalisations fluidiques ne représente *a priori* pas de défis majeurs. L'utilisation du laminage d'un film de DF sur des actionneurs encapsulés représente tout de même l'introduction d'un nouveau matériau dans le procédé. En outre deux métaux, le cuivre et l'or, ont été électrodéposés pour comparer leur propriétés, une étape de recuit a également été réalisée pour l'or.

Le tableau 3.3 et la Fig. 3.13 résument les différentes étapes utilisées pour ce procédé.

Comme décrit précédemment, une couche de Ti/Au 50/50 nm est déposée (b). Un moule en résine positive AZ 40XT (13  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour une hauteur de métal souhaitée de 5  $\mu\text{m}$ ) est réalisé le plus souvent en employant un automate (EVG 120) (c). L'étape suivante est la croissance électrochimique des pistes et bobines dans le moule précédemment déposé. Afin

d'être dans des conditions d'une bonne homogénéité pour la densité de courant électrique à la surface du wafer, des structures carrées (5 mm de côté) sont disposées partout où il n'y a pas de dispositif (voir Fig. 3.18). Un contrôle d'épaisseur est réalisé en fin de croissance, si celle-ci s'avère insuffisante, un dépôt peut être lancé à nouveau. La résine du moule est enfin retirée (d).

Selon les métaux déposés (or ou cuivre), une solution adaptée est utilisée pour l'attaque des couches de bases :

- $I_2$  (5%) + KI (10%) pour l'or, menant à la réaction  $2Au_{(s)} + I_{2(aq)} \rightarrow 2AuI_{(aq)}$ . La présence d'iodure de potassium accroît la solubilité de  $I_2$  et AuI dans l'eau [200],
- $H_2O_2$  (1% vol.) + HCl (1% vol.) pour le cuivre, donnant la réaction  $Cu_{(s)} + H_2O_2 + 2H^+_{(aq)} \rightarrow 2H_2O_{(l)} + Cu^{2+}_{(aq)}$ .

Lors de l'attaque d'une couche d'or, des additifs tels que l'acide laurique, oléique ou des alcanethiols peuvent être ajoutés pour protéger sélectivement un métal (cuivre, aluminium...). Lors de l'utilisation de cuivre pour le dépôt électrolytique, une couche de protection est ainsi formée et évite la bobine d'être trop attaquée par le retrait des couches de base. Le titane est quant à lui retiré avec une solution d'acide fluorhydrique à 5%. Les bobines nues sur le substrat sont alors obtenues (e).

Si de l'or est utilisé pour les bobines, il est possible d'ajouter un recuit afin d'améliorer ses propriétés électriques. Un recuit de 20 min à 250 °C a été effectué, ce qui permet d'obtenir une baisse de la résistivité d'environ 19% (voir la partie caractérisation 3.4.2).

Une encapsulation des bobines est réalisée avec de la SU-8, on rappelle ici que la hauteur de 5  $\mu$ m des fils conducteurs est due aux propriétés magnétiques d'une part (champ de force élevé à proximité de l'actionneur) mais également à des limitations technologiques : la difficulté de planarisation par une résine liquide augmente avec le rapport de forme des objets à recouvrir. Une couche de 10  $\mu$ m est déposée et permet de recouvrir les bobines. Le masque utilisé pour cette étape de photolithographie laisse un accès aux plots de contacts (f).

Enfin des étapes de laminage sont conduites pour la construction d'un réseau (2D avec ces designs) de canalisations. Il faut souligner la compatibilité d'une couche structurée de SU-8 avec les films DF (une activation par plasma  $O_2$  est toutefois nécessaire). Les techniques de laminage sont décrites dans la partie 2.4.

Après obtention des canaux, les puces sont découpées à la scie diamantée. Chaque dispositif est un carré de 18 mm de côté, présente 20 plots de contacts électriques et jusqu'à 5 entrées / sorties fluidiques. Un wafer de 4" comprend 12 puces.

### 3.4.1.2 Bobines spirales

La fabrication d'actionneurs magnétiques comprenant des enroulements, et donc deux niveaux de pistes métalliques est plus complexe à mettre en œuvre que pour des bobines filaires. À cela s'ajoute le choix, pour ces designs, d'associer aux actionneurs un réseau de canalisations en 3D.

Étape	Schéma	Description
1	a)	<b>Nettoyage substrat (verre)</b> - Bain H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 min). Plasma O <sub>2</sub> , 800 W, 15 min.
2	b)	<b>Métallisation</b> - Dépôt couche d'accroche et métal par évaporation : Ti/Au 50/50 nm.
3	c)	<b>Dépôt AZ 40XT</b> 13 µm - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Dépôt résine AZ 40XT de 13 µm, $v_{rot} = 5000$ rpm. Recuit : 126 °C, 4 min (2 min de mise en température). Détourage (acétone).
4	c)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec bobines filaires, $\lambda = 405$ nm, dose de 450 mJ <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> . PEB : 105 °C, 90 s (mise en température de 20 s). Développement : bain de MF CD 26 pendant 1 min puis rinçage à l'eau DI.
5	d)	<b>Électrodéposition</b> 5 µm - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Bain de croissance électrolytique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Cu pour croissance du cuivre). Densité de courant : 1 A <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> . Temps de dépôt de l'ordre de 20 min, en fonction de la surface à croître et de l'épaisseur souhaitée (5 µm).
6	-	<b>Retrait AZ 40XT</b> - Dissolution du moule en AZ 40XT avec un nettoyage (jet / bain) à l'acétone.
7	e)	<b>Attaque des couches d'accroche</b> - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. La couche d'or est attaquée avec une solution de KI + I <sub>2</sub> (bain d'environ 30 s). La couche de titane est attaquée par un bain de HF 5%, pendant environ 20 s. Contrôle visuel au microscope pour les deux opérations.
8	f)	<b>Dépôt SU-8</b> 10 µm - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Dépôt résine SU-8 de 10 µm, $v_{rot} = 900$ rpm. Recuit (rampe) : 95 °C, 7 min. Détourage (acétone).
9	f)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec ouvertures pour connexions électriques, $\lambda = 365$ nm, dose de 200 mJ <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> . PEB (rampe) : 95 °C, 3 min. Développement : bain de PGMEA pendant 5 min. Recuit final (rampe) : 125 °C, 2 min.
10	i)	<b>Laminage DF</b> 20 µm (ou 50 µm) - Plasma O <sub>2</sub> , 200 W, 2 min. Laminage niveau supérieur : P = 2 bar, v = 1 m/ min, T = 65 °C. Découpe et retrait du liner.
11	-	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec réseau fluide et ouvertures connexions électriques, $\lambda = 365$ nm, dose de 250 mJ <sup>2</sup> cm <sup>-1</sup> . PEB (rampe) : 100 °C, 5 min. Développement : cyclohexanone, 2 + 2 min.
... 13	j)	<b>Répétition (×1) des étapes 10 et 11</b> - PEB à 6 min, développement à 3 + 3 min.

TABLEAU 3.3 – Protocole pour la réalisation d'actionneurs (bobines filaires). Les lettres (a-j) se réfèrent à la Fig. 3.13. Le "+" entre deux durées pour une étape de développement indique que le bain a été renouvelé.

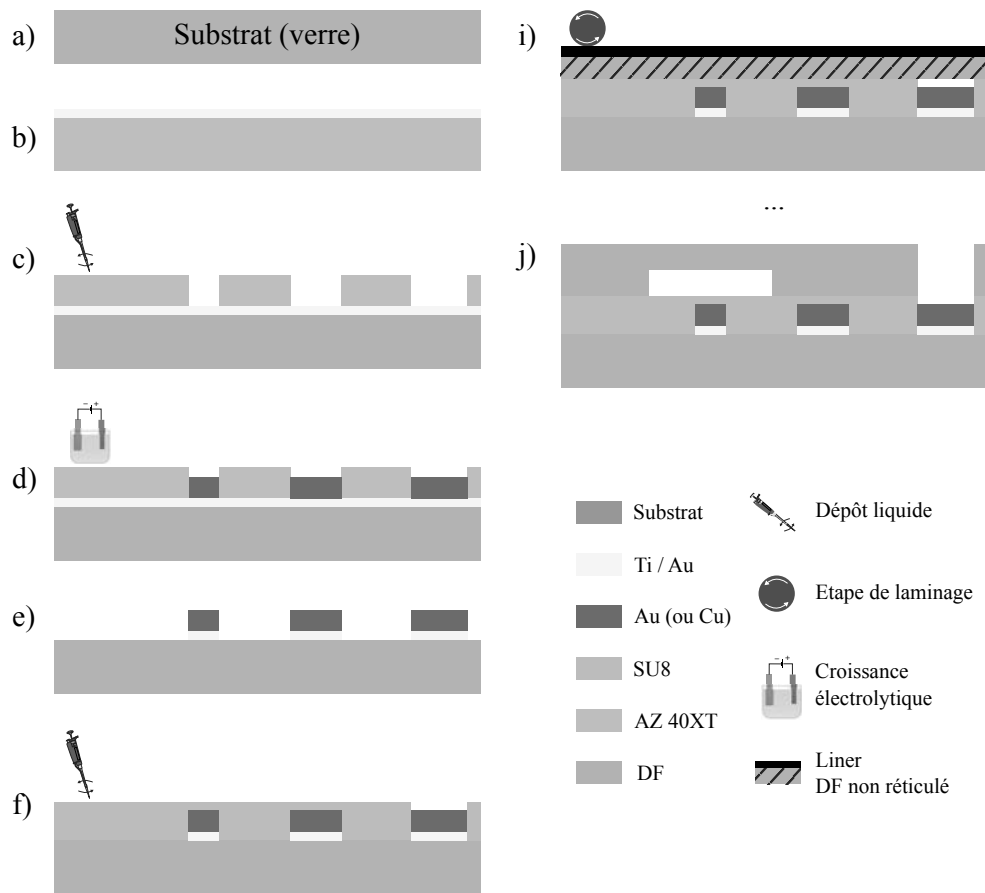


FIGURE 3.13 – Procédé de fabrication d’un dispositif magnéto-microfluidique comprenant des bobines filaires et un niveau de canalisations. Une étape de métallisation, une étape d’électrodéposition et 4 étapes de photolithographie (2 dépôts liquides et 2 laminages) sont nécessaires. Les différentes opérations sont détaillées dans le texte et dans le tableau 3.3.

Les tableaux 3.4 et 3.5, ainsi que la Fig. 3.13 résument les différentes étapes de ce procédé de microfabrication.

Une première couche Ti/Au 50/50 nm est déposée (b), puis une recharge électrolytique est effectuée sur toute la surface du wafer (sans moule), afin de croître une épaisseur de 2  $\mu\text{m}$  d'or (c). Cette couche est ensuite mise en forme pour former le niveau inférieur des pistes électriques : une résine positive ECI (1.2  $\mu\text{m}$ ) protège les zones des pistes (d) et on procède à une gravure des métaux (or puis titane) sur le reste du wafer (e). Cette méthode résulte en une très légère sur-gravure en dessous des bords de la résine, de l'ordre du micron, ce qui n'affecte pas les propriétés des pistes (30  $\mu\text{m}$  de large au minimum).

Ce niveau de piste est alors encapsulé avec une résine SU-8 de 5  $\mu\text{m}$  (f) : cette étape protège les pistes inférieures, laisse des ouvertures pour leurs connexions (plots de contacts), et permet surtout la création d'un via, qui transportera le courant dans les spires des bobines (niveau de piste supérieur). Les épaisseurs ont alors leur importance : la croissance électrolytique de 2  $\mu\text{m}$  et la couche de SU-8 de 5  $\mu\text{m}$  introduisent un gap de 3  $\mu\text{m}$ . Il faut s'assurer que l'étape suivante, de métallisation, ne rompe pas le contact sur cette marche. Ensuite la deuxième étape d'électrodéposition doit mettre en place une croissance supérieure à ce gap pour qu'il y ait un recouvrement suffisant : ce sera le cas puisque l'on déposera au minimum 5  $\mu\text{m}$  (recouvrement de 2  $\mu\text{m}$  pour le passage du courant).

La deuxième étape de métallisation consiste à déposer de nouveau une couche de Ti/Au 50/50 nm (g). Les métallisations sont réalisées dans un bâti où les wafers sont positionnés sur des planétaires, ce qui permet un bon recouvrement et la continuité de la métallisation sur des marches hautes (plusieurs dizaines de microns).

Un moule de 13  $\mu\text{m}$  pour le niveau supérieur de pistes électriques (comprenant les spires des bobines) en AZ 40XT est alors déposé (h). S'en suit une recharge électrolytique pour la croissance de 5  $\mu\text{m}$  d'or (i). Pour ces dispositifs, seul l'or a été utilisé, mais il est tout à fait possible de travailler avec du cuivre. La couche de base est alors gravée : d'abord l'or, puis le titane (j). Les bains utilisés sont les mêmes que pour la partie précédente, on notera cependant qu'en plus du traitement plasma  $\text{O}_2$  précédent l'attaque, en vue d'augmenter la mouillabilité, un tensioactif (SDS) est ajouté au bain de gravure de l'or ( $\text{KI} + \text{I}_2$ ). Cela permet à la solution de pénétrer entre les spires des bobines (espacement inter spire de 5  $\mu\text{m}$ ).

Le deuxième niveau de pistes est ensuite encapsulé avec une résine SU-8 de 10  $\mu\text{m}$  (k), pour la photolithographie le masque prévoit toujours des ouvertures pour les plots de contact électrique. Enfin le réseau 3D microfluidique est superposé en utilisant toujours la même technique de dépôt par laminage et structuration par photolithographie (voir partie 2.4).

#### 3.4.2 Caractérisation

À toutes les étapes de fabrication, il est nécessaire de contrôler ce qui est obtenu. Il s'agit le plus souvent d'épaisseurs et de largeurs (résines), de manière plus générale l'aspect des puces (présence de défauts...), mais également des propriétés particulières comme des résistances

### Chapitre 3. Systèmes microfluidiques et actionnement magnétique

Étape	Schéma	Description
1	a)	<b>Nettoyage substrat (verre)</b> - Bain $\text{H}_2\text{O}_2$ / $\text{H}_2\text{SO}_4$ (2 min). Plasma $\text{O}_2$ , 800 W, 15 min.
2	b)	<b>Métallisation</b> - Dépôt couche d'accroche et métal par évaporation : Ti/Au 50/50 nm.
3	c)	<b>Électrodéposition</b> $2\ \mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Bain de croissance électrolytique. Densité de courant : $1\ \text{A}^2\ \text{cm}^{-1}$ . Temps de dépôt en fonction de la surface à croître et de l'épaisseur souhaitée ( $2\ \mu\text{m}$ ).
4	d)	<b>Dépôt ECI</b> $1.2\ \mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Dépôt résine ECI de $1.2\ \mu\text{m}$ , $v_{rot} = 5000\ \text{rpm}$ . Recuit : $90\ ^\circ\text{C}$ , 1 min. Détourage (acétone).
5	d)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec pistes d'arrivée de courant, $\lambda = 405\ \text{nm}$ , dose de $200\ \text{mJ}^2\ \text{cm}^{-1}$ . PEB : $110\ ^\circ\text{C}$ , 1 min. Développement : bain de MF CD 26 pendant 15 s puis rinçage à l'eau DI.
6	-	<b>Retrait ECI</b> - Dissolution du moule en ECI avec un nettoyage (jet / bain) à l'acétone.
7	e)	<b>Attaque des couches d'accroche</b> - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. La couche d'or est attaquée avec une solution de KI + $\text{I}_2$ (bain d'environ 2 min). La couche de titane est attaquée par un bain de HF 5%, pendant environ 20 s. Contrôle visuel au microscope pour les deux opérations.
8	f)	<b>Dépôt SU-8</b> $5\ \mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Dépôt résine SU-8 3005 de $5\ \mu\text{m}$ , $v_{rot} = 3500\ \text{rpm}$ . Recuit : $95\ ^\circ\text{C}$ , 3 min. Détourage (acétone).
9	f)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec ouvertures pour connexions électriques, $\lambda = 365\ \text{nm}$ , dose de $200\ \text{mJ}^2\ \text{cm}^{-1}$ . PEB : $95\ ^\circ\text{C}$ , 3 min. Développement : bain de PGMEA pendant 3 min. Recuit final (rampe) : $125\ ^\circ\text{C}$ , 2 min.

TABLEAU 3.4 – Première partie du protocole pour la réalisation d'actionneurs (bobines spirales). Les lettres (a-f) se réfèrent à la Fig. 3.14.

Étape	Schéma	Description
10	g)	<b>Métallisation</b> - Dépôt couche d'accroche et métal par évaporation : Ti/Au 50/50 nm.
11	h)	<b>Dépôt AZ 40XT</b> 13 $\mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Dépôt résine AZ 40XT de 13 $\mu\text{m}$ , $v_{rot} = 5000 \text{ rpm}$ . Recuit : 126 °C, 4 min (2 min de mise en température). Détourage (acétone).
12	h)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec bobines spirales, $\lambda = 405 \text{ nm}$ , dose de 450 $\text{mJ}^2 \text{ cm}^{-1}$ . PEB : 105 °C, 90 s (mise en température de 20 s). Développement : bain de MF CD 26 pendant 1 min puis rinçage à l'eau DI.
13	i)	<b>Électrodéposition</b> 5 $\mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Bain de croissance électrolytique. Densité de courant : 1 $\text{A}^2 \text{ cm}^{-1}$ . Temps de dépôt de l'ordre de 20 min, en fonction de la surface à croître et de l'épaisseur souhaitée (5 $\mu\text{m}$ ).
14	-	<b>Retrait AZ 40XT</b> - Dissolution du moule en AZ 40XT avec un nettoyage (jet / bain) à l'acétone.
15	j)	<b>Attaque des couches d'accroche</b> - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. La couche d'or est attaquée avec une solution de KI + $\text{I}_2$ (bain d'environ 30 s). La couche de titane est attaquée par un bain de HF 5%, pendant environ 20 s. Contrôle visuel au microscope pour les deux opérations.
16	k)	<b>Dépôt SU-8</b> 10 $\mu\text{m}$ - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Dépôt résine SU-8 de 10 $\mu\text{m}$ , $v_{rot} = 900 \text{ rpm}$ . Recuit (rampe) : 95 °C, 7 min. Détourage (acétone).
17	k)	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec ouvertures pour connexions électriques, $\lambda = 365 \text{ nm}$ , dose de 200 $\text{mJ}^2 \text{ cm}^{-1}$ . PEB (rampe) : 95 °C, 3 min. Développement : bain de PGMEA pendant 5 min. Recuit final (rampe) : 125 °C, 2 min.
18	i)	<b>Laminage DF</b> 20 $\mu\text{m}$ (ou 50 $\mu\text{m}$ ) - Plasma $\text{O}_2$ , 200 W, 2 min. Laminage niveau supérieur : P = 2 bar, v = 1 m/min, T = 65 °C. Découpe et retrait du liner.
19	-	<b>Photolithographie</b> - Insolation : masque avec réseau fluide et ouvertures connexions électriques, $\lambda = 365 \text{ nm}$ , dose de 250 $\text{mJ}^2 \text{ cm}^{-1}$ . PEB (rampe) : 100 °C, 5 min. Développement : cyclohexanone, 2 + 2 min.
...25	l)	<b>Répétition (<math>\times 3</math>) des étapes 18 et 19</b> - Les temps de PEB et de développement augmentent avec les niveaux.

TABLEAU 3.5 – Deuxième partie du protocole pour la réalisation d'actionneurs (bobines spirales). Les lettres (g-j) se réfèrent à la Fig. 3.14. Le "+" entre deux durées pour une étape de développement indique que le bain a été renouvelé.



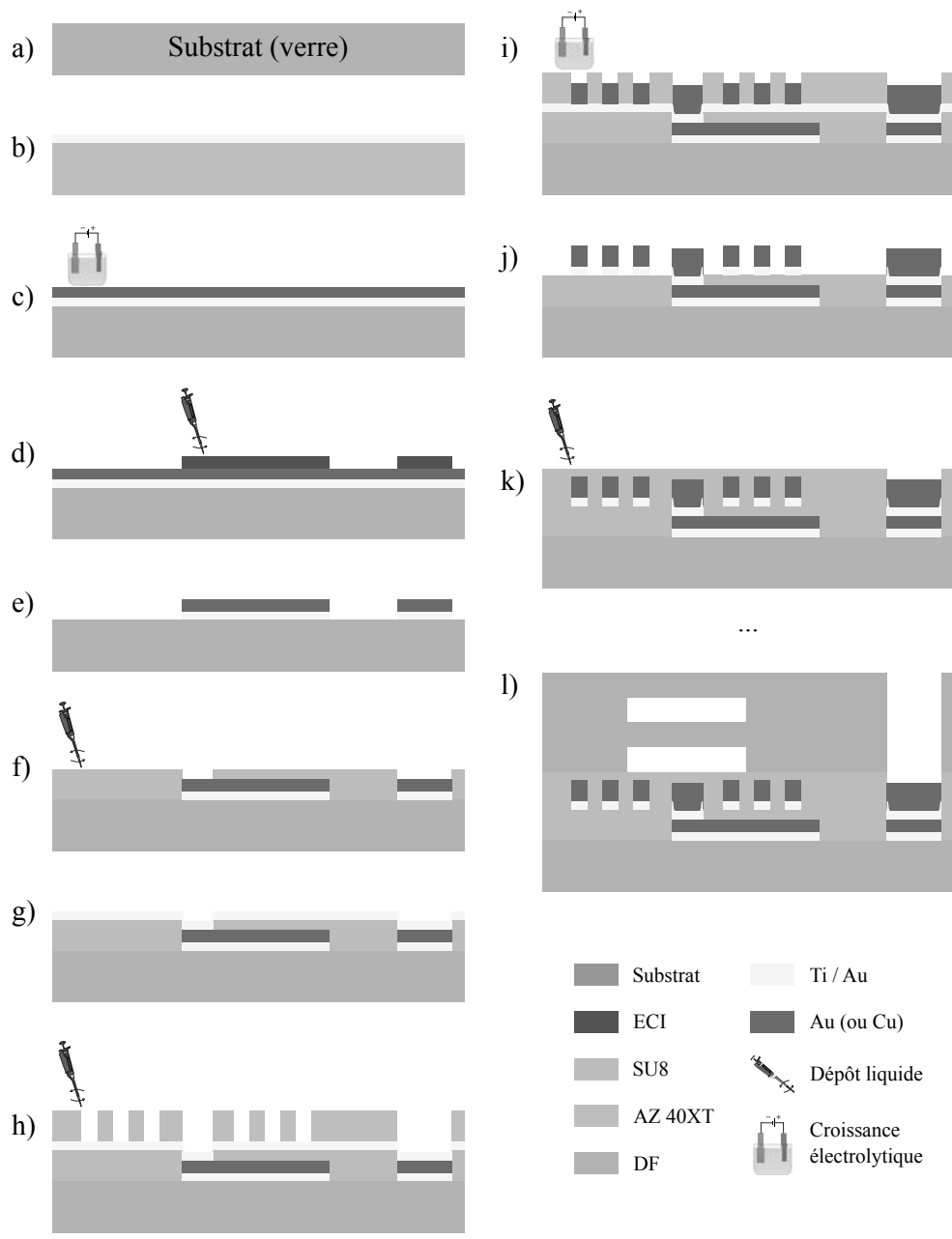


FIGURE 3.14 – Procédé de fabrication d'un dispositif magnéto-microfluidique comprenant des bobines spirales et un réseau de canalisations 3D. Deux étapes de métallisation, deux étapes d'électrodéposition et huit étapes de photolithographie (quatre dépôts liquides et autant de laminages) sont nécessaires. Les différentes opérations sont détaillées dans le texte et dans les tableaux 3.4 et 3.5.

électriques (microbobines).

### 3.4.2.1 Bobines filaires

La Fig. 3.15 présente quelques points de contrôle et résultats de fabrication pour les bobines filaires. Après la recharge électrolytique pour la création des bobines et le retrait de la résine, l'attaque de la couche de base est réalisée. Il faut s'assurer que les couches d'or et de titane (couche d'accroche) ont bien été dissoutes, ce qu'on vérifie au microscope optique (a). La géométrie des bobines est contrôlée de trois manières : au microscope optique, au profilomètre mécanique (épaisseur), et au microscope électronique à balayage, qui permet d'observer avec une plus grande résolution (d-e).

On remarque que la granularité du dépôt électrolytique est différente selon le métal employé : le cuivre (a) est constitué de grains beaucoup plus fins que l'or (b-d). Ce n'est pas un problème pour nos systèmes, la résistivité électrique étant conforme à ce que l'on attendait.

La résistance de chaque bobine est mesurée pour chaque puce, en utilisant une station sous pointe automatisée (mesure de 120 circuits par wafer, pour 3 wafers). La Fig. 3.15 f) présente les mesures obtenues pour un dispositif de piégeage (photos c et e) : pour chaque métal les résistances sont voisines, la variation étant due à des longueurs différentes pour les pistes connectant les bobines. Ces mesures permettent de remonter à des valeurs de résistivité électrique pour chaque métal :  $\sigma_{Cu} = 6.24 \text{ S m}^{-1}$ ,  $\sigma_{Au} = 3.85 \cdot 10^7 \text{ S m}^{-1}$ ,  $\sigma_{Au,r} = 3.12 \cdot 10^7 \text{ S m}^{-1}$ . On note en premier lieu que ces valeurs sont proches de ce qui existe dans la littérature (densité satisfaisante pour la croissance électrochimique), et que la résistance de l'or décroît de près de 20% après un recuit. Le cuivre reste le meilleur matériau en terme de conductivité, mais est plus sujet à l'oxydation lors du procédé (plasma O<sub>2</sub>).

La partie fluide est observée étage par étage au microscope optique (vérification de l'alignement et du bon développement des canaux), comme le montrent les images (b) et (c).

### 3.4.2.2 Bobines spirales

Les dispositifs à bobines spirales sont plus complexes à construire (nombres d'étapes plus élevé), mais les techniques de contrôle sont identiques : microscope optique, électronique, profilomètre mécanique, et mesures de résistivité sous pointes. La Fig. 3.16 montre la réalisation de deux types de bobines spirales à 10 spires, l'une circulaire et l'autre carrée. Le design de séparation verticale met en jeu des bobines en série (gain de place et deux contacts permettent d'alimenter trois bobines en même temps). Cela implique une bonne circulation du courant dans les trois bobines et les trois vias reliant les pistes inférieures et supérieures (a). L'alignement des vias est particulièrement important (b), et doit être précis à 5 µm près pour que toutes les bobines du wafer soient connectées : le phénomène de contraintes mécaniques imposées par la résine désaligne de manière antagoniste des côtés opposés du wafer.

Les images M.E.B. (c-d) ainsi que le profilomètre mécanique permettent de mesurer que des fils conducteurs de 5 × 5 µm de large et de haut sont bien obtenus.

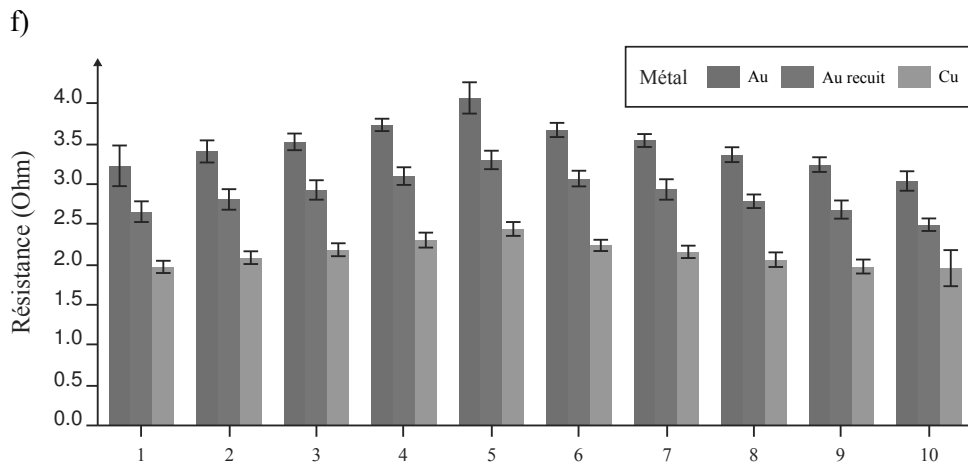
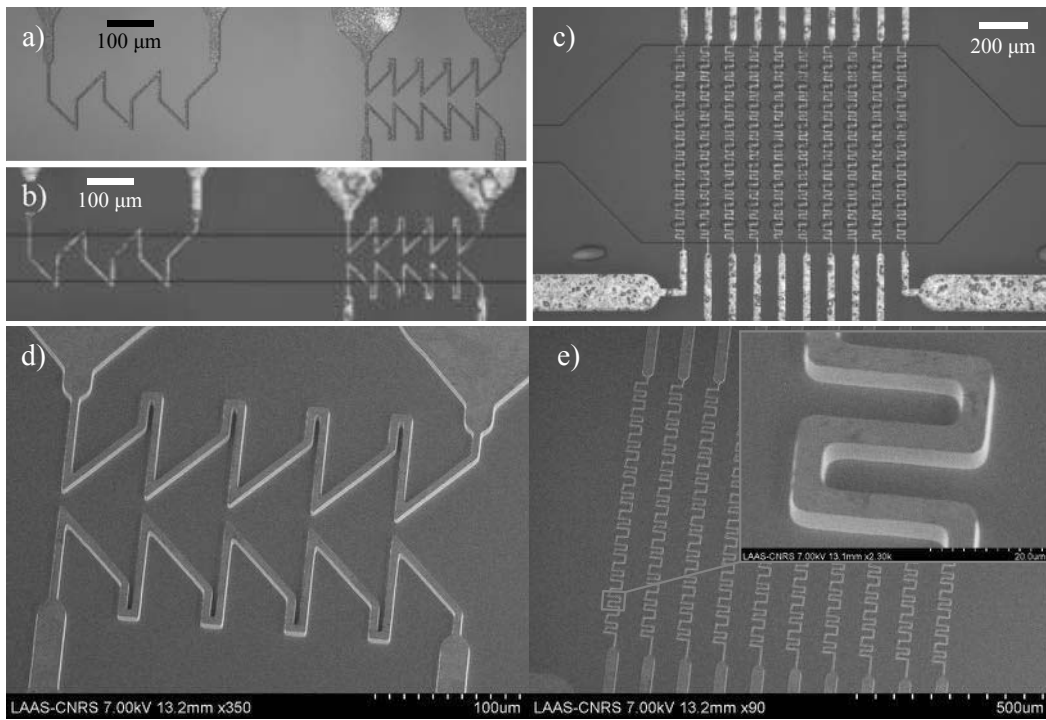


FIGURE 3.15 – Caractérisation des dispositifs comprenant des bobines filaires. a) Image au microscope optique de bobines (focalisation) en cuivre. b) Image au microscope optique de bobines (focalisation) en or après ajout des canalisations. c) Idem que b) pour des systèmes de piégeage. d) Observation au M.E.B. d’une bobine (focalisation) de cuivre. e) Observation au M.E.B. d’un tableau de bobines (piégeage) en or. f) Mesures des résistances de bobines (piégeage) pour chaque matériau employé.

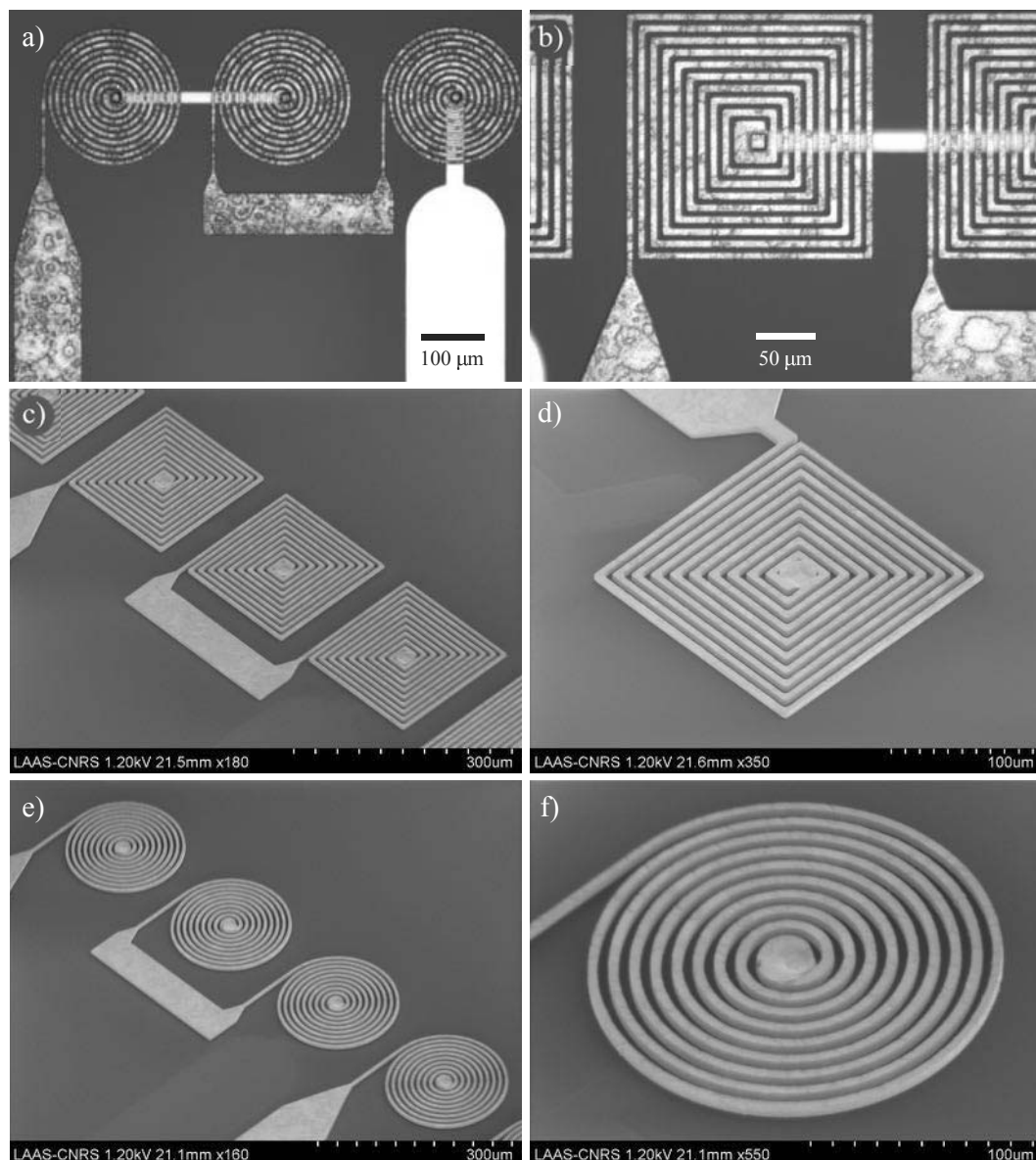


FIGURE 3.16 – Caractérisation des bobines spirales. a-b) Images au microscope optique d’une série de bobines spirales circulaires (a) et carrées (b). c) Image M.E.B. d’une série de trois bobines spirales carrées connectées. d) Zoom de c). e) Image M.E.B. de quatre bobines spirales circulaires (les trois de gauche sont connectées en série). f) Zoom de e).

La Fig. 3.17 montre ainsi l'intégration sur un même dispositif de canalisations 3D obtenues par laminage de films secs (DF) et des bobines spirales (à 2 niveaux de pistes électriques).

Un système combinant les dispositifs fluidiques en bypass et des bobines spirales a été réalisé (c), ainsi qu'un autre système comprenant des mélangeurs 3D et des bobines carrées (d). Toutes les images sont présentées avant ajout du capot final (permet de voir les contours en lumière blanche). Les niveaux fluidiques (a-b) sont bien résolus et ne présentent pas de défauts. Les bulles (points blancs) visibles sont de l'air piégé lors des étapes de laminage, mais ne sont pas en contact avec les canalisations et ne présentent pas de problème pour le système. On distingue également l'ouverture de la séparation centrale au dessus de la zone de piégeage (deux bobines de droite sur e). Enfin les canalisations de sortie (f) bifurquent, celle du bas sur l'image (niveau inférieur) disposant d'autres bobines et éventuellement électrodes pour d'autres opérations de détection et séparation, et celle du haut sur l'image (niveau supérieur) se dirigeant directement vers une sortie fluidique.

### 3.5 Montages expérimentaux et intégration

Une fois le wafer et les puces obtenues, l'étape suivante est de faire le lien entre le système intégré (puce) et l'expérience à réaliser. Cette partie est par conséquent dédiée à l'instrumentation nécessaire autour du dispositif.

#### 3.5.1 Intégration et support de puce

Pour des raisons de coût et de gain de temps, il est logique de vouloir obtenir une puce la plus petite possible, afin d'en obtenir un nombre maximum par wafer. Dans le cas présent, cette intensification du procédé n'est pas limitée par les techniques de fabrication (il est possible de construire un canal microfluidique combiné à des microbobines sur quelques millimètres carrés seulement), mais par la taille des connectiques et les contraintes d'observation.

Pouvoir disposer, sur une même puce, d'une dizaine de microbobines (ou électrodes) est adapté aux fonctions que l'on souhaite développer. De même, en incorporant les étapes de mélange et de séparation sur la même puce, cinq entrées / sorties fluidiques sont nécessaires. Enfin la puce doit être observable au microscope à fluorescence.

Pour les connexions fluidiques, la limite est imposée par le type de connecteurs utilisés (Idex / UpChurch), et qui présentent le plus souvent un diamètre d'environ 6 mm. La solution la plus compacte pour les connexions électriques repose sur des connecteurs à ressort, pour lesquels des carrés de 800  $\mu\text{m}$  de côté suffisent. Ces choix permettent de dimensionner les puces, qui sont des carrés de 18 mm de côté. La Fig. 3.18 présente les dispositifs obtenus (wafer entier et puce individuelle).

Le type de substrat utilisé (silicium, verre ou substrat souple), outre les spécificités dues à la microfabrication, sont guidés par les contraintes liées à l'observation. Historiquement, au laboratoire, les deux types de connexion (fluidiques et électriques) ainsi que l'observation se faisaient du même côté (avec un microscope droit). Cela implique que les positions des

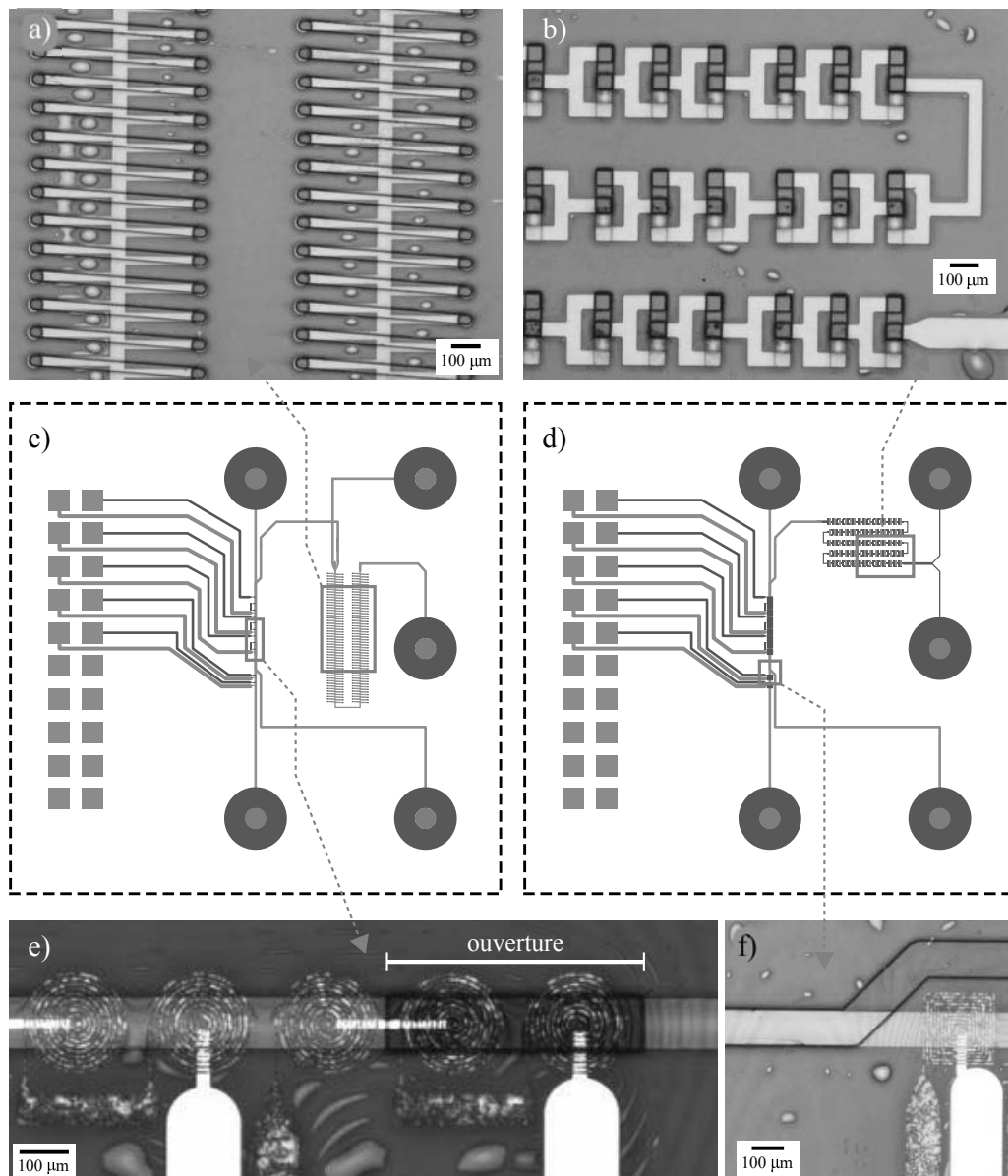


FIGURE 3.17 – Caractérisation de la partie fluide des dispositifs à bobines spirales. a-b) Images au microscope optique de structures fluidiques 3D : en bypass (a) et mélangeur (b). c) Masque d'une puce combinant les bypass 3D et des bobines spirales circulaires. d) Masque d'une puce combinant des mélangeurs 3D et des bobines spirales carrées. e) Image au microscope optique de la zone de séparation (ouverture fluide). f) Image au microscope optique de la sortie du dispositif (les canaux qui sont déjà séparés par une couche intermédiaire bifurquent vers des sorties différentes). Toutes les images sont montrées dans le dernier niveau de film sec présent (capot). Les encadrés rouges sur c) et d) correspondent aux emplacements des autres images.

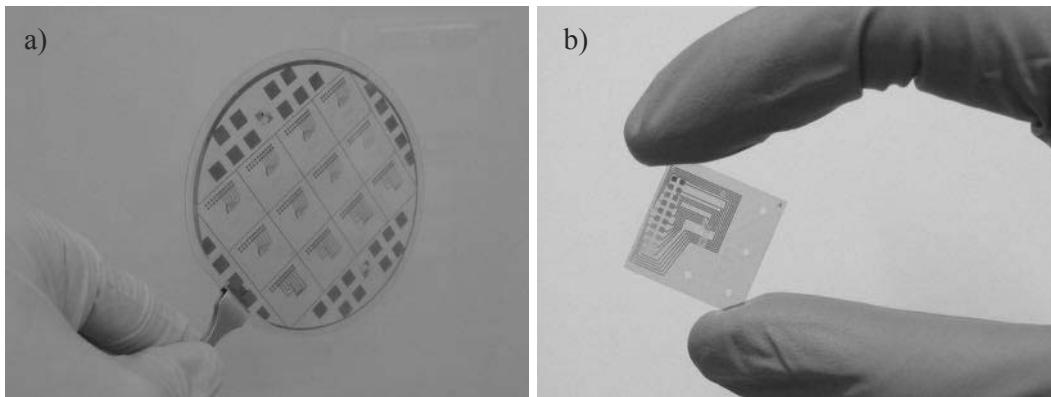


FIGURE 3.18 – Dispositifs obtenus après fabrication, combinant verre (substrat), résine et films époxy, et pistes métalliques (or). a) Wafer entier (4"). b) Puce individuelle (tableau de pièges magnétiques), 18 mm.

connexions doivent être suffisamment espacées pour pouvoir approcher un objectif, et que la visualisation des entrées / sorties sont impossibles. En pratique, ces entrées / sorties peuvent être sujettes à des bouchons de résine (fabrication), et d'autres blocages peuvent être induits par un amas de cellules ou de billes. . . Il paraît donc indispensable de pouvoir visualiser ces zones critiques. En utilisant un substrat transparent, l'observation au travers du substrat (en face arrière de la puce) devient possible. Le substrat souple est une option intéressante mais non retenue car le maintien mécanique de la puce est plus complexe à mettre en œuvre, voire impossible si l'on souhaite combiner une bonne étanchéité (joints) et une observation en face arrière. C'est donc la solution d'un substrat en verre qui a été choisie : un microscope inversé a été utilisé, les connexions se font ainsi en face avant et l'observation en face arrière.

Un support mécanique de la puce est nécessaire pour assurer plusieurs fonctions :

- mise en compression de joints toriques entre le distributeur fluidique et la puce (assure l'étanchéité de la connexion),
- maintien de la puce et support pour les connecteurs électriques à ressort,
- positionnement des aimants permanents par rapport à la puce.

La Fig. 3.19 présente le support de puce utilisé (schéma éclaté et photographie une fois assemblé). Un distributeur fluidique à 5 connecteurs, comprenant des joints toriques, est utilisé pour l'injection et la récupération de liquides, tout comme pour le chapitre précédent (voir la partie 2.5.3 pour plus de détails).

Pour les connexions électriques, des connecteurs à ressort (autrement appelés pogo pins) ont été choisis, ils sont placés sur une petite carte PCB qui les relie à un autre connecteur puis à la carte électronique contrôlant le courant électrique traversant chaque bobine (voir partie suivante). Cette carte est elle même montée sur une plateforme de guidage linéaire, le contact électrique est alors établi en vissant une vis de précision.

Les aimants permanents, pour les systèmes hybrides, peuvent être placés de chaque côté de la puce. Des cales en plastique de différentes épaisseurs servent à faire varier l'espacement entre les aimants et la puce. Enfin les longueur et largeur du support sont de 10 cm et 6 cm ce

qui le rend compatible avec les platines de microscope à disposition.

Cette configuration de puce et de support a été utile pour réaliser les expériences de focalisation, déviation et piégeage lors de ces travaux de thèse, ainsi que lors d'autres travaux combinant des canaux microfluidiques et des électrodes (mesures d'impédance) sur la même puce. Il s'agit d'une approche pratique, qui a dû être réalisée en peu de temps et qui n'est pas exempte de défauts. L'observation en face arrière implique par exemple de visualiser les objets circulant dans les canalisations au travers des microbobines, ce qui permet une approche qualitative mais devient limitante pour du suivi (notamment dans le cas des bobines spirales qui présentent une densité de fil conducteur importante). Par ailleurs la plupart des objectifs à fort grossissement ( $> 40 X$ ) et dotés d'une bonne ouverture numérique sont prévus pour une utilisation sur des distances de travail courtes ( $\leq 170 \mu\text{m}$ , correspondant à des lamelles de verre), condition non respectée avec des substrats de verre de  $500 \mu\text{m}$  : des objectifs spéciaux ou à plus faibles grossissement doivent donc être préférés, ou le procédé de fabrication doit être adapté pour des substrats de verre de  $170 \mu\text{m}$  (plus complexe étant donnée la fragilité du wafer).

#### 3.5.2 Alimentation des bobines

Un des points forts des systèmes magnétiques actifs et hybrides est la possibilité d'être contrôler via l'intensité qui parcourt les électro-aimants. La force magnétique appliquée peut ainsi être finement ajustée, en terme d'intensité, de sens (répulsion / attraction) et varier en fonction du temps. L'instrumentation nécessaire au pilotage des microbobines a donc son importance, le dispositif héritant directement de ses fonctionnalités.

Avant de choisir et concevoir cette instrumentation, il est primordial d'établir une liste de caractéristiques souhaitées. Idéalement, étant donnée la nature des systèmes, le nombre de bobines à contrôler et le contexte d'utilisation (simplicité, interface éventuelle avec d'autres équipements...), le dispositif de pilotage devrait intégrer les fonctions suivantes :

- contrôle de 10 voies (bobines),
- possibilité d'injecter au minimum 150 mA dans chaque voie,
- contrôle de la polarité (sens du courant injecté),
- interface informatique (commande et lecture de l'intensité réalisées avec un ordinateur),
- automatisation (en autonomie ou via un ordinateur),
- compacité (doit s'intégrer à l'environnement d'un microscope).

Les solutions déjà existantes pour l'alimentation de micro-systèmes font appel à des sources de courant continu qui alimentent des porte-pointes. Ces équipements sont onéreux et encombrant, les possibilités d'interface informatique simple sont réduites, par ailleurs les porte-pointes sont maintenus avec un système magnétique, non compatible avec les systèmes hybrides, et leur taille permet de placer au mieux 4 pointes, et non 20 (2 par bobine).

Par conséquent une instrumentation spécifique a été développée au laboratoire. Afin de gagner en rapidité, une solution associant une carte conçue au laboratoire à une carte Arduino Mega (fournissant une interface électronique et logicielle complète à un micro-contrôleur Atmel) a



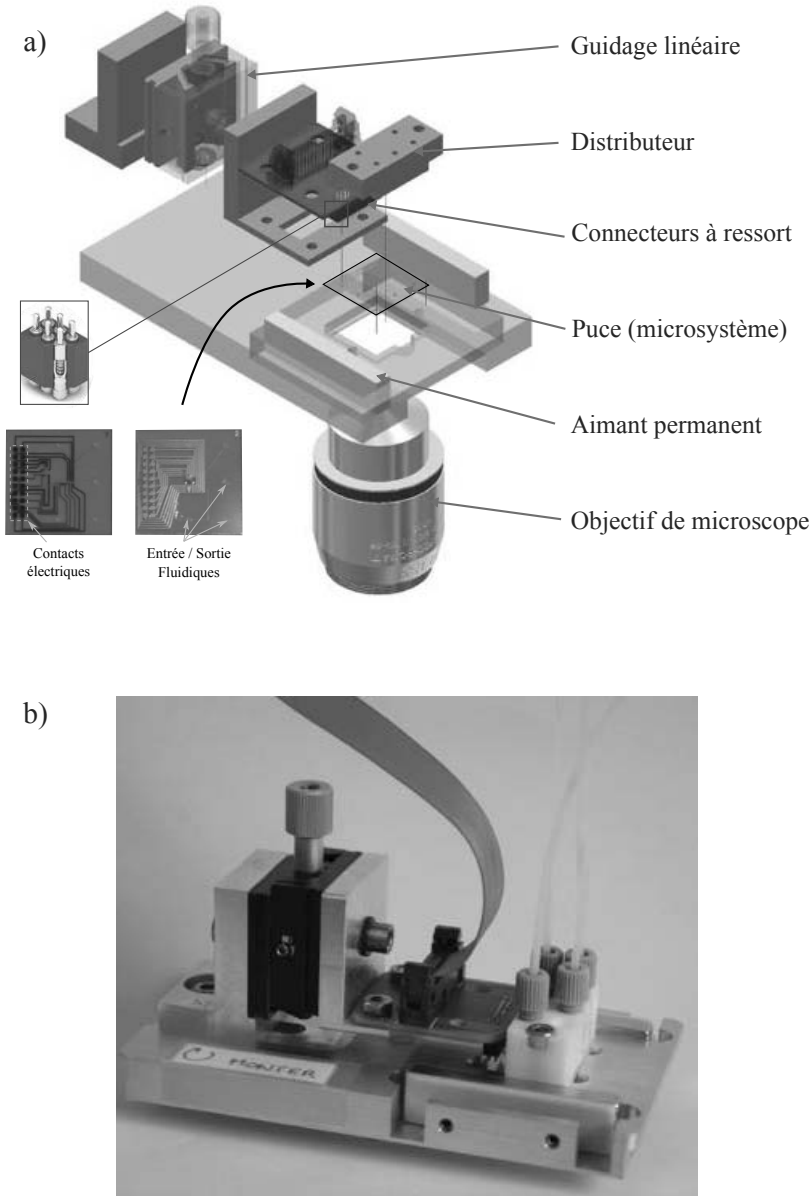


FIGURE 3.19 – Support de puce pour le dispositif magnétofluidique. a) Schéma éclaté du support. b) Photographie du support une fois assemblé.

été adoptée. La carte responsable du contrôle du courant est montée en "bouclier" au-dessus de la carte Arduino, profitant des nombreuses connexions (pins) disponibles. L'Arduino gère la communication avec un ordinateur de manière très simple (interface série), et reste une solution libre!

La Fig. 3.20 résume l'approche mise en œuvre pour le contrôle de l'intensité. Les bobines sont connectées d'un côté à l'alimentation (+5 V), et de l'autre à la masse. Un multiplexeur positionné aux bornes des bobines permet d'invertir le sens de connexion de la bobine, et par conséquent le sens de courant circulant au travers. Le multiplexeur est commandé directement par une sortie digitale de l'Arduino (0 ou 5 V). Afin de moduler l'intensité du courant, un contrôleur de courant est positionné sur le circuit des bobines, au niveau de la masse. Comme pour le multiplexeur, le contrôleur de courant est commandé par un "pin" digital de l'Arduino (associé à une LED pour savoir si la voie est active), mais doit recevoir également une tension analogique correspondant au courant désiré. Cette tension est fournie par un convertisseur digital - analogique (DAC), qui est piloté par l'Arduino via une interface série. Pour terminer avec le circuit des bobines, afin d'avoir un retour sur la valeur du courant imposé, un ampèremètre est ajouté. Il s'agit en réalité d'un composant retournant une tension correspondant à la différence de tension aux bornes d'une résistance (placée en série sur le circuit des bobines). Cette tension est mesurée avec les entrées analogiques de l'Arduino.

Toutes les commandes (sorties digitales et interface série jusqu'au DAC) ainsi que la lecture de l'entrée analogique sont gérées par le micro-contrôleur de l'Arduino et transmises depuis et vers un ordinateur via une autre interface série (connexion USB). Un pilote (libre et multiplateforme, fourni par Arduino) et un programme écrit en Python (2.7) disposant d'une interface graphique (bibliothèque PyQt, voir Fig. 3.21) forment ainsi le lien entre l'utilisateur et le contrôleur de courant.

Le choix des composants a en partie été guidé par la réalisation d'une précédente carte de nature voisine (C. Escriba, R. Fulcrand), s'appuyant sur le même principe de contrôle de l'intensité électrique. Les références du contrôleur d'intensité et de l'ampèremètre (tension de sortie proportionnelle à la différence de potentiel mesuré aux bornes d'une résistance de  $1\ \Omega$  placée sur le circuit des bobines) ont été conservées car leurs caractéristiques conviennent (limite de 180 mA pour le contrôleur, version disponible avec un gain de 50 pour l'ampèremètre) et ils ont fait leurs preuves. Le multiplexeur permet de gérer deux circuits de bobines (réduction du nombre de composants) et supporte les intensités d'utilisation. Au laboratoire, Loïc Recoules a permis d'identifier un DAC convenant parfaitement à la carte. Enfin les connecteurs permettent de lier les 10 voies (20 points de contacts) entre la carte "bouclier" et une autre carte plus petite, comprenant des connecteurs à ressorts directement en contact avec la puce. Les références des composants sont listées dans le tableau 3.6.

La carte électronique de contrôle du courant a été réalisée afin qu'elle puisse s'insérer au-dessus de la carte Arduino, elle présente donc les mêmes dimensions. Le routage a requis six niveaux de cuivre pour le PCB. Une photographie de l'instrumentation une fois terminée est montrée Fig. 3.21 a).

La partie commande et contrôle des bobines n'est pas négligeable car elle occupe une place

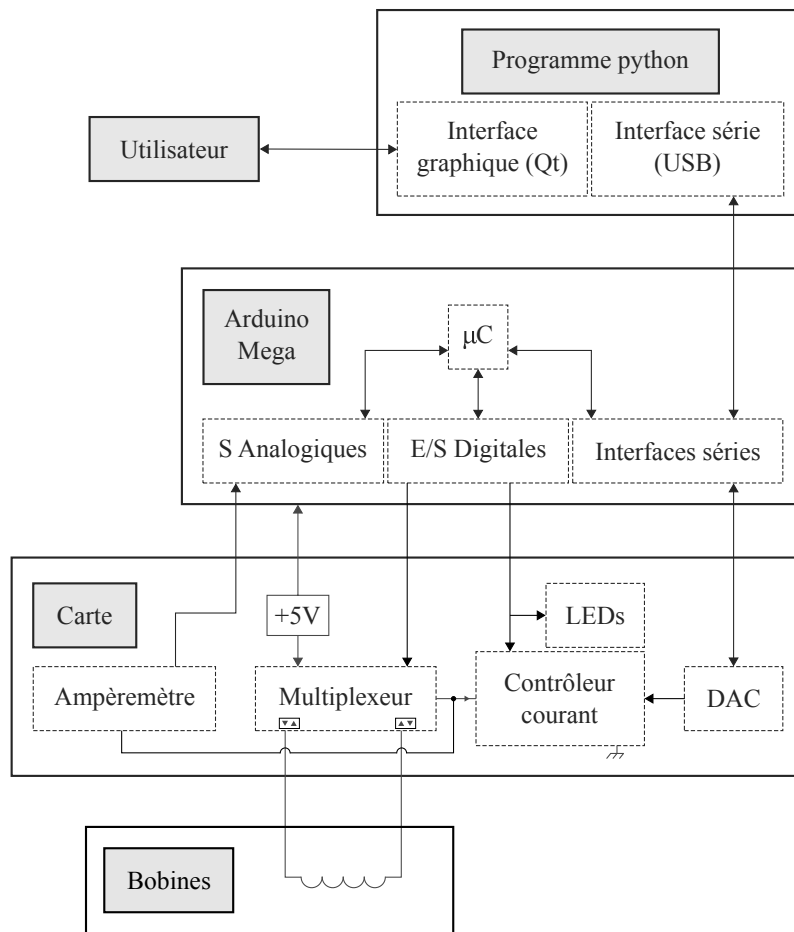


FIGURE 3.20 – Schéma du procédé de contrôle de l'intensité du courant électrique parcourant les électro-aimants. L'utilisateur, le programme informatique (écrit en Python), la carte Arduino et la carte de contrôle développée au laboratoire sont représentés. Les fils représentant le circuit électrique des bobines entre l'alimentation et la masse sont colorés en bleu. Le reste des fils et flèches sont des indications de communication et commandes (couleur noire).

Composants	Références
Contrôleur intensité	MAX1916
Ampèremètre	MAX4073
Multiplexeur	ADG888
DAC	AD8802
Connecteurs cartes	Harwin M50-3551042
Connecteurs à ressort	Mill-Max Double Row Series 855

TABEAU 3.6 – Récapitulatif des principaux composants utilisés dans la carte électronique pour le contrôle de l'intensité électrique dans les microbobines.

### 3.5. Montages expérimentaux et intégration

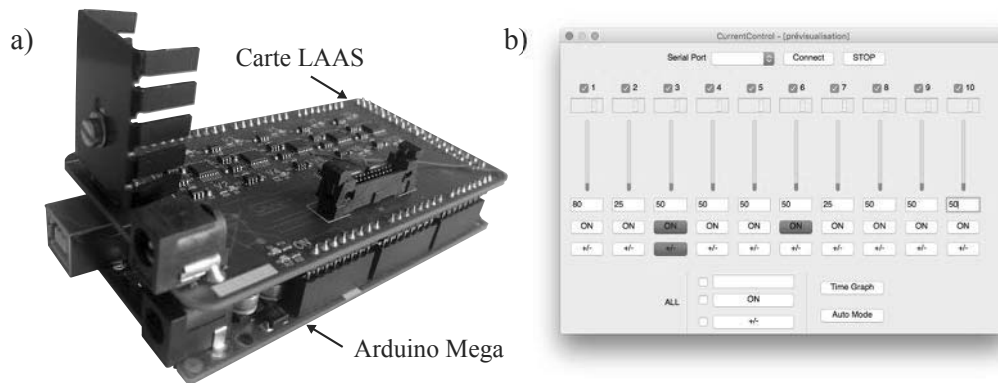


FIGURE 3.21 – Instrumentation pour le contrôle de l’intensité, une fois finalisée. a) Cartes électroniques (assemblage de deux cartes). b) Interface graphique du programme Python.

centrale dans le choix technologique des systèmes actifs et hybrides, dont la valeur ajoutée est la commande (temporelle et en intensité) de la force magnétique appliquée. Cette instrumentation de contrôle a rempli son rôle lors des différentes expériences menées. Les programmes pilotant l’interface et les différentes fonctionnalités peuvent être encore enrichis mais ont apporté satisfaction lors de ces travaux. Enfin ce système s’avèrera être d’autant plus utile dans le contexte d’études pour lesquelles les fréquences d’allumage ou de renversement de polarité des bobines sont plus élevées.

#### 3.5.3 Sédimentation

Les microparticules superparamagnétiques utilisées lors de ces travaux sont plus denses que l’eau (ou que les tampons employés) et par conséquent sédimentent. L’enjeu est de pouvoir réaliser les expériences avec une concentration en particules connue et si possible homogène dans les microcanaux (ou du moins à l’entrée du système). Cela implique de pouvoir maintenir ces microbilles denses en suspension à la fois dans les réservoirs (tubes eppendorf), dans les capillaires ou éventuellement dans des réservoirs intégrés.

Dans la partie 3.1.2, un bilan des forces en vue des calculs de trajectoire avait été établi. Dans le cas d’une particule plongée dans un liquide au repos, les forces de gravité, la poussée d’Archimède et la force de traînée (régime de Stokes) sont rappelées :

$$\mathbf{F}_g + \mathbf{F}_a = V_p(\rho_{\text{flu}} - \rho_p)\mathbf{g} \quad (3.17)$$

$$\mathbf{F}_t = -6\pi r_p \mu_{\text{flu}} \mathbf{v}_p. \quad (3.18)$$

La vitesse terminale de chute de la particule est obtenue en considérant l’accélération nulle, les forces s’équilibrent et on obtient, en projetant sur un axe  $\hat{z}$  de même direction que la gravité :

$$v_t = \frac{2}{9} \frac{r_p^2 (\rho_{\text{flu}} - \rho_p) g}{\mu_{\text{flu}}} \quad (3.19)$$

Type	Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	$\rho$ ( $\text{kg}^3 \text{m}^{-1}$ )	$v_t$ ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	$Re_p$
MyOne	1.05	1700	0.4	$4.4 \cdot 10^{-7}$
M-280	2.83	1400	1.7	$4.9 \cdot 10^{-6}$
M-450	4.40	1600	6.3	$2.8 \cdot 10^{-5}$
Monocytes THP-1	15	1.065	8.0	$1.2 \cdot 10^{-4}$

TABLEAU 3.7 – Propriétés physiques, vitesses terminales de chute et nombre de Reynolds particulaire des billes et cellules utilisées.

Les application numériques pour les billes et cellules employées dans les expériences sont regroupées dans le tableau 3.7. La loi de Stokes (cas d'un écoulement rampant) n'est considérée précise que dans les cas où le Reynolds particulaire  $Re_p = \frac{\rho_{\text{flu}} d_p v_t}{\mu_{\text{flu}}}$  est inférieur à 0.1. Le  $Re_p$  est donc rappelé et l'utilisation de la loi de Stokes est effectivement correcte.

Les valeurs de vitesses terminales indiquent qu'en solution de densité proche de l'eau, les billes et cellules sédimentent rapidement à l'échelle des canalisations. Ces valeurs de l'ordre de quelques  $\mu\text{m s}^{-1}$  soulignent la nécessité de prendre en compte la sédimentation lors du design des dispositifs et du choix des vitesses de fonctionnement (tri vertical). Par ailleurs les cellules sont un cas particulier étant donné le confinement appliqué (cellules d'environ  $15 \mu\text{m}$  pour des canaux de 20 à  $50 \mu\text{m}$  de hauteur. Les parois jouent alors un rôle important et il est difficile de prévoir les trajectoires des cellules, d'autant plus lorsqu'elles sont marquées...

Au delà même de l'intérieur de la puce microfluidique, la sédimentation pose un problème dans les systèmes d'injection. Si l'on souhaite évacuer une suspensions de billes M-450 d'un tube de 1 cm de diamètre, sans que ces billes sédimentent, cela impose un débit d'environ  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ , soit une vitesse moyenne de  $25 \text{ cm s}^{-1}$  (!) dans une canalisation de  $20 \mu\text{m}$  de haut et  $100 \mu\text{m}$  de large. Pour des réservoirs intégrés d'environ 5 mm de diamètre, on divise par 4 : cela revient à  $6 \text{ cm s}^{-1}$  dans le canal microfluidique... De même, des capillaires de  $300 \mu\text{m}$  de diamètre interne dont la direction est vers le haut (opposée à la gravité) imposeraient des débits conséquents pour ne pas avoir de sédimentation. La vitesse du flux autour de la particule doit être nettement supérieure à la vitesse terminale de chute, y compris près des bords (profil parabolique).

Un système d'agitation est donc nécessaire dans les réservoirs pour commencer. L'agitation magnétique (barreau aimanté) qui est traditionnellement utilisée est dans notre cas exclue (particules magnétiques). Quelques configurations (fabrication "artisanale") employées sont présentées sur la Fig. 3.22.

Une agitation mécanique (tube dans une plateforme sur un vortex) a été envisagée, mais d'une part des mouvements de "va et vient" étaient observés dans les microcanaux (oscillations de la pression dues aux mouvements du liquide dans le tube), d'autre part les mouvements et vibrations étaient transmis aux capillaires et en moindre mesure au support de puce, mais suffisamment tout de même pour ne pas avoir une observation propre. Sans mentionner qu'il n'est évidemment pas souhaitable d'avoir une pièce en mouvement ou des vibrations à proximité d'un microscope pour l'observation.

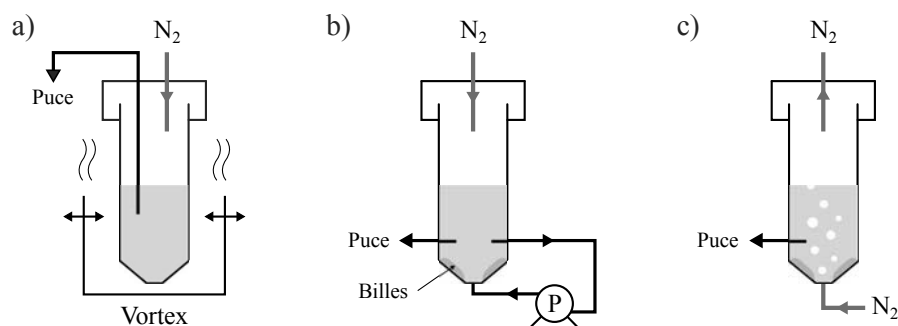


FIGURE 3.22 – Dispositifs visant à limiter la sédimentation de particules magnétiques ou cellules dans les réservoirs d’injection. a) Agitation mécanique à l’aide d’un vortex. b) Circulation de liquide dans le bas du réservoir induite par une micropompe. c) Bullage d’azote par le fond du réservoir. Sur toutes les configurations le contrôle de l’injection de liquide vers la puce microfluidique est assuré en pression ( $N_2$ ). Aucune de ces configurations ne s’est révélée satisfaisante.

Une autre approche a été de générer une recirculation de liquide dans le réservoir, avec une micropompe péristaltique (Mikrotechnik). Une sortie latérale et une entrée par le bas du réservoir assurent le refoulement, alors qu’une deuxième sortie est connectée au système microfluidique (l’injection est réglée avec un contrôleur de pression). Malheureusement la forme du réservoir (fond trop peu incliné) n’a pas permis une bonne homogénéisation (dépôt de particules). En outre il est difficile de connaître la concentration localement, et un contrôle du niveau est nécessaire.

Enfin une solution mettant en place une injection d’azote par le bas du réservoir a été testée, mais posait le même problème que la précédente solution (dépôt de particules au fond du tube), et du gaz risque d’être injecté dans le microsystème...

L’utilisation de pousse-seringues (contrôle en débit) ne constitue pas une alternative : les particules sédimentent également dans les seringues. Les capillaires font également partie du problème : malgré l’apport d’une agitation mécanique (vibreurs identiques à ceux des téléphones portables) - qui perturbe l’observation par ailleurs - un débit minimal est nécessaire.

Toutes ces solutions sont fastidieuses à mettre en œuvre et en général non (ou peu) reproductibles, et c’est pourquoi, lors de ces travaux de thèse, la présence, la position ou la vitesse des objets (obtenues par visualisation au microscope) ont été les variables observées, n’ayant pas accès à la concentration injectée des particules ou cellules.

La sédimentation a été dans l’ensemble un phénomène délicat à contourner, mais d’autres solutions peuvent être envisagées. Il faut mentionner le développement de la microfluidique en gouttes, qui par la production de gouttes à hautes fréquences (utilisées par la suite à des débits plus faibles éventuellement), s’affranchit du problème. Une autre idée à développer serait, en utilisant un microsystème hybride, de pouvoir stocker une quantité de particules donnée à l’entrée du dispositif, puis d’éjecter (répulsion) de petites quantités sur demande, formant une succession de paquets. Divers systèmes d’agitation peuvent être imaginés, mais la compatibilité avec une taille d’échantillon faible (quelques microlitres) est complexe à

assurer.

### 3.6 Conclusion

L'intégration et l'utilisation d'actionneurs magnétiques dans des dispositifs microfluidiques étaient le sujet de ce chapitre. Les modèles permettant de calculer les champs d'excitation et de force magnétique ont d'abord été introduits. On soulignera l'utilisation de la notion de gradient efficace de champ d'excitation magnétique,  $\mathbf{G}$ , qui est adaptée à la comparaison de différentes sources magnétiques [109]. Les modèles employés sont simples mais précis, nous avons montré qu'ils permettent de se passer dans notre cas de la méthode des éléments finis, plus longue et délicate à mettre en œuvre.

La combinaison d'aimants permanents, créant un champ magnétique localement homogène, et de microbobines, le tout formant un système hybride, a été employée lors de l'ensemble des expériences. Deux familles d'électro-aimants ont été conçues : les bobines dites filaires, et les bobines spirales.

Des fonctions de focalisation (deux designs de bobines testés) et de piégeage ont pu être démontrées avec les bobines filaires. Nous avons fourni la preuve de concept de la manipulation de microbilles magnétiques se déplaçant à des vitesses de l'ordre du  $\text{mm s}^{-1}$ , en appliquant des intensités de courant électrique compatibles avec des applications biologiques.

Deux cas de figure ont été distingués pour les bobines spirales. Utilisées seules, elles peuvent être intégrées à un système de séparation vertical. L'étude de ce type de séparateur ayant été réalisée lors de travaux antérieurs, nous nous sommes concentrés sur la problématique de l'intégration et de la disposition de fonctions à la fois de pré-traitement de l'échantillon et de séparation sur la même puce. Des dispositifs couplant les réacteurs étudiés au chapitre 2 et des groupes de bobines spirales ont été fabriqués avec succès, et se sont avérés fonctionnels (test de remplissage, caractérisation des bobines).

Les mêmes bobines, utilisées dans le cadre d'un système hybride, peuvent former des aiguilleurs (focalisation de billes magnétiques d'un côté ou de l'autre d'une canalisation). Encore une fois, la preuve de concept a été apportée, en utilisant de faibles intensités (50 mA).

Le procédé technologique utilisé pour la fabrication des puces est assez standard. Il a tout de même nécessité quelques développements pour atteindre les épaisseurs de résine souhaitables, ainsi que pour l'adaptation de la partie fluide (notamment 3D), présentée au chapitre précédent.

Un des intérêts principaux de l'utilisation d'électro-aimants est le caractère contrôlable, non permanent, des champs magnétiques (et *a fortiori* de l'intensité électrique parcourant les bobines). Le contrôle de l'intensité revêt donc un enjeu important, c'est pourquoi nous avons développé une instrumentation spécifique. Une carte électronique pouvant être utilisée en autonomie, ou reliée à un programme informatique (libre) pilotant l'intensité a donc été réalisée. Au delà du contrôle, un support permettant l'interface de l'instrumentation externe (électrique et fluide) avec la puce, ainsi que le maintien des aimants permanents, a été

conçu et a permis une plus grande robustesse et flexibilité lors des expériences.

Enfin la limitation majeure qui a été rencontrée pour l'exploitation de ces systèmes a été l'injection des billes magnétiques. L'homogénéisation de la solution avant injection est contrainte par la sédimentation et/ou l'agrégation des particules. De surcroit, même en partant d'une solution homogène, la sédimentation reste possible dans les capillaires entre les réservoirs et la puce. Un travail d'ingénierie reste donc à accomplir pour dépasser cet obstacle. Malgré une perte de charge plus importante, des capillaires plus fins peuvent par exemple être employés, ou un distributeur incluant des réservoirs agités pourrait être imaginé.





# Conclusion

## Le bilan

Comment concevoir une plateforme microfluidique pour la manipulation magnétique de cellules à partir d'échantillons complexes ? Telle était la problématique à laquelle nous nous sommes efforcés de répondre au travers de ces travaux de thèse. Comme le montre la structure de ce manuscrit, chaque partie du problème a été adressée séparément (tri cellulaire, opérations de marquage, et actionnement magnétique) avant de réaliser une synthèse, symbolisée par l'intégration de deux de ces opérations sur une même puce.

Le procédé de microfabrication, reposant sur le laminage de films secs photosensibles, libère des contraintes de design importantes, et rend possible la réalisation de dispositifs en trois dimensions. La compatibilité avec les procédés standards nous permet d'affronter le challenge qu'est l'intégration d'opérations différentes (unités fluidiques / actionneurs magnétiques) au sein d'un même dispositif.

Cet avènement de la microfluidique 3D a un impact sur les nouvelles fonctions possibles et sur leur plus grande efficacité. Parmi toutes les techniques de tri passives répertoriées (1.3.2), la filtration hydrodynamique a été retenue et étudiée. Une approche 3D a amené à l'adaptation de cette technique pour concevoir un réacteur fonctionnant spécifiquement avec des particules ou cellules. Un modèle pour leur fonctionnement a pu être décrit et validé, par ailleurs le marquage de monocytes avec ces systèmes a été montré. Nous avons également opté pour la conception d'un autre réacteur, basé sur la transformée du boulanger, et plus polyvalent. Celui-ci a permis de réaliser le mélange de solutions contenant des espèces moléculaires (fluorescéine) ou des particules, ainsi qu'une réaction de marquage de monocytes par des billes magnétiques.

Pour compléter ces opérations de traitement de l'échantillon, nous nous sommes attelés à la conception d'actionneurs magnétiques. Les systèmes hybrides, couplant aimants permanents et microbobines, ont montré des performances intéressantes (gradient efficace de champ magnétique  $G$  de l'ordre de  $10^2 \text{ T m}^{-1}$ ), et ce même à des intensités de courant électrique faibles (50 mA). Les preuves de concepts pour des fonctions de focalisation, de piégeage (à l'échelle de la cellule unique) et d'aiguillage ont été apportées, et ce pour des vitesses de particules de l'ordre du  $\text{mms}^{-1}$ . Enfin, dans le cadre de microbobines spirales seules (sans aimants permanents), nous avons montré l'intégration d'un étage de traitement de l'échantillon (réacteurs) et de manipulation (actionneurs), pour former un séparateur vertical.

### Les limites

Des verrous technologiques et techniques sont apparus tout au long de ces travaux. Certains, comme le blocage de canaux par de la résine lors de la fabrication, ou le remplissage des puces, ont pu être identifiés et contournés ou résolus (piliers empêchant l'effondrement des couches, rampes de température pour les PEB, instrumentation appropriée pour l'injection). En revanche un travail de développement est toujours nécessaire pour arriver à injecter dans les microcanaux une solution homogène de microbilles magnétiques, de concentration connue, et de manière contrôlée. On pourra citer les systèmes fluidiques à gouttes par exemple, pour lesquels la sédimentation de billes ou cellules, de toute manière piégées dans des gouttes, importe moins.

De manière générale, il a été noté une certaine difficulté - ou un antagonisme - entre l'aspect fonctionnel d'un dispositif et les techniques de caractérisation possibles. L'observation *in canalis* de monocytes et billes magnétiques peut se faire à faibles vitesses, ce qui est incompatible avec la sédimentation, mais qui permettrait pourtant de remonter à des paramètres intéressants (cinétiques pour la réaction de marquage). De même, pour les actionneurs magnétiques, une bonne dissipation thermique (pour limiter l'impact de l'effet Joule) va de pair avec un substrat en silicium et des pistes électriques les plus larges possibles, rendant la visualisation très délicate pour des systèmes intégrés. Une solution évoquée est d'introduire une carte fluidique intermédiaire (en COC ou PMMA par exemple) pour déporter les connectiques fluidiques et électriques et disposer de suffisamment d'espace pour un objectif de microscope. On peut y voir un parallèle avec des composants (notre puce microfluidique) connectés via un PCB (une carte fluidique).

### Et après ?

Les systèmes présentés dans ce manuscrit ont certes demandé plusieurs années de développement, mais ne sont pas moins représentatifs du jeune âge de la microfluidique 3D et du balbutiement de l'intégration complexe en microfluidique. Il faut donc placer ces dispositifs en perspective d'une amélioration continue. L'efficacité et un débit traité d'échantillon toujours plus grands sont par exemples recherchés pour la filtration hydrodynamique. Des résultats préliminaires, non exposés dans ce document, montrent qu'il est possible, pour y parvenir, d'aborder une approche de parallélisation. Celle-ci est rendue possible par la microfluidique 3D, où la distribution des entrées / sorties vers de nombreux étages en parallèle est permise.

Il en est de même pour les actionneurs magnétiques : l'introduction de nouveaux éléments, tel qu'un matériau ferromagnétique doux (Nickel, Permalloy...) offre des possibilités intéressantes. Au lieu d'une matrice de pièges pour cellules uniques qui doit être activée en permanence, on peut imaginer magnétiser des plots de Nickel (avec des aimants permanents), sous lesquels on placerait des bobines filaires adressables. Toutes les particules ou cellules seraient piégées au niveau des plots, et relâchées sélectivement en appliquant un pulse de courant dans une (ou plusieurs) bobine(s), générant une force de répulsion qui contrebalancerait la force d'attraction du/des plot(s) correspondant(s).

Les systèmes magnéto-fluidiques continueront, il est probable, de se développer et de s'améliorer. Les particules magnétiques autour desquelles ils sont souvent centrés sont disponibles pour de très nombreuses applications, bactériologiques, génétiques, immunologiques. . . Elles suscitent un vif intérêt auprès de la communauté, tant au niveau de leur fabrication que de leur utilisation, et pérennisent de ce fait les nouvelles approches microfluidiques les concernant.

Mêmes les techniques de séparation microfluidiques décrites il y a une décennie revêtent toujours un fort potentiel applicatif. Nos efforts concernant la filtration hydrodynamique ayant permis d'atteindre des tailles de séparation sub-micrométriques, des équipes étudiant les microparticules sanguines ont manifesté leur intérêt pour collaborer sur ces technologies. Un projet visant à concevoir des dispositifs de tri spécifiques a ainsi déjà commencé au LAAS.



# Abréviations

APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster de différenciation
CMOS	Complementary metal–oxide–semiconductor
COC	Cyclic Olefin Copolymer
COP	Cyclic Olefin Polymer
CTCs	Cellules Tumorales Circulantes
DI (eau)	DésIonisée
DLD	Deterministic Lateral Displacement
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FEM	Méthode des éléments finis
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MEMS	Micro Electro Mechanical Systems
NHS	N-hydroxysuccinimide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	Printed Circuit Board
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Poly(dimethylsiloxane)
PEB	Post Exposure Bake
PET	Poly(éthylène terephtalate)
PGMEA	Propylene glycol monomethyl ether acetate
PI	Polyimide
PMMA	Poly(MethylMethAcrylate)
PS	PolyStyrène
PTFE	Poly(tetrafluorométhylène)
PVC	Poly(vinyl chloride)
TPP	Two photons polymerization
UV	Ultra Violet



# A

## Compléments d'introduction

### A.1 Tri cellulaire classique

Cette partie dédiée aux méthodes de tri cellulaire classiques (hors du contexte des laboratoires sur puces) peut être considérée comme un préambule aux techniques employées essentiellement en microfluidique. Les méthodes de tri cellulaire les plus courantes font appel à des outils macroscopiques.

**La centrifugation** se base sur la différence de densité des composants à séparer. Elle est largement utilisée pour séparer les constituants du sang : les globules rouges sont au fond du tube, le plasma est en surface et les autres cellules (globules blancs...) forment une fine épaisseur entre les deux, appelée couche leucocytaire (voir Figure A.1 a). L'utilisation d'un gradient de densité (ajout d'un composé à forte masse molaire, tels le Ficoll, l'iodixanol...), ou la lyse des globules rouges, permettent de diminuer la contamination lors du prélèvement de cette couche leucocytaire.

**La filtration par membrane** trie les cellules en fonction de leurs tailles et de leurs propriétés mécaniques. Elle consiste à faire passer l'échantillon à travers une membrane comprenant des pores calibrés (8  $\mu\text{m}$ ) : les globules rouges traversent, alors que les autres cellules, plus grandes et moins souples, restent piégées (Figure A.1 b) et c). Les inconvénients résident dans le temps d'analyse (pour chaque membrane) et dans l'agglutination (pores bouchés).

**Les marqueurs** L'utilisation des anticorps comme marqueurs de surface permet une bonne spécificité, le multiplexage, et est souvent la seule solution pour différencier un type de population cellulaire. Ils peuvent être couplés à des fluorophores ou enrober des micro-nano billes magnétiques, pour un tri par cytométrie en flux ou magnétique.

**FACS** La cytométrie en flux reste *a priori* la technique permettant de travailler à la fréquence la plus élevée (près de 100 000 cellules triées par seconde, Beckman Coulter). Chaque cellule est encapsulée dans une goutte, puis dirigée au travers du faisceau d'un ou plusieurs lasers (plus de 15 fluorophores et des paramètres morphologiques peuvent être analysés). Si la cellule a été marquée, la fluorescence de l'anticorps est détectée (photodétecteur), et une décision est envoyée au trieur. Celui-ci est composé d'un système d'éjection des cellules



## Annexe A. Compléments d'introduction

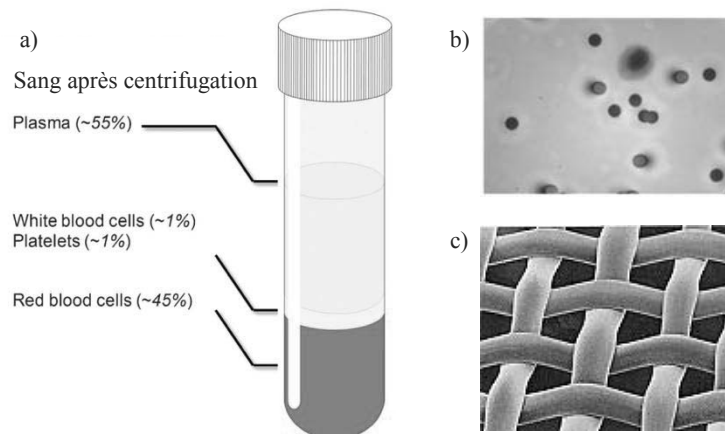


FIGURE A.1 – Méthodes de centrifugation et de filtration. a) Composition d'un tube contenant du sang après filtration (tiré de la revue de M. Kersaudy-Kerhoas et E. Sollier [15]). b) Technique d'isolation par taille de cellules endothéliales tumorales (ISET) [201]. La cellule en bleu est une cellule circulante de mélanome. c) Filtres "classiques" de la société Biodesign (CellMicroSieves™).

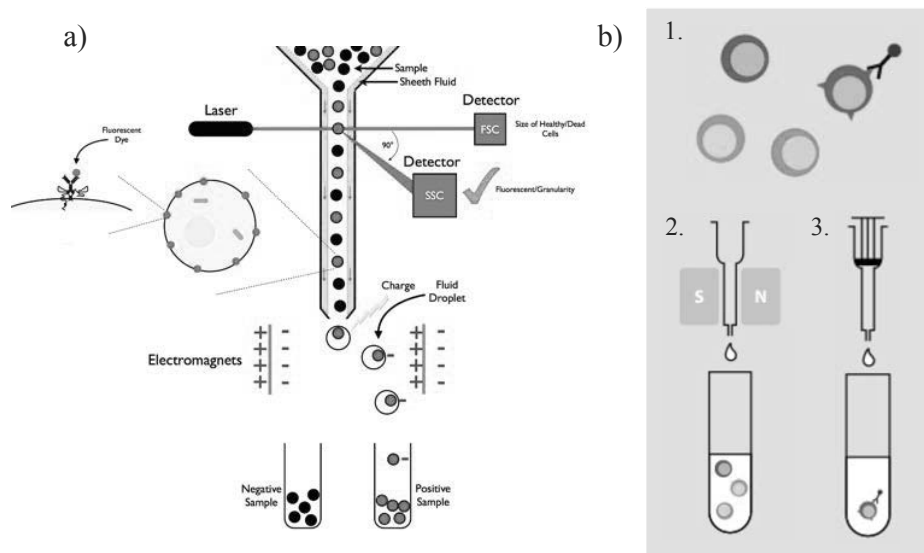


FIGURE A.2 – Techniques FACS et MACS. a) Principe de la FACS : illustration tirée de la thèse de Sari Sabban (2011, University of Sheffield). b) Principe de la MACS : figures (modifiées) provenant de la brochure "MACS®Technology" de Miltenyi Biotec. 1. Marquage (en général immunologique) avec des microbilles magnétiques. 2. Séparation magnétique à l'aide d'un aimant et d'une colonne de séparation contenant une matrice ferromagnétique. 3. Éluion des cellules marquées en rinçant la colonne.

formant un aérosol (la cellule est dans une goutte d'eau en contact avec l'air), et d'électrodes qui appliquent un champ électrique statique pour dévier cette goutte (voir le principe Figure A.2 a).

Les cytomètres en flux sont rapides mais requièrent un pré-traitement de l'échantillon (souvent une lyse pour l'élimination des globules rouges), ce qui allonge le temps d'analyse et les manipulations. Il faut ajouter que les petits nombres de cellules (petits échantillons) ne peuvent pas être traités avec une grande fiabilité [14]. D'autre part ce sont des équipements chers, complexes, et qui demandent des coûts de fonctionnement (entretien, marqueurs fluorescents) conséquents.

**MACS** Le tri cellulaire par activation magnétique (MACS en anglais) repose sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes des anticorps d'intérêt. Les cellules cibles sont donc non plus attachées à des anticorps fluorescents, mais à des billes magnétiques que l'on peut déplacer dans un champ magnétique non uniforme (typiquement avec un aimant). Le premier système commercial a été proposé par Miltenyi Biotec [108], utilisant des nanoparticules et des colonnes de séparation présentant un fort gradient de champ magnétique (voir Figure A.2 b). Le procédé est moins cher que l'utilisation d'un FACS, mais il est plus long (étapes de préparation de l'échantillon, lavages multiples...).

Un autre exemple d'utilisation courante de cette technologie est l'enrichissement de cellules circulantes tumorales (CTCs) : le seul système commercial accepté aux Etats-Unis par la FDA (Cellsearch®, de Veridex) opère par tri magnétique, en utilisant des nanoparticules avec un anticorps a priori spécifique des CTCs (EpCAM). Les cellules capturées sont ensuite imagées et comptées.

Ces quelques techniques utilisées à échelle macroscopique sont encore des standards à l'heure actuelle, et présentes dans la plupart des laboratoires. Des adaptations, améliorations, et nouvelles méthodes ont été introduites à l'échelle des microsystèmes.



# B Écoulements et diffusion en microcanaux

## B.1 Profils de vitesse

### B.1.1 Écoulement dans un cylindre

On détaille ici le calcul d'un écoulement de Poiseuille, dans une canalisation de section circulaire (exemple typique d'un capillaire). Le but est de déterminer les champs de pression et vitesse en tout point de l'écoulement (noté  $M$  dans la Figure B.1).

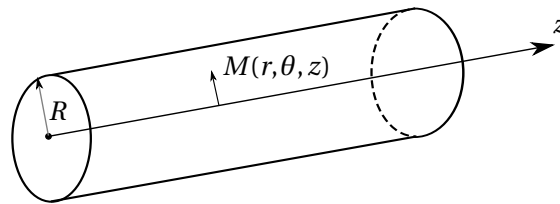


FIGURE B.1 – Cylindre de rayon  $R$  dans lequel s'écoule le fluide.

Hypothèses :

- écoulement stationnaire,
- le fluide est un liquide incompressible,
- régime à faibles vitesses,
- à la paroi du cylindre, la vitesse est nulle (condition de non glissement).

L'écoulement est unidirectionnel, selon l'axe  $z$ . D'autre part, on observe une invariance par toute rotation autour de l'axe  $z$  donc le champ de vitesse est de la forme  $\vec{v}(M) = v_z(r, z)\vec{e}_z$ . On considère la loi de conservation de la matière, et l'écoulement est incompressible donc

$$\nabla \cdot \vec{v} = \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \quad \text{et} \quad \vec{v}(M) = v_z(r)\vec{e}_z. \quad (\text{B.1})$$

L'équation de Navier-Stokes est à résoudre :

$$\underbrace{\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho \vec{v} \cdot \nabla \vec{v}}_0 = -\nabla p + \mu \vec{\Delta} \vec{v} \quad (\text{B.2})$$

## Annexe B. Écoulements et diffusion en microcanaux

---

La dérivée temporelle est nulle car l'écoulement est stationnaire, et le terme de convection est aussi nul car l'écoulement est unidirectionnel ( $v_r = v_\theta = 0$ ) et incompressible ( $\frac{\partial v_z}{\partial z} = 0$ ).

L'équation se simplifie et devient linéaire :

$$\nabla p = \mu \vec{\Delta} \vec{v} = \mu \Delta v_z \vec{e}_z. \quad (\text{B.3})$$

Soit, en géométrie cylindrique :

$$\frac{\partial p}{\partial z} = \mu \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial v_z}{\partial r} \right) = C. \quad (\text{B.4})$$

Le premier membre est une fonction de  $z$ , le deuxième est une fonction de  $r$ , et sont donc constants ; ainsi le champ de pression ne dépend que de  $z$ , et on peut intégrer l'équation selon  $r$ .

$$\frac{dp}{dz} \frac{1}{2} r^2 + C_1 = r \mu \frac{\partial v_z}{\partial r} \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{dp}{dz} \frac{r}{2\mu} + \frac{C_1}{\mu r} = \frac{\partial v_z}{\partial r} \quad (\text{B.6})$$

$$v_z = \frac{dp}{dz} \frac{r^2}{4\mu} + \frac{C_1}{\mu} \ln r + C_2. \quad (\text{B.7})$$

Les conditions aux limites sont que  $v_z$  admet un maximum (dérivée nulle) en  $r = 0$  et que  $v_z(r = R) = 0$ .

$$\boxed{v_z = -\frac{1}{4\mu} \frac{dp}{dz} (R^2 - r^2)} \quad (\text{B.8})$$

En intégrant sur la surface du cylindre, on peut obtenir le débit volumique, et on peut en tirer la vitesse moyenne de l'écoulement.

$$Q_v = \iint_{\Sigma} \vec{v} \cdot \vec{dS} = \int_0^R v_z(r) dr \quad (\text{B.9})$$

$$Q_v = -\frac{\pi R^4}{8\mu} \frac{dp}{dz} \quad (\text{B.10})$$

$$v_{moy} = -\frac{R^2}{8\mu} \frac{dp}{dz} \quad (\text{B.11})$$

### B.1.2 Écoulement dans un canal de section rectangulaire

La plupart des applications en microfluidique font appel à des canaux à section rectangulaire. On décrit ici un écoulement de Poiseuille dans ce type de canaux. Ces calculs sont basés sur le livre "Theoretical microfluidics" de Bruus[199], s'y référer pour d'autres géométries.

La géométrie considérée est celle de la Figure B.2 : il s'agit d'un canal rectangulaire de hauteur  $h$ , de largeur  $w$ , et l'origine des axes  $O$  est prise au bas du canal au centre ( $z \in [0; h]$ ,  $y \in [-\frac{w}{2}; \frac{w}{2}]$ ).

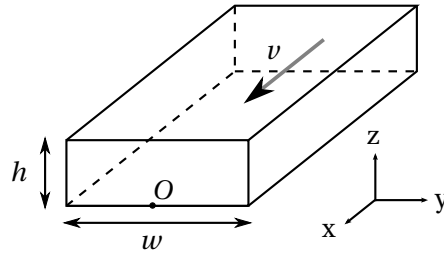


FIGURE B.2 – Canal de hauteur  $h$  et largeur  $w$  dans lequel s'écoule le fluide.

Hypothèses :

- écoulement stationnaire,
- le fluide est un liquide incompressible,
- régime à faibles vitesses,
- aux parois, la vitesse est nulle.

L'écoulement est unidirectionnel (selon l'axe  $x$ ), et l'invariance translationnelle selon l'axe  $x$  implique que le champ de vitesse est de la forme  $\vec{v}(M) = v_x(y, z)\vec{e}_x$ .

La différence de pression est appliquée de manière constante et selon  $x$ . On part de l'équation de Navier-Stokes B.2 et on applique les mêmes simplifications pour obtenir :

$$\nabla p = \mu \vec{\Delta} \vec{v} = \mu \Delta v_x \vec{e}_x. \quad (\text{B.12})$$

Avec les conditions aux limites suivantes :

$$v_x(y, z) = 0 \text{ pour } y = \pm \frac{w}{2}, z = 0, z = h. \quad (\text{B.13})$$

En coordonnées cartésiennes, nous devons donc résoudre l'équation suivante :

$$\frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial z^2} = -\frac{\nabla p}{\mu} \quad (\text{B.14})$$

cependant elle n'admet pas de solution analytique. Une des méthodes pour parvenir à une solution est le développement en séries de Fourier. Nous commençons par exprimer les différentes fonctions en développant selon la variable  $z$  (hauteur du canal).

Pour vérifier les conditions aux limites ( $v_x(y, 0) = v_x(y, h) = 0$ ), on utilisera des termes propor-

## Annexe B. Écoulements et diffusion en microcanaux

---

tionnels à  $\sin(n\pi z/h)$ , où  $n$  est un entier positif. Si on change l'origine du repère (et que  $O$  est au centre du canal en  $z$  par exemple, il faut bien entendu changer de développement)...

Le terme de droite de l'équation précédente devient (en sommant les  $n$  impairs uniquement) :

$$-\frac{\nabla p}{\mu} = -\frac{\nabla p}{\mu} \frac{4}{\pi} \sum_{n, \text{imp.}}^{\infty} \frac{1}{n} \sin(n\pi \frac{z}{h}) \quad (\text{B.15})$$

Les coefficients pour le champ de vitesse dépendent de  $y$  étant donné que nous développons la série selon  $z$  :

$$v_x(y, z) = \sum_{n=1}^{\infty} f_n(y) \sin(n\pi \frac{z}{h}). \quad (\text{B.16})$$

On injecte cette expression de la vitesse dans l'équation B.14, on obtient :

$$\frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial z^2} = \sum_{n=1}^{\infty} \left[ f_n''(y) - \frac{n^2 \pi^2}{h^2} f_n(y) \right] \sin(n\pi \frac{z}{h}). \quad (\text{B.17})$$

D'après l'équation B.14, les coefficients de B.16 et de B.17 doivent être égaux termes à termes pour tout  $n$ . La solution doit donc satisfaire :

$$f_n(y) = 0 \quad \text{pour } n \text{ pair}, \quad (\text{B.18})$$

$$f_n''(y) - \frac{n^2 \pi^2}{h^2} f_n(y) = -\frac{\nabla p}{\mu} \frac{4}{\pi} \frac{1}{n} \quad \text{pour } n \text{ impair}. \quad (\text{B.19})$$

Afin de déterminer  $f_n(y)$ , il faut résoudre l'équation différentielle du second ordre, qui s'écrit comme la somme d'une solution homogène et d'une solution particulière.

On cherche une solution particulière sous la forme d'une constante, ce qui donne, toujours pour  $n$  impair :

$$f_n^p(y) = \frac{4h^2 \nabla p}{\pi^3 \mu} \frac{1}{n^3}. \quad (\text{B.20})$$

Pour trouver la solution homogène, il faut résoudre l'équation  $f_n''(y) - (n^2 \pi^2 / h^2) f_n(y) = 0$  qui a pour solution :

$$f_n^h(y) = A \cosh(\frac{n\pi}{h} y) + B \sinh(\frac{n\pi}{h} y). \quad (\text{B.21})$$

En tenant compte des conditions aux limites ( $f_n(\pm \frac{w}{2}) = 0$ ) et en ajoutant les solutions particu-

lière et homogène, on trouve la forme de  $f_n(y)$  pour les  $n$  impairs :

$$f_n(y) = \frac{4h^2 \nabla p}{\pi^3 \mu} \frac{1}{n^3} \left[ 1 - \frac{\cosh(n\pi \frac{y}{h})}{\cosh(n\pi \frac{w}{2h})} \right]. \quad (\text{B.22})$$

On peut maintenant écrire le champ de vitesse pour un écoulement de Poiseuille en canal rectangulaire.

$$v_x(y, z) = \frac{4h^2 \nabla p}{\pi^3 \mu} \sum_{n, \text{imp.}} \frac{1}{n^3} \left[ 1 - \frac{\cosh(n\pi \frac{y}{h})}{\cosh(n\pi \frac{w}{2h})} \right] \sin(n\pi \frac{z}{h}) \quad (\text{B.23})$$

À partir du champ de vitesse, on peut déduire le débit volumique à travers une surface  $\Sigma$  :  $Q_V = \iint_{\Sigma} \vec{v} \cdot \vec{dS}$ . Si la surface est rectangulaire, dans le cas général on intègre entre  $y_A$ ;  $y_B$  et  $z_A$ ;  $z_B$ , comme indiqué Figure B.3.

L'équation suivante est obtenue :

$$Q_v = \frac{4h^2 \nabla p}{\pi^3 \mu} \sum_{n, \text{imp.}} \frac{h}{n^4 \pi} \left( (y_B - y_A) - \frac{h}{n\pi} \frac{\sinh(\frac{n\pi y_B}{h}) - \sinh(\frac{n\pi y_A}{h})}{\cosh(\frac{n\pi w}{2h})} \right) \left( \cos(\frac{n\pi z_A}{h}) - \cos(\frac{n\pi z_B}{h}) \right) \quad (\text{B.24})$$

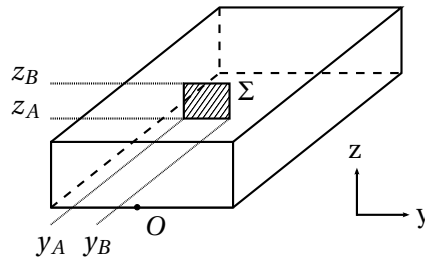


FIGURE B.3 – Calcul du débit volumique à travers une surface  $\Sigma$  dans le canal.

Après intégration du profil de vitesse sur la section du canal, on peut exprimer le débit volumique :

$$Q_v = 2 \int_0^{w/2} \int_0^h v_x(y, z) dy dz \quad (\text{B.25})$$

$$Q_v = \frac{h^3 w \nabla p}{12\mu} \left[ 1 - \sum_{n, \text{imp.}} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh(n\pi \frac{w}{2h}) \right]. \quad (\text{B.26})$$

D'autre part, si le canal possède une longueur  $L$ , et qu'on applique une différence de pression de part et d'autre du canal, on a  $\nabla p = \frac{\Delta p}{L}$  et on peut exprimer la résistance hydrodynamique



## Annexe B. Écoulements et diffusion en microcanaux

---

volumique de ce canal  $R = \frac{\Delta p}{Q_v}$ .

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w} \left[ 1 - \sum_{n, imp.}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right) \right]^{-1} \quad (\text{B.27})$$

## B.2 Diffusion 1D dans un micromélangeur

Le mélange en microfluidique est essentiellement basé sur la diffusion (nombre de Reynolds faible, pas d'écoulements turbulents...). On s'intéresse ici au cas d'un canal présentant un profil de vitesse plat, où une espèce moléculaire est injectée et présente un profil de concentration à un endroit précis du canal. On cherche à calculer ce profil de concentration à une position plus éloignée dans le sens de l'écoulement. Le résultat du calcul est tiré d'un rapport de 2009 du Pr. Larry Caretto de California State University, Northridge.

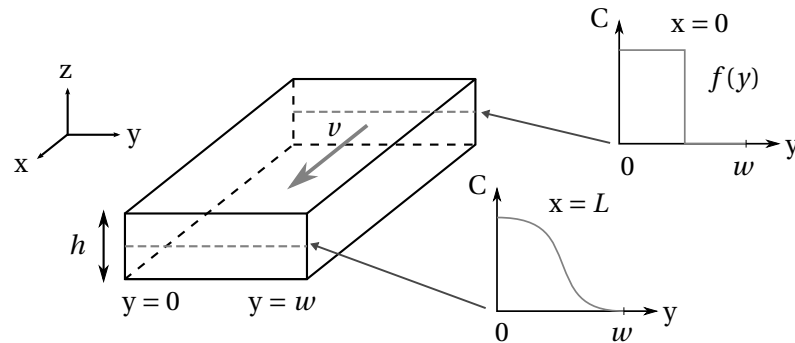


FIGURE B.4 – Schéma pour la géométrie et la notation du problème de diffusion.

La figure B.4 présente la géométrie à laquelle on s'intéresse. On notera que la hauteur  $h$  n'interviendra pas dans la résolution, car nous considérons uniquement un problème à une dimension (1D), où la concentration est dépendante uniquement des coordonnées  $x$  et  $y$ .

Les hypothèses suivantes sont adoptées :

- régime (écoulement, flux de matière) stationnaire,
- le fluide est un liquide Newtonien incompressible,
- l'écoulement est unidimensionnel,
- la vitesse est uniforme ( $\vec{v} = v_x \vec{e}_x$ ),
- la diffusion est normale (coefficient de diffusion  $D$  constant),
- le gradient de concentration (flux de matière) aux parois est nul,
- aucune production ou consommation de l'espèce (réactions chimiques...) n'est envisagée,
- la diffusion moléculaire (dans le sens de l'écoulement) est négligée par rapport à l'advection.

L'équation de diffusion-advection dans le cas général s'écrit :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) - \nabla \cdot (\vec{v} c) + S \quad (\text{B.28})$$

où  $c(x, y, z, t)$  est la concentration que l'on cherche à déterminer,  $D$  est le coefficient de diffusion,  $\vec{v}$  la vitesse du flux et  $S$  un terme de production/consommation de l'espèce considérée. D'après les hypothèses posées précédemment, les premier et dernier membres sont nuls,  $D$  et  $v$  sont constants et  $\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \ll \frac{\partial c}{\partial x}$ .

## Annexe B. Écoulements et diffusion en microcanaux

---

On obtient donc la forme simplifiée :

$$\frac{\partial c(x, y)}{\partial x} = \frac{D}{v} \frac{\partial^2 c(x, y)}{\partial y^2} \quad (\text{B.29})$$

soit encore, en définissant  $\delta = \frac{D}{v}$  :

$$\frac{\partial c}{\partial x} = \delta \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \quad (\text{B.30})$$

La condition initiale est :

$$c(0, y) = f(y) \quad (\text{B.31})$$

et les conditions aux limites sont :

$$\left. \frac{\partial c}{\partial y} \right|_{x, y=0} = \left. \frac{\partial c}{\partial y} \right|_{x, y=w} = 0 \quad (\text{B.32})$$

En outre, en considérant le régime permanent, la vitesse homogène, la diffusion négligeable selon la direction du flux, et la conservation de la masse, le flux de matière à travers une section de canal  $\Phi_m$  s'écrit :

$$\Phi_m = h \int_0^w \vec{j}_{\text{adv.}} \cdot dy = h \int_0^w v c(x, y) dy \Rightarrow \frac{\Phi_m}{vh} = \int_0^w c(x, y) dy = \text{cte.} \quad (\text{B.33})$$

Une méthode de résolution repose sur la séparation des variables. On pose l'hypothèse que  $c(x, y)$  s'écrit sous la forme d'une somme d'une constante et d'un produit de deux fonctions dépendantes seulement de  $x$  et de  $y$  :

$$c(x, y) = c_a(x, y) + c_b = X(x)Y(y) + c_b \quad (\text{B.34})$$

En remplaçant  $c(x, y)$  par sa nouvelle expression dans l'équation (B.30), on obtient :

$$Y(y) \frac{\partial X(x)}{\partial x} = \delta X(x) \frac{\partial^2 Y(y)}{\partial y^2} \quad (\text{B.35})$$

$$\frac{1}{\delta} \frac{1}{X(x)} \frac{\partial X(x)}{\partial x} = \frac{1}{Y(y)} \frac{\partial^2 Y(y)}{\partial y^2} \quad (\text{B.36})$$

Les membres à gauche et à droite sont dépendant uniquement de  $x$  et de  $y$  respectivement, et sont donc constants. On leur attribue (arbitrairement, pour faciliter l'expression des solutions) une constante,  $-\lambda^2$ , qui permet de revenir à deux équations différentielles ordinaires :

$$\frac{1}{\delta} \frac{1}{X(x)} \frac{\partial X(x)}{\partial x} = -\lambda^2 \text{ et } \frac{1}{Y(y)} \frac{\partial^2 Y(y)}{\partial y^2} = -\lambda^2 \quad (\text{B.37})$$

Les solutions générales s'écrivent :

$$X(x) = \alpha e^{-\lambda^2 \delta x} \quad (\text{B.38})$$

$$Y(y) = \beta \sin(\lambda y) + \gamma \cos(\lambda y) \quad (\text{B.39})$$

Donc la concentration admet comme solution :

$$c(x, y) = \alpha e^{-\lambda^2 \delta x} [\beta \sin(\lambda y) + \gamma \cos(\lambda y)] + c_b \quad (\text{B.40})$$

$$c(x, y) = e^{-\lambda^2 \delta x} [\epsilon_1 \sin(\lambda y) + \epsilon_2 \cos(\lambda y)] + c_b \quad (\text{B.41})$$

En prenant en compte les conditions aux limites :

$$\left. \frac{\partial c}{\partial y} \right|_{x,y} = e^{-\lambda^2 \delta x} [\lambda \epsilon_1 \cos(\lambda y) - \lambda \epsilon_2 \sin(\lambda y)]$$

$$\left. \frac{\partial c}{\partial y} \right|_{x,y=0} = 0 \Rightarrow e^{-\lambda^2 \delta x} \lambda \epsilon_1 = 0 \Rightarrow \epsilon_1 = 0, \text{ pour } \lambda \neq 0$$

$$\left. \frac{\partial c}{\partial y} \right|_{x,y=w} = 0 \Rightarrow e^{-\lambda^2 \delta x} \lambda \epsilon_2 \sin(\lambda w) = 0 \Rightarrow \sin(\lambda w) = 0, \text{ pour } \epsilon_2 \neq 0$$

La dernière équation (deuxième condition aux limites) admet une infinité de solutions, de la forme  $\lambda_n = \frac{n\pi}{w}$ . La solution la plus générale à l'équation (B.41) est une combinaison linéaire de l'ensemble (infini) de ces solutions particulières (fonctions propres orthogonales). En appelant  $C_n$  les coefficients, on écrit :

$$c(x, y) = c_b + \sum_{n=1}^{\infty} C_n e^{-\lambda_n \delta x} \cos(\lambda_n y), \text{ où } \lambda_n = \frac{n\pi}{w} \quad (\text{B.42})$$

Intéressons nous maintenant à la condition initiale :

$$c(0, y) = f(y) = c_a(0, y) + c_b \quad (\text{B.43})$$

Posons  $g(y) = f(y) - c_b \Rightarrow c_a(0, y) = g(y)$ , soit :

$$g(y) = \sum_{n=1}^{\infty} C_n \cos(\lambda_n y) \quad (\text{B.44})$$

Multiplions les deux membres par  $\cos\left(\frac{m\pi}{w} y\right)$  où  $m \geq 1$  est un entier quelconque, puis intégrons le long de la canalisation  $\int_0^w dy$  :

$$\int_0^w g(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w} y\right) dy = \int_0^w \sum_{n=1}^{\infty} C_n \cos\left(\frac{n\pi}{w} y\right) \cos\left(\frac{m\pi}{w} y\right) dy \quad (\text{B.45})$$

$$= \sum_{n=1}^{\infty} C_n \int_0^w \cos\left(\frac{n\pi}{w} y\right) \cos\left(\frac{m\pi}{w} y\right) dy \quad (\text{B.46})$$

Les intégrales dans le second membre sont nulles (fonctions orthogonales) sauf pour  $m = n$ ,

## Annexe B. Écoulements et diffusion en microcanaux

on obtient donc :

$$\int_0^w g(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy = C_m \int_0^w \cos^2\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy \quad (\text{B.47})$$

Calculons l'intégrale de droite.

$$\int_0^w \cos^2\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy = \left[ \frac{y}{2} + \frac{w}{4\pi m} \sin\left(\frac{2\pi m y}{w}\right) \right]_0^w = \frac{w}{2}$$

On peut finalement déduire la valeur des coefficients  $C_m$  en fonction de  $g(y)$  :

$$\forall m \geq 1, C_m = \frac{2}{w} \int_0^w g(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy \quad (\text{B.48})$$

Et en remplaçant  $g(y)$  :

$$C_m = \frac{2}{w} \int_0^w f(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy - \frac{2c_b}{w} \int_0^w \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy \quad (\text{B.49})$$

$$= \frac{2}{w} \int_0^w f(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy - \frac{2c_b}{w} \underbrace{\left[ \frac{w}{n\pi} \sin\left(\frac{m\pi}{w}y\right) \right]_0^w}_0 \quad (\text{B.50})$$

Soit au final :

$$\forall m \geq 1, C_m = \frac{2}{w} \int_0^w f(y) \cos\left(\frac{m\pi}{w}y\right) dy \quad (\text{B.51})$$

Par ailleurs nous avons vu (équation (B.33)) que la conservation de la matière impose :

$$\forall x, \int_0^w c(x, y) dy = \text{constante}. \quad (\text{B.52})$$

Lorsque  $x \rightarrow \infty$ ,  $c(x, y) \rightarrow c_b$ . Soit  $\int_0^w c(x, y) dy = wc_b$  pour  $x \rightarrow \infty$ . En  $x = 0$ ,  $c(x = 0, y) = f(y)$  et on peut ainsi déduire :

$$c_b = \frac{1}{w} \int_0^w f(y) dy \quad (\text{B.53})$$

En prenant des notations homogènes, la solution s'écrit donc :

$$c(x, y) = C_0 + \sum_{n=1}^{\infty} C_n e^{-\lambda_n \delta x} \cos(\lambda_n y) \quad (\text{B.54})$$

avec :

$$\lambda_n = \frac{n\pi}{w} \quad (\text{B.55})$$

$$C_0 = \frac{1}{w} \int_0^w f(y) dy \quad (\text{B.56})$$

$$C_n = \frac{2}{w} \int_0^w f(y) \cos\left(\frac{n\pi}{w}y\right) dy \quad (\text{B.57})$$

# C Calculs de force magnétique

## C.1 Expression de la force magnétique

Les expressions de la force magnétique présentées en chapitre d'introduction (équation (1.3) partie 1.3.5) puis dans la partie sur l'actionnement magnétique (équation (3.1) partie 3.1) sont courantes dans la littérature, et utilisées telles quelles. Néanmoins il est légitime de se poser la question de l'origine de ces équations.

Une approche rigoureuse a été trouvée dans l'ouvrage de L. D. Landau et E. M. Lifshitz (1963) [202], qui se base sur les relations thermodynamiques pour les milieux diélectriques et magnétiques dans les champs électromagnétiques. Un lien entre la force  $\mathbf{f}dV$  appliquée à un volume  $dV$ ,  $\mathbf{f}$  étant la densité de force volumique, et le tenseur des contraintes  $\sigma_{ij}$  est tout d'abord établi :

$$\iiint_V f_i dV = \oiint_{\Sigma} \sigma_{ij} dS_j \quad (\text{C.1})$$

où  $dS_j$  est l'élément de surface infinitésimal orienté normalement à la surface, dirigé de l'intérieur vers l'extérieur du volume considéré. Après transformation de l'intégrale surfacique en intégrale volumique on obtient :

$$f_i = \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j}. \quad (\text{C.2})$$

En utilisant les équations de Maxwell (postulat de base de l'électromagnétisme classique) et la conservation de l'énergie, le travail et la variation d'énergie libre lors d'une modification de charge et courant sont calculés :

$$\delta W = \iiint_V \mathbf{E} \cdot d\mathbf{D} + \mathbf{H} \cdot d\mathbf{B} dV, \quad (\text{C.3})$$

où on rappelle que  $\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E}$  et  $\mathbf{B} = \frac{1}{\mu} \mathbf{H}$ , avec  $\epsilon$  la permittivité électrique et  $\mu$  la perméabilité magnétique du milieu. À partir de la variation d'énergie libre, le tenseur des contraintes

## Annexe C. Calculs de force magnétique

---

pour des milieux fluides et solides sont établis. Sans tenir compte des effets d'électro et magnétostriction, le tenseur obtenu pour un milieu polarisable et magnétisable est semblable au tenseur de Maxwell (valable dans le vide) :

$$\sigma_{ij} = -\frac{1}{2}(\epsilon_0 \mathbf{E}^2 + \mu_0 \mathbf{H}^2) \delta_{ij} + E_i D_j + H_i B_j. \quad (\text{C.4})$$

La densité de force puis la force pondéromotrice en sont déduites :

$$f_i = \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} = \left( P_j \frac{\partial}{\partial x_j} \right) E_i + \mu_0 \left( M_j \frac{\partial}{\partial x_j} \right) H_i \quad (\text{C.5})$$

$$\mathbf{F} = \iint_{\Sigma} \left[ -\frac{1}{2}(E^2 + H^2) \mathbf{n} + \mathbf{P}(\mathbf{n} \cdot \mathbf{E}) + \mu_0 \mathbf{M}(\mathbf{n} \cdot \mathbf{H}) \right] dS, \quad (\text{C.6})$$

où  $\mathbf{P} = \mathbf{D} - \epsilon_0 \mathbf{E}$  et  $\mathbf{M} = \frac{1}{\mu_0} \mathbf{B} - \mathbf{H}$ .

Une autre approche, plus pratique, permet d'exprimer cette force en fonction non pas des champs électrique et magnétique réels, mais en fonction des champs qui existent en l'absence du matériau polarisable et magnétisable que l'on considère. Ces champs électrique et magnétique théoriques sont notés  $\mathfrak{E}$  et  $\mathfrak{H}$  respectivement.

La variation d'énergie libre du système (obtenue en considérant la variation de charge ou du courant) s'écrit :

$$\delta \mathcal{F} = - \iiint_V (\mathbf{P} \cdot \delta \mathfrak{E} + \mu_0 \mathbf{M} \cdot \delta \mathfrak{H}). \quad (\text{C.7})$$

Si l'on applique une translation infinitésimale de distance  $d\mathbf{l}$  du corps d'intérêt dans l'espace, alors on a  $\delta \mathcal{F} = -d\mathbf{l} \cdot \mathbf{F}$  et on peut remonter à l'expression de la force :

$$\mathbf{F} = \iiint_V ((\mathbf{P} \cdot \nabla) \mathfrak{E}) + \mu_0 (\mathbf{M} \cdot \nabla) \mathfrak{H}) dV. \quad (\text{C.8})$$

La force magnétique sera uniquement retenue pour ces travaux, et la validité de cette expression s'applique uniquement aux champs statiques, et dans les milieux non conducteurs, soit pour  $\nabla \times \mathfrak{H} = 0$  :

$$\boxed{\mathbf{F} = \iiint_V (\mu_0 (\mathbf{M} \cdot \nabla) \mathfrak{H}) dV} \quad (\text{C.9})$$

Dans le cas où la taille de l'objet considéré est négligeable devant la distance caractéristique du gradient du champ, cette expression se simplifie :

$$\mathbf{F} = \mu_0 (\mathbf{M} \cdot \nabla) \mathfrak{H}. \quad (\text{C.10})$$

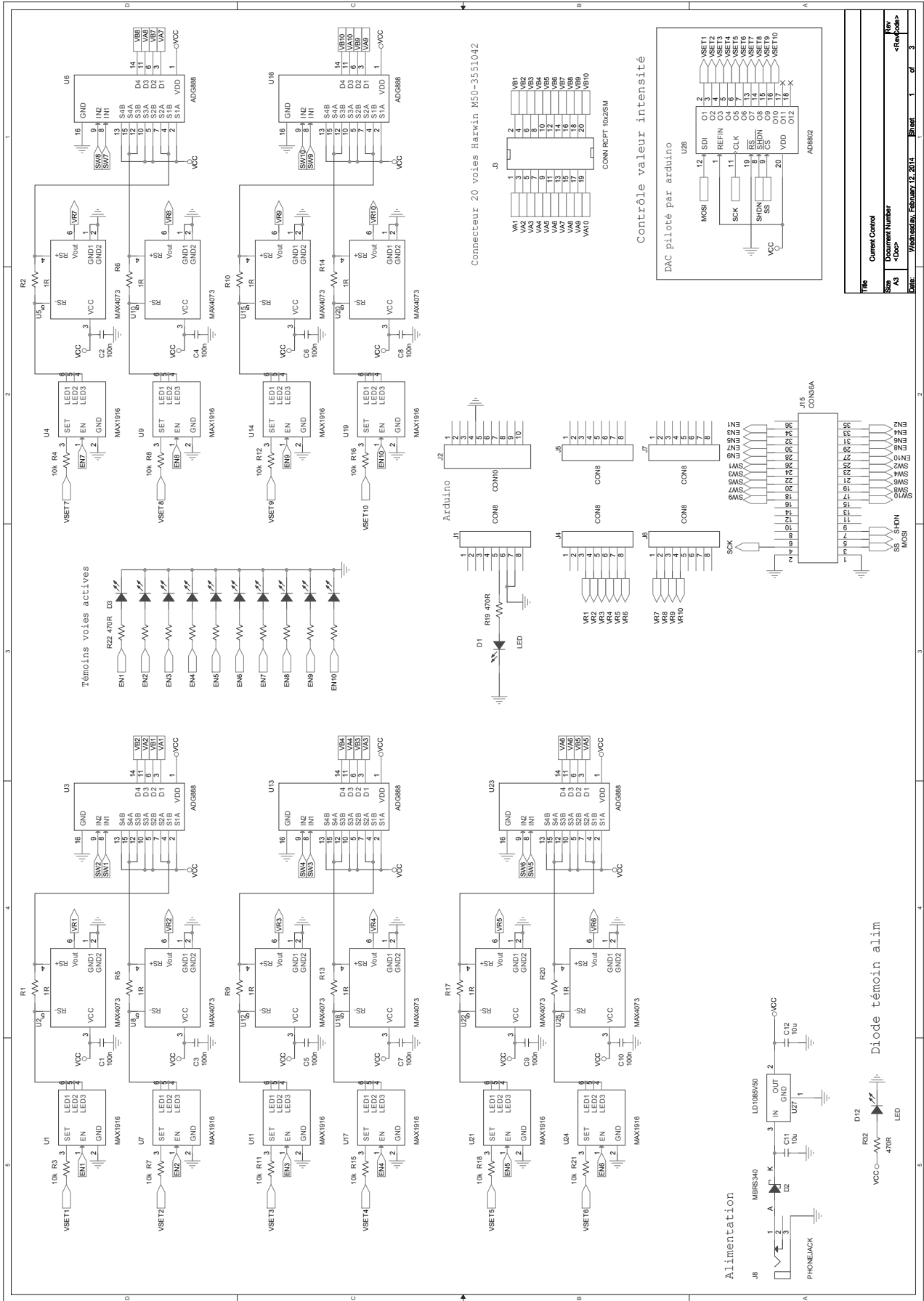
# **D** Instrumentation


## **D.1 Plan de la carte électronique de contrôle d'intensité**

Voir verso.



# Annexe D. Instrumentation



- 
- [1] S. Terry, J. Jerman, and J. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, pp. 1880–1886, Dec. 1979.
- [2] D. Qi, D. J. Hoelzle, and a. C. Rowat, "Probing single cells using flow in microfluidic devices," *The European Physical Journal Special Topics*, vol. 204, pp. 85–101, Apr. 2012.
- [3] A. M. Thompson, A. L. Paguirigan, J. E. Kreutz, J. P. Radich, and D. T. Chiu, "Microfluidics for single-cell genetic analysis," *Lab on a Chip*, vol. 14, pp. 3135–3142, July 2014.
- [4] D. Wlodkowic and J. M. Cooper, "Tumors on chips : oncology meets microfluidics.," *Current opinion in chemical biology*, vol. 14, pp. 556–67, Oct. 2010.
- [5] M. Junkin and S. Tay, "Microfluidic single-cell analysis for systems immunology.," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 1246–60, Apr. 2014.
- [6] P. Abgrall, *Microtechnologies polymères pour les laboratoires sur puces*. PhD thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2006.
- [7] S. Cargou, *Développement d'outils microfluidiques appliqués à la biologie. Réalisation de dispositifs de tri cellulaire magnétique vertical*. PhD thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2014.
- [8] R. Fulcrand, *Etude et développement d'une plateforme microfluidique dédiée à des applications biologiques Intégration d'un actionneur magnétique sur substrat souple*. PhD thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2009.
- [9] R. Courson, S. Cargou, V. Conédéra, M. Fouet, and A.-M. Gué, "Low cost integration of multilevel lab-on-a-chip using a new generation of dry film photoresists," in *Smart System Integration*, 2014.
- [10] R. Courson, S. Cargou, V. Conédéra, M. Fouet, M. C. Blatché, C. L. Serpentine, and A. M. Gue, "Low-cost multilevel microchannel lab on chip : DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler," *RSC Adv.*, Oct. 2014.
- [11] M. Fouet, R. Courson, S. Baster, and A.-M. Gué, "An integrated magneto-fluidic device enabling novel actuation functionalities," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 1533–1535, CBMS, 2014.
- [12] M. Fouet, S. Cargou, R. Courson, X. Bouquet, L. Salvagnac, and A. M. Gue, "Multilevel (3D) lab on chip for implementing reconfigurable magnetophoretic fonctionnalités," in *18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, pp. 529–532, IEEE, 21-25 June 2015.

- [13] C. Wyatt Shields IV, C. D. Reyes, and G. P. López, "Microfluidic cell sorting : a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation," *Lab Chip*, vol. 15, pp. 1230–1249, 2015.
- [14] Z. T. F. Yu, K. M. Aw Yong, and J. Fu, "Microfluidic blood cell sorting : now and beyond.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 10, pp. 1687–703, May 2014.
- [15] M. Kersaudy-Kerhoas and E. Sollier, "Micro-scale blood plasma separation : from acoustophoresis to egg-beaters.," *Lab on a chip*, July 2013.
- [16] P. Sajeesh and A. K. Sen, "Particle separation and sorting in microfluidic devices : a review," *Microfluidics and Nanofluidics*, Nov. 2013.
- [17] A. Lenshof and T. Laurell, "Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, pp. 1203–1217, Feb. 2010.
- [18] D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini, and D. Di Carlo, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 397, pp. 3249–67, Aug. 2010.
- [19] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, and A. P. Lee, "Droplet microfluidics.," *Lab on a chip*, vol. 8, pp. 198–220, Feb. 2008.
- [20] A. Ng, K. Choi, R. Luoma, J. Robinson, and A. Wheeler, "Digital Microfluidic Magnetic Separation for Particle-Based Immunoassays," *Analytical ...*, no. 84, pp. 8805–8812, 2012.
- [21] A. Ashkin, "Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, pp. 4853–4860, May 1997.
- [22] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature*, vol. 330, pp. 769–771, Dec. 1987.
- [23] T. Kaneta, Y. Ishidzu, N. Mishima, and T. Imasaka, "Theory of Optical Chromatography," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 2701–2710, July 1997.
- [24] Q. Guo, S. Park, and H. Ma, "Microfluidic micropipette aspiration for measuring the deformability of single cells," *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 2687–2695, July 2012.
- [25] P. Sethu, A. Sin, and M. Toner, "Microfluidic diffusive filter for apheresis (leukapheresis)," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 83–89, Dec. 2006.
- [26] M. Yamada, M. Nakashima, and M. Seki, "Pinched flow fractionation : Continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel," *Analytical Chemistry*, vol. 76, no. 18, pp. 5465–5471, 2004.
- [27] T. Morijiri, S. Sunahiro, M. Senaha, M. Yamada, and M. Seki, "Sedimentation pinched-flow fractionation for size- and density-based particle sorting in microchannels," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 11, pp. 105–110, Mar. 2011.
- [28] M. Yamada and M. Seki, "Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics.," *Lab on a chip*, vol. 5, pp. 1233–9, Nov. 2005.
- [29] D. W. Inglis and N. Herman, "A scalable approach for high throughput branch flow filtration.," *Lab on a chip*, Mar. 2013.
- [30] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm, "Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement," *Science*, vol. 304, pp. 987–990, May 2004.

- [31] J. McGrath, M. Jimenez, and H. Bridle, "Deterministic lateral displacement for particle separation : a review.," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 4139–58, Sept. 2014.
- [32] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. A. Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm, and R. H. Austin, "Deterministic hydrodynamics : Taking blood apart," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 14779–14784, Mar. 2006.
- [33] N. Li, D. T. Kamei, and C.-M. Ho, "On-Chip Continuous Blood Cell Subtype Separation by Deterministic Lateral Displacement," in *Proceedings of Nano/Micro Engineered and Molecular Systems Conference, 2007*, (Bangkok), pp. 932–936, IEEE, Jan. 2007.
- [34] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, pp. 18892–18897, Nov. 2007.
- [35] H. W. Hou, M. E. Warkiani, B. L. Khoo, Z. R. Li, R. A. Soo, D. S.-W. Tan, W.-T. Lim, J. Han, A. A. S. Bhagat, and C. T. Lim, "Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces," *Scientific Reports*, vol. 3, Feb. 2013.
- [36] K. W. Seo, H. J. Byeon, H. K. Huh, and S. J. Lee, "Particle migration and single-line particle focusing in microscale pipe flow of viscoelastic fluids," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 3512–3520, Dec. 2013.
- [37] S. Roman, S. Lorthois, P. Duru, and F. Risso, "Velocimetry of red blood cells in microvessels by the dual-slit method : Effect of velocity gradients," *Microvascular Research*, vol. 84, pp. 249–261, Nov. 2012.
- [38] K. L. Davenpeck, M. E. Brummet, S. a Hudson, R. J. Mayer, and B. S. Bochner, "Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 165, pp. 2764–72, Sept. 2000.
- [39] S. Choi, J. M. Karp, and R. Karnik, "Cell sorting by deterministic cell rolling.," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 1427–30, Apr. 2012.
- [40] X. Yu, R. He, S. Li, B. Cai, L. Zhao, L. Liao, W. Liu, Q. Zeng, H. Wang, S.-S. Guo, and X.-Z. Zhao, "Magneto-Controllable Capture and Release of Cancer Cells by Using a Micropillar Device Decorated with Graphite Oxide-Coated Magnetic Nanoparticles.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, pp. 1–7, May 2013.
- [41] A.-E. Saliba, L. Saias, E. Psychari, N. Minc, D. Simon, F.-C. Bidard, C. Mathiot, J.-Y. Pierga, V. Fraissier, J. Salamero, V. Saada, F. Farace, P. Vielh, L. Malaquin, and J.-L. Viovy, "Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 14524–9, Aug. 2010.
- [42] X. Zheng, L. S.-L. Cheung, J. a Schroeder, L. Jiang, and Y. Zohar, "Cell receptor and surface ligand density effects on dynamic states of adhering circulating tumor cells.," *Lab on a chip*, vol. 11, pp. 3431–9, Oct. 2011.
- [43] S. S. Shevkoplyas, T. Yoshida, L. L. Munn, and M. W. Bitensky, "Biomimetic Autoseparation of Leukocytes from Whole Blood in a Microfluidic Device," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 933–937, Feb. 2005.

## Bibliographie

---

- [44] V. Hessel, H. Löwe, and F. Schönfeld, "Micromixers—a review on passive and active mixing principles," *Chemical Engineering Science*, vol. 60, pp. 2479–2501, Apr. 2005.
- [45] C.-Y. Lee, C.-L. Chang, Y.-N. Wang, and L.-M. Fu, "Microfluidic mixing : a review.," *International journal of molecular sciences*, vol. 12, pp. 3263–87, Jan. 2011.
- [46] G. S. Jeong, S. Chung, C.-B. Kim, and S.-H. Lee, "Applications of micromixing technology.," *The Analyst*, vol. 135, pp. 460–73, Mar. 2010.
- [47] Y. K. Suh and S. Kang, "A Review on Mixing in Microfluidics," *Micromachines*, vol. 1, pp. 82–111, Sept. 2010.
- [48] L. Falk and J.-M. Commenge, "Performance comparison of micromixers," *Chemical Engineering Science*, vol. 65, pp. 405–411, Jan. 2010.
- [49] E. A. Mansur, M. YE, Y. WANG, and Y. DAI, "A State-of-the-Art Review of Mixing in Microfluidic Mixers," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 16, no. 4, pp. 503–516, 2008.
- [50] N.-T. Nguyen and Z. Wu, "Micromixers—a review," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, pp. R1–R16, Feb. 2005.
- [51] M. X. Lin, K.-A. Hyun, H.-S. Moon, T. S. Sim, J.-G. Lee, J. C. Park, S. S. Lee, and H.-I. Jung, "Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation.," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 40, pp. 63–7, Feb. 2013.
- [52] J. H. Jung, G.-Y. Kim, and T. S. Seo, "An integrated passive micromixer–magnetic separation–capillary electrophoresis microdevice for rapid and multiplex pathogen detection at the single-cell level," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 3465–3470, Oct. 2011.
- [53] W.-H. Tan, Y. Suzuki, N. Kasagi, N. Shikazono, K. Furukawa, and T. Ushida, "A Lamination Micro Mixer for  $\mu$ -Immunomagnetic Cell Sorter," *JSME International Journal Series C Mechanical Systems, Machine Elements and Manufacturing*, vol. 48, no. 4, pp. 425–435, 2005.
- [54] P. Carrière, "On a three-dimensional implementation of the baker's transformation," *Physics of Fluids (1994-present)*, vol. 19, p. 118110, Nov. 2007.
- [55] H. SadAbadi, M. Packirisamy, and R. Wüthrich, "High performance cascaded PDMS micromixer based on split-and-recombination flows for lab-on-a-chip applications," *RSC Advances*, vol. 3, no. 20, pp. 7296–7296, 2013.
- [56] T. Yasui, Y. Omoto, K. Osato, N. Kaji, N. Suzuki, T. Naito, M. Watanabe, Y. Okamoto, M. Tokeshi, E. Shamoto, and Y. Baba, "Microfluidic baker's transformation device for three-dimensional rapid mixing.," *Lab on a chip*, vol. 11, pp. 3356–60, Oct. 2011.
- [57] P. E. Neerincx, R. P. J. Denteneer, S. Peelen, and H. E. H. Meijer, "Compact Mixing Using Multiple Splitting, Stretching, and Recombining Flows," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 296, pp. 349–361, Mar. 2011.
- [58] Y. Liao, J. Song, E. Li, Y. Luo, Y. Shen, D. Chen, Y. Cheng, Z. Xu, K. Sugioka, and K. Midorikawa, "Rapid prototyping of three-dimensional microfluidic mixers in glass by femtosecond laser direct writing.," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 746–9, Feb. 2012.

- [59] S.-J. J. Lee and N. Sundararajan, *Microfabrication for microfluidics*. Boston : Artech House, 2010.
- [60] W.-C. Tian and E. Finehout, "Materials and Microfabrication Processes for Microfluidic Devices," in *Microfluidics for Biological Applications*, pp. 35–92, Springer US, 2008.
- [61] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*. Belin, 2003.
- [62] M. A. Unger, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," *Science*, vol. 288, pp. 113–116, Apr. 2000.
- [63] E. S. Park, A. C. Brown, M. a DiFeo, T. H. Barker, and H. Lu, "Continuously perfused, non-cross-contaminating microfluidic chamber array for studying cellular responses to orthogonal combinations of matrix and soluble signals.," *Lab on a chip*, vol. 10, pp. 571–80, Mar. 2010.
- [64] C.-T. Pan, H. Yang, S.-C. Shen, M.-C. Chou, and H.-P. Chou, "A low-temperature wafer bonding technique using patternable materials," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 12, p. 611, June 2002.
- [65] F. J. Blanco, M. Agirregabiria, J. Garcia, J. Berganzo, M. Tijero, M. T. Arroyo, J. M. Ruano, I. Aramburu, and K. Mayora, "Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 14, p. 1047, June 2004.
- [66] H. Sato, H. Matsumura, S. Keino, and S. Shoji, "An all SU-8 microfluidic chip with built-in 3D fine microstructures," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, p. 2318, Sept. 2006.
- [67] X. Gong, X. Yi, K. Xiao, S. Li, R. Kodzius, J. Qin, and W. Wen, "Wax-bonding 3D microfluidic chips.," *Lab on a chip*, vol. 10, pp. 2622–7, Oct. 2010.
- [68] V. Sunkara, D.-K. Park, H. Hwang, R. Chantiwas, S. a Soper, and Y.-K. Cho, "Simple room temperature bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane).," *Lab on a chip*, vol. 11, pp. 962–5, Mar. 2011.
- [69] J. Wu and N. Y. Lee, "One-step surface modification for irreversible bonding of various plastics with a poly(dimethylsiloxane) elastomer at room temperature," *Lab on a Chip*, vol. 14, pp. 1564–1571, Apr. 2014.
- [70] P. Abgrall, C. Lattes, V. Conédéra, X. Dollat, S. Colin, and A. M. Gué, "A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, p. 113, Dec. 2005.
- [71] P. Vulto, N. Glade, L. Altomare, J. Bablet, L. D. Tin, G. Medoro, I. Chartier, N. Manaresi, M. Tartagni, and R. Guerrieri, "Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips," *Lab on a Chip*, vol. 5, pp. 158–162, Jan. 2005.
- [72] N. Wangler, L. Gutzweiler, K. Kalkandjiev, C. Müller, F. Mayenfels, H. Reinecke, R. Zengerle, and N. Paust, "High-resolution permanent photoresist laminate TMMF for sealed microfluidic structures in biological applications," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 21, p. 095009, Aug. 2011.

- [73] K. Kalkandjiev, L. Riegger, D. Kosse, M. Welsche, L. Gutzweiler, R. Zengerle, and P. Koltay, "Microfluidics in silicon/polymer technology as a cost-efficient alternative to silicon/glass," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 21, p. 025008, Jan. 2011.
- [74] R. C. Meier, V. Badilita, J. Brunne, U. Wallrabe, and J. G. Korvink, "Complex three-dimensional high aspect ratio microfluidic network manufactured in combined PerMX dry-resist and SU-8 technology," *Biomicrofluidics*, vol. 5, pp. 034111–034111–10, Aug. 2011.
- [75] R. C. Meier, J. Höfflin, V. Badilita, U. Wallrabe, and J. G. Korvink, "Microfluidic integration of wirebonded microcoils for on-chip applications in nuclear magnetic resonance," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, pp. 045021–045021, Apr. 2014.
- [76] P. F. O'Neill, a. Ben Azouz, M. Vázquez, J. Liu, S. Marczak, Z. Slouka, H. C. Chang, D. Diamond, and D. Brabazon, "Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications," *Biomicrofluidics*, vol. 8, pp. 052112–052112, Sept. 2014.
- [77] A. K. Au, W. Lee, and A. Folch, "Mail-order microfluidics : evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 14, pp. 1294–1301, Mar. 2014.
- [78] S. Tendulkar, S.-H. Mirmalek-Sani, C. Childers, J. Saul, E. C. Opara, and M. K. Ramasubramanian, "A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells," *Biomedical microdevices*, vol. 14, pp. 461–9, June 2012.
- [79] P. J. Kitson, M. H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, and L. Cronin, "Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic 'lab on a chip' reactionware devices," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 3267–71, Sept. 2012.
- [80] J. L. Erkal, A. Selimovic, B. C. Gross, S. Y. Lockwood, E. L. Walton, S. McNamara, R. S. Martin, and D. M. Spence, "3D printed microfluidic devices with integrated versatile and reusable electrodes," *Lab on a chip*, Apr. 2014.
- [81] A. del Campo and C. Greiner, "SU-8 : a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, p. R81, May 2007.
- [82] S. M. Eaton, C. De Marco, R. Martinez-Vazquez, R. Ramponi, S. Turri, G. Cerullo, and R. Osellame, "Femtosecond laser microstructuring for polymeric lab-on-chips," *Journal of biophotonics*, vol. 16, pp. 1–16, May 2012.
- [83] K. Sugioka, J. Xu, D. Wu, Y. Hanada, Z. Wang, Y. Cheng, and K. Midorikawa, "Femtosecond laser 3D micromachining : a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass," *Lab on a chip*, July 2014.
- [84] Y. He, B.-L. Huang, D.-X. Lu, J. Zhao, B.-B. Xu, R. Zhang, X.-F. Lin, Q.-D. Chen, J. Wang, Y.-L. Zhang, and H.-B. Sun, "'Overpass' at the junction of a crossed microchannel : an enabler for 3D microfluidic chips," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 3866–9, Oct. 2012.
- [85] S. Hengsbach and A. D. Lantada, "Rapid prototyping of multi-scale biomedical microdevices by combining additive manufacturing technologies," *Biomedical microdevices*, vol. 16, pp. 617–27, Aug. 2014.

- [86] Y. Hanada, K. Sugioka, and K. Midorikawa, "Highly sensitive optofluidic chips for biochemical liquid assay fabricated by 3D femtosecond laser micromachining followed by polymer coating.," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 3688–93, Oct. 2012.
- [87] A. A. Nawaz, X. Zhang, X. Mao, J. Rufo, S.-C. S. Lin, F. Guo, Y. Zhao, M. Lapsley, P. Li, J. P. McCoy, S. J. Levine, and T. J. Huang, "Sub-micrometer-precision, three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing via "microfluidic drifting" .," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 415–23, Jan. 2014.
- [88] P. Nge, C. Rogers, and A. Woolley, "Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications," *Chemical reviews*, 2013.
- [89] Y. Temiz, R. D. Lovchik, G. V. Kaigala, and E. Delamarche, "Lab-on-a-chip devices : how to close and plug the lab?," *Microelectronic Engineering*, vol. 132, pp. 156–175, Oct. 2014.
- [90] P. Grodzinski, J. Yang, R. H. Liu, and M. D. Ward, "A Modular Microfluidic System for Cell Pre-concentration and Genetic Sample Preparation," *Biomedical Microdevices*, vol. 5, pp. 303–310, Dec. 2003.
- [91] T. Thorsen, S. J. Maerkl, and S. R. Quake, "Microfluidic large-scale integration.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, pp. 580–4, Oct. 2002.
- [92] M. Rhee and M. a Burns, "Microfluidic pneumatic logic circuits and digital pneumatic microprocessors for integrated microfluidic systems.," *Lab on a chip*, vol. 9, pp. 3131–43, Nov. 2009.
- [93] L. Clime, D. Brassard, M. Geissler, and T. Veres, "Active pneumatic control of centrifugal microfluidic flows for lab-on-a-chip applications," *Lab Chip*, 2015.
- [94] R. Renaudot, V. Agache, Y. Fouillet, G. Laffite, E. Bisceglia, L. Jalabert, M. Kumemura, D. Collard, and H. Fujita, "A programmable and reconfigurable microfluidic chip," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 4517–4524, Oct. 2013.
- [95] J. Lim, F. Maes, V. Taly, and J.-C. Baret, "The microfluidic puzzle : chip-oriented rapid prototyping," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 1669–72, May 2014.
- [96] M. Saber, J. Commenge, and L. Falk, "Rapid design of channel multi-scale networks with minimum flow maldistribution," *Chemical Engineering and Processing : Process Intensification*, vol. 48, pp. 723–733, Mar. 2009.
- [97] B. Li, L. Li, A. Guan, Q. Dong, K. Ruan, R. Hu, and Z. Li, "A smartphone controlled handheld microfluidic liquid handling system.," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 4085–92, Oct. 2014.
- [98] H. Zhu, I. Sencan, J. Wong, S. Dimitrov, D. Tseng, K. Nagashima, and A. Ozcan, "Cost-effective and rapid blood analysis on a cell-phone.," *Lab on a chip*, vol. 1, Feb. 2013.
- [99] M. F. Mora, F. Greer, A. M. Stockton, S. Bryant, and P. A. Willis, "Toward Total Automation of Microfluidics for Extraterrestrial In Situ Analysis," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 8636–8641, Nov. 2011.
- [100] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4974–4984, Dec. 1998.



## Bibliographie

---

- [101] A. Scott, A. K. Au, E. Vinckenbosch, and A. Folch, "A microfluidic D-subminiature connector," *Lab on a chip*, vol. 13, pp. 2036–9, May 2013.
- [102] E. Wilhelm, C. Neumann, and T. Düttenhofer, "Connecting microfluidic chips using a chemically inert, reversible, multichannel Chip-to-World-Interface," *Lab Chip*, no. 207890, 2013.
- [103] J. Wang, W. Chen, J. Sun, C. Liu, and Q. Yin, "A Microfluidic Tubing Method and Its Application to Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles," *Lab on a Chip*, 2014.
- [104] H.-H. Shen, S.-K. Fan, C.-J. Kim, and D.-J. Yao, "EWOD microfluidic systems for biomedical applications," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 16, pp. 965–987, Mar. 2014.
- [105] H. Kim, M. S. Bartsch, R. F. Renzi, J. He, J. L. Van de Vreugde, M. R. Claudnic, and K. D. Patel, "Automated digital microfluidic sample preparation for next-generation DNA sequencing," *Journal of laboratory automation*, vol. 16, pp. 405–14, Dec. 2011.
- [106] K. Choi, A. Ng, and R. Fobel, "Automated Digital Microfluidic Platform for Magnetic-Particle-Based Immunoassays with Optimization by Design of Experiments," *Analytical chemistry*, no. 85, pp. 9638–9646, 2013.
- [107] X. Huang, J. Guo, X. Wang, M. Yan, Y. Kang, and H. Yu, "A Contact-Imaging Based Microfluidic Cytometer with Machine-Learning for Single-Frame Super-Resolution Processing," *PloS one*, vol. 9, pp. e104539–e104539, Jan. 2014.
- [108] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch, "High gradient magnetic cell separation with MACS," *Cytometry*, vol. 11, pp. 231–238, Jan. 1990.
- [109] K. Smistrup, *Magnetic separation in microfluidic systems*. PhD thesis, Technical University of Denmark, Jan. 2007.
- [110] R. E. Pelrine, S. V. Shastri, and J. P. Joseph, "Microlaboratory devices and methods," Aug. 2002. CIB : B01J19/00 ; B01L3/00 ; B01L99/00 ; B81B7/02 ; C12M1/00 ; B81B1/00 ; C40B40/06 ; C40B40/10 ; G01N35/00 ; (IPC1-7) : B01J19/08.
- [111] A. Ichikawa, S. Sakuma, M. Sugita, T. Shoda, T. Tamakoshi, S. Akagi, and F. Arai, "On-chip enucleation of an oocyte by untethered microrobots," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, pp. 095004–095004, Sept. 2014.
- [112] R. Blakemore, "Magnetotactic bacteria," *Science*, vol. 190, pp. 377–379, Oct. 1975.
- [113] H. Lee, A. M. Purdon, V. Chu, and R. M. Westervelt, "Controlled Assembly of Magnetic Nanoparticles from Magnetotactic Bacteria Using Microelectromagnets Arrays," *Nano Letters*, vol. 4, pp. 995–998, May 2004.
- [114] L. M. González, W. C. Ruder, P. R. Leduc, and W. C. Messner, "Controlling Magnetotactic Bacteria through an Integrated Nanofabricated Metallic Island and Optical Microscope Approach," *Scientific reports*, vol. 4, pp. 4104–4104, Jan. 2014.
- [115] M. a. M. Gijs, F. Lacharme, and U. Lehmann, "Microfluidic applications of magnetic particles for biological analysis and catalysis," *Chemical reviews*, vol. 110, pp. 1518–63, Mar. 2010.
- [116] K.-H. Han and A. B. Frazier, "Continuous magnetophoretic separation of blood cells in microdevice format," *Journal of Applied Physics*, vol. 96, pp. 5797–5802, Nov. 2004.

- [117] D. Robert, N. Pamme, H. Conjeaud, F. Gazeau, A. Iles, and C. Wilhelm, "Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device.," *Lab on a chip*, vol. 11, pp. 1902–10, June 2011.
- [118] D. Horák, M. Babic, H. Macková, and M. J. Benes, "Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations.," *Journal of separation science*, vol. 30, pp. 1751–72, July 2007.
- [119] A. Sandhu, H. Handa, and M. Abe, "Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics.," *Nanotechnology*, vol. 21, pp. 442001–442001, Nov. 2010.
- [120] P. Chen, Y.-Y. Huang, K. Hoshino, and X. Zhang, "Multiscale immunomagnetic enrichment of circulating tumor cells : from tubes to microchips.," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 446–58, Feb. 2014.
- [121] L. Hajba and A. Guttman, "Circulating tumor-cell detection and capture using microfluidic devices," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 59, pp. 9–16, July 2014.
- [122] R. Ganguly and I. K. Puri, "Microfluidic transport in magnetic MEMS and bioMEMS.," *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, vol. 2, pp. 382–99, July 2010.
- [123] J. R. Basore and L. a Baker, "Applications of microelectromagnetic traps.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 403, pp. 2077–88, June 2012.
- [124] Q. Cao, X. Han, and L. Li, "Configurations and control of magnetic fields for manipulating magnetic particles in microfluidic applications : magnet systems and manipulation mechanisms.," *Lab on a chip*, vol. 14, pp. 2762–77, Aug. 2014.
- [125] A. van Reenen, A. de Jong, J. den Toonder, and M. Prins, "Integrated lab-on-chip biosensing systems based on magnetic particle actuation – a comprehensive review," *Lab on a Chip*, 2014.
- [126] N. Pamme, "Magnetism and microfluidics.," *Lab on a chip*, vol. 6, pp. 24–38, Jan. 2006.
- [127] M. a. M. Gijs, "Magnetic bead handling on-chip : new opportunities for analytical applications," *Microfluidics and Nanofluidics*, pp. 22–40, Oct. 2004.
- [128] J. H. Kang, S. Krause, H. Tobin, A. Mammoto, M. Kanapathipillai, and D. E. Ingber, "A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells.," *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 2175–81, June 2012.
- [129] T. P. Forbes, M. S. Munson, and S. P. Forry, "Theoretical analysis of a magnetophoresis-diffusion T-sensor immunoassay," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 3935–3944, Aug. 2013.
- [130] H. Lee, L. Xu, B. Ahn, K. Lee, and K. W. Oh, "Continuous-flow in-droplet magnetic particle separation in a droplet-based microfluidic platform," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 13, pp. 613–623, Apr. 2012.
- [131] S. Tabnaoui, L. Malaquin, S. Descroix, and J.-L. Viovy, "Integrated microfluidic fluidized bed for sample preconcentration and immunoelectroextraction," in *Proceedings of 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, (Okinawa, Japan), pp. 1408–1410, Oct. 2012.

## Bibliographie

---

- [132] S. Tabnaoui, I. Pereiro, M. Fermigier, S. Descroix, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, "Magnetic fluidized bed in microfluidics : hydrodynamic characterization and validation to immunocapture," in *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, (Freiburg, Germany), pp. 1394–1396, Oct. 2013.
- [133] T. Zhu, R. Cheng, Y. Liu, J. He, and L. Mao, "Combining positive and negative magnetophoreses to separate particles of different magnetic properties," *Microfluidics and Nanofluidics*, Apr. 2014.
- [134] L. Liang and X. Xuan, "Diamagnetic particle focusing using ferromicrofluidics with a single magnet," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 13, pp. 637–643, June 2012.
- [135] J. Zeng, C. Chen, P. Vedantam, V. Brown, T.-R. J. Tzeng, and X. Xuan, "Three-dimensional magnetic focusing of particles and cells in ferrofluid flow through a straight microchannel," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 22, pp. 105018–105018, Oct. 2012.
- [136] J. Kim, J. Won, and S. Song, "Dual-mode on-demand droplet routing in multiple microchannels using a magnetic fluid as carrier phase.," *Biomicrofluidics*, vol. 8, pp. 054105–054105, Sept. 2014.
- [137] T. Ohashi, H. Kuyama, N. Hanafusa, and Y. Togawa, "A simple device using magnetic transportation for droplet-based PCR.," *Biomedical microdevices*, vol. 9, pp. 695–702, Oct. 2007.
- [138] C. Phurimsak, E. Yildirim, M. D. Tarn, S. J. Trietsch, T. Hankemeier, N. Pamme, and P. Vulto, "Phaseguide assisted liquid lamination for magnetic particle-based assays," *Lab on a Chip*, vol. 14, pp. 2334–2343, June 2014.
- [139] C.-L. Chang, W. Huang, S. I. Jalal, B.-D. Chan, A. Mahmood, S. Shahda, B. H. O'Neil, D. E. Matei, and C. A. Savran, "Circulating tumor cell detection using a parallel flow micro-aperture chip system," *Lab on a Chip*, vol. 15, pp. 1677–1688, Mar. 2015.
- [140] N. Xia, T. P. Hunt, B. T. Mayers, E. Alsberg, G. M. Whitesides, R. M. Westervelt, and D. E. Ingber, "Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow.," *Biomedical microdevices*, vol. 8, pp. 299–308, Dec. 2006.
- [141] C. Hale and J. Darabi, "Magnetophoretic-based microfluidic device for DNA isolation.," *Biomicrofluidics*, vol. 8, pp. 044118–044118, July 2014.
- [142] S. a Khashan, a. Alazzam, and E. P. Furlani, "Computational analysis of enhanced magnetic bioseparation in microfluidic systems with flow-invasive magnetic elements.," *Scientific reports*, vol. 4, pp. 5299–5299, Jan. 2014.
- [143] C. M. Earhart, C. E. Hughes, R. S. Gaster, C. C. Ooi, R. J. Wilson, L. Y. Zhou, E. W. Humke, L. Xu, D. J. Wong, S. B. Willingham, E. J. Schwartz, I. L. Weissman, S. S. Jeffrey, J. W. Neal, R. Rohatgi, H. A. Wakelee, and S. X. Wang, "Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips," *Lab on a Chip*, vol. 14, pp. 78–88, Nov. 2013.
- [144] J. D. Adams, U. Kim, and H. T. Soh, "Multitarget magnetic activated cell sorter.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 18165–70, Nov. 2008.

- [145] M. Helou, M. Reisbeck, S. F. Tedde, L. Richter, L. Bär, J. J. Bosch, R. H. Stauber, E. Quandt, and O. Hayden, "Time-of-flight magnetic flow cytometry in whole blood with integrated sample preparation," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 1035–1038, Feb. 2013.
- [146] M. Faivre, R. Gelszinnis, J. Degouttes, N. Terrier, C. Rivière, R. Ferrigno, and A.-L. Deman, "Magnetophoretic manipulation in microsystem using carbonyl iron-polydimethylsiloxane microstructures.," *Biomicrofluidics*, vol. 8, pp. 054103–054103, Sept. 2014.
- [147] M. Riahi and E. Alizadeh, "Fabrication of a 3D active mixer based on deformable Fe-doped PDMS cones with magnetic actuation," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 22, pp. 115001–115001, Nov. 2012.
- [148] L. Coudron, I. D. Johnston, C. K. L. Tan, and M. C. Tracey, "Low-cost credit card-based microfluidic devices for magnetic bead immobilisation," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 14, pp. 359–369, Sept. 2012.
- [149] J. Pivetal, D. Royet, G. Ciuta, M. Frenea-Robin, N. Haddour, N. M. Dempsey, F. Dumas-Bouchiat, and P. Simonet, "Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 380, pp. 72–77, Apr. 2015.
- [150] J. Pivetal, S. Toru, M. Frenea-Robin, N. Haddour, S. Cecillon, N. M. Dempsey, F. Dumas-Bouchiat, and P. Simonet, "Selective isolation of bacterial cells within a microfluidic device using magnetic probe-based cell fishing," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 195, pp. 581–589, May 2014.
- [151] a. Rida, V. Fernandez, and M. a. M. Gijs, "Long-range transport of magnetic microbeads using simple planar coils placed in a uniform magnetostatic field," *Applied Physics Letters*, vol. 83, no. 12, pp. 2396–2396, 2003.
- [152] A. Beyzavi and N.-T. Nguyen, "One-dimensional actuation of a ferrofluid droplet by planar microcoils," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 42, pp. 015004–015004, Jan. 2009.
- [153] U. Lehmann, C. Vandevyver, V. K. Parashar, and M. a. M. Gijs, "Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 45, pp. 3062–7, May 2006.
- [154] C.-H. Chiou, D. Jin Shin, Y. Zhang, and T.-H. Wang, "Topography-Assisted Electromagnetic Platform for Blood-to-PCR in a Droplet," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50, pp. 91–99, June 2013.
- [155] P. J. Chang, F. W. Chang, M. C. Yuen, R. Otilar, and D. a. Horsley, "Force measurements of a magnetic micro actuator proposed for a microvalve array," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, pp. 034005–034005, Mar. 2014.
- [156] N. Pekas, M. Granger, M. Tondra, A. Popple, and M. D. Porter, "Magnetic particle diverter in an integrated microfluidic format," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 293, pp. 584–588, May 2005.
- [157] I. Stateikina, S. Eissa, and M. Zourob, "Design and Fabrication of Integrated Multianalyte Sensing Platform With Magnetic Micro-Coils," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 22, pp. 1339–1346, Dec. 2013.

## Bibliographie

---

- [158] C. W. Shields, C. E. Livingston, B. B. Yellen, G. P. López, and D. M. Murdoch, “Magneto-graphic array for the capture and enumeration of single cells and cell pairs,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, pp. 041101–041101, July 2014.
- [159] L. Saias, A.-E. Saliba, J.-L. Viovy, J.-Y. Pierga, P. Vielh, and F. Farace, “Microfluidic magnetic cell sorting system for cancer diagnosis,” *La Houille Blanche*, pp. 105–111, Nov. 2009.
- [160] L. Saias, J. Autebert, L. Malaquin, and J.-L. Viovy, “Design, modeling and characterization of microfluidic architectures for high flow rate, small footprint microfluidic systems.,” *Lab on a chip*, vol. 11, pp. 822–32, Mar. 2011.
- [161] D. Horák, Z. Svobodová, J. Autebert, B. Coudert, Z. Plichta, K. Královec, Z. Bílková, and J.-L. Viovy, “Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies : Application to the capture of epithelial cancer cells.,” *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 101, pp. 23–32, Jan. 2013.
- [162] B. Teste, N. Jamond, D. Ferraro, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, “Selective handling of droplets in a microfluidic device using magnetic rails,” *Microfluidics and Nanofluidics*, 2015.
- [163] G. Katsikis, J. S. Cybulski, and M. Prakash, “Synchronous universal droplet logic and control,” *Nature Physics*, vol. 11, pp. 588–596, June 2015.
- [164] B. Lim, V. Reddy, X. Hu, and K. Kim, “Magnetophoretic circuits for digital control of single particles and cells,” *Nature Communications*, vol. 5, no. May, pp. 1–10, 2014.
- [165] P. Poesio and E. Wang, “Resonance induced wetting state transition of a ferrofluid droplet on superhydrophobic surfaces,” *Experimental Thermal and Fluid Science*, vol. 57, pp. 353–357, Sept. 2014.
- [166] J. W. Choi, T. M. Liakopoulos, and C. H. Ahn, “An on-chip magnetic bead separator using spiral electromagnets with semi-encapsulated permalloy,” *Biosensors & bioelectronics*, vol. 16, pp. 409–16, Aug. 2001.
- [167] Q. Ramadan, V. Samper, D. Poenar, and C. Yu, “An integrated microfluidic platform for magnetic microbeads separation and confinement,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1693–1702, 2006.
- [168] Q. Ramadan, V. Samper, D. Poenar, and C. Yu, “Magnetic-based microfluidic platform for biomolecular separation,” *Biomedical microdevices*, pp. 151–158, 2006.
- [169] Q. Ramadan, C. Yu, V. Samper, and D. Poenar, “Microcoils for transport of magnetic beads,” *Applied physics letters*, vol. 032501, 2006.
- [170] Q. Ramadan, D. P. Poenar, and C. Yu, “Customized trapping of magnetic particles,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 6, pp. 53–62, Apr. 2008.
- [171] Y. Zheng, A. Mannai, and M. Sawan, “A BioMEMS chip with integrated micro electromagnet array towards bio-particles manipulation,” *Microelectronic Engineering*, vol. 128, pp. 1–6, Oct. 2014.
- [172] R. Rong, J.-W. Choi, and C. H. Ahn, “An on-chip magnetic bead separator for biocell sorting,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, pp. 2783–2790, Dec. 2006.

- [173] F. Li and J. Kosel, "An efficient biosensor made of an electromagnetic trap and a magneto-resistive sensor," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 59, pp. 145–50, Sept. 2014.
- [174] H. Suzuki, C. Ho, and N. Kasagi, "A chaotic mixer for magnetic bead-based micro cell sorter," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 13, no. 5, pp. 779–790, 2004.
- [175] M. K. Yapici and J. Zou, "Permalloy-coated tungsten probe for magnetic manipulation of micro droplets," *Microsystem Technologies*, vol. 14, pp. 881–891, Apr. 2008.
- [176] A. Ali-Cherif, S. Begolo, S. Descroix, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, "Programmable magnetic tweezers and droplet microfluidic device for high-throughput nanoliter multi-step assays.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 51, pp. 10765–9, Oct. 2012.
- [177] B. Teste, A. Ali-Cherif, J. L. Viovy, and L. Malaquin, "A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets.," *Lab on a chip*, vol. 13, pp. 2344–9, June 2013.
- [178] J. Schotter, A. Shoshi, and H. Brueckl, "Development of a magnetic lab-on-a-chip for point-of-care sepsis diagnosis," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 1671–1675, May 2009.
- [179] B. Eickenberg, F. Wittbracht, P. Stohmann, J.-R. Schubert, C. Brill, A. Weddemann, and A. Hütten, "Continuous-flow particle guiding based on dipolar coupled magnetic superstructures in rotating magnetic fields.," *Lab on a chip*, vol. 13, pp. 920–7, Mar. 2013.
- [180] A. van Reenen, A. M. de Jong, and M. W. J. Prins, "Transportation, dispersion and ordering of dense colloidal assemblies by magnetic interfacial rotaphoresis," *Lab on a Chip*, vol. 15, pp. 2864–2871, June 2015.
- [181] J. A. Owen, J. Punt, S. A. Stranford, P. P. Jones, and J. Kuby, *Kuby immunology*. Macmillan Higher Education, 2013.
- [182] G. Fingerle, a. Pforte, B. Passlick, M. Blumenstein, M. Ströbel, and H. W. Ziegler-Heitbrock, "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients.," *Blood*, vol. 82, pp. 3170–6, Nov. 1993.
- [183] W. a Nockher and J. E. Scherberich, "Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis.," *Infection and immunity*, vol. 66, pp. 2782–90, June 1998.
- [184] F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman, "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.," *Immunity*, vol. 19, pp. 71–82, July 2003.
- [185] D. Strauss-Ayali, S. M. Conrad, and D. M. Mosser, "Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, pp. 244–252, Jan. 2007.
- [186] L. Ziegler-Heitbrock, "The CD14+ CD16+ blood monocytes : their role in infection and inflammation.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 81, pp. 584–92, Mar. 2007.
- [187] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz, "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood," *Blood*, vol. 116, pp. e74–e80, Oct. 2010.

## Bibliographie

---

- [188] A. Ghattas, H. R. Griffiths, A. Devitt, G. Y. H. Lip, and E. Shantsila, "Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis : Where are we now?," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 62, no. 17, pp. 1541–1551, 2013.
- [189] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, and H. Wang, "Monocyte and macrophage differentiation : circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.," *Biomarker research*, vol. 2, pp. 1–1, Jan. 2014.
- [190] N. Periasamy and A. S. Verkman, "Analysis of fluorophore diffusion by continuous distributions of diffusion coefficients : application to photobleaching measurements of multicomponent and anomalous diffusion.," *Biophysical Journal*, vol. 75, pp. 557–567, July 1998.
- [191] M. Fouet, M.-A. Mader, S. Iraïn, Z. Yanha, A. Naillon, S. Cargou, A.-M. Gué, and P. Joseph, "Filter-less submicron hydrodynamic size sorting," *Lab on a Chip*, Jan. 2016.
- [192] E. L. Cussler, *Diffusion : mass transfer in fluid systems*. New York : Cambridge University Press, 1997.
- [193] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants, version 3.99," *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, vol. 14, pp. 29615–30521, Nov. 2014.
- [194] G. Fonnum, C. Johansson, A. Molteberg, S. Mørup, and E. Aksnes, "Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 293, pp. 41–47, May 2005.
- [195] A. Garcíá, J. Carrasco, J. Soto, F. Maganto, and C. Morón, "A method for calculating the magnetic field produced by a coil of any shape," *Sensors and Actuators A : Physical*, vol. 91, pp. 230–232, June 2001.
- [196] A. Beyzavi and N.-T. Nguyen, "Modeling and optimization of planar microcoils," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 18, pp. 095018–095018, Sept. 2008.
- [197] K. Kuns, "Calculation of Magnetic Field Inside Plasma Chamber," tech. rep., UCLA, 2007.
- [198] Z. J. Yang, T. H. Johansen, H. Bratsberg, G. Helgesen, and A. T. Skjeltorp, "Potential and force between a magnet and a bulk Y1Ba2Cu3O7- $\delta$  superconductor studied by a mechanical pendulum," *Superconductor Science and Technology*, vol. 3, p. 591, Dec. 1990.
- [199] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press, 2008.
- [200] K. R. Williams, S. Member, K. Gupta, S. Member, and M. Wasilik, "Etch Rates for Micromachining Processing — Part II," 2003.
- [201] V. De Giorgi, P. Pinzani, F. Salvianti, J. Panelos, M. Paglierani, A. Janowska, M. Grazzini, J. Wechsler, C. Orlando, M. Santucci, T. Lotti, M. Pazzagli, and D. Massi, "Application of a Filtration- and Isolation-by-Size Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells in Cutaneous Melanoma," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 130, pp. 2440–2447, Oct. 2010.
- [202] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Electrodynamics of continuous media*, vol. 8. elsevier, oxford : pergamon ed., 1963.

- [203] R. Manczak, M. Fouet, R. Courson, P.-L. Fabre, A. Montrose, J. Sudor, A.-M. Gue, and K. Reybier, "IMPROVED ON-CHIP IMPEDIMETRIC IMMUNO-DETECTION OF SUBPOPULATIONS OF CELLS TOWARD SINGLE-CELL RESOLUTION," *Sensors and Actuators B : Chemical*, Feb. 2016.
- [204] T. T. Vu, M. Fouet, A.-M. Gue, and J. Sudor, "A new and easy surface functionalization technology for monitoring wettability in heterogeneous nano- and microfluidic devices," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 196, pp. 64–70, June 2014.
- [205] Y. Viero, Q. He, M. Fouet, and A. Bancaud, "Single molecule study of DNA collision with elliptical nanoposts conveyed by hydrodynamics.," *Electrophoresis*, vol. 34, pp. 3300–4, Dec. 2013.
- [206] M. Fouet, R. Courson, X. Dollat, D. Médale, and A.-M. Gué, "A microfluidic magnetic hybrid actuator for advanced handling functions at cell resolution," in *10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, 2014.
- [207] M. Fouet, S. Cargou, R. Courson, C. Blatche, A. Montrose, K. Reybier, and A. M. Gue, "Multilevel 3D microfluidic technology for an innovative magnetic cell separation platform," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 440–442, CBMS, 2014.
- [208] R. Courson, M. Fouet, P. Joseph, F. Mesnilgrente, V. Conédéra, and A.-M. Gué, "SAMs vapor deposition : a ready to use functionalization technology for monitoring wettability properties in microfluidic devices," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 1909–1911, CBMS, 2014.
- [209] S. Cargou, M. Fouet, A. Montrose, D. Bourrier, K. Reybier, and A.-M. Gué, "An integrated magnetic planar actuator redefining multilevel (3D) microfluidic strategies," in *10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, 2014.
- [210] T. T. Vu, M. Fouet, A.-M. Gué, and J. Sudor, "An easy surface modification in heterogeneous nano and microfluidic devices," in *Chem. Listy*, pp. 338–340, 2013.



### Publications de l'auteur

Les articles et actes de conférences réalisés pendant la thèse sont listés ci-dessous.

#### Articles

M. Fouet, M.-A. Mader, S. Iraïn, Z. Yanha, A. Naillon, S. Cargou, A.-M. Gué, and P. Joseph, "Filter-less submicron hydrodynamic size sorting," *Lab on a Chip*, Jan. 2016

R. Manczak, M. Fouet, R. Courson, P.-L. Fabre, A. Montrose, J. Sudor, A.-M. Gue, and K. Reybier, "IMPROVED ON-CHIP IMPEDIMETRIC IMMUNO-DETECTION OF SUBPOPULATIONS OF CELLS TOWARD SINGLE-CELL RESOLUTION," *Sensors and Actuators B: Chemical*, Feb. 2016

T. T. Vu, M. Fouet, A.-M. Gue, and J. Sudor, "A new and easy surface functionalization technology for monitoring wettability in heterogeneous nano- and microfluidic devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 196, pp. 64–70, June 2014

R. Courson, S. Cargou, V. Conédéra, M. Fouet, M. C. Blatché, C. L. Serpentine, and A. M. Gue, "Low-cost multilevel microchannel lab on chip: DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler," *RSC Adv.*, Oct. 2014

Y. Viero, Q. He, M. Fouet, and A. Bancaud, "Single molecule study of DNA collision with elliptical nanoposts conveyed by hydrodynamics," *Electrophoresis*, vol. 34, pp. 3300–4, Dec. 2013

#### Conférences

M. Fouet, S. Cargou, R. Courson, X. Bouquet, L. Salvagnac, and A. M. Gue, "Multilevel (3D) lab on chip for implementing reconfigurable magnetophoretic functionalities," in *18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, pp. 529–532, IEEE, 21–25 June 2015

M. Fouet, R. Courson, X. Dollat, D. Médale, and A.-M. Gué, "A microfluidic magnetic hybrid actuator for advanced handling functions at cell resolution," in *10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, 2014

M. Fouet, R. Courson, S. Baster, and A.-M. Gué, "An integrated magneto-fluidic device enabling novel actuation functionalities," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 1533–1535, CBMS, 2014

M. Fouet, S. Cargou, R. Courson, C. Blatche, A. Montrose, K. Reybier, and A. M. Gue, "Multilevel 3D microfluidic technology for an innovative magnetic cell separation platform," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 440–442, CBMS, 2014

R. Courson, M. Fouet, P. Joseph, F. Mesnilgrete, V. Conédéra, and A.-M. Gué, "SAMs vapor deposition: a ready to use functionalization technology for monitoring wettability properties in microfluidic devices," in *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 1909–1911, CBMS, 2014

R. Courson, S. Cargou, V. Conédéra, M. Fouet, and A.-M. Gué, "Low cost integration of multilevel lab-on-a-chip using a new generation of dry film photoresists," in *Smart System Integration*, 2014

S. Cargou, M. Fouet, A. Montrose, D. Bourrier, K. Reybier, and A.-M. Gué, "An integrated magnetic planar actuator redefining multilevel (3D) microfluidic strategies," in *10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, 2014

T. T. Vu, M. Fouet, A.-M. Gué, and J. Sudor, "An easy surface modification in heterogeneous nano and microfluidic devices," in *Chem. Listy*, pp. 338–340, 2013