



**HAL**  
open science

# Réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible et étude du glissement par nanovélocimétrie

Loïc d'Eramo

► **To cite this version:**

Loïc d'Eramo. Réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible et étude du glissement par nanovélocimétrie. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066683 . tel-01593323

**HAL Id: tel-01593323**

**<https://theses.hal.science/tel-01593323v1>**

Submitted on 26 Sep 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 DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Microfluidique / Physique des liquides**

(ED 391 - Sciences mécaniques, acoustique, électronique et robotique de Paris)

Préparée à GULLIVER — MICROFLUIDIQUE, MEMS ET NANOSTRUCTURES (MMN)

Présentée par

**Loïc D'ERAMO**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel  
thermosensible  
&  
Étude du glissement par nanovélocimétrie**

Soutenance prévue le 1<sup>er</sup> décembre 2016

devant le jury composé de :

Mme. Martine	BEN AMAR	Examinatrice
Mme. Cécile	COTTIN-BIZONNE	Rapporteuse
Mme. Anne-Marie	GUÉ	Rapporteuse
M. Patrick	TABELING	Directeur de thèse
Mme. Yvette	TRAN	Membre invitée





---

## Remerciements

---



# Table des matières

<b>Présentation du manuscrit</b>	<b>1</b>
<b>I Réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible</b>	<b>3</b>
<b>1 État de l'art des actionneurs en microfluidique</b>	<b>5</b>
1.1 Actionneurs à activation mécanique . . . . .	7
1.1.1 Micro-vannes à activation mécanique localisée . . . . .	7
1.1.2 Micro-vannes à activation pneumatique . . . . .	9
1.2 Actionneurs à transition de phases . . . . .	14
1.2.1 Micro-vanne à transition solide/liquide . . . . .	14
1.2.2 Micro-vanne à mémoire de forme . . . . .	14
1.3 Actionneurs à base d'hydrogel . . . . .	15
1.3.1 Actionneurs hydrogels à membrane . . . . .	15
1.3.2 Actionneurs hydrogels intégrés . . . . .	16
1.4 Introduction à la notion de microfluidique reconfigurable . . . . .	16
1.5 Critères de comparaison des actionneurs . . . . .	20
1.6 Défis à relever des actionneurs à base d'hydrogel . . . . .	21
Bibliographie du chapitre . . . . .	23
<b>2 Microfabrication d'actionneurs à base de films d'hydrogel</b>	<b>27</b>
2.1 Description de la stratégie adoptée . . . . .	29
2.1.1 La technique générale de fabrication . . . . .	29
2.1.2 Un processus à deux substrats . . . . .	30
2.1.3 Une seule chimie : la réaction thiol-ène . . . . .	30
2.2 Procédé de fabrication . . . . .	31
2.2.1 Choix et modifications du polymère . . . . .	31
2.2.2 Dépôt de films épais de polymère . . . . .	32
2.2.3 Traitements des surfaces pour le greffage . . . . .	34
2.2.4 Deux voies de structuration UV . . . . .	37
2.2.5 Assemblage final . . . . .	45
2.3 Protocoles d'observation en fluorescence . . . . .	46
2.3.1 Profilométrie optique par fluorescence . . . . .	48
2.3.2 Mesure de température par fluorescence . . . . .	49
Bibliographie du chapitre . . . . .	51
<b>3 Mise en œuvre d'actionneurs à base d'hydrogel dans des systèmes dans des systèmes microfluidiques</b>	<b>53</b>
3.1 Activation thermique de structures en p(NIPAM) . . . . .	55

3.2	Géométrie type « vanne » . . . . .	57
3.2.1	Particularités de fabrication . . . . .	57
3.2.2	Profilométrie par fluorescence d'une vanne . . . . .	58
3.2.3	Étude d'une géométrie avec dérivation . . . . .	59
3.2.4	Étude du fonctionnement par mesure de débit . . . . .	62
3.2.5	Étude aux temps longs . . . . .	64
3.2.6	Possibilité d'une activation individualisée . . . . .	65
3.3	Compartmentation libre en système microfluidique . . . . .	71
3.3.1	Intérêt d'une telle disposition . . . . .	71
3.3.2	Propriétés de perméabilité du p(NIPAM) . . . . .	73
3.3.3	Intégration de compartiments à haute densité . . . . .	74
3.4	Applications dans le domaine des biotechnologies . . . . .	75
3.4.1	Piégeage de cellules uniques . . . . .	75
3.4.2	Amplification isotherme d'ADN . . . . .	77
	Bibliographie du chapitre . . . . .	81
 <b>II Étude du glissement par nanovélocimétrie</b>		<b>83</b>
 <b>4 État de l'art et compléments à la publication</b>		<b>85</b>
4.1	Le glissement hydrodynamique . . . . .	86
4.2	La méthode expérimentale utilisée : compléments . . . . .	88
4.2.1	Traitement de la source lumineuse . . . . .	88
4.2.2	Rendre la méthode quantitative . . . . .	89
4.3	La simulation de Langevin : compléments . . . . .	89
4.4	Conclusion . . . . .	91
	Bibliographie du chapitre . . . . .	93
 <b>5 Article dans <i>Journal of Fluid Mechanics</i></b>		<b>95</b>
 <b>Conclusion générale</b>		<b>123</b>
 <b>A Fabrication de substrats micro-structurés en PDMS</b>		<b>127</b>
A.1	Fabrication d'un moule en silicium avec des structures SU8 . . . . .	127
A.2	Moulage des structures en PDMS . . . . .	128
A.3	Cas particulier des timbres en PDMS . . . . .	128
 <b>B Dépôts métalliques par évaporation</b>		<b>131</b>
B.1	Préparation des surfaces . . . . .	131
B.2	Évaporation métallique pour le dépôt d'or . . . . .	131
 <b>C Amplification d'ADN isotherme par RCA</b>		<b>133</b>

---

## Présentation du manuscrit

---

Cette thèse est constituée de deux parties distinctes, qui abordent les études menées sur deux projets différents.

La première partie est dédiée à la réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible. C'est celle pour laquelle le temps investi a été le plus important, à savoir plus de deux ans, entre janvier 2014 et ce jour. Avec un contenu très axé sur les technologies mises en œuvre, nous présenterons l'approche qui nous a permis de proposer une nouvelle manière d'intégrer des structures d'hydrogel thermosensible dans les micro-systèmes et de les utiliser comme actionneurs. Ces travaux font suite à deux thèses réalisées au laboratoire par Clémence VERGNE et Benjamin CHOLLET, en collaboration avec le laboratoire Science et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM) à l'ESPCI. Elles ont permis de développer une technique robuste de fabrication qui nous permettra à l'avenir de nous tourner vers des applications dans les biotechnologies.

La seconde partie traite quant à elle de l'étude du glissement de fluides newtoniens par nanovélocimétrie en utilisant la technique de microscopie de fluorescence par réflexion interne totale, ou TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*). Elle utilise le suivi de nanoparticules fluorescentes pour déterminer la vitesse du fluide à proximité de la paroi d'un micro-canal. Ces travaux, réalisés en collaboration avec Zhenzhen LI pendant sa thèse, ont donné lieu à un article publié en janvier 2015 dans *Journal of Fluid Mechanics*. Nous nous contenterons de donner quelques précisions et éclairages sur les aspects propres à notre travail, pour finalement inclure l'article en question. Nous verrons que pour la première fois, les longueurs de glissement de fluides newtoniens sur des surfaces aux conditions de mouillage différentes ont été discriminées.



# Première partie

## Réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible





---

## État de l'art des actionneurs en microfluidique

---

### Sommaire du chapitre

---

1.1	Actionneurs à activation mécanique . . . . .	<b>7</b>
1.1.1	Micro-vannes à activation mécanique localisée . . . . .	7
1.1.2	Micro-vannes à activation pneumatique . . . . .	9
1.2	Actionneurs à transition de phases . . . . .	<b>14</b>
1.2.1	Micro-vanne à transition solide/liquide . . . . .	14
1.2.2	Micro-vanne à mémoire de forme . . . . .	14
1.3	Actionneurs à base d'hydrogel . . . . .	<b>15</b>
1.3.1	Actionneurs hydrogels à membrane . . . . .	15
1.3.2	Actionneurs hydrogels intégrés . . . . .	16
1.4	Introduction à la notion de microfluidique reconfigurable . . . . .	<b>16</b>
1.5	Critères de comparaison des actionneurs . . . . .	<b>20</b>
1.6	Défis à relever des actionneurs à base d'hydrogel . . . . .	<b>21</b>
	Bibliographie du chapitre . . . . .	<b>23</b>

---

Les progrès dans la maîtrise de l'outil microfluidique ont permis l'apparition de systèmes intégrés d'analyse appelés laboratoires sur puces, « Lab-On-a-Chip » (LOC). L'idée sous-jacente est de miniaturiser les opérations réalisées dans un laboratoire à taille humaine sur un dispositif centimétrique où les transports de matières se font à l'échelle micrométrique ; l'intérêt étant qu'à cette échelle, on améliore la prédictibilité des comportements des fluides, qu'on accélère le déroulement des différentes étapes d'analyses tout en réduisant les volumes des échantillons.

Afin d'augmenter leur potentiel, les LOC ont intégré des actionneurs. Les actionneurs apportent de nouvelles fonctions dans un laboratoire sur puce pour que les systèmes intégrés gagnent en performance, en rapidité, en transportabilité, en simplicité d'utilisation, tout en permettant aussi de diminuer les coûts de fabrication et de fonctionnement. On peut citer par exemple des fonctions de tri, de pompage des fluides, de stockage, etc.

Dans le cadre général de la microfluidique, l'émergence d'un matériau comme le polydiméthylsiloxane (PDMS), introduit par l'équipe de George M. Whitesides en 1998 [1], a rendu la technologie accessible à une plus grande part de la communauté scientifique en simplifiant les process de fabrication, en améliorant leur reproductibilité et en diminuant fortement les coûts (comparé à la fabrication de systèmes en silicium ou en verre notamment). Ces améliorations ont aussi bénéficié aux actionneurs.

Dans ce chapitre, nous allons présenter une vision d'ensemble du contrôle des fluides par des actionneurs à l'échelle micrométrique. Nous verrons qu'ils peuvent exister sous forme d'actionneurs à activation mécanique (avec paroi déformable donc), avec l'actionnement pneumatique comme principale solution actuelle. Dans un deuxième temps, nous considérerons d'autres actionneurs sans paroi mobile. Dans un troisième temps, nous nous focaliserons sur les actionneurs à base d'hydrogel, qui feront l'objet de cette thèse. Un quatrième paragraphe sera consacré à un aparté concernant la microfluidique reconfigurable, notion éclairante dans le cadre de notre étude. Enfin, après avoir comparé les différentes technologies d'actionneurs selon des critères choisis, nous ferons le bilan des défis à relever par les actionneurs à base d'hydrogel.

## 1.1 Actionneurs à activation mécanique

Cette catégorie d'actionneurs a pour principe de disposer d'une paroi déformable (typiquement une membrane élastique) qui peut obstruer le canal de circulation des liquides une fois déplacée — d'où l'appellation « mécanique ». On les distinguera selon qu'ils intègrent leur système d'activation de manière locale, à l'endroit où la déformation se produit, ou bien de manière externalisée, en dehors du micro-système.

### 1.1.1 Micro-vannes à activation mécanique localisée

Les revues de OH et AHN et AU et coll. recensent de nombreuses réalisations, dont les principales sont illustrées sur la figure 1.1.

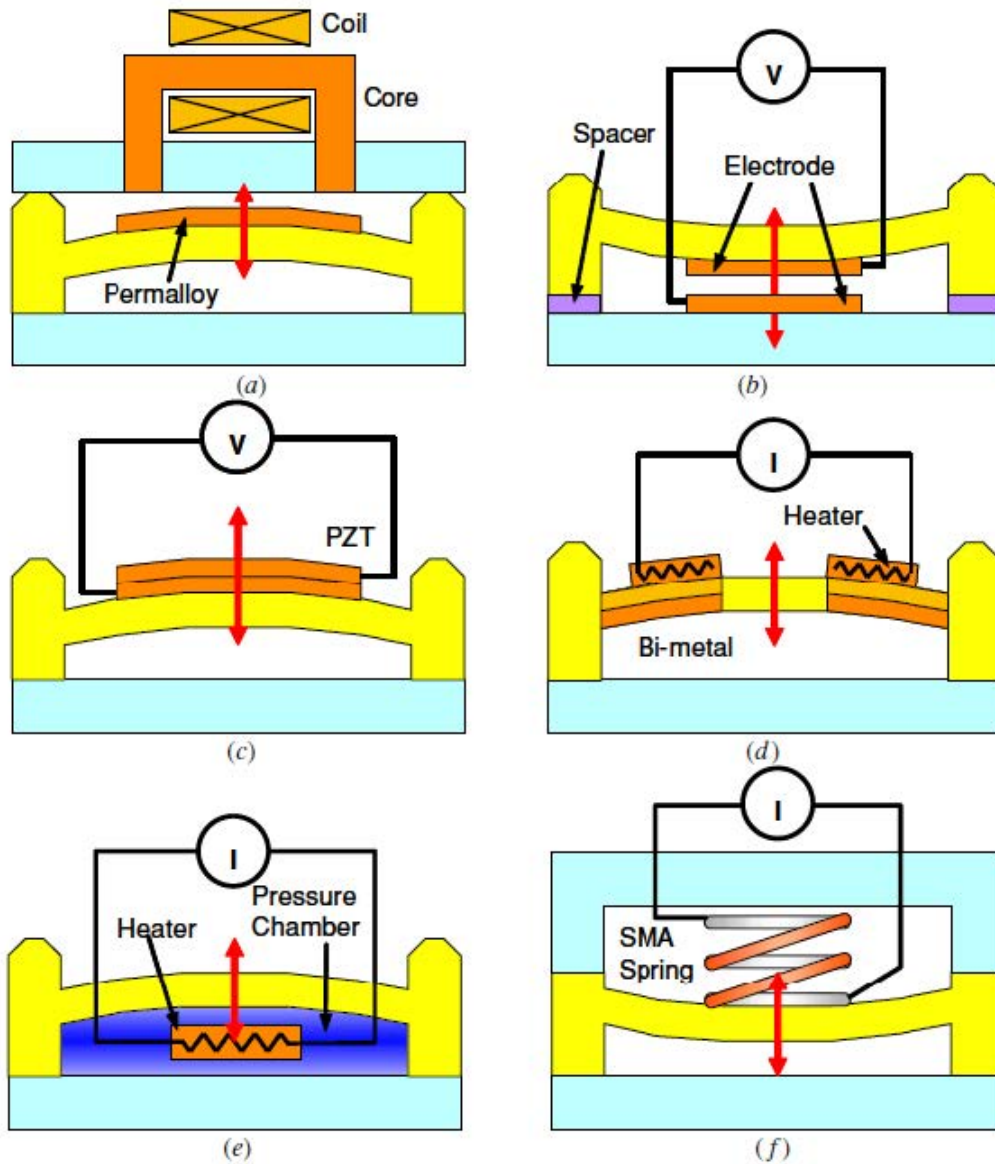
La première est historiquement la micro-vanne réalisée par TERRY et coll. [4] en 1979 (figure 1.1 (a)). Dans un dispositif de chromatographie en phase gaz en silicium, un solénoïde est lié à une membrane en nickel qui se déforme sous l'application d'un **champ magnétique**. Des optimisations à cette technique ont été apportées par la suite en intégrant des aimants permanents qui permettent une consommation moindre en énergie [5].

D'autres exemples, utilisant des modules **piézo-électriques**, des éléments **bimétalliques**, un effet **thermo-pneumatique** et des matériaux à **mémoire de forme** sont illustrés en figure 1.1 et peuvent être mentionnés.

Les matériaux piézo-électriques ont la capacité de se déformer sous l'application d'un champ électrique. Cette propriété peut être mise à profit pour actionner la déformation d'une membrane intégrée dans un actionneur (c). On retrouve cette méthode dans les travaux de ROGGE et coll.[6], où la micro-vanne réalisée a un temps de réponse inférieur à 2 ms, avec des dimensions millimétriques. Les travaux de WAIBEL et coll. intègrent une micro-vanne piézoélectrique dans un système de dosage précis sous forme de stylo. Là encore, les dimensions invoquées sont de l'ordre du millimètre, ce qui limite la capacité d'intégration dense sur un micro-système.

En ce qui concerne les activations bimétallique (d), thermo-pneumatique, et à matériaux à mémoire de forme, toutes trois permettent une action mécanique d'origine **thermique** : sous l'effet d'un changement de température, les matériaux se déforment, et déforment à leur tour la membrane sur laquelle ils sont implantés. JERMAN [8] a utilisé une lame bi-métallique silicium/aluminium, dont la différence de coefficient de dilatation thermique provoque la déformation. L'activation thermo-pneumatique (e) repose sur l'expansion volumique d'un fluide isolé du canal principal de circulation par une membrane [9]. Enfin, l'activation à base de matériaux à mémoire de forme repose sur leur capacité à retrouver leur géométrie initiale après déformation (f). On parle d'alliages à mémoire de forme, comme l'alliage de Titane et de Nickel utilisé par BENARD et coll. [10], qui fonctionne comme une membrane-ressort.

L'effet **électrostatique** peut aussi être mis à profit : en intégrant des électrodes à une membrane et à la base du substrat (b), on applique un champ électrique entre ces deux électrodes et la membrane se déforme. L'illustration la plus impressionnante est celle de



**Figure 1.1** – Illustration des principales méthodes d'activation des micro-vannes à paroi mobile : (a) électromagnétique ; (b) électrostatique ; (c) piézo-électrique ; (d) bi-métallique ; (e) thermo-pneumatique ; (f) à mémoire de forme. D'après [2].

CHANG et MAHARBIZ [11] dont la structure est détaillée en figure 1.2 (a). Une électrode en or est intégrée à une membrane en PDMS structurée qui forme un canal. En regard, une électrode en ITO (« Indium Tin Oxide ») est déposée sur le substrat de verre. Un isolant la sépare du canal. Lorsqu'on applique une tension aux bornes de ces électrodes, la membrane en PDMS se déforme et écrase le canal. Notons aussi par anticipation avec les propos du paragraphe 1.4 qu'en organisant ces vannes en une matrice hexagonale, les auteurs ont pu réaliser un système reconfigurable dans la mesure où différents chemins sont disponibles pour le fluide en écoulement selon le schéma d'activation des micro-vannes (voir figure 1.2 (b) et (c)).

Une autre méthode d'activation localisée utilise le changement de phase de la paraffine. YANG et LIN [12] utilisent un réservoir pressurisé rempli de paraffine surplombant une membrane en PDMS (figure 1.3). En faisant fondre la paraffine, le module élastique de l'ensemble {paraffine + membrane} diminue et peut se déformer sous la pression appliquée.

La fabrication de ces dispositifs peut s'avérer complexe puisqu'il faut ajouter des éléments actifs aux membranes déformables. Outre la complexité des opérations, ces éléments peuvent aussi être coûteux (les piézo-électriques notamment). Leur taille peut également limiter la densité d'intégration. Enfin, on constate que ces actionneurs sont quasi-exclusivement des vannes et que peu d'autres fonctions sont disponibles.

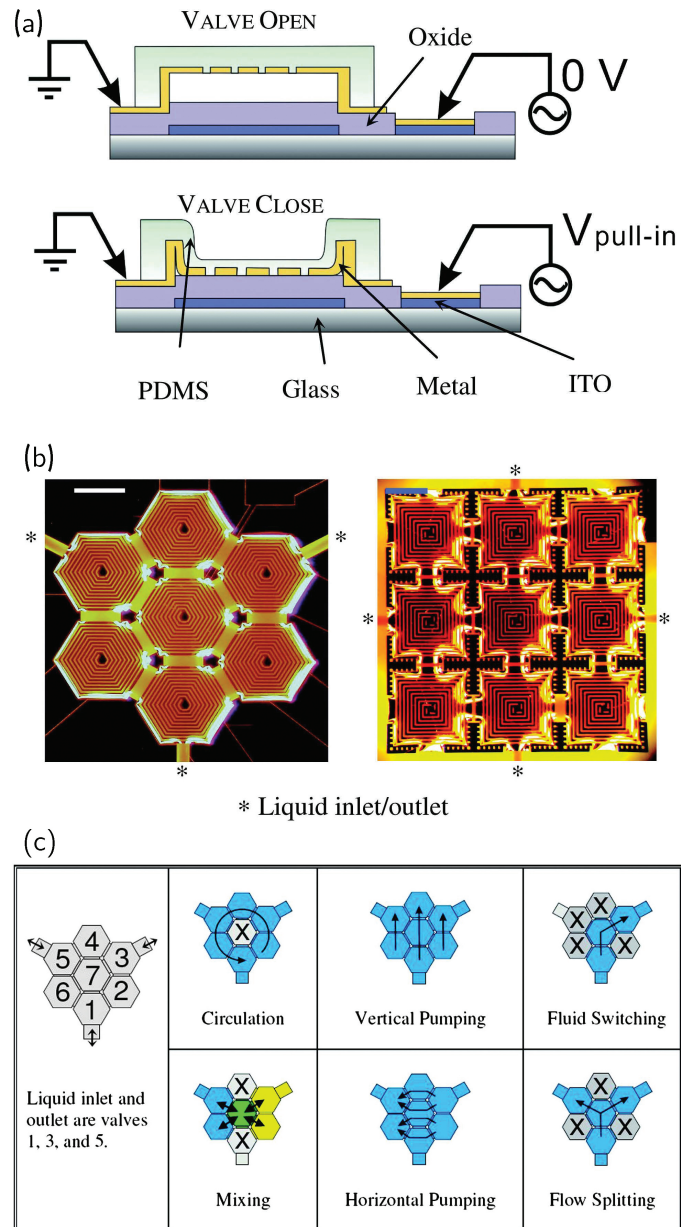
### 1.1.2 Micro-vannes à activation pneumatique

Introduits par l'équipe de S. Quake en 2000 [13], ces actionneurs pneumatiques reposent également sur le principe d'induire la déflexion d'une membrane en PDMS afin d'obstruer le canal de circulation des fluides. La différence majeure est que cette fois le dispositif d'activation est déplacé à l'extérieur du microsystème.

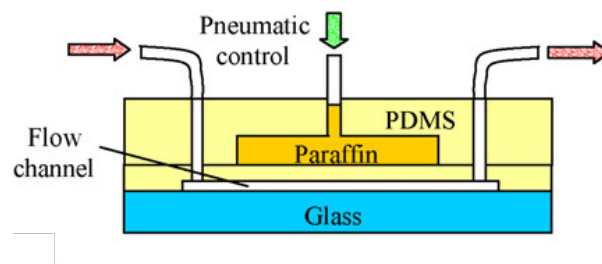
En effet, comme illustré en figure 1.4 A, ces actionneurs sont des vannes constituées par le croisement d'un canal dit de contrôle avec le canal principal, les deux canaux étant séparés par une fine couche de PDMS (40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur d'après les premiers travaux). Ces vannes ont initialement eu un fonctionnement normalement ouvert, et sont actionnées par application d'une pression dans le canal de contrôle. Cette surpression engendre la déformation de la membrane. Afin d'optimiser l'efficacité de la vanne, il est nécessaire que le canal principal soit de forme parabolique [14, 15]. Cela permet une obstruction complète du canal (voir figure 1.4 B).

Cette configuration a remporté un large succès auprès de la communauté microfluidique et même au-delà. Dans la mesure où elle ne fait intervenir que des techniques standard de lithographie, sa conception est considérée comme relativement simple. Au fil des années, la densité d'intégration a augmenté et les usages se sont diversifiés [16–21].

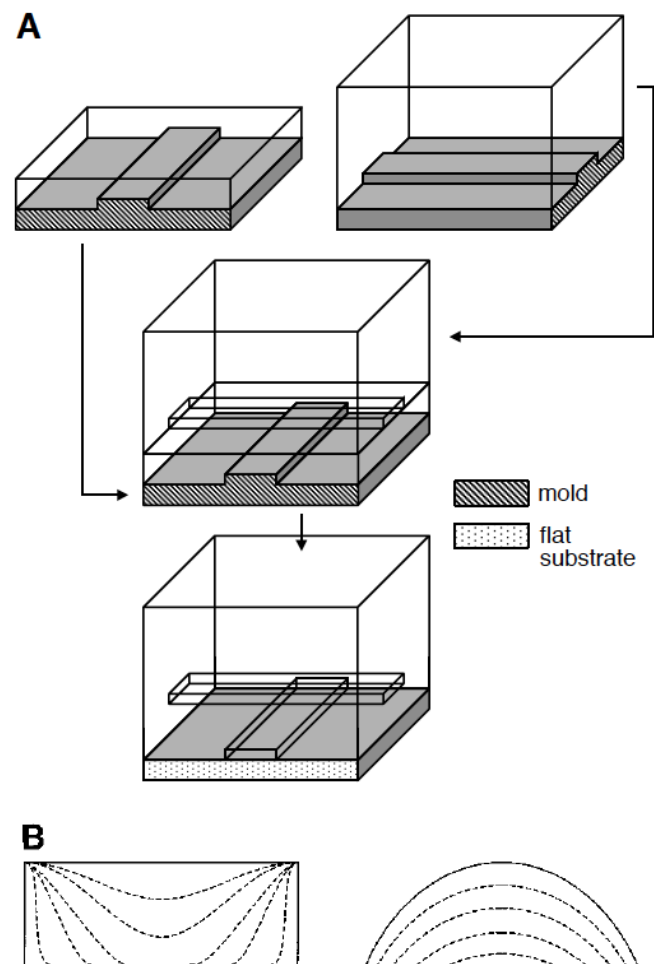
Le premier exemple illustré sur la figure 1.5 est un comparateur de 256 chambres de réaction qui, par l'activation sélective parmi 2056 micro-vannes grâce à 18 sources de pression différentes, permet de charger deux réactifs séparément, puis les mélanger, et éventuellement en récupérer le contenu individuellement. Il est utilisé pour observer l'expression d'une enzyme par une bactérie en fluorescence [18].



**Figure 1.2** – Vanne électrostatique à base de PDMS. (a) Schéma du principe de l'activation électrostatique normalement ouverte. Deux électrodes en regard permettent d'appliquer un champ électrique qui déforme la membrane. (b) Photographie de deux configurations d'intégration possibles à 7 (à gauche) et 9 éléments (à droite). (c) Schémas des différentes fonctions possibles d'un dispositif hexagonal à 7 éléments grâce à la reconfiguration des écoulements. D'après [11].

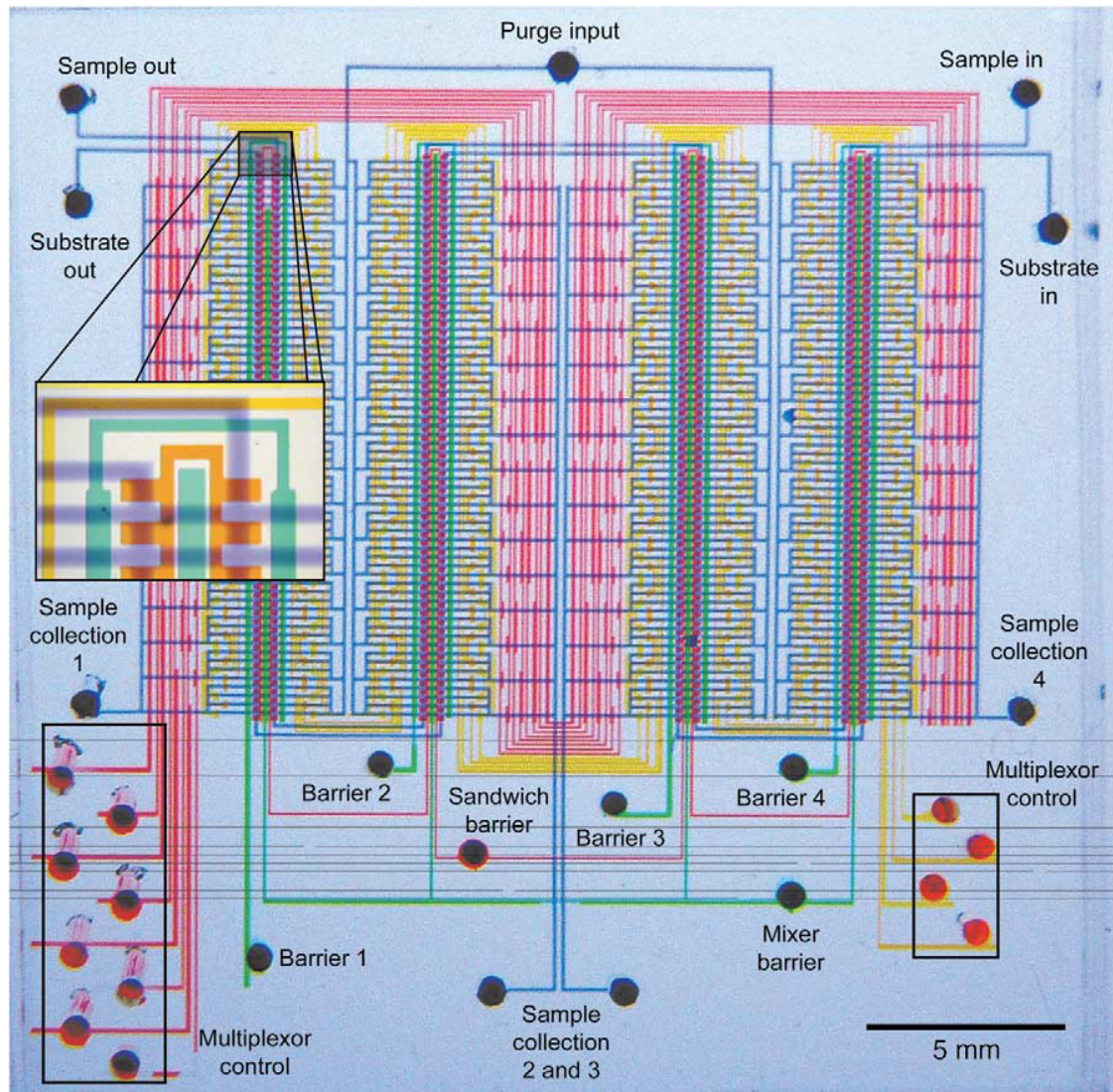


**Figure 1.3** – Vanne normalement ouverte à base de paraffine dans une configuration avec paroi mobile. D'après [12].

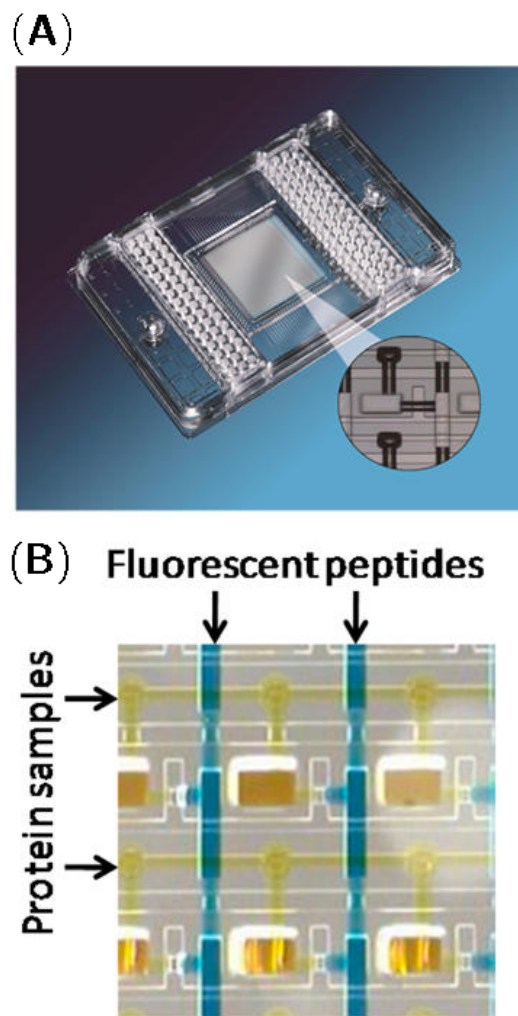


**Figure 1.4** – Principe du fonctionnement des vannes pneumatiques développées par S. Quake [13]. (A) Schéma de la structure d'une vanne pneumatique avec une fabrication en deux couches. (B) Comparaison de la fermeture d'une vanne selon que le canal principal est rectangulaire ou parabolique. Les pointillés représentent les positions de la membranes au fur et à mesure où l'on augmente la pression dans le canal de contrôle.





**Figure 1.5** – Photographie d'un comparateur à 256 chambres de réactions. Des liquides colorés permettent de visualiser les différentes fonctions et sources d'activations dans ce dispositif. D'après [18].

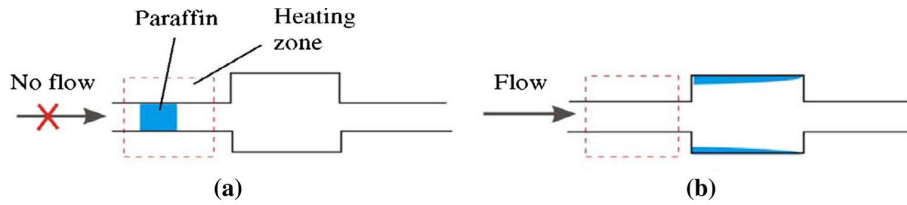


**Figure 1.6** – (A) Cartouche Dynamic Array 48.48 de Fluidigm. (B) Photographie de microscopie de la cartouche où les canaux dédiés à l'étude multiplexée des interactions peptides/protéines sont colorés. Les structures transparentes sont les canaux de contrôle des vannes pneumatiques. D'après [22].

La société Fluidigm (États-Unis) commercialise des consommables microfluidiques basés sur cette technologie, ainsi que les équipements d'analyse associés. Les produits vendus permettent plusieurs opérations de manipulation de matériel biologique, avec notamment la cristallisation de protéines, l'amplification d'ADN, et la manipulation de cellules uniques.

Le dernier exemple fait appel à un produit Fluidigm : il s'agit d'une « cartouche » de 2304 chambres de réaction de 9 nl (représentée sur la figure 1.6 (A)) employée pour l'étude multiplexée des interactions protéines/ligands [22]. Cette cartouche est aussi dédiée à l'amplification d'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

En général, le contrôle d'une grande quantité de ces actionneurs s'avère complexe et coûteux : le transfert de la technologie dans les laboratoires et l'industrie ne s'est pas opéré aussi facilement qu'attendu [23].



**Figure 1.7** – Vanne à transition de phase à base de paraffine, d'après [24]. (a) Schéma de la situation initiale où un bouchon de paraffine bouche le canal. (b) Après chauffage, la paraffine fond et s'évacue dans la chambre de refroidissement.

## 1.2 Actionneurs à transition de phases

Le fonctionnement des actionneurs à transition de phases repose sur la capacité de certains matériaux à changer brutalement ses caractéristiques (densité, module élastique, affinité avec le milieu ambiant, etc.) lorsque des conditions critiques sont satisfaites. Ce changement de phase est souvent provoqué par activation thermique, et il ne nécessite pas beaucoup d'apport d'énergie.

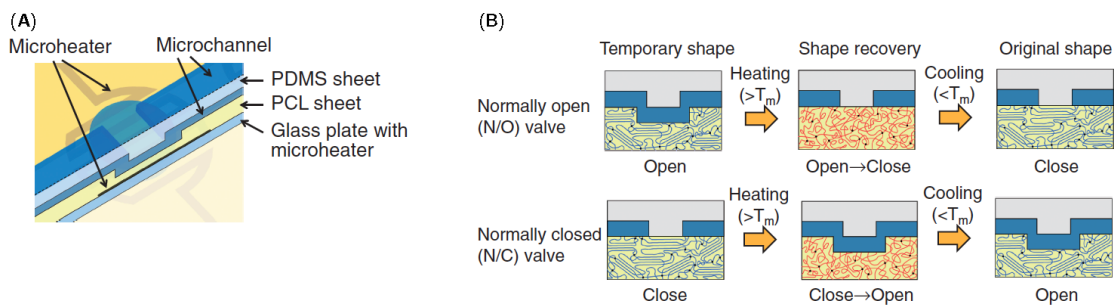
### 1.2.1 Micro-vanne à transition solide/liquide

La première fait appel à la paraffine [24]. Dans cette étude, les auteurs utilisent le changement d'état solide/liquide de la paraffine à 70 °C pour réaliser un bouchon de paraffine et matérialiser une vanne (figure 1.7). Grâce à un module Peltier, ils sont en mesure de chauffer le système à 90 °C pour faire fondre une petite quantité de paraffine, qui va ainsi se déplacer sous l'application d'une pression, puis de la refroidir à un autre endroit afin de créer un bouchon. Plusieurs géométries ont été réalisées, avec par exemple une géométrie en « T » qui permet de réaliser un tri. L'inconvénient majeur de cette technique est que son utilisation est à **usage unique** : dès que le bouchon de paraffine fondu est déplacé hors de la zone d'intérêt, il est perdu. Néanmoins, les auteurs démontrent qu'il est possible de réaliser une amplification d'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction »). D'autres utilisations de la paraffine sont résumées dans la revue de OGDEN et coll. [25].

### 1.2.2 Micro-vanne à mémoire de forme

Il est possible d'utiliser les matériaux à mémoire de forme sans faire appel à une paroi mobile : en utilisant un polymère (poly( $\epsilon$ -caprolactone)), TAKEHARA et coll. [26] ont réalisé des vannes activables par *stimulus* thermique autour de 50 °C (figure 1.8). Elles sont dédiées à un **usage unique** puisque leur activation n'est pas réversible. L'intégration à plus grande densité est rendue possible par l'ajout de micro-résistances chauffantes. De plus, la puissance nécessaire à l'activation est inférieure à 100 mW et le temps de réponse inférieur à la seconde.

Dans cette catégorie des actionneurs à transition de phases, on peut intégrer les actionneurs à base d'hydrogel stimuable. Afin d'en détailler l'étude, nous les traiterons à part.



**Figure 1.8** – Vanne à mémoire de forme d'après [26]. (A) Schéma du dispositif intégrant une couche de poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). (B) En haut : vanne normalement ouverte. En bas : vanne normalement fermée.

## 1.3 Actionneurs à base d'hydrogel

L'utilisation d'hydrogels pour la réalisation d'actionneurs peut se faire avec ou sans l'implication d'une membrane. Néanmoins, elle repose dans tous les cas sur un principe de base des hydrogels : par une variation des paramètres physiques de son environnement (*stimulus*), en milieu aqueux, un hydrogel va voir son volume changer avec une grande amplitude (plus d'un ordre de grandeur sur le volume entre deux états). En voici quelques exemples, notamment issus des travaux de HILBER [27].

### 1.3.1 Actionneurs hydrogels à membrane

Le principe est d'utiliser la variation de volume induite par le gonflement de l'hydrogel pour déplacer une membrane élastique. Il a été mis en œuvre par LIU et coll. [28, 29]. Cette micro-vanne utilise un matériau polymérisé *in-situ* dans un canal de contrôle, séparé du canal principal où les fluides circulent par une membrane élastique en PDMS de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Lorsque circule une solution à pH 11 dans le canal de contrôle, l'hydrogel subit un changement de phase et gonfle. Cela a pour effet de déplacer la membrane en PDMS. À noter qu'il est rapporté un déplacement de 185  $\mu\text{m}$  de la membrane en 19s, soit un temps de réponse assez long. Des travaux similaires ont été réalisés en utilisant pour stimulus la température. Après la démonstration de l'équipe de Fréchet en 1997 [30], on peut citer les travaux de HARMON et coll. [31], qui, en utilisant du poly(N-isopropylacrylamide) (p(NIPAM)), induit un déplacement allant jusqu'à 380  $\mu\text{m}$  en presque 20 minutes avec un compartiment hydrogel de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. D'autres travaux théoriques et expérimentaux [32–34] montrent le potentiel de cette technologie, tout en soulevant tout de même plusieurs inconvénients :

- la fabrication nécessite la superposition et l'alignement de plusieurs couches, dont la fine membrane.
- le temps de réponse de ces systèmes varie de la dizaine de secondes à la minute (voir ci-après).
- la résolution spatiale de la polymérisation *in-situ* limite la densité d'intégration de ce type de dispositif.



Quels que soient les *stimuli*, l'hydrogel sensible est ici séparé du canal principal. Une autre stratégie où l'hydrogel est intégré a également été envisagée.

### 1.3.2 Actionneurs hydrogels intégrés

Le fait d'intégrer l'actionneur dans le canal de circulation des fluides permet en général de simplifier les étapes de fabrication. L'équipe de Beebe [35] a proposé en 2000 une stratégie qui permet de résoudre plusieurs problèmes évoqués plus tôt. En juxtaposant plusieurs manchons d'hydrogel autour de plots en résine, la distance sur laquelle le solvant doit diffuser est réduite : le temps de réponse annoncé est réduit à 8 secondes, alors qu'il faut 130 secondes avec une structure unique (voir figure 1.9 e). L'hydrogel en question est ici sensible à la variation de pH.

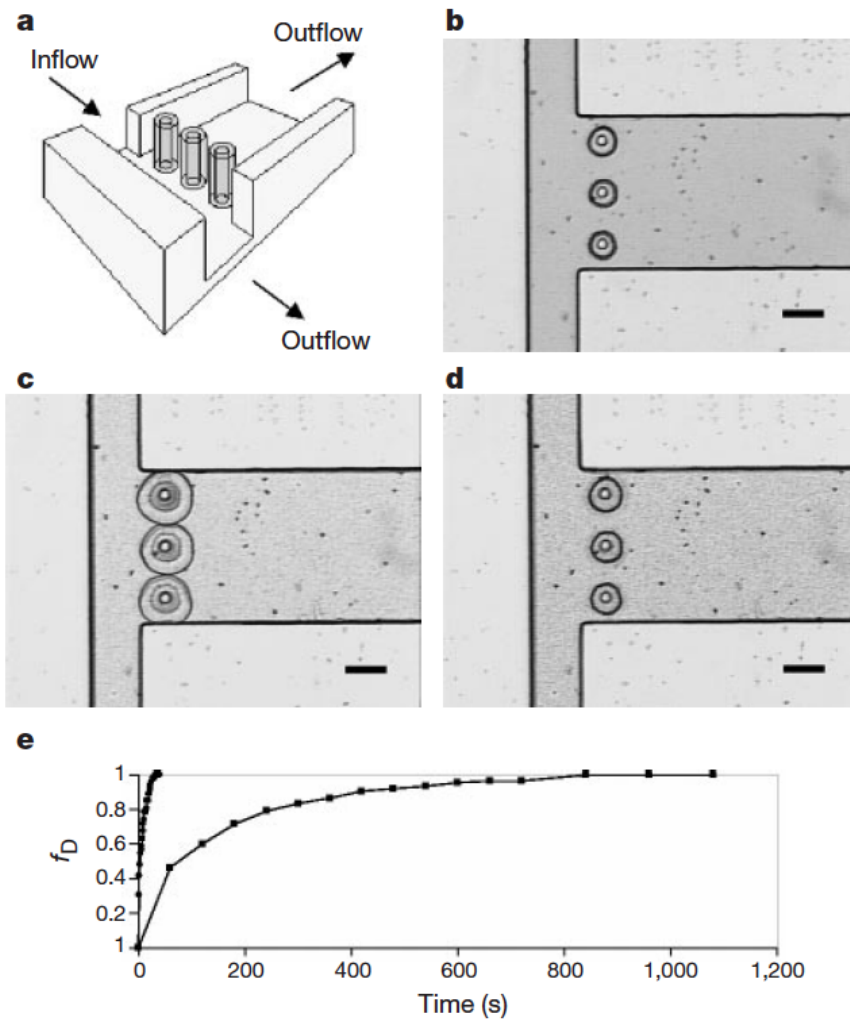
Du point de vue de la fabrication, cette méthode présente l'avantage de ne nécessiter que deux substrats pour constituer le système complet, contre au moins trois dans une configuration mécanique. La polymérisation *in-situ* du polymère est réalisée en injectant une solution de monomères à laquelle est ajouté un photo-initiateur puis en éclairant cette solution avec une lampe UV à travers un photomasque en prenant soin d'aligner ce dernier avec les plots qui supportent les manchons. La résolution spatiale est aussi améliorée puisque les structures ont chacune un diamètre de 200  $\mu\text{m}$ .

Cependant, des contraintes demeurent. D'abord, la présence des plots et des manchons d'hydrogel sur toute la hauteur du canal implique une augmentation de la résistance hydrodynamique conséquente, y compris dans le cas ouvert. Ensuite, les manchons d'hydrogel ne sont pas liés à leur support. Or, comme le suggèrent MARCOMBE et coll. [36], de fortes contraintes mécaniques peuvent s'exercer au sein de l'hydrogel lors des cycles de gonflement/effondrement. Elles peuvent avoir pour conséquences une détérioration progressive des manchons d'hydrogel.

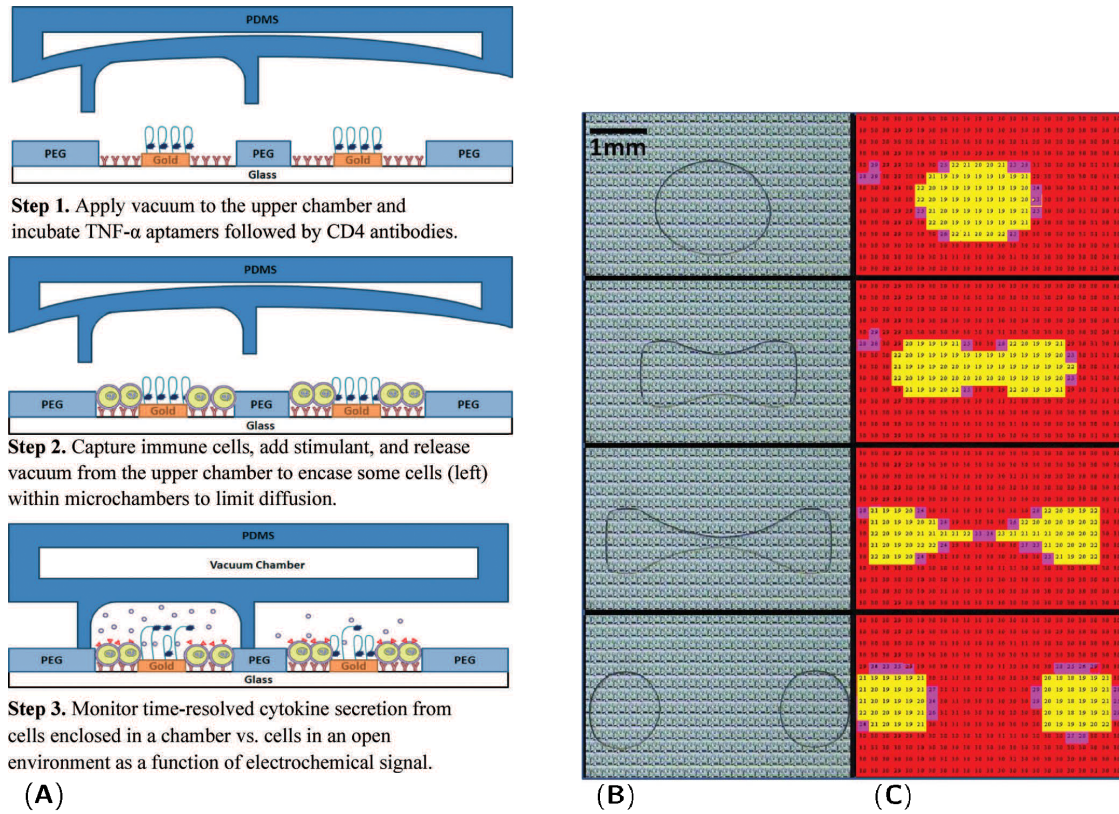
Cet inconvénient peut être évité en adoptant une autre géométrie, basée sur les films fins d'hydrogels, et évoqué dans la littérature par TOKAREV et MINKO [37] puis réalisé plus tard par BÄCKER et coll. [38]. Le principe est cette fois d'utiliser l'hydrogel (du p(NIPAM) et du poly(sodium acrylate)) sous forme de film épais de 10  $\mu\text{m}$ , polymérisé *in situ* par UV sur une portion élargie d'un canal microfluidique. La rétrécissement de la largeur du canal après la portion élargie assure une meilleure immobilisation de la structure d'hydrogel. S'ils n'ont pas réussi à résoudre tous les problèmes — la vanne n'est pas totalement étanche, la fuite mesurée est de 1  $\mu\text{l/s}$ , et la fabrication est complexe —, cette méthode permet de considérer le problème sous un autre angle.

## 1.4 Introduction à la notion de microfluidique reconfigurable

On appellera système « reconfigurable » un dispositif qui permet de modifier à la demande sa géométrie, sur *stimulus* extérieur. Un système muni de micro-vanne en est l'illustration minimale.



**Figure 1.9** – (a) Schéma du dispositif de vanne à base manchons de p(NIPAM) autour de plots en PDMS. (b) Photographie du dispositif après polymérisation de l'hydrogel. (c) État gonflé de l'hydrogel ; le canal à droite est isolé du reste du circuit. (d) État effondré de l'hydrogel. (e) Comparaison de la réponse temporelle entre le cas d'une structure unique (■) et celui des manchons d'hydrogel (●). D'après [35].

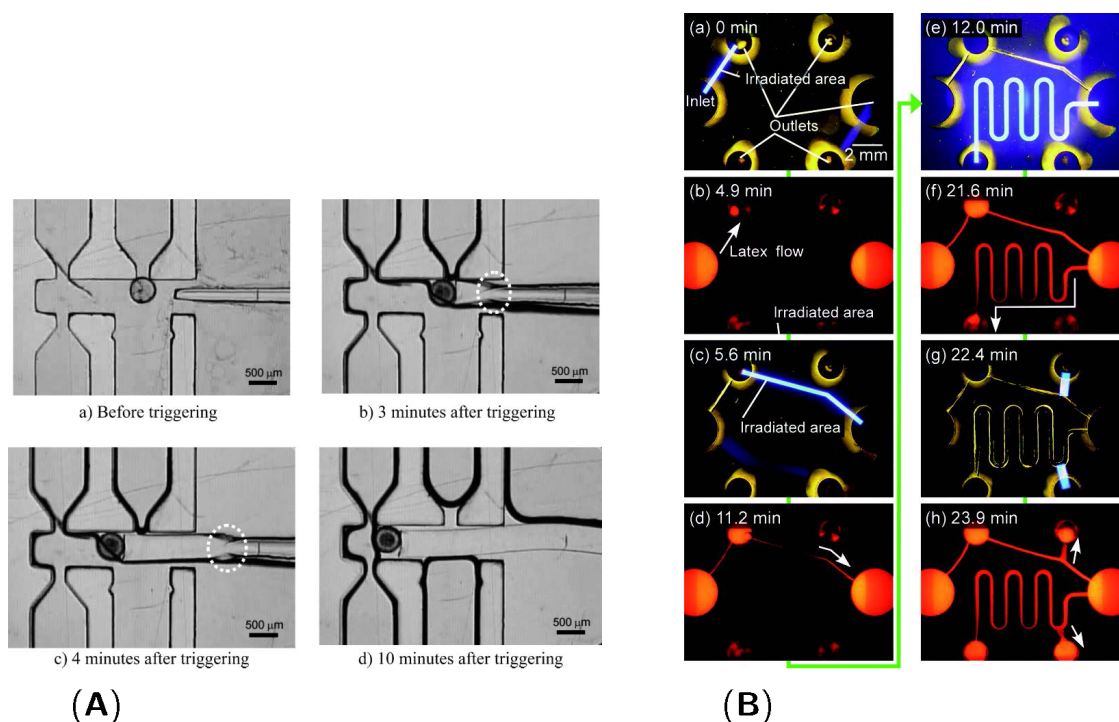


**Figure 1.10** – Exemples de systèmes microfluidiques reconfigurables. (A) Système reconfigurable pneumatique. D'après [40]. (B) Séquence de photographies de la manipulation d'une goutte par EWOD. (C) Matrice des pixels activés correspondante. D'après [41].

Nous allons présenter dans ce paragraphe différents moyens d'introduire de la « reconfigurabilité » dans les systèmes microfluidiques.

Le premier est basé sur les systèmes pneumatiques. L'équipe de Revzina a utilisé un système qui s'apparente à des chambres isolées sous la forme de vannes normalement fermées (voir figure 1.10 (A)) [39, 40]. Lorsqu'on applique une pression négative au canal de contrôle, la membrane en PDMS se déforme pour ouvrir la vanne — soit la chambre. On peut alors introduire différents réactifs dans le dispositif, soit ici des aptamères, antigènes et cellules. Ensuite, on rétablit une différence de pression nulle, ce qui a pour effet de rétablir les compartiments et isoler certaines parties du système, pour une analyse cinétique de l'émission de protéines par les cellules dans les différents environnements. Ce dispositif présente les avantages et les inconvénients des systèmes pneumatiques : il a un temps de réponse court, mais l'aspect reconfigurable est assez binaire, puisqu'on ne fait que déplacer des structure rigides. De plus, il ne permet de travailler qu'à très faibles pressions.

Le second s'appuie sur le phénomène d'électromouillage, et a été réalisé par HADWEN et coll. [41]. Des gouttes sont manipulées assez précisément dans l'espace par une matrice de pixels activés à la demande pour modifier la topographie du champ électrique. Cette modification induit une variation de la tension de surface de la goutte avec le substrat — c'est le principe de l'électromouillage — et permet de déplacer, scinder en deux (voir figure 1.10 (B)), fusionner, mélanger des gouttes. La matrice est contrôlée par ordinateur, avec une technologie similaire à celle utilisée dans les afficheurs de type TFT (« Thin-film transistor »). Ici encore, les temps de réponse sont courts, et de plus la flexibilité dans la

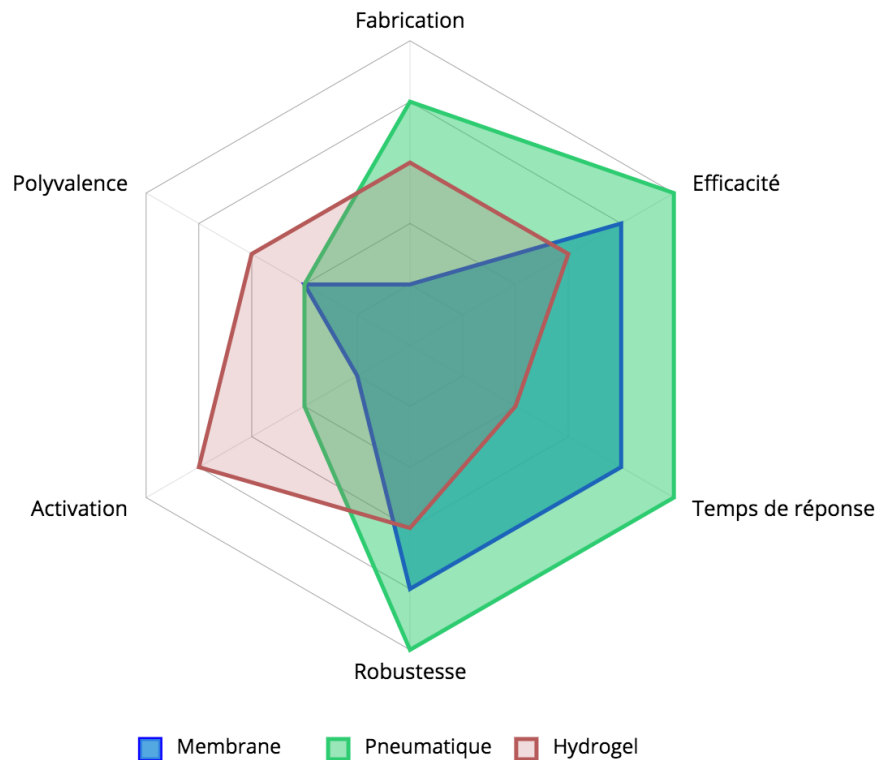


**Figure 1.11** – Exemples de systèmes reconfigurables à base d'hydrogel. (A) Séquence d'activation d'un piston en hydrogel thermosensible pour déplacer une bille. D'après [42]. (B) Séquence d'images montrant la création d'un canal microfluidique dans un hydrogel photo-sensible par micro-projection. D'après [43].

manipulation des compartiments est bien plus grande. Par contre, le dispositif repose sur une électronique relativement complexe et coûteuse. De plus, les volumes manipulés sont en général plutôt grands, ce qui implique une moins grande densité d'intégration.

Les deux derniers exemples utilisent des hydrogels et sont illustrés sur la figure 1.11. Le premier d'entre eux date de 2007 et est issu de l'équipe de Beebe [42]. Leur réalisation repose sur l'intégration d'un piston en hydrogel thermosensible. Ce piston est en fait un bloc longiligne d'hydrogel qui, en gonflant, se déforme pour pousser du liquide ou bloquer certaines parties du système, comme illustré sur la figure 1.10 (A). On peut y voir une nouvelle façon de disposer de parois actives et mobiles en microfluidiques. Cependant, les temps de réponses sont très longs : il faut 10 minutes au piston pour parcourir 1,8 mm. Le deuxième utilise un polymère photosensible [43]. SUGIURA et coll. sont parvenus à atteindre une reconfigurabilité complète : des microcanaux sont « dessinés » dans une couche d'hydrogel (du p(NIPAM) fonctionnalisé avec du spiropyrane), comme représenté sur la figure 1.10 (B). Celui-ci s'effondre lorsqu'il est soumis à une radiation à 436 nm, ce qui laisse le champ libre au fluide. D'un point de vue pratique, cela est réalisé grâce à un dispositif optique avancé de microprojection. Une fois encore, le temps de réponse n'est pas optimal : on parle de plusieurs minutes pour ouvrir un canal, et d'une heure pour qu'il se referme. Néanmoins, la résolution spatiale peut atteindre 10 μm avec un objectif à fort grossissement, ce qui constitue un beau progrès. Cela au prix d'un dispositif optique également coûteux.





**Figure 1.12** – Comparaison des performances des technologies à membranes, pneumatique et hydrogel, en tant qu'actionneurs en microfluidique. Si la supériorité des actionneurs pneumatiques semble démontrée, il existe un potentiel non négligeable pour les actionneurs à base d'hydrogel.

## 1.5 Critères de comparaison des actionneurs

Plusieurs critères ont été choisis pour évaluer les performances des différentes technologies en se basant sur les besoins de l'utilisateur final :

- fabrication : facilité et coût de la production d'un système.
- efficacité : capacité à isoler les fluides — par exemple l'étanchéité dans le cas d'une micro-vanne.
- temps de réponse : brièveté du processus d'actionnement.
- robustesse : tenue et durabilité du système.
- activation : facilité de l'actionnement à l'utilisation et capacité d'intégration à grande échelle.
- polyvalence : capacité à réaliser des opérations variées : vanne, pompe, régulation, etc.

Chacun de ces critères est caractérisé par une « note » allant de 0 à 5, certes arbitraire mais qui reflète le niveau de chaque technologie pour le critère en question. Le résultat est représenté par le schéma 1.12.

On constate que l'utilisation d'un contrôle pneumatique satisfait le plus grand nombre de critères, mais l'activation de ces systèmes est contraignante (nombreuses sources de pressions) et ils ne sont pas très polyvalents. Leurs bonnes performances dans les autres secteurs leur ont permis de s'imposer dans les solutions commerciales. En ce qui concerne les approches à membranes, elles sont pénalisées par une fabrication complexe ainsi que

par peu de polyvalence possible.

Les actionneurs à base d'hydrogels sensibles sont prometteurs : ils présentent l'avantage d'ouvrir la voie à de nouveaux usages et leur activation possible par différents facteurs environnementaux renforcent cette idée, même si à ce jour leurs performances sont à améliorer en ce qui concerne notamment le temps de réponse, le contrôle sur la fabrication et la robustesse des dispositifs. Ce sont d'ailleurs les axes d'améliorations qui seront présentés par la suite.

## 1.6 Défis à relever des actionneurs à base d'hydrogel

Notre approche consiste à s'inspirer des progrès réalisés par les travaux de Beebe et de Bäcker et à faire évoluer les actionneurs à base d'hydrogel de manière à répondre à plusieurs besoins ; non seulement ils devront être capables de remplir les fonctions classiques des actionneurs — à savoir le contrôle des flux — mais aussi d'apporter de nouvelles fonctions.

On dresse ainsi un cahier des charges des caractéristiques que doit présenter la technologie, que l'on peut faire au regard de la comparaison des performances des différentes technologies.

Critère	Problème rencontré	Évolution envisagée
Fabrication	Mauvais contrôle des propriétés de l'hydrogel	Fabrication <i>ex situ</i>
Efficacité	Étanchéité perfectible	Géométrie repensée
Temps de réponse	Volume important donc temps longs	Films d'hydrogel
Robustesse	Mauvaise tenue dans le temps	Greffage de l'hydrogel
Polyvalence	Vannes uniquement	Nouvelles fonctions grâce à la structuration
Activation	Satisfaisante	Améliorer sa résolution

**Table 1.1** – Illustration des points faibles de la technique, et du cahier des charges établi en conséquence.



## Bibliographie du chapitre

- [1] David C. DUFFY et coll. « Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in poly(dimethylsiloxane) ». In : *Analytical Chemistry* 70.23 (1998), p. 4974–4984.
- [2] Kwang W. OH et Chong H. AHN. « A review of microvalves ». en. In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16.5 (2006), R13.
- [3] Anthony K. AU et coll. « Microvalves and Micropumps for BioMEMS ». en. In : *Micromachines* 2.2 (2011), p. 179–220.
- [4] S. C. TERRY, J. H. JERMAN et J. B. ANGELL. « A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer ». In : *IEEE Transactions on Electron Devices* 26.12 (1979), p. 1880–1886.
- [5] A MECKES et coll. « Microfluidic system for the integration and cyclic operation of gas sensors ». In : *Sensors and Actuators A : Physical* 76.1 (1999), p. 478–483.
- [6] T ROGGE, Z RUMMLER et WK SCHOMBURG. « Polymer micro valve with a hydraulic piezo-drive fabricated by the AMANDA process ». In : *Sensors and Actuators A : Physical* 110.1 (2004), p. 206–212.
- [7] G WAIBEL et coll. « Highly integrated autonomous microdosage system ». In : *Sensors and Actuators A : Physical* 103.1 (2003), p. 225–230.
- [8] Hal JERMAN. « Electrically activated normally closed diaphragm valves ». In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 4.4 (1994), p. 210.
- [9] Toyohiro NAITO et coll. « Temperature-driven self-actuated microchamber sealing system for highly integrated microfluidic devices ». In : *Lab on a Chip* 13.3 (2013), p. 452–458.
- [10] William L BENARD et coll. « Thin-film shape-memory alloy actuated micropumps ». In : *Journal of Microelectromechanical Systems* 7.2 (1998), p. 245–251.
- [11] Meng-Ping CHANG et Michel M. MAHARBIZ. « Electrostatically-driven elastomer components for user-reconfigurable high density microfluidics ». en. In : *Lab on a Chip* 9.9 (2009), p. 1274.
- [12] Bozhi YANG et Qiao LIN. « A latchable microvalve using phase change of paraffin wax ». In : *Sensors and Actuators A : Physical* 134.1 (2007), p. 194–200.
- [13] Marc A. UNGER et coll. « Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multi-layer Soft Lithography ». en. In : *Science* 288.5463 (2000), p. 113–116.
- [14] Vincent STUDER et coll. « Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve ». In : *Journal of applied physics* 95.1 (2004), p. 393–398.
- [15] Anna PANDOLFI et Michael ORTIZ. « Improved design of low-pressure fluidic microvalves ». In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17.8 (2007), p. 1487.
- [16] Kazuo HOSOKAWA et Ryutaro MAEDA. « A pneumatically-actuated three-way microvalve fabricated with polydimethylsiloxane using the membrane transfer technique ». In : *Journal of Micromechanics and Microengineering* 10.3 (2000), p. 415.
- [17] Hou-Pu CHOU, Marc A. UNGER et Stephen R. QUAKE. « A Microfabricated Rotary Pump ». en. In : *Biomedical Microdevices* 3.4 (2001), p. 323–330.
- [18] Todd THORSEN, Sebastian J. MAERKL et Stephen R. QUAKE. « Microfluidic Large-Scale Integration ». en. In : *Science* 298.5593 (2002), p. 580–584.
- [19] Carl L. HANSEN et coll. « A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion ». en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.26 (2002), p. 16531–16536.

- [20] Jian LIU, Carl HANSEN et Stephen R. QUAKE. « Solving the “World-to-Chip” Interface Problem with a Microfluidic Matrix ». In : *Analytical Chemistry* 75.18 (2003), p. 4718–4723.
- [21] William H GROVER et coll. « Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 89.3 (2003), p. 315–323.
- [22] Lih Feng CHEOW et coll. « Multiplexed Analysis of Protein–Ligand Interactions by Fluorescence Anisotropy in a Microfluidic Platform ». In : *Analytical Chemistry* 86.19 (2014), p. 9901–9908.
- [23] Eric K. SACKMANN, Anna L. FULTON et David J. BEEBE. « The present and future role of microfluidics in biomedical research ». en. In : *Nature* 507.7491 (2014), p. 181–189.
- [24] Robin H LIU et coll. « Single-use, thermally actuated paraffin valves for microfluidic applications ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 98.2 (2004), p. 328–336.
- [25] Sam OGDEN et coll. « Review on miniaturized paraffin phase change actuators, valves, and pumps ». In : *Microfluidics and nanofluidics* 17.1 (2014), p. 53–71.
- [26] Hiroaki TAKEHARA et coll. « Novel Microfluidic Valve Technology Based on Shape Memory Effect of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) ». In : *Applied Physics Express* 6.3 (2013), p. 037201.
- [27] Wolfgang HILBER. « Stimulus-active polymer actuators for next-generation microfluidic devices ». en. In : *Applied Physics A* 122.8 (2016), p. 751.
- [28] R. H. LIU, Qing YU et D. J. BEEBE. « Fabrication and characterization of hydrogel-based microvalves ». In : *Journal of Microelectromechanical Systems* 11.1 (2002), p. 45–53.
- [29] Robin H. LIU et coll. « In-Channel Processing to Create Autonomous Hydrogel Microvalves ». en. In : *Micro Total Analysis Systems 2000*. Sous la dir. d’Albert van den BERG, W. OLTHUIS et Piet BERGVELD. Springer Netherlands, 2000, p. 45–48.
- [30] Eric C PETERS, Frantisek SVEC et Jean MJ FRÉCHET. « Thermally responsive rigid polymer monoliths ». In : *Advanced Materials* 9.8 (1997), p. 630–633.
- [31] Marianne E HARMON, Mary TANG et Curtis W FRANK. « A microfluidic actuator based on thermoresponsive hydrogels ». In : *Polymer* 44.16 (2003), p. 4547–4556.
- [32] H MAZAHERI et coll. « Inhomogeneous swelling behavior of temperature sensitive PNIPAM hydrogels in micro-valves : analytical and numerical study ». In : *Smart Materials and Structures* 24.4 (2015), p. 045004.
- [33] Andreas RICHTER et coll. « Micropumps operated by swelling and shrinking of temperature-sensitive hydrogels ». en. In : *Lab on a Chip* 9.4 (2009), p. 613–618.
- [34] Emil J GEIGER, Albert P PISANO et Frantisek SVEC. « A polymer-based microfluidic platform featuring on-chip actuated hydrogel valves for disposable applications ». In : *Journal of Microelectromechanical Systems* 19.4 (2010), p. 944–950.
- [35] David J. BEEBE et coll. « Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels ». en. In : *Nature* 404.6778 (2000), p. 588–590.
- [36] Romain MARCOMBE et coll. « A theory of constrained swelling of a pH-sensitive hydrogel ». en. In : *Soft Matter* 6.4 (2010), p. 784–793.
- [37] Ihor TOKAREV et Sergiy MINKO. « Stimuli-responsive hydrogel thin films ». en. In : *Soft Matter* 5.3 (2009), p. 511.

- [38] M. BÄCKER et coll. « Microfluidic chip with integrated microvalves based on temperature and pH-responsive hydrogel thin films ». en. In : *physica status solidi (a)* 209.5 (2012), p. 839–845.
- [39] Kyung Jin SON et coll. « Micropatterned Sensing Hydrogels Integrated with Reconfigurable Microfluidics for Detecting Protease Release from Cells ». In : *Analytical Chemistry* 85.24 (2013), p. 11893–11901.
- [40] Timothy KWA et coll. « Reconfigurable microfluidics with integrated aptasensors for monitoring intercellular communication ». en. In : *Lab on a Chip* 14.10 (2014), p. 1695–1704.
- [41] B. HADWEN et coll. « Programmable large area digital microfluidic array with integrated droplet sensing for bioassays ». en. In : *Lab on a Chip* 12.18 (2012), p. 3305–3313.
- [42] Dongshin KIM et David J. BEEBE. « Hydrogel-based reconfigurable components for microfluidic devices ». en. In : *Lab on a Chip* 7.2 (2007), p. 193–198.
- [43] Shinji SUGIURA et coll. « On-demand microfluidic control by micropatterned light irradiation of a photoresponsive hydrogel sheet ». In : *Lab on a Chip* 9.2 (2009), p. 196–198.



---

Microfabrication d'actionneurs à base de films d'hydrogel

---

**Sommaire du chapitre**

---

2.1	Description de la stratégie adoptée . . . . .	<b>29</b>
2.1.1	La technique générale de fabrication . . . . .	29
2.1.2	Un processus à deux substrats . . . . .	30
2.1.3	Une seule chimie : la réaction thiol-ène . . . . .	30
2.2	Procédé de fabrication . . . . .	<b>31</b>
2.2.1	Choix et modifications du polymère . . . . .	31
2.2.2	Dépôt de films épais de polymère . . . . .	32
2.2.3	Traitements des surfaces pour le greffage . . . . .	34
	Activation globale : thiolisation de surfaces en verre . . . . .	35
	Activation locale : dépôt et fonctionnalisation d'un circuit en or	36
2.2.4	Deux voies de structuration UV . . . . .	37
	Insolation UV « classique » : la photolithographie par masque	37
	Insolation UV haute résolution : lithographie directe par laser	40
	Optimisation des conditions d'insolation . . . . .	44
2.2.5	Assemblage final . . . . .	45
2.3	Protocoles d'observation en fluorescence . . . . .	<b>46</b>
2.3.1	Profilométrie optique par fluorescence . . . . .	48
	Calibration . . . . .	49
2.3.2	Mesure de température par fluorescence . . . . .	49
	Bibliographie du chapitre . . . . .	<b>51</b>

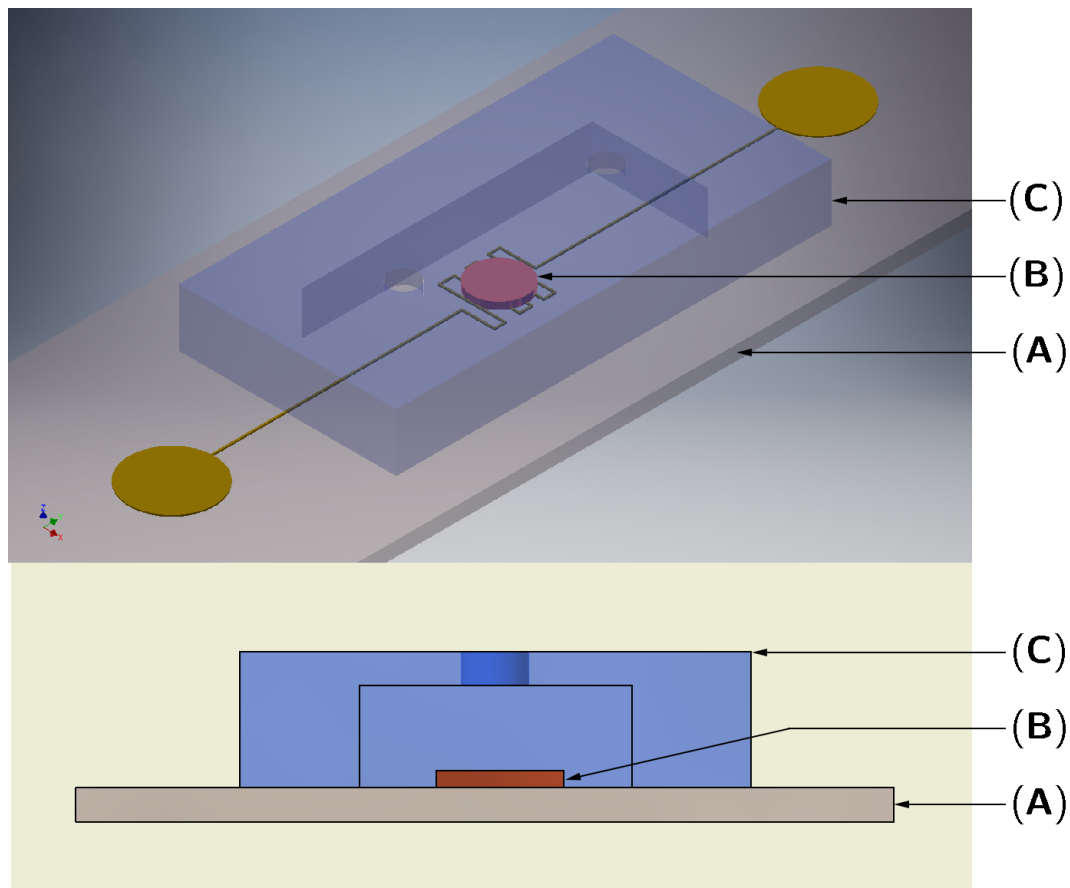
---



Les actionneurs à base d'hydrogel sensible sont très prometteurs : leur grande flexibilité ainsi que leur aptitude à réagir à différents *stimuli* de leur environnement les rendent attractifs. La contrepartie est leur intégration souvent peu robuste, leur activation relativement lente et les procédés de fabrication assez complexes. On en a déduit que pour proposer une nouvelle approche technologique, il est nécessaire de progresser sur ces différents points et ce chapitre sera dédié à cette étude.

Nous commencerons par exposer la stratégie choisie et qui découle des conclusions tirées du chapitre précédent. Nous verrons comment, à partir de deux substrats indépendants et d'une chimie simple, il est possible d'obtenir des micro-systèmes intégrant des actionneurs d'un genre nouveau.

Nous détaillerons ensuite le procédé de fabrication de ces systèmes. Nous expliquerons par quoi le choix d'un polymère thermosensible est motivé, et la manière d'obtenir des films épais d'hydrogel structuré qui répondent aux exigences du cahier des charges.



**Figure 2.1** – Schéma de principe de l'actionneur à base d'hydrogel. Un substrat (A) (généralement en verre) comporte une structure en hydrogel (B). Un deuxième substrat structuré pour l'écoulement des fluides (C) ferme le dispositif.

## 2.1 Description de la stratégie adoptée

Les actionneurs à base d'hydrogel que nous allons mettre en oeuvre dans cette thèse ont une structure représentée sur la figure 2.1. Elle comprend :

- un substrat « actif », dans le sens où y est intégré un élément qui activera l'actionneur (A).
- un hydrogel de forme et d'épaisseur adaptées pour remplir la fonction désirée (B).
- un substrat structuré pour l'écoulement des fluides se fixant sur le substrat « actif » (C).

Intéressons-nous maintenant plus en détails au procédé de fabrication.

### 2.1.1 La technique générale de fabrication

L'intégration des actionneurs à base d'hydrogel sera qualifiée d'« *ex situ* » dans la mesure où le micro-système n'est pas fermé au moment où l'hydrogel est synthétisé. Cette particularité présente plusieurs avantages :

- un contrôle complet des propriétés géométriques de l'hydrogel, qui permet de décorrélérer la forme de l'actionneur de celle du canal microfluidique.
- l'assurance d'obtenir une bonne tenue de l'hydrogel au substrat actif en procédant aux traitements nécessaires sans que ça n'ait d'influence sur le reste du système.

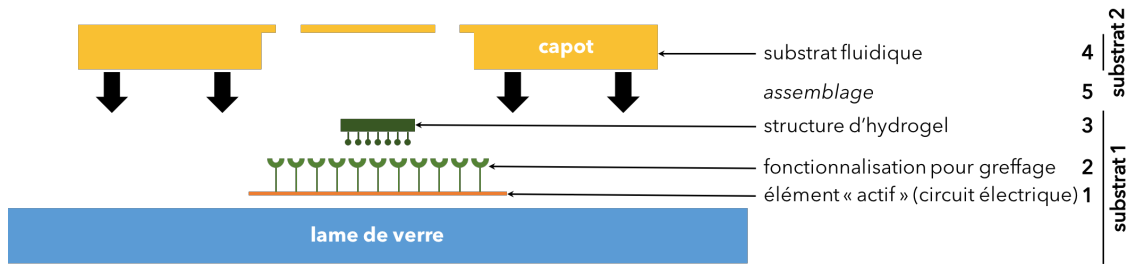


Figure 2.2 – Schéma de principe de la fabrication du dispositif.

On s'assurera de **greffer** chimiquement l'hydrogel à ce substrat.

- la possibilité de « laver » les structures d'hydrogel pour que le système ne soit pas pollué.
- un contrôle des propriétés fonctionnelles de l'hydrogel, à savoir la possibilité de faire des mesures directes d'épaisseur, de réaction au *stimulus* externe.

Aussi, cette méthode permet de ne faire intervenir que deux substrats, comme dans les méthodes de fabrication les plus simples en microfluidique.

### 2.1.2 Un processus à deux substrats

Le principe de base de la fabrication est illustré sur la figure 2.2.

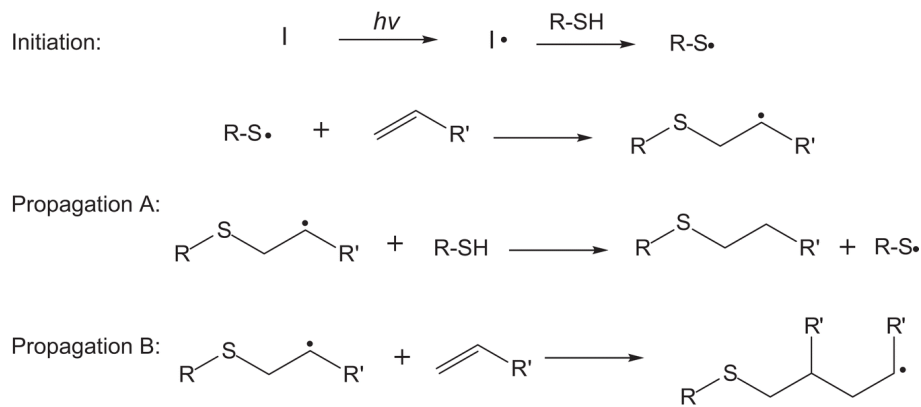
1. un premier substrat est conçu en intégrant un élément « activable » (typiquement un circuit électrique).
2. sa surface est fonctionnalisée par une espèce capable d'interactions avec l'hydrogel.
3. l'hydrogel y est déposé de manière structurée. La fonctionnalisation garantit le greffage.
4. un deuxième substrat est structuré pour l'écoulement des fluides (voir plus loin les matériaux envisagés et utilisés).
5. enfin, on assemble les deux substrats en prenant soin d'aligner les structures fluide et hydrogel.

Une étape-clé de ce procédé est de greffer l'hydrogel au substrat actif. Voyons en quoi des optimisations sont possibles en ce sens.

### 2.1.3 Une seule chimie : la réaction thiol-ène

Les travaux réalisés au cours de la thèse de Benjamin Chollet au laboratoire SIMM de l'ESPCI [1, 2] ont permis de mettre en œuvre une chimie particulière pour obtenir des hydrogels greffables. Nous allons ici résumer la démarche.

Rappelons d'abord qu'un hydrogel est un réseau de polymères [3] qui gonfle dans l'eau, et que cette structure nécessite la présence d'une espèce fonctionnelle capable de lier les différentes chaînes polymères, qu'on appelle « réticulant ». Aussi, deux voies générales de synthèse sont possibles : on peut soit co-polymériser (par exemple par polymérisation radicalaire) des monomères directement en une matrice hydrogel, soit réticuler des chaînes



**Figure 2.3** – Schéma de la réaction thiol-ène.

polymères pré-existantes. Cependant la co-polymérisation de monomères nécessite une chambre de réaction sous atmosphère contrôlée pour éviter la présence d'oxygène qui inhibe considérablement la réaction de polymérisation radicalaire [4]. C'est la raison pour laquelle il a été préféré la deuxième méthode : un polymère est d'abord synthétisé et modifié afin d'y adjoindre une fonction chimique qui le rend réactif. On y ajoute un réticulant capable de réagir avec la modification pour assembler les chaînes. La solution obtenue est alors déposée sur un substrat sous forme de film épais, puis réticulée grâce à une source d'énergie extérieure qui active la réaction de réticulation. Le réticulant permet non seulement de réticuler les chaînes entre elles, mais aussi de greffer le réseau de chaînes sur le substrat par la même réaction chimique.

La chimie choisie par l'équipe SIMM pour la réticulation est la chimie du thiol-ène [5] (voir figure 2.3) qui présente plusieurs avantages. D'abord, elle n'est pas sensible à l'oxygène, et on peut donc réaliser la réticulation des chaînes de polymères à l'air, ce qui est beaucoup moins contraignant [6]. Ensuite, elle n'a pas nécessairement besoin d'être catalysée ni d'être amorcée par un initiateur, selon les espèces en présence et la source d'activation. Par ailleurs, la source d'activation peut être elle-même structurée : il s'avère que la réticulation peut être initiée thermiquement — et donc globale — ou initiée par exposition aux UV profonds ( $\sim 254\text{ nm}$ ) — et ainsi structurable en choisissant les zones exposées.

## 2.2 Procédé de fabrication

Nous allons ici détailler et commenter les différentes étapes de la fabrication d'un micro-système comportant un ou plusieurs actionneurs à base d'hydrogel, en suivant le procédé *ex situ*.

### 2.2.1 Choix et modifications du polymère

Le gel de polymère étudié est le gel de poly(N-isopropylacrylamide), p(NIPAM) (figure 2.4). Ce polymère est connu pour ses propriétés à LCST (*Lower Critical Solubility Temperature*) avec une température critique inférieure de solubilité d'environ  $32^\circ\text{C}$  en milieu aqueux [7], soit une température proche de la température ambiante. Cela en fait un bon candidat pour une utilisation en tant qu'hydrogel thermosensible. Pour former le film

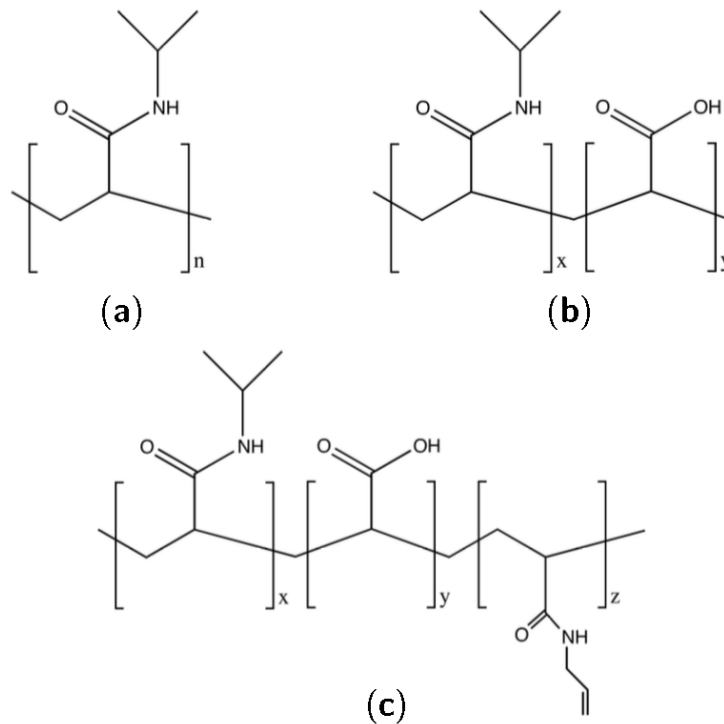


Figure 2.4 – (a) p(NIPAM), (b) p(NIPAM-co-AA), et (c) p(NIPAM-co-AA) modifié « ène ».

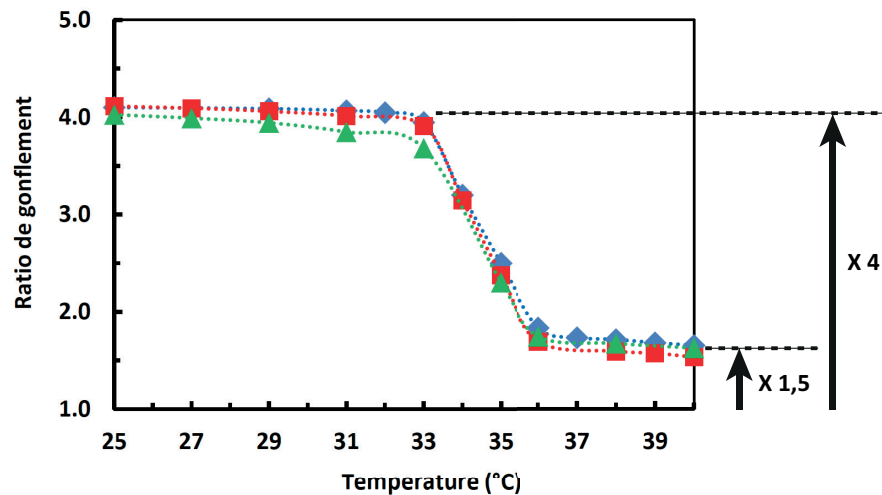
d'hydrogel de p(NIPAM), on doit partir de chaînes de p(NIPAM) fonctionnalisées par des groupes –ène. Pour ce faire, on co-polymérise le NIPAM avec l'acide acrylique (AA). Ce co-polymère est ensuite modifié avec de l'allylamine qui permet d'apporter les fonctions « ène » aux chaînes polymères [8]. La synthèse du p(NIPAM) fonctionnalisé –ène est effectuée au laboratoire SIMM par le doctorant Ekkachai Martwong.

On utilise en général un polymère p(NIPAM-co-AA) constitué à 95% de p(NIPAM), de poids moléculaire aux alentours de 350 kg/mol et avec un taux de modification — c'est-à-dire la proportion de monomères modifiés avec l'allylamine, soit de fonctions « ène » — de 2%.

Dans ces conditions, des mesures de gonflement de couches minces d'hydrogel ont été réalisées au SIMM par ellipsométrie. Le facteur de gonflement est défini comme étant le rapport entre l'épaisseur du film dans l'eau (à différentes températures) et l'épaisseur du film sec mesurée dans l'air. Les mesures montrent un **facteur de gonflement de 4** aux températures inférieures à la LCST, et de 1,5 aux températures supérieures (voir figure 2.5).

## 2.2.2 Dépôt de films épais de polymère

Le co-polymère p(NIPAM-co-AA) modifié, que nous appellerons désormais p(NIPAM) par souci de simplicité, peut maintenant être mis en solution en vue d'être déposé en film fin sur le substrat. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer d'un solvant capable de dissoudre à la fois le p(NIPAM) et le réticulant, à savoir dans notre cas un dithiol : le dithioerythritol (que l'on peut voir sur la figure 2.4). Aussi, la solution obtenue devra permettre un dépôt par spin-coating, que l'on discutera plus tard. Benjamin Chollet au



**Figure 2.5** – Mesure du taux de gonflement de films fins de p(NIPAM) par ellipsométrie, pour différentes épaisseurs à sec (♦ 150 nm, ■ 250 nm et ▲ 420 nm). Le ratio est normalisé par l'épaisseur à sec des films. D'après [1].

laboratoire SIMM a réalisé l'étude permettant de trouver le solvant le plus adapté. Ainsi, on utilisera une solution 1 : 1 v/v de méthanol et de butanol. Ce co-solvant est adapté au spin-coating dans la mesure où il permet un bon étalement de la solution sur les surfaces. Il faut en effet une solution avec une faible tension de surface (typiquement inférieure à 40 mN/m) et une volatilité modérée (car les solvants à haute pression de vapeur peuvent induire des instabilités pendant l'étalement).

En ce qui concerne les proportions de réticulant à ajouter à la solution, il a été déterminé qu'un excès de 30 fois par rapport au taux de modification était adapté. Avec un taux usuel de modification de 2%, cela correspond à un ajout de réticulant à 60% en masse de p(NIPAM).

La préparation de la solution consiste donc à dissoudre une quantité allant jusqu'à 10% en masse de p(NIPAM) dans le mélange méthanol/butanol et à placer le mélange sur un agitateur orbital jusqu'à dissolution complète — selon la concentration en p(NIPAM), cela peut prendre de quelques minutes à une nuit pour une solution à 10%. On ajoute ensuite la quantité nécessaire de réticulant, et on agite à nouveau jusqu'à bonne dissolution — une quinzaine de minutes suffit. À température ambiante, la réticulation ne se produit pas. La solution peut néanmoins être stockée au réfrigérateur afin de mieux la conserver, surtout pour éviter l'évaporation du solvant.

Les conditions du spin-coating sont fixées en fonction des attentes sur l'épaisseur finale du film. Le temps de rotation est par convention de 30 secondes, et on peut faire varier la vitesse de rotation : le résultat est présenté sur la figure 2.6 pour une solution à 10% en p(NIPAM), la plus couramment utilisée. Les mesures sont effectuées par profilométrie optique.

Les épaisseurs obtenues à cette concentration et à une température basse (10°C) permettent d'obtenir une gamme d'épaisseur comprise entre 2 et 5 µm. Cela signifie que l'on peut obstruer un canal 4 fois plus épais, soit au maximum de 20 µm, ce qui est convenable pour l'utilisation de matériel biologique notamment.

Pour garantir un débit correct dans les utilisations des micro-systèmes, on cherche souvent

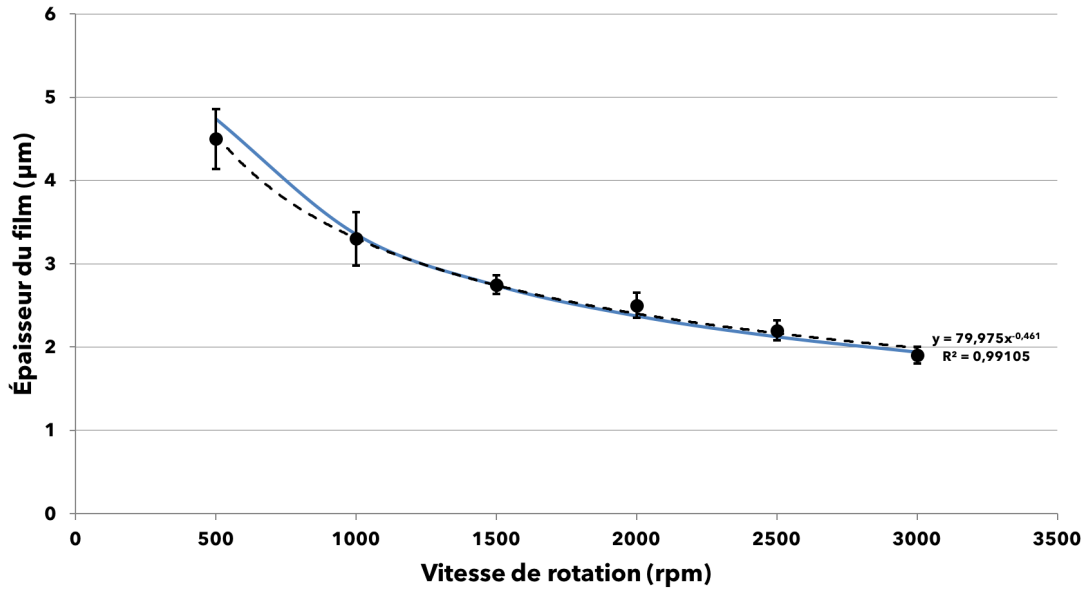


Figure 2.6 – (●) Épaisseur à sec des films de p(NIPAM) obtenus par spin-coating d'une solution à 10% en masse sur un substrat de verre. (—) Ajustement par une loi en  $\omega^{-1/2}$ , avec  $\omega$  la vitesse de rotation. (---) Ajustement par une loi puissance.

à avoir des canaux de hauteur suffisante. C'est la raison pour laquelle dans nos travaux nous avons également cherché à réaliser des dépôts d'épaisseur importante, afin de maximiser la hauteur des canaux. L'épaisseur  $e$  obtenue peut être évaluée par l'expression :

$$e \sim \left( \frac{\mu(T)}{\omega} \right)^{1/2} c \quad (2.1)$$

où  $\mu(T)$  est la viscosité de la solution à la température  $T$ ,  $\omega$  la vitesse de rotation et  $c$  la concentration du polymère [9].

Ainsi, en augmentant la viscosité et/ou la concentration, à conditions de spin-coating égales, on obtient des dépôts plus épais. Cependant, la solubilité du polymère au-delà de 10% en masse n'est pas bonne pour obtenir des dépôts convenables : des essais à 12% montrent la présence de sortes de filaments résiduels après le dépôt. Une solution est donc d'abaisser la température de la solution au spin-coating pour augmenter sa viscosité en la plaçant au réfrigérateur.

### 2.2.3 Traitements des surfaces pour le greffage

Pour des questions pratiques de manipulation et d'observation, le substrat de base est du verre. Rappelons aussi que le substrat peut être doté d'un élément « actif », comme un circuit électrique. Nous allons donc considérer deux cas ici :

- sans élément actif : le substrat est typiquement une lame de verre, et l'activation se fera par un élément chauffant extérieur au micro-système. C'est la configuration la plus basique, et on parlera d'**activation globale**.
- avec élément actif : le substrat en verre est doté d'un élément actif, à savoir un circuit électrique comportant une micro-résistance chauffante. C'est une configuration avancée, et on parlera d'**activation locale**.

## Activation globale : thiolisation de surfaces en verre

Avant le dépôt des films de polymère par spin-coating, les surfaces doivent être traitées chimiquement pour le greffage des chaînes de polymère par chimie click thiol-ène. Ce greffage est essentiel pour assurer la stabilité des hydrogels sur le substrat et la réversibilité des actionneurs. Pour ce faire, on utilise la technique courante de la silanisation. Ici, elle fera intervenir un silane comportant une fonction thiol, comme par exemple le 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS).

Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir une mono-couche de silane, et adopté le protocole suivant, établi au laboratoire SIMM [1] :

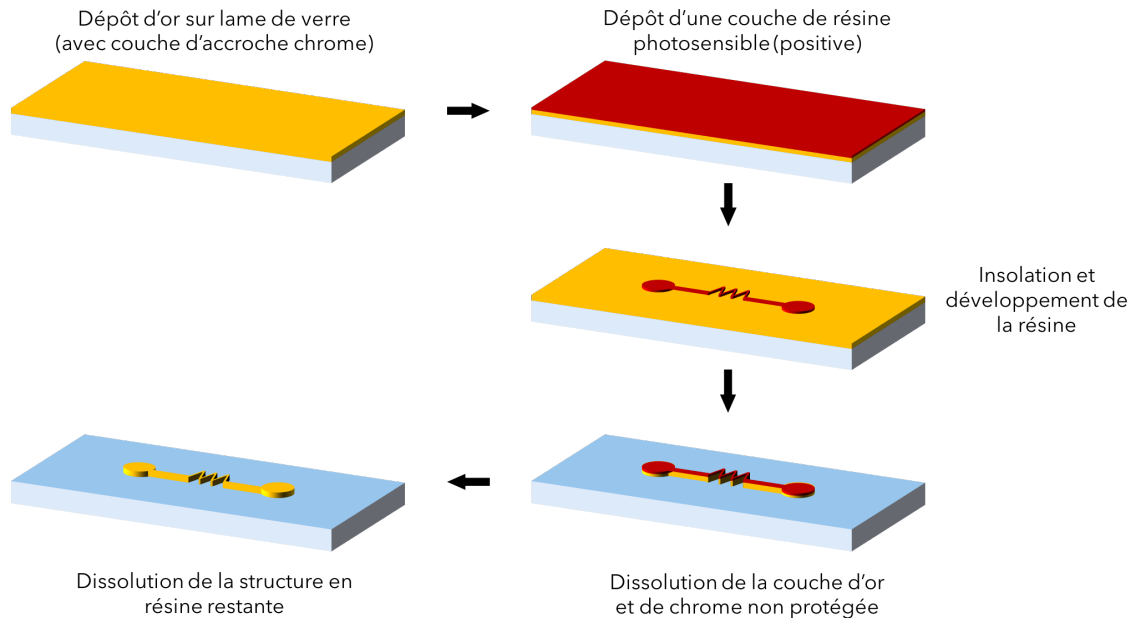
1. les surfaces sont nettoyées, et les groupements silanols de surface activés par un nettoyage Piranha. Les plaques sont immergées dans un mélange 3 : 1 v/v d'acide sulfurique (>95%) et d'eau oxygénée (35%). Le mélange est porté à ébullition par chauffage à 200°C jusqu'à ce que le dégazage de la solution s'estompe (15 à 30 minutes). Les plaques sont ensuite abondamment rincées et mises sous ultra-sons une minute dans l'eau ultrapure. Enfin elles sont séchées sous flux d'azote.
2. les substrats sont immédiatement placés dans un réacteur hermétique. Celui-ci est purgé sous azote pour éviter la présence d'eau.
3. une solution de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane à 3 vol% dans le toluène anhydre est transférée dans le réacteur sous azote. Les plaques sont conservées immergées dans la solution pendant 3 heures. Les surfaces sont ensuite rincées et mises sous ultra-sons dans du toluène et séchées sous flux d'azote. Elles peuvent être conservées jusqu'à leur utilisation pour le dépôt par spin-coating évoqué dans le paragraphe précédent.

Ce protocole est relativement contraignant, mais le fait de maintenir une atmosphère en azote donne de très bons résultats en matière d'homogénéité de la fonctionnalisation : des mesures d'ellipsométrie montrent le dépôt d'une couche de 1 nm avec moins de 10% de dispersion par rapport à la moyenne.

Dans un souci de simplification, nous avons adopté un nouveau protocole qui permet de fonctionnaliser ces substrats à l'air [10] :

1. les surfaces sont également nettoyées par une solution Piranha, comme décrit au premier point du protocole précédent.
2. les substrats sont ensuite placés à plat dans un cristalliseur ; on y verse une solution à 1 : 200 v/v de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS) dans l'éthanol absolu et on laisse en contact 1 heure afin de laisser le silane s'adsorber, en couvrant avec un verre de montre pour éviter l'évaporation du solvant. Les surfaces sont ensuite rincées à l'éthanol et séchées sous flux d'azote.
3. les substrats sont ensuite placés à nouveau à plat dans le cristalliseur ; on y verse une dilution à 0,1 M d'acide chlorhydrique à 38% dans de l'eau et on laisse réagir pendant 1 heure. Cette étape permet l'hydrolyse — catalysée en milieu acide — et la condensation du silane sur la surface. Les surfaces sont finalement rincées à l'eau ultrapure et séchées sous flux d'azote. Elles peuvent être conservées jusqu'à leur utilisation pour le dépôt par spin-coating évoqué dans le paragraphe précédent.





**Figure 2.7** – Schéma détaillant les différentes étapes pour la création de circuit en or sur un substrat de verre.

Nous avons également appliqué ce protocole à des surfaces en PDMS. Après le dépôt par spin-coating et la réticulation au four à 70 °C pendant 1 heure d'une fine couche de PDMS sur une lame en verre, on active les surface par un traitement plasma  $O_2$  pendant 45 seconde et on reprend les étapes 2 et 3.

L'état des surfaces traitées suivant ce protocole n'a pas été caractérisé, mais il a été constaté qualitativement un bon greffage de l'hydrogel à sa suite. C'est la raison pour laquelle il a finalement été adopté pour la configuration par activation globale car plus simple à mettre en œuvre.

### Activation locale : dépôt et fonctionnalisation d'un circuit en or

La possibilité de localiser l'activation du p(NIPAM) est permise par l'intégration d'éléments chauffants sur le substrat « actif ». S'il a d'abord été question de réaliser des dépôts métalliques sur des surfaces en verre (détaillé en Annexe B), nous avons aussi eu recours à des substrats métallisés prêts à l'emploi vendus par la société ACM composés d'un substrat de verre de 0,5 mm sur lequel sont déposés une couche d'accroche en chrome de 15 nm et une couche d'or de 120 nm.

Ces substrats sont ensuite structurés par lithographie et gravure afin d'apporter la fonction chauffante par le biais de micro-résistances. Ces étapes sont illustrées sur la figure 2.7.

Après avoir placé le substrat d'or sur une plaque chauffante à 115 °C pendant environ 5 minutes, on dépose une couche de résine positive S1818 (Shipley) par spin-coating à 3000 tours/min (environ 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Après une première cuisson de 2 minutes à 115 °C, on insole le substrat, à travers un photo-masque qui détermine la géométrie, aux UV à 436 nm sur une « aligneuse » MJB4 (Süss Microtech). Après développement (MF-319, Microposit), on obtient une surface d'or protégée uniquement là où on souhaite garder une structure en or (les micro-résistances et les circuits associés).

On plonge ensuite le substrat dans une solution de gravure de l'or (Microchemicals) pendant environ 20 secondes sous agitation orbitale, puis on réitère l'opération dans une solution de gravure du chrome (Sigma-Aldrich). Il ne reste plus qu'à l'insoler une nouvelle fois aux UV sans photo-masque, de développer la résine et de rincer finalement à l'acétone pour obtenir une structure de micro-résistance en or sur un substrat de verre : c'est le substrat actif dédié à l'activation locale.

Tout comme dans le cas de l'activation globale, la surface du substrat actif est fonctionnalisée pour greffer l'hydrogel. Pour ce faire, on choisit une fonctionnalisation de l'or par le protocole suivant [2] :

1. les surfaces d'or sont immergées pendant 2 heures dans une solution de dithioerythritol — c'est le réactif utilisé également pour la réticulation des chaînes polymères — à 1 mM dans le chloroforme. La réaction est réalisée dans un réacteur fermé afin d'éviter l'évaporation du chloroforme, mais sans précaution particulière quant à la composition de l'environnement.
2. les substrats sont rincés sous ultrasons dans le chloroforme avant d'être séchés sous flux d'azote.

Après ces étapes de fonctionnalisation, les substrats (actifs ou non) portent des fonctions —thiols qui permettent le greffage de l'hydrogel. La suite du processus de fabrication consiste donc à déposer la solution de polymère en couche mince comme indiqué à la fin du paragraphe 2.2.2.

L'étape qui suit permet la formation de l'hydrogel : c'est la réticulation par voie UV. Dans notre cas, on cherchera en plus à le structurer.

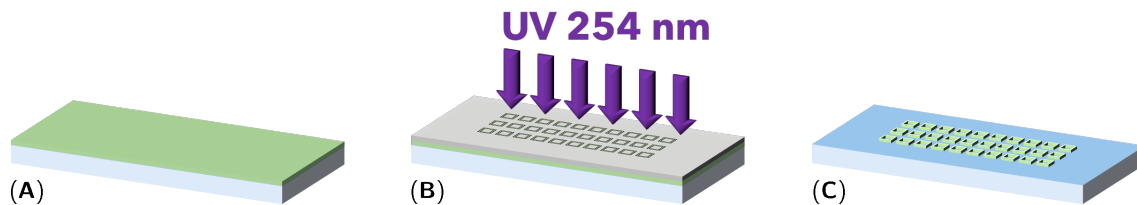
## 2.2.4 Deux voies de structuration UV

Comme vu précédemment, la réaction thiol-ène présente l'avantage de pouvoir être initiée par UV profond (autour de 250 nm), sans photo-initiateurs, et cette méthode de réticulation par insolation UV permet donc, à la manière d'une photolithographie, de la structurer. Dans ce paragraphe, nous allons voir que les méthodes classiques de photolithographie donnent de bons résultats, mais qu'il est aussi possible d'utiliser un dispositif plus sophistiqué pour atteindre une résolution supérieure : l'écriture directe par laser.

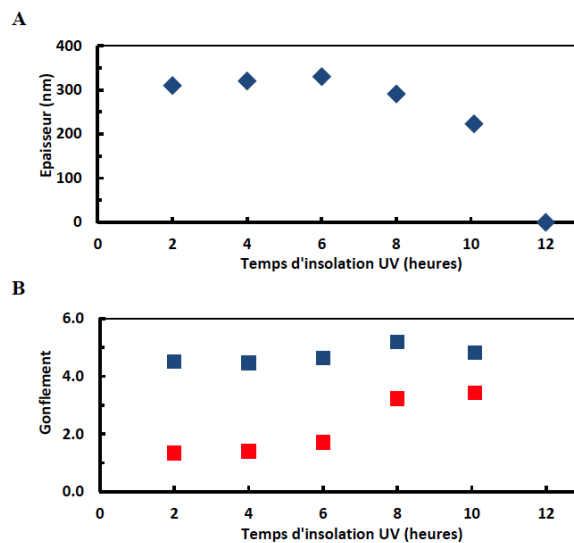
### Insolation UV « classique » : la photolithographie par masque

La technique de photolithographie dite « classique » est illustrée sur la figure 2.8. Elle consiste à exposer le dépôt de solution de polymère aux UV à travers un masque transparent uniquement là où on souhaite obtenir un motif réticulé, et opaque ailleurs.

La particularité dans le cas présenté ici est que la longueur d'onde de la lumière excitatrice est de 254 nm. Dans cette gamme de longueur d'onde, la plupart des matériaux utilisés habituellement pour l'insolation UV (comme le verre et les films plastiques) est absorbante. Pour la fabrication du masque de lithographie, nous avons donc eu recours au quartz, transparent à 90% au delà de 200 nm, sur lequel on a déposé une couche de chrome d'environ 100 nm par évaporation métallique (voir en Annexe B). Cette couche de chrome



**Figure 2.8** – Principe de la structuration UV par photolithographie « classique » avec un masque. (A) Une couche micrométrique de solution de p(NIPAM) et de réticulant est déposée par spin-coating sur une lame de verre fonctionnalisée. (B) La couche est exposée aux UV avec une source de lumière de longueur d'onde 254 nm à travers un masque en chrome pour créer des structures. (C) Après développement dans l'eau, seules restent les structures d'hydrogel sur la lame de verre.



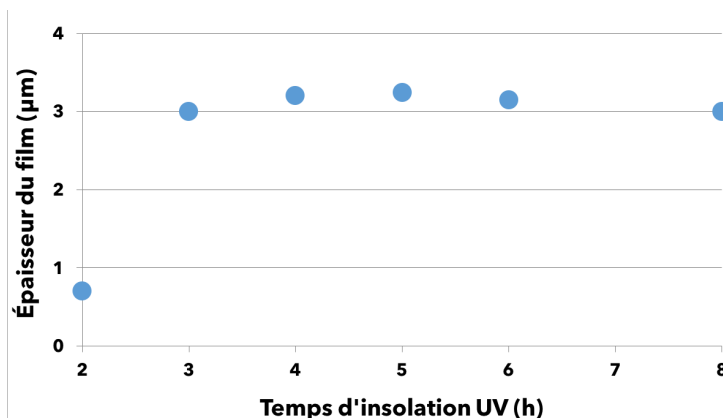
**Figure 2.9** – (A) Évolution de l'épaisseur obtenue après insolation d'un film fin (300 nm) de p(NIPAM) aux UV en fonction du temps. (B) Taux de gonflement de ces films de p(NIPAM) à 25 °C et 40 °C. D'après [1].

est structurée de la même manière que les substrats dédiés à l'activation locale, à ceci près que dans ce cas seule la solution de gravure du chrome est utilisée, et que le temps de gravure est augmenté à environ une minute étant donné l'épaisseur plus importante du dépôt de chrome.

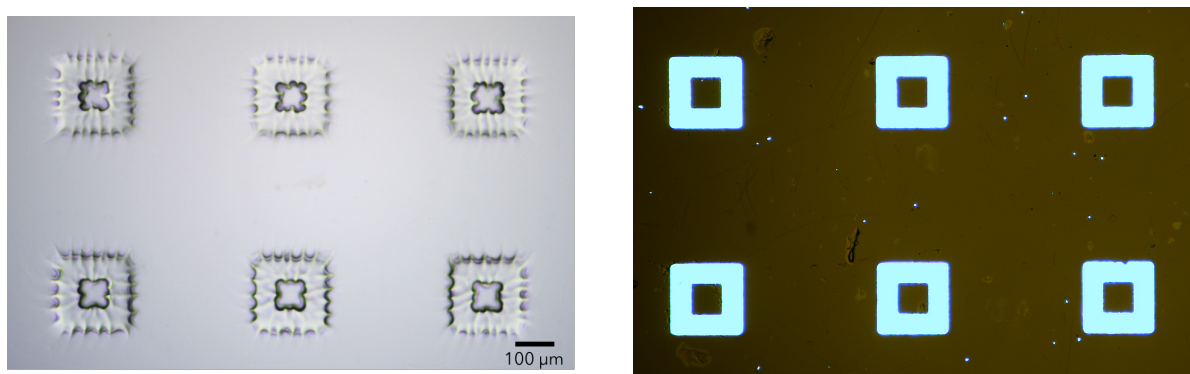
Le masque en chrome est disposé sur le dépôt de polymère, en s'assurant d'un bon contact entre le dépôt de chrome et le film fin déposé par spin-coating. Le tout est placé sous une lampe UV à 254 nm (modèle courant, habituellement dédié à la chromatographie) de 8 W qui délivre une puissance surfacique de 1 mW/cm<sup>2</sup> pendant 3 heures, puis développé dans un bain d'eau ultrapure sous agitation orbitale pendant au moins 30 minutes.

Le temps d'exposition aux UV a été déterminé grâce à une calibration menée par Benjamin Chollet dont les résultats sont présentés sur la figure 2.9.

On constate qu'au delà de 6 heures d'insolation UV, l'épaisseur du film d'hydrogel diminue : l'apport d'énergie par les UV finit par dégrader la réticulation qu'il a formé dans les premières heures du dépôt (vieillesse accéléré, oxydation). Cette dégradation semble confirmée par le fait que le taux de gonflement des films exposés au-delà de 4 heures est modifié. On constate qu'entre 2 et 6 heures d'insolation, pour des films très fins de



**Figure 2.10** – Évolution de l'épaisseur obtenue après insolation d'un film épais ( $> 1 \mu\text{m}$ ) de p(NIPAM) aux UV en fonction du temps. Ce film a été obtenu à partir d'une solution de p(NIPAM) à 10% déposée par spin-coating à une vitesse de rotation de 1000 rpm.



**Figure 2.11** – (A) Résultat d'une insolation UV d'un film épais de p(NIPAM) par lithographie classique, observé au microscope avec un grossissement X5. (B) Photographie du masque quartz-chrome utilisé, au même grossissement.

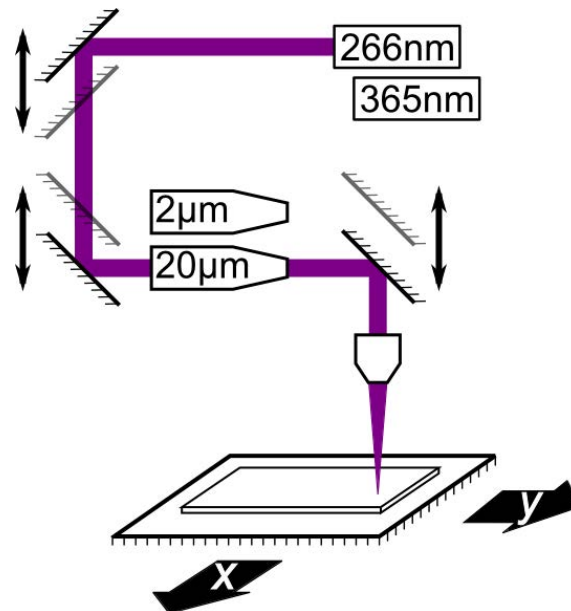
quelques centaines de nanomètres, la réticulation est optimale.

Dans la mesure où nous avons préféré des films plus épais, ce temps a été optimisé à 3 voire 4 heures d'insolation UV afin d'obtenir la plus grande épaisseur possible, comme confirmé par les mesures de profilométrie mécanique de la figure 2.10.

Le résultat de cette technique est illustré par la photographie de la figure 2.11. Ces structures ont été obtenues après une insolation de 3 heures à travers un masque dont les structures transparentes ont les dimensions indiquées, à savoir des carrés de dimensions intérieures de  $100 \mu\text{m}$  avec une bordure de  $50 \mu\text{m}$ .

On remarque un élargissement systématique des dimensions des structures en hydrogel par rapport à celles censées être imposées par le masque. C'est très probablement un effet de la diffraction qui est accentué par la durée importante de l'insolation, ainsi que de l'absence de collimation de la lampe UV. On constate aussi une certaine irrégularité des contours qui peut provenir de l'effet du gonflement lors du développement dans l'eau, probablement due au flambage [11]. Néanmoins, on atteint sans peine une résolution de l'ordre de  $25 \mu\text{m}$  pour des structures d'épaisseur supérieure à  $1 \mu\text{m}$ , ce qui présente déjà un intérêt dans les applications à forte densité d'intégration.

Nous avons tout de même cherché à améliorer la résolution des structures d'hydrogel en



**Figure 2.12** – Schéma du principe de fonctionnement de l'équipement DILASE 650 de Kloé. Dans notre cas, on n'utilise que le laser à 266 nm. D'après [1].

utilisant une autre voie d'insolation UV : la lithographie directe par laser.

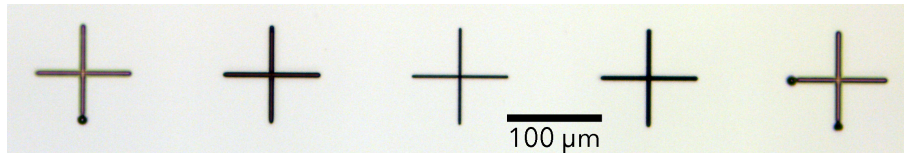
### Insolation UV haute résolution : lithographie directe par laser

Cette technique avancée de lithographie est basée sur un concept simple : plutôt que d'insoler la totalité de l'échantillon par une lampe à travers un masque, on utilise un faisceau laser avec une longueur d'onde, une puissance et une taille adaptée à nos besoins. L'objectif est, qu'en un seul passage, le faisceau laser *trace* directement la structure voulue en activant localement la réaction de réticulation.

En terme d'instrumentation, le dispositif est bien sûr plus complexe. Nous avons eu recours à un système commercialisé par la société KLOÉ appelé Dilase 650, qui a été équipé d'un laser de longueur d'onde 266 nm adapté à notre procédé. Son principe est illustré sur la figure 2.12.

La source laser émet un faisceau qui passe à travers un module acousto-optique ultra-rapide (1 ms) qui fait office d'obturateur. Il est ensuite dirigé vers une cascade de deux paires de miroirs dont, pour chacune des paires, l'un d'entre eux est monté sur un rail motorisé. Ce dispositif permet de sélectionner une des deux lignes de traitement optique situées en aval par un système de bascule du couple de miroirs motorisés. Les lignes optiques sont des systèmes optiques qui traitent le faisceau de sorte à les épurer, et à fixer la taille de la tache laser, à savoir dans notre cas 2 ou 20 µm. Cette tache est justement obtenue après une dernière réflexion sur un miroir et le passage à travers un objectif de microscope (dont la position verticale est ajustable) qui focalise le faisceau sur le substrat à écrire. Ce dernier est disposé sur une platine motorisée 2 axes contrôlée avec une précision de 100 nm.

Un changement de matériel entre les premiers essais et la fin de la thèse a remplacé la ligne de traitement à 20 µm par une ligne à 10 µm de diamètre, ce qui peut expliquer des différences dans les résultats qui seront présentés dans la suite.



**Figure 2.13** – Détermination de la position de la focale  $Z$  de l’objectif du dispositif Dilase650. À  $P$  et  $V$  fixés, on fait varier  $Z$ , ici par pas de  $20\ \mu\text{m}$  en utilisant la ligne d’écriture de  $2\ \mu\text{m}$  de diamètre. La position centrale donne l’écriture la plus fine et correspond donc à la position focale.

Le tableau 2.1 référence les valeurs des puissances associées à chaque ligne optique. Les mesures ont été réalisées en sortie de ligne de traitement optique (avant le deuxième couple de miroirs) et les résultats sont les moyennes prises sur 5 mesures.

	Ligne $2\ \mu\text{m}$	Ligne $10\ \mu\text{m}$	Ligne $20\ \mu\text{m}$
Puissance (mW)	6,45	3,4	5,9

**Table 2.1** – Puissances mesurées sur chacune des lignes optiques du Dilase 650 par un puissance-mètre Gentec Tuner à  $266\ \text{nm}$ .

Les trajectoires de la platine motorisée sont contrôlées par ordinateur de sorte à être synchronisées avec le déclenchement du laser, ou plutôt du module acousto-optique — le laser est toujours allumé, mais le faisceau n’est transmis par le module acousto-optique que sur demande. Ainsi, on peut tracer n’importe quelle forme, à condition de prendre en compte la taille du faisceau et les limites des courses des moteurs (on peut écrire sur une zone de  $10\ \text{x}\ 10\ \text{cm}$ ).

Sur cet appareil, comparé à la lithographie classique par masquage, il y a plus de paramètres à définir. En effet, avec le dispositif décrit au paragraphe précédent, seule la durée d’insolation est à déterminer puisque la puissance de la lampe est fixée ainsi que la géométrie du dispositif. Ici, il y a 3 paramètres à fixer :

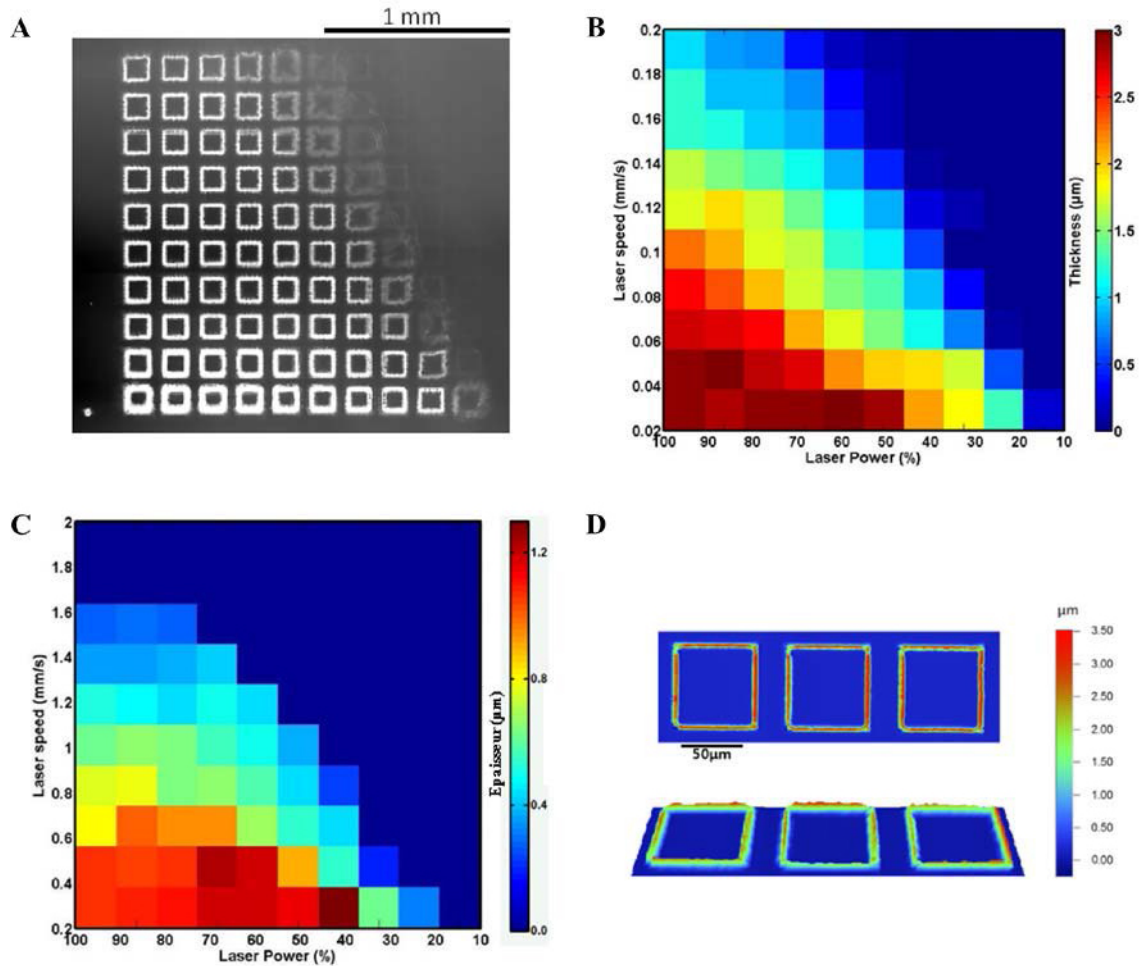
- la puissance  $P$  du laser, variable en pourcentage de la puissance maximale (voir table 2.1).
- la vitesse d’écriture  $V$ , c’est-à-dire la vitesse de déplacement de la platine-support.
- la position de la focale de l’objectif  $Z$ , de sorte à obtenir une tâche laser à la bonne taille et homogène sur le substrat sensible (le film mince de p(NIPAM)).

Cela nécessite donc de procéder à une calibration de l’appareil, de sorte à trouver un triplet de paramètres ( $P, V, Z$ ) qui donne la résolution spatiale et l’épaisseur finale attendues (avec un hydrogel fonctionnel, comme décrit pour la lithographie classique en remarque).

Dans la pratique, la détermination d’un triplet de paramètres adaptés est complexe si on ne suit pas un protocole simple permettant une convergence rapide :

1. on détermine d’abord la position de la focale de l’objectif en traçant des motifs simples (une croix) à différentes valeurs de  $Z$  (voir un exemple sur la figure 2.13), en général avec un pas de  $50\ \mu\text{m}$ . La position focale idéale est celle pour laquelle on obtient le motif le plus fin.





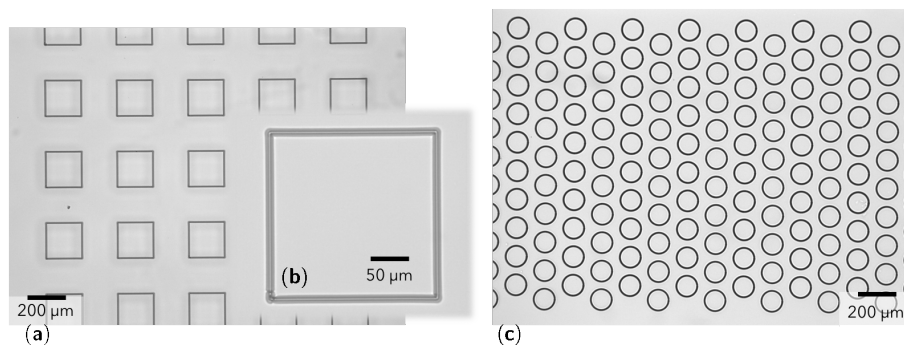
**Figure 2.14** – (A) Image de profilométrie optique de la matrice de test des paramètres puissance (abscisse) et vitesse (ordonnée) pour la ligne à 20  $\mu\text{m}$ . (B) Épaisseur moyenne sur chaque motif pour cette même matrice. (C) Épaisseur moyenne obtenue pour la ligne à 2  $\mu\text{m}$ . (D) Vue 2D (en haut) et 3D (en bas) de motifs obtenus par la ligne à 2  $\mu\text{m}$ . D'après [1].

- pour cette valeur de  $Z$ , on trace une matrice ( $P, V$ ) de motifs identiques (des carrés par exemple) : sur un axe, la puissance laser varie de 100 à 10 % par pas dégressif de 10%, et sur l'autre la vitesse d'écriture de 0,2 à 2 mm/s par pas de 0,2 mm/s. Les épaisseurs moyennes obtenues sont mesurées sur chaque motif par profilométrie optique, pour en déduire le (ou les) meilleur(s) couple(s). Un exemple de résultat est donné en figure 2.14.

L'ensemble de ces opérations de calibration peut être réalisé en une demi-journée.

Cette calibration faite, on peut réaliser des structures de très haute résolution : on atteint en moyenne 4  $\mu\text{m}$  de largeur de trait pour la ligne à 2  $\mu\text{m}$ , et des valeurs très proches de 20  $\mu\text{m}$  (ou 10  $\mu\text{m}$  après le changement de matériel) sur l'autre ligne. Cela peut représenter un gain jusqu'à un facteur 5 sur la finesse des motifs dessinés par rapport à la technique dite classique.

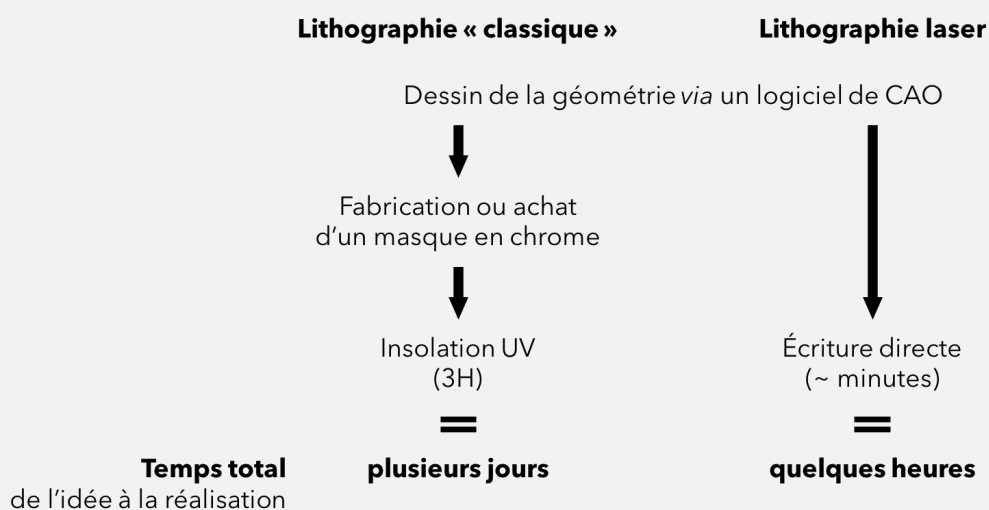
La figure 2.15 montre le potentiel de cette technique avec deux géométries différentes, réalisées avec la ligne de 10  $\mu\text{m}$ . On constate notamment que les motifs sont beaucoup mieux définis. Aussi, sur ces deux exemples, plusieurs centaines de structures sont dessinées en quelques dizaines de minutes, contre au moins 3 heures par lithographie classique.



**Figure 2.15** – Photographies de motifs en gel de p(NIPAM) au microscope avec un grossissement X5 (a,c), X20 (b). Les motifs sont tracés avec la ligne de 10 µm.

### Commentaires

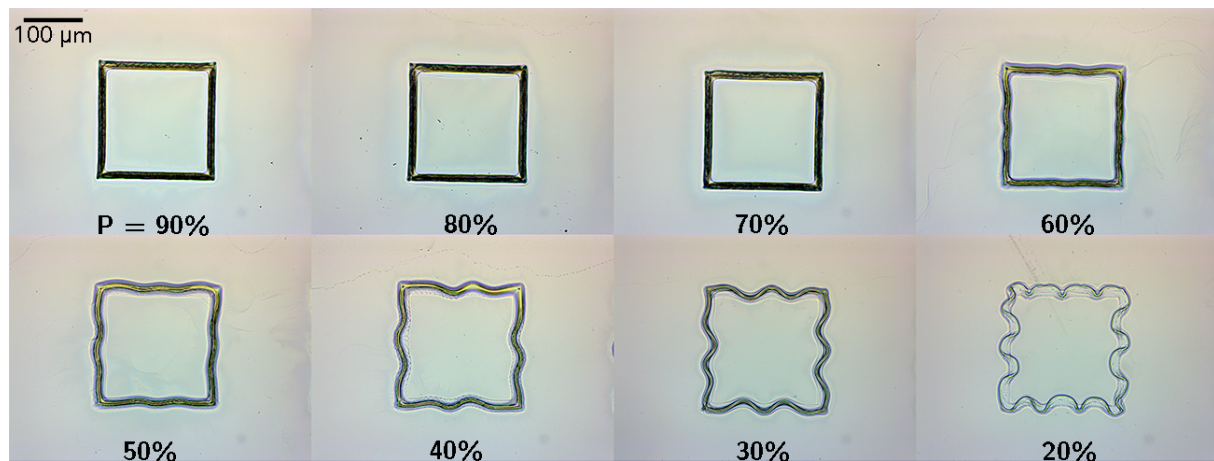
Il est important de remarquer que la technique d'écriture directe par laser présente un grand intérêt pour le développement de cette technologie. Quand la lithographie classique nécessite la conception d'un masque en chrome — qui constitue soit des étapes supplémentaires à la fabrication, soit un achat de l'ordre de 400 € par masque — pour chaque géométrie souhaitée, on peut modifier à volonté les géométries conçues pour la lithographie laser.



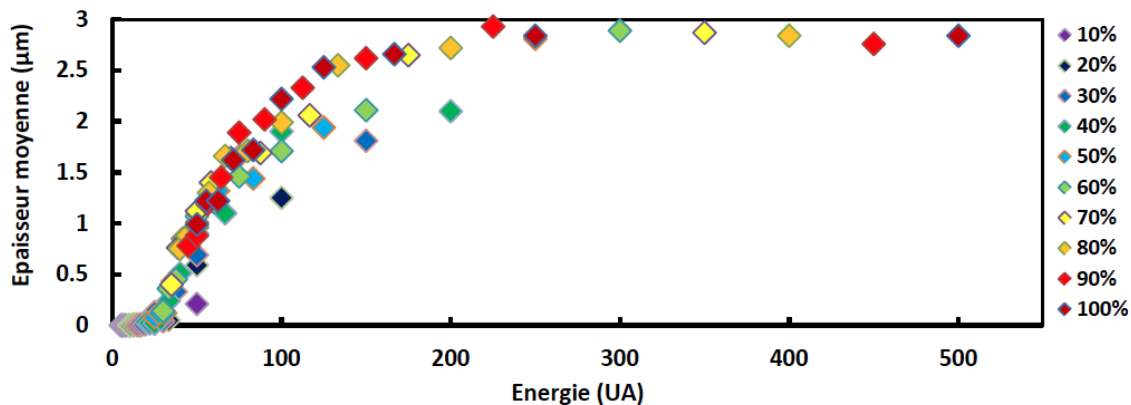
**Figure 2.16** – Comparaison des deux techniques de lithographie.

De plus, le temps d'écriture est aussi réduit : on passe de 3 heures d'insolation UV avec la lithographie classique à quelques minutes dans la plupart des cas en lithographie laser. À titre de comparaison, 3 heures d'écriture laser correspondent à plus d'un mètre linéaire de structures, ce qui correspond à 2700 carrés de 100 µm de côté. Finalement, si l'on considère le temps nécessaire depuis l'idée d'une géométrie jusqu'au développement des structures d'hydrogel, cela peut représenter un gain de quelques jours.





**Figure 2.17** – Photographies issues d'une matrice de tests des paramètres  $(P, V)$  sur la ligne de  $10\ \mu\text{m}$ . Ici, la puissance varie de gauche à droite de 90% à 20%. Le phénomène de flambage est visible par les ondulations qui apparaissent en-dessous de 60% de puissance.



**Figure 2.18** – Épaisseur moyenne obtenue en fonction de la dose laser (en UA) sur la ligne de  $20\ \mu\text{m}$ . D'après [1].

### Optimisation des conditions d'insolation

La nécessité d'une calibration de paramètres est présente dans les deux techniques pour garantir les meilleurs résultats en termes d'épaisseur et de fonctionnalité. Pour rappel, en lithographie classique, on doit calibrer le temps d'insolation ; nous avons montré que le temps d'insolation était lié à l'efficacité de la réticulation des chaînes polymères. En lithographie laser, c'est le couple puissance/vitesse  $(P, V)$  qui joue ce rôle : pour certaines valeurs de ce couple, on peut observer une insuffisance de la réticulation des chaînes pour former l'hydrogel, comme montré par la figure 2.17.

À plus faible puissance, on observe qu'après développement, la structure se déforme. C'est une conséquence du flambage, comme discuté dans la littérature [11].

On peut réaliser la même calibration qu'en lithographie classique, en traçant cette fois l'épaisseur obtenue en fonction de la dose reçue donnée ici en valeurs arbitraires. Pour information, la référence est fixée à 100 UA, ce qui correspond au produit  $P \times V$  à  $P = 100\%$  et  $V = 0,1\ \text{mm/s}$ . On obtient le type de courbe représenté en figure 2.18.

On constate que la réticulation est atteinte à partir d'une dose de 200 UA pour des

puissances supérieures à 60%, ce qui confirme les observations faites ci-avant.

### Remarque

On peut comparer les deux méthodes en discutant de l'apport d'énergie de chacune pour mener la réticulation à terme. Pour cela, calculons l'énergie délivrée dans les deux cas :

- lithographie classique : la puissance de la lampe étant  $P_{\text{lampe}} = 1 \text{ mW/cm}^2$ , on obtient aisément la dose délivrée en  $\Delta t = 3 \text{ h}$ , à savoir

$$E = P_{\text{lampe}} \times \Delta t = 10,8 \text{ J/cm}^2 \quad (2.2)$$

- lithographie laser : la dose est cette fois rapportée à la taille de la tache laser  $d$  et à la vitesse d'écriture  $v$ , pour une puissance nominale  $P_0$  qui dépend de la ligne optique utilisée et est donné dans le tableau 2.1. Par ailleurs, on peut considérer que chaque portion du film de p(NIPAM) d'aire  $\mathcal{A} = \pi d^2$  est éclairée pendant  $\Delta t \simeq d/v$ . La dose s'écrit donc

$$E = \frac{P_0 \times \Delta t}{\mathcal{A}} \simeq \frac{P_0}{\pi \times d \times v} \quad (2.3)$$

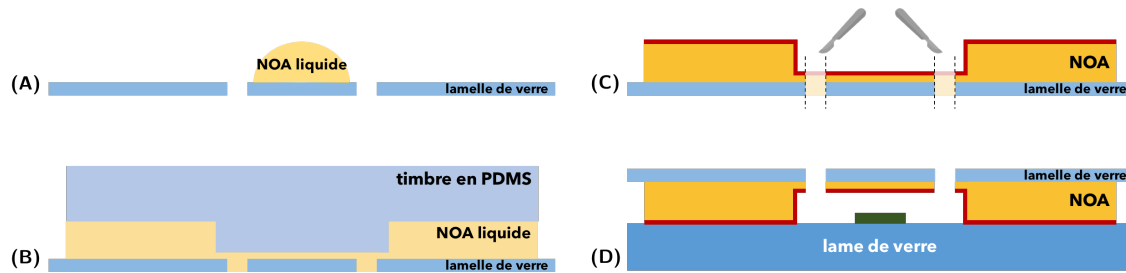
Si on évalue cette expression avec les valeurs mesurées de puissance, on obtient une dose environ 5 fois supérieure à celle de la lithographie classique. Par exemple, pour la ligne à  $10 \mu\text{m}$ , l'application numérique donne  $E = 47,8 \text{ J/cm}^2$ . On ne constate pourtant pas de destruction du gel ni de perte de la fonctionnalité de gonflement. Cela peut s'expliquer par le fait que les deux détecteurs utilisés pour les mesures de puissances sont différents.

À ce stade, le substrat actif est prêt puisqu'il comporte un élément activable ainsi qu'un film fin d'hydrogel greffé et structuré par insolation UV. Il ne reste plus qu'à fermer le micro-système en fabriquant le second substrat qui contiendra la structure de l'écoulement fluide.

### 2.2.5 Assemblage final

La grande majorité des micro-systèmes que nous avons fabriqués ont été fermés en utilisant la technique des « autocollants microfluidiques », mise au point par BARTOLO et coll. [12]. Le matériau utilisé est la NOA81 (Norland Optical Adhesives), une colle optique photoréticulable qui durcit lorsqu'elle est insolée aux UV à 365 nm. Elle est structurée par l'intermédiaire d'un « timbre » en PDMS — dont la fabrication est détaillée en annexe A. Le protocole, illustré sur la figure 2.19, est le suivant :

1. une lamelle de verre d'épaisseur  $170 \mu\text{m}$  est percée à l'aide d'une graveuse laser afin de dégager les entrées et sorties des micro-canaux.
2. une goutte de NOA liquide, préchauffée à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  pour diminuer sa viscosité, est déposée sur la lamelle.



**Figure 2.19** – Principe de fabrication des autocollants microfluidiques et assemblage final du micro-système. (A) Une goutte de NOA81 est déposée sur une lamelle de verre pré-percée. (B) Le « timbre » en PDMS (bleu) est délicatement posé sur la colle. (C) Après une première insolation UV, les trous sont dégagés. La surface de la colle (en rouge) n'a pas durci et est toujours collante. (D) Le système microfluidique en NOA est aligné et collé sur le substrat (noir) intégrant le motif d'hydrogel (en vert).

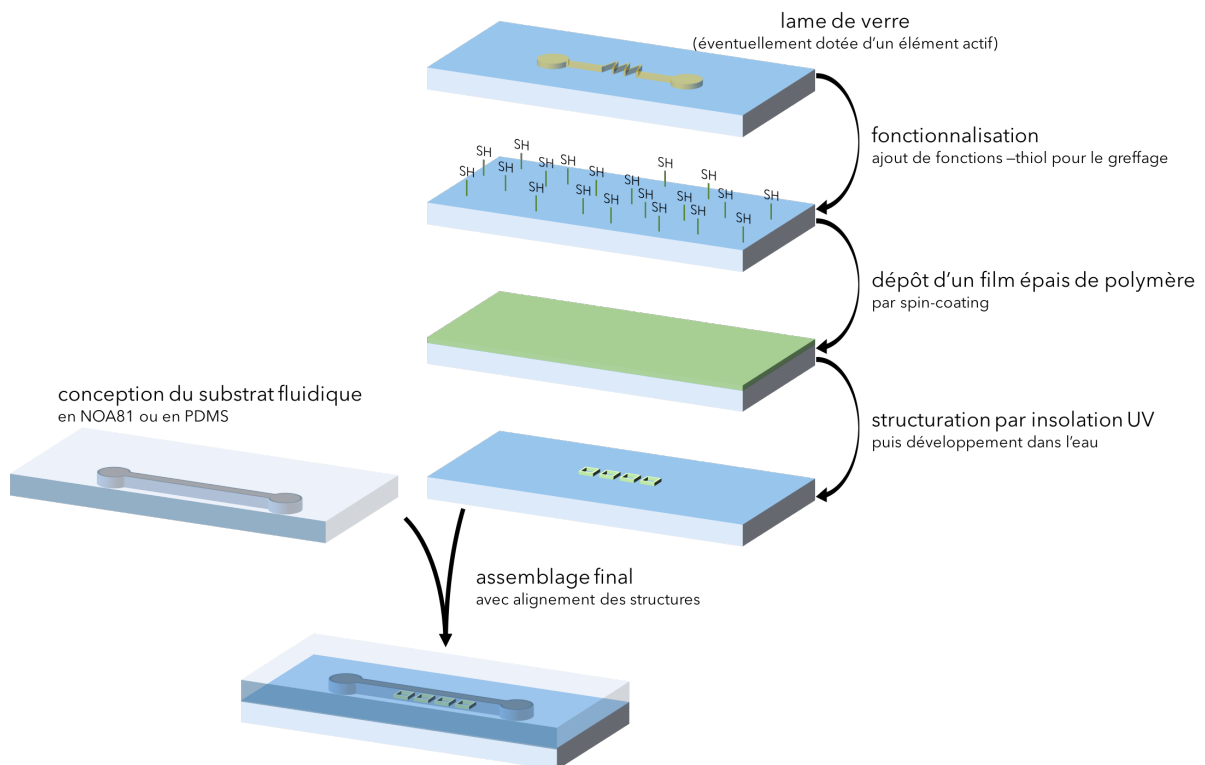
3. le timbre en PDMS (préalablement placé sous vide pour faciliter la disparition d'éventuelles bulles d'air dans la colle liquide) est délicatement déposé sur la goutte de colle en prenant soin d'aligner les structures si nécessaire.
4. l'ensemble est porté sous une lampe UV à  $\lambda = 365 \text{ nm}$  pendant 8,5 s à une puissance de  $18 \text{ mW/cm}^2$  pour être partiellement réticulé : il subsiste une couche superficielle de NOA liquide et collante à l'interface avec le timbre en PDMS, ce qui permettra l'adhésion de l'ensemble au substrat actif.
5. les entrées/sorties sont dégagées à l'aide d'un scalpel.
6. les deux substrats sont mis en contact, une nouvelle fois en s'assurant un bon alignement des structures à l'aide d'une loupe ; on s'assure d'une bonne adhésion en pressant délicatement à l'aide de la pointe du scalpel ou d'un coton-tige.
7. l'ensemble est insolé une seconde fois pendant 90 s à pleine puissance ( $60 \text{ mW/cm}^2$ ) pour finaliser la réticulation de la colle et obtenir un matériau résistant. La puce est enfin placée à l'étuve à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant au moins 30 minutes.
8. une couche de quelques millimètres de PDMS plat pré-percée est collée par plasma oxygène (45 s à 500 mTorr) de sorte à pouvoir connecter facilement les entrées/sorties du circuit microfluidique.

Nous avons également pu avoir recours à un substrat structuré en PDMS pour fermer le système. Sa fabrication, identique à celle du timbre utilisé pour la fabrication des autocollants microfluidiques, est détaillée en Annexe A. Si cette méthode est plus simple, le PDMS présente l'inconvénient d'être beaucoup plus déformable que la NOA et n'est donc pas toujours adapté pour des applications qui nécessitent une bonne étanchéité.

Le processus de fabrication est résumé dans le schéma de la figure 2.20.

## 2.3 Protocoles d'observation en fluorescence

Afin de caractériser les dispositifs fabriqués, nous avons utilisé des méthodes de visualisation par fluorescence. Essentiellement deux fluorochromes ont été employés : la fluorescéine et la rhodamine B. Leurs spectres d'absorption et d'émission sont présentés sur la figure



**Figure 2.20** – Résumé du principe de fabrication. À gauche, la fabrication du substrat fluide n'est pas détaillée. À droite, les différentes étapes de fabrication du substrat « actif » avec dans l'ordre l'éventuelle intégration d'éléments chauffants, la fonctionnalisation de surface par thiolisation, le dépôt d'un film micrométrique de polymère, sa structuration par insolation UV avec greffage au substrat. Enfin, en bas, l'assemblage des deux substrats résulte en un micro-système prêt à l'emploi.

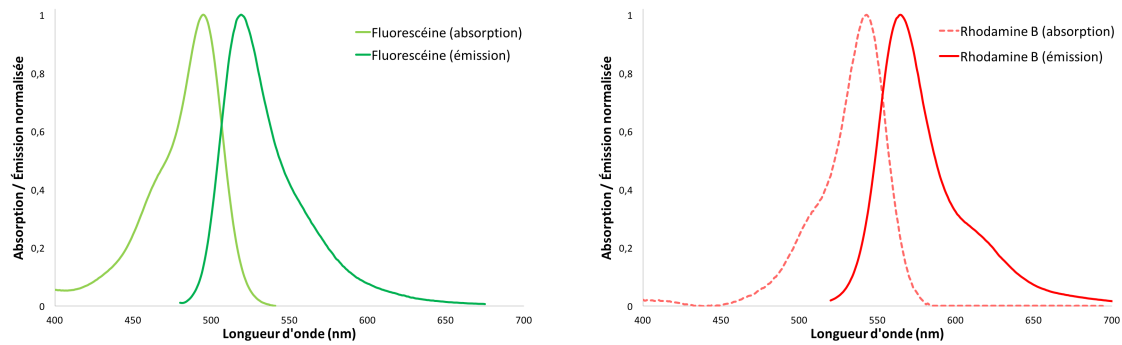


Figure 2.21 – Spectres d'absorption de la fluorescéine (à gauche) et de la rhodamine B (à droite).

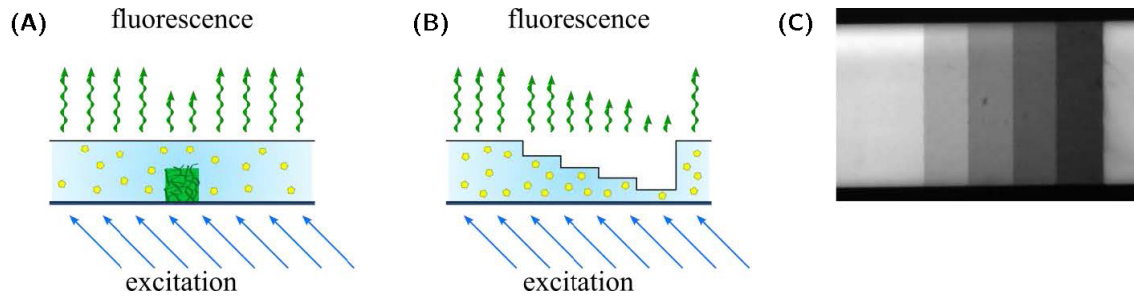


Figure 2.22 – (A) Schéma du principe de la mesure d'épaisseur par intensité de fluorescence. (B) Schéma de l'expérience de calibration. (C) Image en microscopie de fluorescence de l'expérience de calibration.

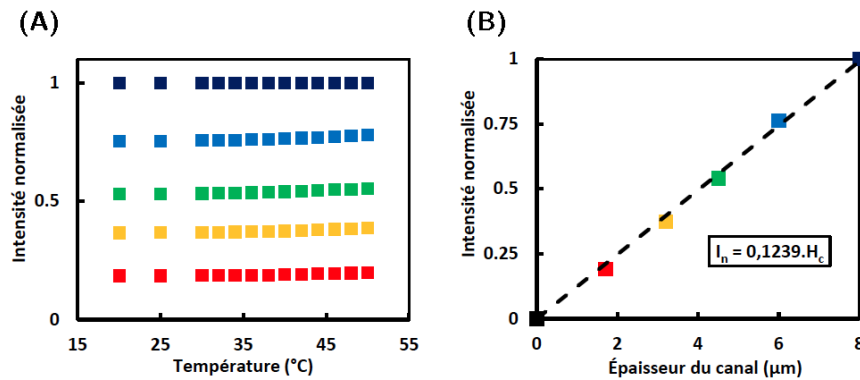
2.21 Nous présentons ici comment réaliser des mesures quantitatives en systèmes fermés grâce à ce phénomène de fluorescence.

La première utilise la fluorescéine comme marqueur de l'épaisseur du canal afin de vérifier *in situ* l'activation des structures d'hydrogel. La seconde se base sur les propriétés de la rhodamine B pour en faire un indicateur de température, afin de mesurer une fois encore *in situ* les propriétés des actionneurs localisés par micro-résistances chauffantes.

### 2.3.1 Profilométrie optique par fluorescence

Nous avons réalisé des images en fluorescence pour visualiser le gonflement des structures en hydrogel car cela permet une observation quantitative. Le principe est d'utiliser l'intensité de fluorescence émise depuis tout point éclairé du canal afin d'en connaître la hauteur locale. L'intensité est maximale partout, sauf là où un objet dans le canal viendrait réduire localement son volume (voir figure 2.22). L'intérêt majeur de cette méthode est qu'au moyen d'une calibration préalable on en tire une information quantitative de la hauteur disponible dans le canal — et donc par soustraction la hauteur des structures qui l'occupent.

Nous avons utilisé une solution de fluorescéine à 0,1 mM. Cette molécule émet une fluorescence avec un pic à 521 nm lorsqu'elle est éclairée autour du pic d'excitation situé à 494 nm.



**Figure 2.23** – Courbes obtenues pour l'expérience de calibration après renormalisation. (A) Intensité normalisée pour chaque épaisseur de canal en fonction de la température. (B) Courbe de calibration de l'intensité de fluorescence en fonction de l'épaisseur.

## Calibration

La calibration consiste à mesurer l'intensité de fluorescence dans un canal structuré de sorte que différentes hauteurs soient disponibles, comme schématisé sur la figure 2.22. La hauteur de ces structures étant connue, on en déduit la loi de calibration « intensité de fluorescence » en fonction de « hauteur de canal disponible ». Afin d'établir une loi qui ne dépend pas de la température, les intensités de fluorescences sont renormalisées. Les résultats sont présentés sur les graphiques de la figure 2.23.

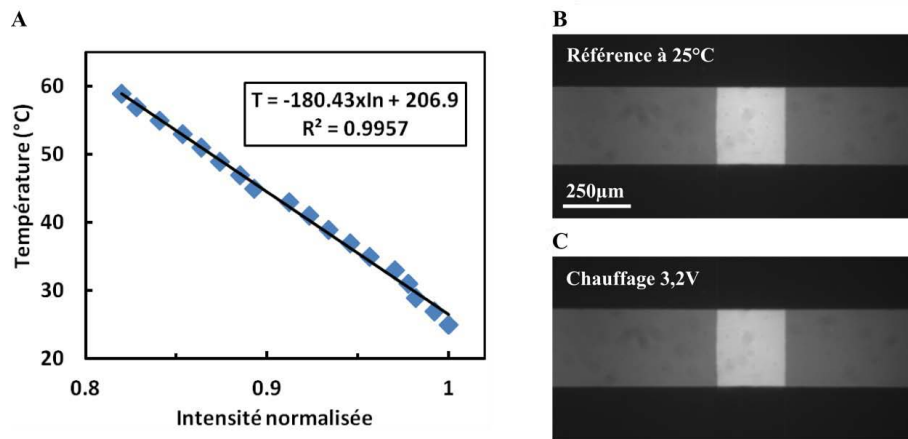
L'augmentation de fluorescence est linéaire avec la hauteur de canal sur la gamme considérée — ici jusqu'à 8  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.2 Mesure de température par fluorescence

Nous avons utilisé une solution de rhodamine B pour évaluer la variation de la température autour d'une résistance chauffante [13]. La rhodamine B a pour propriété d'émettre une intensité de fluorescence qui dépend de la température.

La configuration consiste en un canal droit de 250  $\mu\text{m}$  de largeur et 10  $\mu\text{m}$  de hauteur, croisant une résistance chauffante de 250  $\mu\text{m}$  de largeur. Une solution de rhodamine B à 0,1 mM est stabilisée à pH 9,6 par une solution tampon carbonate-bicarbonate (0,25 M). Les pics d'absorption et d'émission sont situés respectivement autour de 562 et 583 nm dans l'eau. Afin d'éviter le photoblanchiment, la source de lumière est équipée d'un obturateur synchronisé avec les acquisitions de la caméra.

La relation entre l'intensité de fluorescence et la température est calibrée par une expérience sur module Peltier (figure 2.24), de la même manière que pour le calibration de la profilométrie optique par fluorescence.



**Figure 2.24** – (A) Courbe de calibration de l'intensité de fluorescence en fonction de la température. Images en microscopie de fluorescence à la température de référence (A) et en appliquant une tension de 3,2 V aux bornes du circuit (C). D'après [1].

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé les procédés de fabrication permettant de répondre aux différents points du cahier des charges établi. Nous proposons en effet une technologie d'actionneurs à base d'hydrogel dont la géométrie est totalement maîtrisée et personnalisable, ce qui permet d'imaginer de nouveaux usages et une forte densité d'intégration. De plus, la robustesse des dispositifs est garantie par l'association de traitements de surface et de modifications chimiques sur le polymère de base qui assurent le greffage des films épais d'hydrogel structurés. Enfin, l'ajout d'une fonction active au substrat de base, à savoir des micro-résistances chauffantes, sera déterminant dans l'amélioration des performances — et surtout de la rapidité — des dispositifs.

Il faut noter que la structuration du film d'hydrogel *ex situ* joue un grand rôle, et nous avons porté une grande attention à optimiser les paramètres qui y sont associés, ainsi qu'à innover en la matière en s'appuyant sur une technologie de pointe avec la lithographie laser. Avec cette technique, une résolution de quelques microns est atteinte sur des épaisseurs supérieures au micron.

Plus généralement, on constate un gain considérable en maîtrise et en simplicité dans la conception des micro-systèmes intégrant des actionneurs à base d'hydrogel sensible, à savoir dans notre cas le p(NIPAM), un polymère thermosensible, dont la manipulation a été adaptée et pensée dans l'optique d'une intégration en micro-canaux.

Forts de ces progrès, nous allons voir dans le chapitre suivant les apports cette nouvelle stratégie en faisant la démonstration de sa polyvalence et de ses performances.

## Bibliographie du chapitre

- [1] Benjamin CHOLLET. « Hydrogels greffés stimulables comme actionneurs microfluidiques ». 2015PA066494. Thèse de doct. 2015.
- [2] Benjamin CHOLLET et coll. « Multiscale Surface-Attached Hydrogel Thin Films with Tailored Architecture ». In : *ACS Applied Materials & Interfaces* 8.18 (2016), p. 11729–11738.
- [3] Anthony M LOWMAN et Nikolaos A PEPPAS. « Hydrogels ». In : *Encyclopedia of controlled drug delivery* 1 (1999), p. 397–418.
- [4] Christian DECKER et Aubrey D JENKINS. « Kinetic approach of oxygen inhibition in ultraviolet-and laser-induced polymerizations ». In : *Macromolecules* 18.6 (1985), p. 1241–1244.
- [5] Charles E. HOYLE, Tai Yeon LEE et Todd ROPER. « Thiol-enes : Chemistry of the past with promise for the future ». en. In : *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry* 42.21 (2004), p. 5301–5338.
- [6] Joshua D. MCCALL et Kristi S. ANSETH. « Thiol–Ene Photopolymerizations Provide a Facile Method To Encapsulate Proteins and Maintain Their Bioactivity ». In : *Biomacromolecules* 13.8 (2012), p. 2410–2417.
- [7] Michael HESKINS et James E GUILLET. « Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide) ». In : *Journal of Macromolecular Science—Chemistry* 2.8 (1968), p. 1441–1455.
- [8] Mengxing LI. « Films minces d’hydrogels stimulables ». 2014PA066268. Thèse de doct. 2014.
- [9] Charles W EXTRAND. « Spin coating of very thin polymer films ». In : *Polymer Engineering & Science* 34.5 (1994), p. 390–394.
- [10] Jianwei WU et coll. « Inkjet-printed microelectrodes on PDMS as biosensors for functionalized microfluidic systems ». en. In : *Lab on a Chip* 15.3 (2015), p. 690–695.
- [11] Samuel James DUPONT JR. et coll. « Swelling-induced instabilities in microscale, surface-confined poly(N-isopropylacryamide) hydrogels ». en. In : *Soft Matter* 6.16 (2010), p. 3876.
- [12] Denis BARTOLO et coll. « Microfluidic stickers ». en. In : *Lab on a Chip* 8.2 (2008), p. 274–279.
- [13] David ROSS, Michael GAITAN et Laurie E LOCASCIO. « Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye ». In : *Analytical chemistry* 73.17 (2001), p. 4117–4123.





---

Mise en œuvre d'actionneurs à base d'hydrogel dans des systèmes dans des systèmes microfluidiques

---

**Sommaire du chapitre**

---

3.1	Activation thermique de structures en p(NIPAM) . . . . .	<b>55</b>
3.2	Géométrie type « vanne » . . . . .	<b>57</b>
3.2.1	Particularités de fabrication . . . . .	57
3.2.2	Profilométrie par fluorescence d'une vanne . . . . .	58
3.2.3	Étude d'une géométrie avec dérivation . . . . .	59
3.2.4	Étude du fonctionnement par mesure de débit . . . . .	62
3.2.5	Étude aux temps longs . . . . .	64
3.2.6	Possibilité d'une activation individualisée . . . . .	65
	Activation thermique locale par micro-résistances chauffantes	65
	Montage électrique et conception d'une interface de contrôle .	67
	Utilisation pour le choix d'une voie de fluide . . . . .	67
	Étude sur la résolution spatiale de l'échauffement . . . . .	67
	Caractérisation du temps de réponse du système . . . . .	69
3.3	Compartimentation libre en système microfluidique . . . . .	<b>71</b>
3.3.1	Intérêt d'une telle disposition . . . . .	71
3.3.2	Propriétés de perméabilité du p(NIPAM) . . . . .	73
3.3.3	Intégration de compartiments à haute densité . . . . .	74
3.4	Applications dans le domaine des biotechnologies . . . . .	<b>75</b>
3.4.1	Piégeage de cellules uniques . . . . .	75
3.4.2	Amplification isotherme d'ADN . . . . .	77
	Bibliographie du chapitre . . . . .	<b>81</b>

---

Durant cette thèse, nous avons proposé une méthode pour intégrer des structures en gel de p(NIPAM) dans des micro-systèmes. L'objectif est d'utiliser ce gel comme actionneur sensible à un *stimulus* en température.

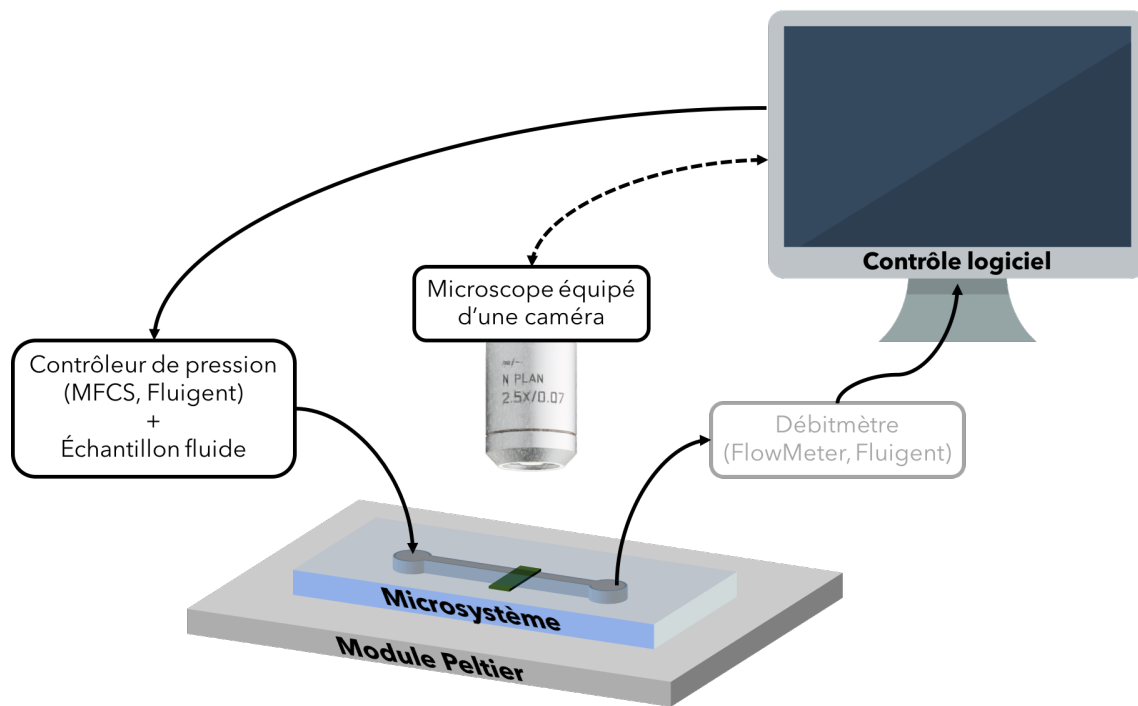
Plusieurs objectifs, évoqués dans le premier chapitre, ont émergé et dirigé la stratégie de fabrication. Plusieurs points restent maintenant à démontrer pour faire de la technologie d'actionneurs à base d'hydrogel un candidat sérieux, dont les performances et la pertinence sont comparables à celles des micro-vannes pneumatiques.

Dans un premier temps, nous commencerons par caractériser l'activation de l'hydrogel par stimulation thermique, afin de bien maîtriser son comportement en micro-systèmes. Nous montrerons qu'il a le comportement attendu avec une transition autour de 32 °C, en mettant en œuvre la technique de profilométrie par fluorescence décrite au chapitre précédent.

Nous montrerons dans un deuxième temps comment l'intégrer en tant que micro-vanne, dans une situation simplifiée où l'activation sera globale. Nous verrons qu'il est possible d'utiliser ces micro-vannes pour isoler des portions de fluide, mais que des contraintes à la fabrication existent. Les vannes seront ensuite caractérisées plus précisément et nous verrons qu'elles ont de bonnes performances en termes d'étanchéité et de durabilité. Enfin, grâce à l'intégration de micro-résistances chauffantes, nous verrons comment on peut très simplement rendre des micro-vannes indépendantes dans un dispositif peu coûteux en énergie. Ce sera l'occasion de proposer une mesure de leur temps de réponse, ainsi que d'argumenter sur les capacités d'intégration à plus grande densité.

Dans un troisième temps, nous présenterons une évolution dans la géométrie des actionneurs rendue possible par la structuration de l'hydrogel *ex situ* par insolation UV, en intégrant des compartiments indépendants des structures d'écoulement. Dans cette nouvelle disposition, nous étudierons les propriétés de perméabilité de l'hydrogel à la molécule de fluorescéine. Nous verrons enfin que cette configuration présente l'avantage d'intégrer les compartiments à haute densité, à raison de plusieurs dizaines par millimètre carré.

Dans un quatrième et dernier temps, nous aborderons deux applications de la compartimentation en microfluidique dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire. La première est une preuve de concept du piégeage de cellules uniques, qui a un fort intérêt dans les problématiques d'analyse des mécanismes cellulaires. La seconde montre la réalisation d'une amplification isotherme d'ADN dans des compartiments, méthode très intéressante pour la détection ciblée de matériel génétique pour le diagnostic de pathologies par exemple.



**Figure 3.1** – Schéma du dispositif expérimental de mesure de débit dans un canal droit muni d'un motif en hydrogel thermosensible.

### 3.1 Activation thermique de structures en p(NIPAM)

Nous allons dans un premier temps montrer le fonctionnement de micro-systèmes fabriqués en suivant les protocoles décrits au chapitre précédent. Pour cela, considérons une première expérience basée sur la mesure de fluorescence dans un micro-canal. Le dispositif est schématisé sur la figure 3.1.

Il comporte :

- un dispositif optique composé d'un microscope, muni d'une lampe à mercure pour des observations en fluorescence, et d'une caméra pour l'acquisition d'images.
- un module Peltier sur lequel sera placé le micro-système, et qui permet de le chauffer ou le refroidir.
- un contrôleur de pression MFCS (Fluigent) pour l'alimentation des fluides.
- un ordinateur pour contrôler la caméra et le contrôleur de pression.

La solution de fluorescéine décrite au paragraphe 2.3.1 p.48 est injectée dans un canal droit qui contient une structure en p(NIPAM) greffée au substrat inférieur. Un module Peltier règle précisément la température, que l'on fait varier de 20 à 50 °C avec des paliers de 2 minutes.

Lorsque ce motif est noir ou gris foncé, cela signifie que l'épaisseur disponible pour la fluorescéine est minimale et donc que l'hydrogel est gonflé. Au contraire, lorsqu'il s'éclaircit, la hauteur disponible est plus importante et cela signifie que l'hydrogel est effondré. Comme cette méthode est quantitative, on peut reconstruire des images en 2D du gonflement/effondrement de l'hydrogel. Cette reconstruction a été réalisée avec un programme Matlab qui traduit chaque point de l'image en une épaisseur (figure 3.3).

Le comportement du motif d'hydrogel correspond aux attentes, à savoir qu'en dessous

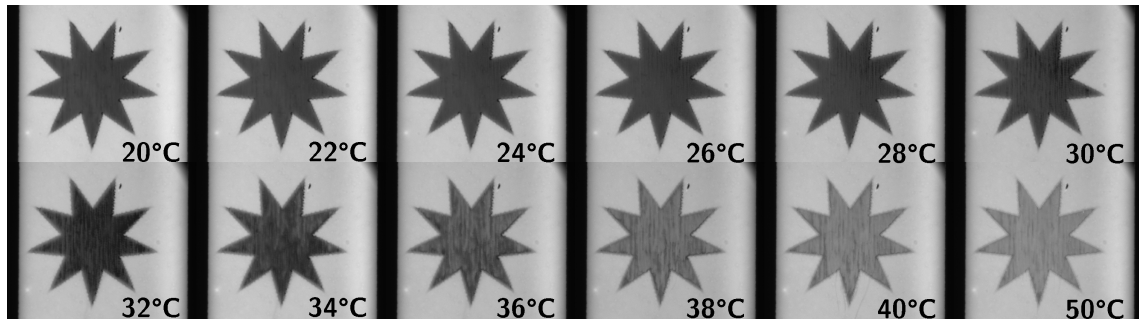


Figure 3.2 – Séquence d'images d'un motif d'hydrogel en forme d'étoile dans un canal microfluidique rempli de fluorescéine entre 20 et 50 °C.

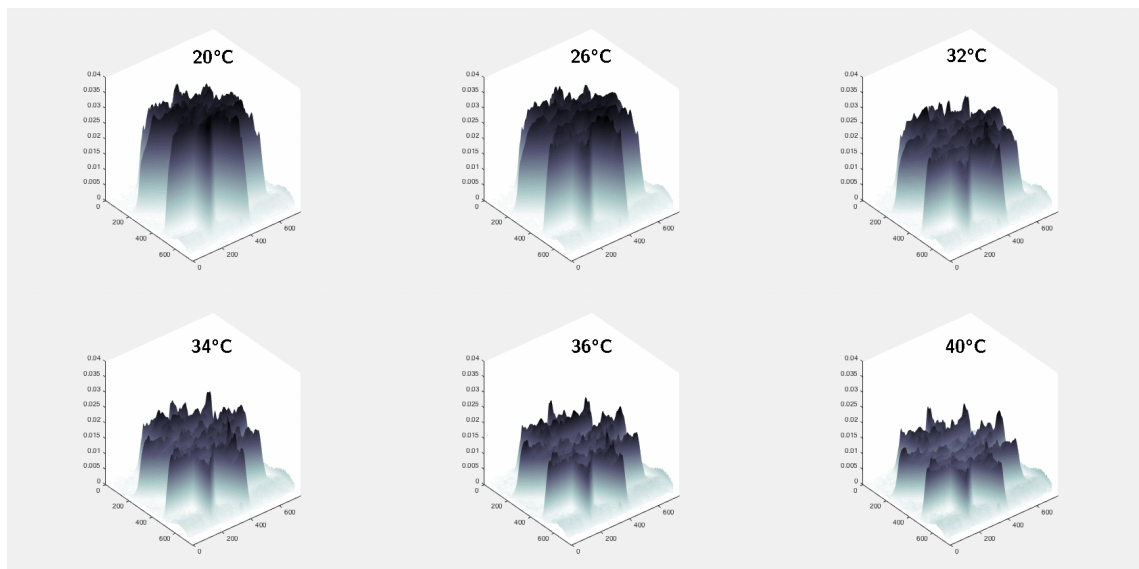
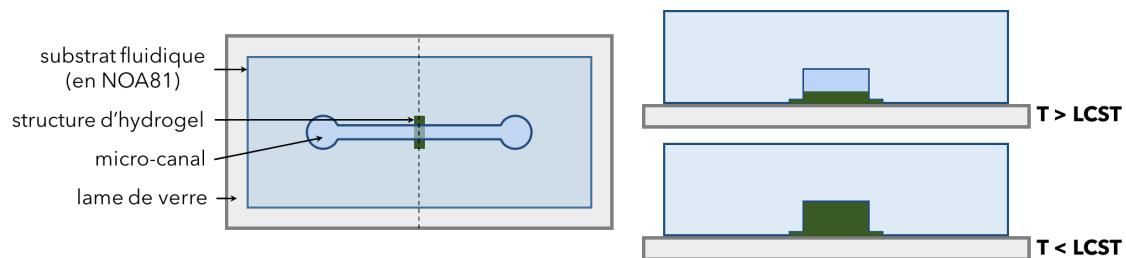


Figure 3.3 – Reconstitution 3D de la séquence présentée sur la figure 3.2 par profilométrie par fluorescence.



**Figure 3.4** – Schéma de principe d'une vanne à base d'hydrogel. Vue de dessus (à gauche) et en coupe dans la situation vanne ouverte (en haut à droite) et vanne fermée (en bas à droite).

de la LCST (graphes 1 et 2), le motif est donc gonflé, tandis qu'au dessus (graphes 4 à 6) le gel est effondré. On voit plus précisément sur les images de la figure 3.2 que la transition s'opère aux alentours de  $35^{\circ}\text{C}$ . Quantitativement, on retrouve le taux de gonflement attendu à savoir environ  $\times 2,5$  entre les deux états.

De plus, les opérations de gonflement/effondrement ont été répétées plusieurs centaines de fois sans constater de changement de comportement. Ce point sera d'ailleurs abordé plus en détails dans le paragraphe suivant.

Nous avons donc ici apporté la preuve qu'une structure en hydrogel de p(NIPAM) intégrée dans un micro-canal peut être activée par un *stimulus* thermique. Son greffage au substrat lui garantit une bonne tenue dans le temps sans dégrader ses propriétés fonctionnelles. Nous avons aussi proposé une méthode de mesure et d'observation *in situ* qui permet de caractériser le gonflement/effondrement de l'hydrogel, dont nous nous servons par la suite pour illustrer les diverses fonctions présentées.

## 3.2 Géométrie type « vanne »

Nous allons nous inspirer de la configuration des vannes pneumatiques pour réaliser une vanne à base d'hydrogel thermosensible. Le principe d'une vanne étant de stopper le flux des fluides dans le canal, il faut s'assurer d'une bonne étanchéité du dispositif. Ainsi, nous devons intégrer la capacité de gonflement de l'hydrogel, à savoir un facteur 4 sur l'épaisseur à sec.

### 3.2.1 Particularités de fabrication

Le principe d'une vanne à base d'hydrogel est schématisé sur la figure 3.4. Il s'agit de réticuler et de greffer une bande d'hydrogel sur un substrat de verre d'une part, et de concevoir une partie fluide à base de NOA structurée. Ces étapes sont décrites dans le chapitre précédent.

Dans ce cas particulier, il sera nécessaire de trouver un compromis entre deux impératifs qui ont des effets contradictoires :

- pour compenser les erreurs d'alignement, il est plus simple de créer des bandes d'hydrogel plus longues que la largeur du canal.

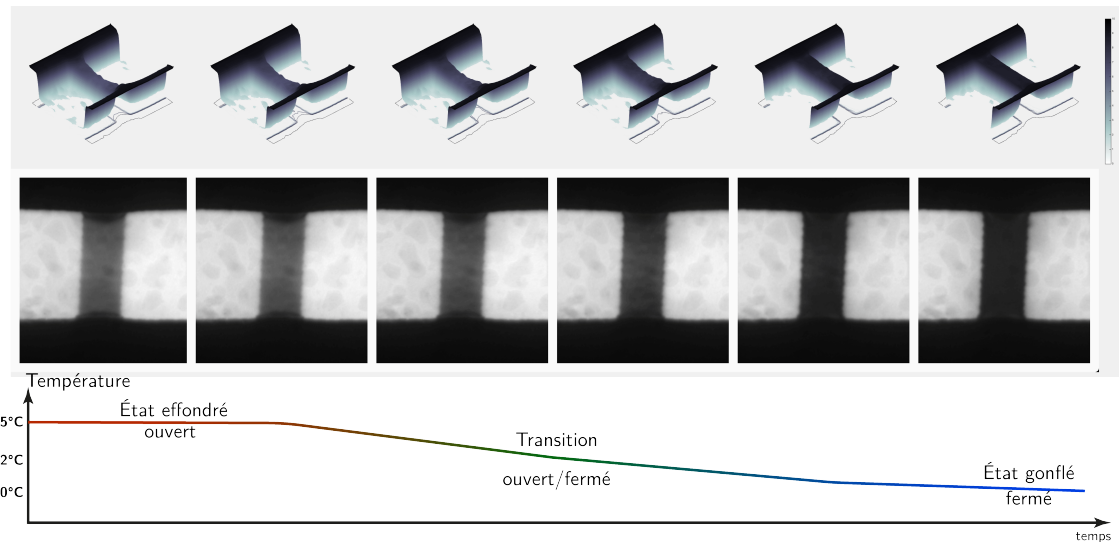


Figure 3.5 – En haut : reconstruction 3D par fluorescence de l'activation d'une vanne. En bas : séquence d'images correspondantes en fluorescence.

- pour éviter une déformation mécanique trop importante du substrat, et éliminer les fuites, on a intérêt à créer des bandes de longueur exactement égale à la largeur du canal.

On peut rajouter que pour garantir l'étanchéité de la vanne, la hauteur du canal dans la structure en NOA devra être au plus 4 fois plus grande que l'épaisseur à sec de la bande d'hydrogel (en général, on garde une marge d'un ou deux microns).

### 3.2.2 Profilométrie par fluorescence d'une vanne

De la même manière que nous avons illustré le comportement d'un motif d'hydrogel au paragraphe 3.1, on peut appliquer la méthode de profilométrie par fluorescence au fonctionnement d'une vanne unique dans un canal. On utilise ici un canal de 400  $\mu\text{m}$  de largeur et 10  $\mu\text{m}$  de hauteur dans lequel on injecte la même solution de fluorescéine que précédemment à une pression allant jusqu'à 1 bar. La séquence est montrée sur la figure 3.5.

Afin de rendre compte précisément de la topologie du canal, une correction est à apporter aux images. En effet, lorsque la vanne est en position fermée, le débit s'annule (voir paragraphe précédent), et la solution de fluorescéine est alors éclairée en continu sans être renouvelée : on observe alors un phénomène de photoblanchiment qui fait rapidement décroître l'intensité de fluorescence. La correction consiste donc à maintenir constant le niveau de fluorescence par rapport à l'instant où la vanne est ouverte.

Une conséquence de cette correction est qu'elle peut exagérer la visualisation des fuites lorsque la vanne est fermée, afin de les détecter plus facilement.

Finalement, on observe un bon fonctionnement de la vanne puisqu'en position fermée, aucune fluorescence n'est visible ni au dessus ni à travers la barrière d'hydrogel.

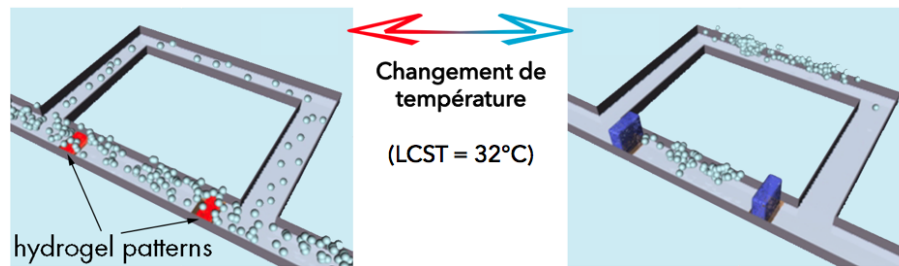


Figure 3.6 – Schéma du principe de l'isolement d'une portion de fluide par une paire de vannes avec un canal de dérivation.

### 3.2.3 Étude d'une géométrie avec dérivation

Pour illustrer un problème rencontré lors de l'utilisation des structures de p(NIPAM) pour la réalisation de micro-vannes, nous allons considérer une géométrie sensiblement différente, et qui met en œuvre une paire de micro-vannes en hydrogel afin d'isoler une portion de fluide. C'est une configuration qui s'apparente à celle utilisée par S. Quake en utilisant des vannes pneumatiques.

Le principe est illustré sur la figure 3.6. Deux motifs de p(NIPAM) sont disposés en tant que microvannes le long d'un canal dit *canal principal*. Un autre canal, aux dimensions latérales plus faibles, encadre ces deux micro-vannes, et est appelé *canal de dérivation*. Les vannes sont activées par *stimulus* température grâce à un module Peltier.

Le fonctionnement attendu et observé sur la figure 3.7 est le suivant :

1. un premier fluide est injecté lorsque les micro-vannes sont ouvertes — la température imposée par le module Peltier est supérieure à la LCST — et circule dans les deux canaux, mais préférentiellement dans le canal principal pour des questions de résistance hydrodynamique (B).
2. la température est abaissée de sorte à fermer les vannes : une portion est isolée entre les vannes, et le fluide ne circule désormais plus que par le canal de dérivation (C).
3. à des fins de visualisation par exemple, le premier fluide est lavé par un second, sauf sur la portion isolée par les vannes (D).
4. si l'on augmente à nouveau la température, on peut libérer la portion isolée et la solution de lavage passe par les deux canaux à nouveau (E).

Les expériences présentées dans la suite ont été réalisées pendant les stages d'Émilie Bayon et Bhuwan Ghimire. Les circuits sont cette fois une succession de motifs avec dérivation dont la largeur des bandes d'hydrogel varie par paire de 25  $\mu\text{m}$  à 200  $\mu\text{m}$ , comme schématisé sur la figure 3.8.

Une solution de fluorescéine est injectée, et tout comme il a été montré qu'on pouvait isoler une portion de fluide sur la figure 3.7, plusieurs portions de fluide peuvent être isolée de la même manière ici. Cependant, cette expérience montre également un problème qui peut être rencontré dans ce type de dispositif : la présence de fuites. Sur la figure 3.9, ces fuites sont visibles et peuvent être expliquées par le fait que le substrat supérieur ne colle pas parfaitement au substrat inférieur du fait de la présence du motif d'hydrogel.



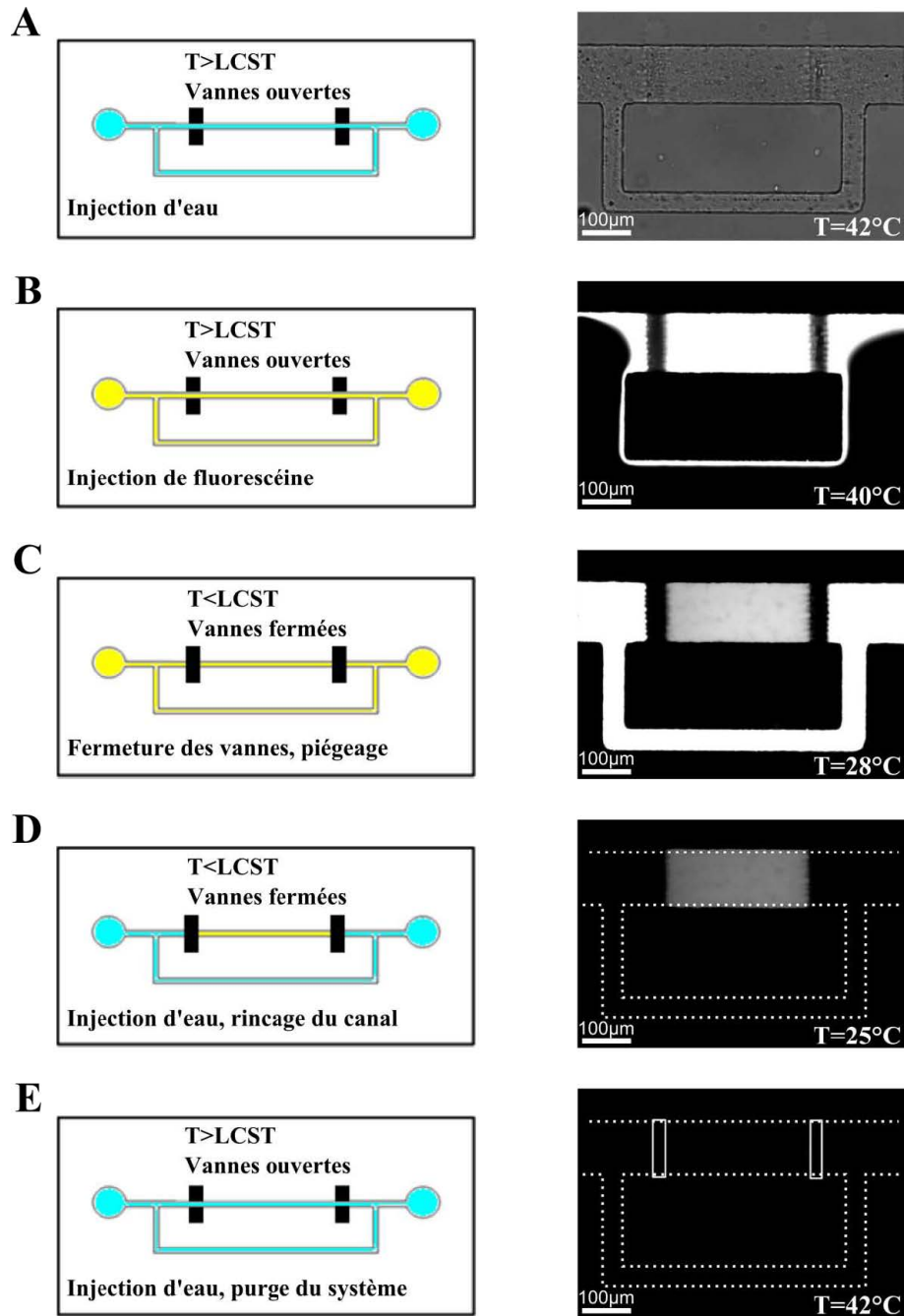


Figure 3.7 – Séquence d'images de l'isolement d'une portion de fluide entre deux vannes hydrogel dans un dispositif à deux vannes avec canal de dérivation. D'après [1]

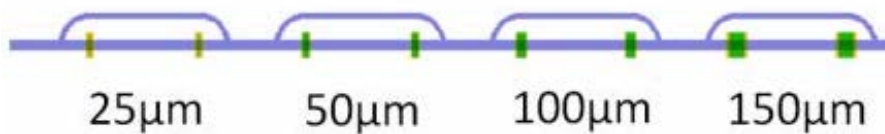
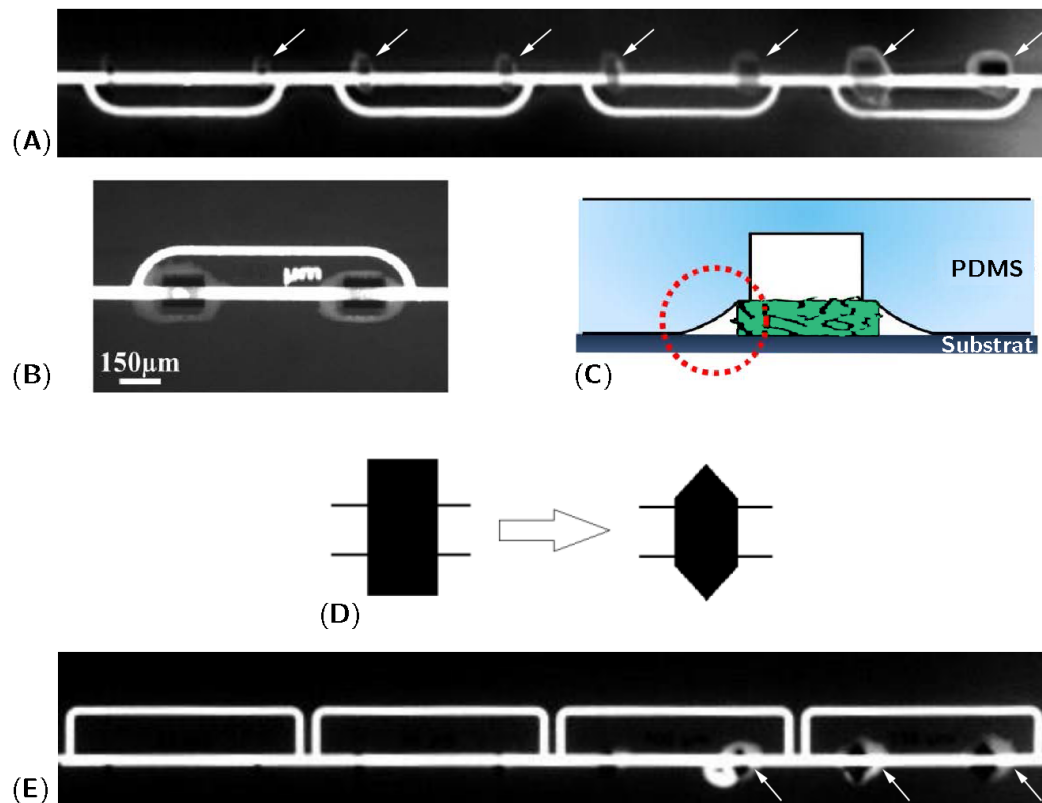


Figure 3.8 – Schéma du système combinant plusieurs largeurs de bandes d'hydrogel dans un dispositif avec dérivation.



**Figure 3.9** – (A) Images en fluorescence du microsystème comportant des vannes rectangulaires et présence de fuites (flèches) autour des structures d'hydrogel. (B) Zoom sur les structures provoquant des fuites. (C) Schéma du phénomène expliquant la présence des fuites : la structure d'hydrogel empêche la fermeture étanche du circuit. (D) Illustration du changement de géométrie pour limiter le phénomène de « bavures » : on passe d'un motif rectangulaire à un motif en « diamant ». (E) Le phénomène est atténué par la géométrie en « diamant ».

Une solution mise en œuvre a consisté à modifier la forme des structures d'hydrogel pour minimiser la surface que le substrat supérieur doit recouvrir. Les bandes rectangulaires sont remplacées par des hexagones (figure 3.9 (D)). Avec cette modification, les fuites sont bien réduites, notamment sur les bandes les moins larges, mais subsistent sur les structures plus grandes.

Cette étude a permis de mettre en évidence les limites de cette géométrie « vanne » en termes d'intégration à haute densité. Néanmoins, il est possible d'intégrer des vannes sans rencontrer de problème en prenant soin de respecter des critères géométriques d'espace-ment entre les structures et de largeur de structures, qui restent encore à affiner.

### 3.2.4 Étude du fonctionnement par mesure de débit

Une vanne étant censée avoir un comportement binaire « ouvert/fermé », le débit de fluide en sortie d'un canal comportant une vanne est une donnée de choix pour caractériser son fonctionnement. Nous avons donc simplement ajouté au dispositif décrit au paragraphe 3.1 un débitmètre (Fluigent Flow-Rate Platform) de calibre 0 – 80  $\mu\text{l}/\text{min}$ , placé en sortie du micro-système.

Le canal utilisé ici est un canal droit qui a pour longueur  $L = 1,2\text{ cm}$ , pour largeur  $w = 400\ \mu\text{m}$ , et pour hauteur  $h = 9,4\ \mu\text{m}$ . Les mesures ont été réalisées par Margaux Kerdraon lors de son stage.

On peut connaître le débit théorique maximal dans le canal, obtenu lorsque la vanne est ouverte, par la formule 3.1

$$Q = \frac{\Delta P}{R_h} \quad (3.1)$$

où  $\Delta P$  est la différence de pression appliquée en entrée du canal, soit dans notre cas 345 mbar, et  $R_h$  la résistance hydrodynamique, qui lorsque  $w \gg h$  est donnée par  $R_h = \frac{12\eta L}{wh^3}$ , où  $\eta$  est la viscosité du fluide de travail, c'est-à-dire l'eau dans notre cas.

Le débit théorique maximal est  $Q_{max} = 4,8\ \mu\text{l}/\text{min}$ . La température est augmentée de 20 à 50 °C par pas de 2 °C et par paliers de 2 minutes, dans le sens croissant puis décroissant, et une mesure du débit dans le canal est faite toutes les 100 ms ; la moyenne des débits sur le palier en est déduite. Les résultats sont représentés sur la figure 3.10.

La figure 3.10 (A) montre qu'en dessous de 28 °C le débit est nul : la vanne est bien fermée. Considérant la précision du débitmètre utilisé, les fuites éventuelles sont au plus de 120 nl/min.

La transition vers l'ouverture a lieu entre 28 °C et 34 °C. Cela correspond bien aux données attendues, à savoir une LCST autour de 32 °C. Cette transition s'effectue sur seulement quelques degrés et est donc assez étroite pour garantir un comportement « ouvert/fermé » conforme aux attentes d'une vanne.

Au-delà de 34 °C, le comportement correspond à celui d'une vanne ouverte, mais on constate que le débit continue d'augmenter alors que l'on s'attend plutôt à un plafonnement.

Pour expliquer ce phénomène et vérifier que cela n'était pas dû à une variation dans le

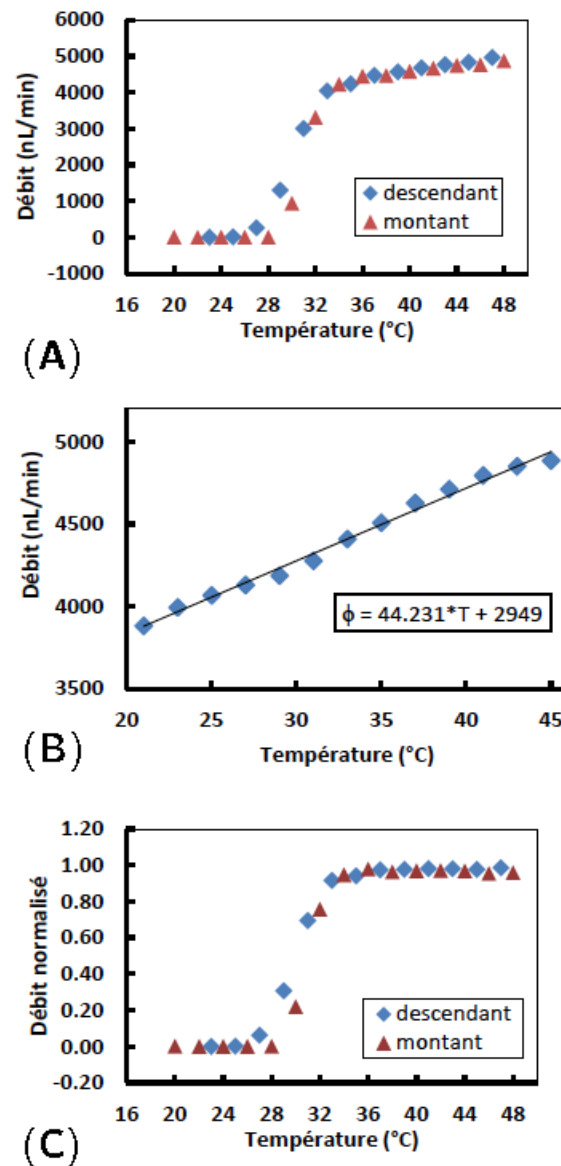
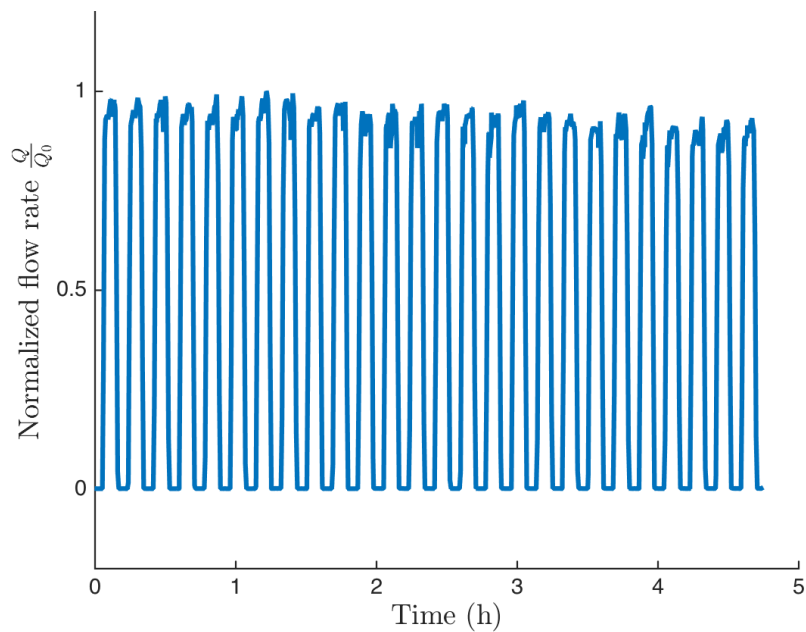


Figure 3.10 – Mesures de débit dans un canal droit muni d'une vanne. (A) Mesure brute dans le canal muni d'une vanne. (B) Mesure du débit dans le même canal sans la vanne : le débit augmente avec la température. (C) Mesure corrigée dans le canal muni d'une vanne. D'après [1].



**Figure 3.11** – Mesure du débit, normalisé par le débit maximal, lors d'une expérience aux temps longs où l'on alterne ouverture et fermeture d'une vanne.

temps de l'épaisseur de la structure d'hydrogel, nous avons mesuré le débit dans le même micro-canal sans vanne hydrogel (figure 3.10 (B)). Comme attendu, celui-ci augmente avec la température puisque la viscosité de l'eau diminue. On extrait de cette expérience une loi — linéaire — qui permet de corriger ce biais lié à la température en normalisant les débits mesurés dans la figure A.

Dans ces conditions, la courbe obtenue (figure 3.10 (C)) correspond aux attentes et on atteint un plateau lorsque la vanne est ouverte, à une température supérieure à 34 °C, tandis que le débit reste nul en-dessous de 28 °C.

### 3.2.5 Étude aux temps longs

L'un des critères importants dans la conception de ces actionneurs est leur résistance et durabilité. Nous avons mené des expériences de longue durée pour nous assurer que le comportement des micro-vannes est bien stable au cours du temps. Pour ce faire, nous avons utilisé le même dispositif expérimental que précédemment, et réalisé des cycles de chauffage/refroidissement entre 25 °C et 50 °C avec des paliers de 5 minutes pour stabiliser la température et une pression d'entrée de 500 mbar. La figure 3.11 présente les résultats normalisés par le débit maximal sur près de 5 heures, soit 27 cycles. L'expérience a en fait été réalisée sur près de 10 heures, et le comportement est identique.

Si le débit à l'ouverture peut légèrement varier, la fermeture de la vanne est par contre très stable puisque le débit minimal est toujours nul. La variation des mesures de débits vanne ouverte est probablement due à l'imprécision des mesures : les données brutes montrent parfois des mesures non représentatives de la réalité.

Enfin, les structures d'hydrogel semblent stables dans le temps pour cette configuration de micro-vanne. Cela représente un véritable progrès par rapport aux travaux

présentés au chapitre 3.

### 3.2.6 Possibilité d'une activation individualisée

La méthode de fabrication présentée dans le chapitre précédent offre la possibilité d'incorporer des éléments actifs au substrat inférieur. Ici cela consiste à ajouter des micro-résistances chauffantes par effet Joule à la lame de verre sur laquelle est déposé le gel de p(NIPAM).

Cette configuration permet essentiellement d'individualiser l'activation d'un actionneur afin de rendre le micro-système plus flexible, en comparaison avec l'utilisation d'un module Peltier qui chauffe ou refroidit l'intégralité du système. On peut donc activer un actionneur indépendamment des autres.

Par ailleurs, du fait qu'un moindre volume est chauffé, on réduit le temps alloué à l'activation de l'actionneur, ce qui améliore *in fine* son temps de réponse global. Nous verrons d'ailleurs comment nous avons pu donner une estimation plus précise du temps de réponse de l'hydrogel grâce à un système à activation localisée.

#### Activation thermique locale par micro-résistances chauffantes

Le concept d'activation locale est schématisé sur la figure 3.12. Comme expliqué au chapitre précédent, on dépose une fine couche de métal — une couche d'accroche de chrome et de l'or — sous forme d'un circuit électrique comportant une portion plus étroite que les autres, sous forme de serpent. Typiquement, les portions de « circuit en or » font 300  $\mu\text{m}$  de large, à comparer aux portions « micro-résistances » qui ne font que 10  $\mu\text{m}$  de large.

La résistance  $R$  d'une piste électrique est donnée par la formule suivante :

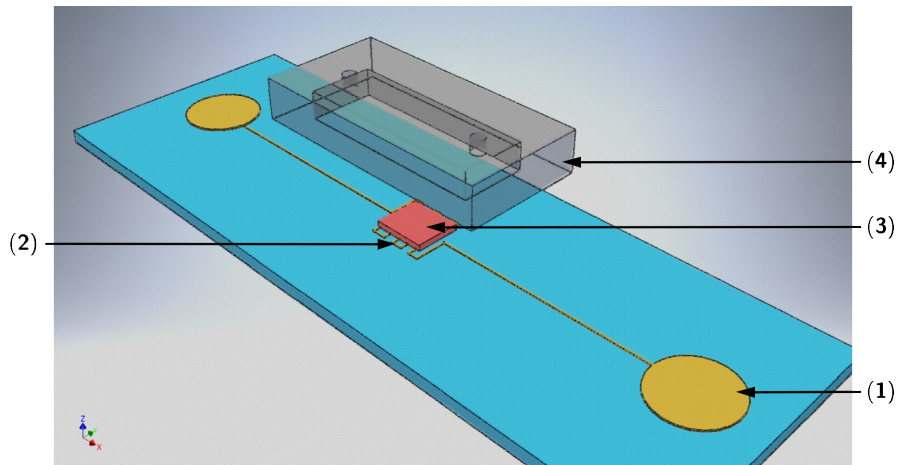
$$R = \rho \frac{L}{S} = \rho \frac{L}{l \times e} \quad (3.2)$$

où  $\rho$  est la résistivité du matériau,  $L$  la longueur de la piste,  $S$  sa section définie comme le produit de la largeur  $l$  et de l'épaisseur  $e$ .

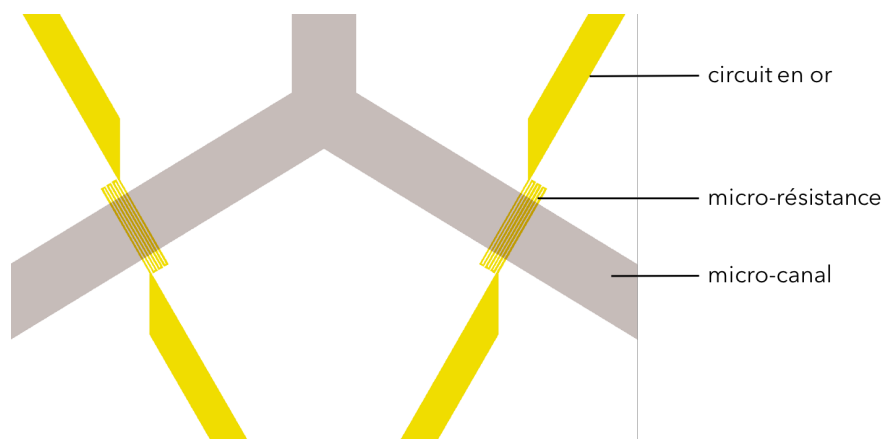
Ainsi, dans notre cas, la micro-résistance est théoriquement près de 100 fois plus résistive que le reste du circuit. La puissance dissipée par effet Joule étant proportionnelle à la résistance, le chauffage est concentré sur la micro-résistance.

Les circuits sont dimensionnés pour être utilisés sous des tensions relativement faible, à savoir inférieures à 5 V.

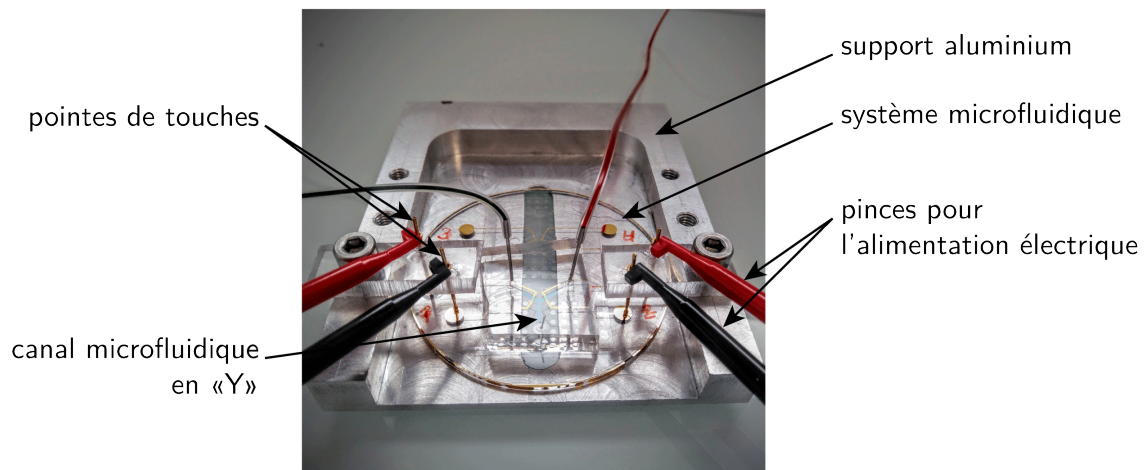
La géométrie choisie pour illustrer l'activation locale par micro-résistances chauffantes est schématisée sur la figure 3.13. C'est un canal microfluidique en forme de « Y » dont les deux branches symétriques sont dotées d'une micro-vanne, chacune pouvant être activée indépendamment de l'autre par une micro-résistance chauffante. Le canal a une largeur de 400  $\mu\text{m}$  et une hauteur de 9,2  $\mu\text{m}$ . Les micro-vannes sont des structures en hydrogel de 2,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à sec — soit environ 10  $\mu\text{m}$  une fois gonflées.



**Figure 3.12** – Schéma illustrant le principe de l'activation locale. Le substrat actif comporte un circuit électrique (1) comportant une section en serpentins de largeur réduite, une micro-résistance chauffante (2). Une structure d'hydrogel est ajoutée au niveau de la micro-résistance (2). Le canal microfluidique (4) est ensuite assemblé au reste du système.



**Figure 3.13** – Schéma du système en « Y ». Chaque branche du « Y » comporte une micro-vanne actionnable indépendamment de l'autre.



**Figure 3.14** – Photographie du dispositif d'activation locale. Le système (1) est inséré dans un support en aluminium (2). Des pointes de touche (3) permettent les connexions électriques.

### Montage électrique et conception d'une interface de contrôle

Dans le dispositif expérimental utilisé ici, le module Peltier est remplacé par un générateur électrique capable de délivrer une tension maximale de 5 V sur deux canaux. La puce est placée sur un support en aluminium qui fait office de puits thermique pour assurer une bonne évacuation de la chaleur. Les connexions électriques sur la puce se font par l'intermédiaire de pointes de touche, en contact avec des zones du circuit en or prévues à cet effet. L'ensemble est présenté sur les photographies de la figure 3.14.

### Utilisation pour le choix d'une voie de fluide

Avec ce dispositif en « Y », nous avons montré comment l'activation locale des vannes permet de sélectionner une des deux branches pour l'écoulement principal. Pour ce faire, une solution de fluorescéine d'un côté, et une solution de *quantum dots* fluorescents dans le rouge (excitation 561 nm / émission 585 nm) de l'autre, sont injectées avec la même pression d'entrée. Au repos, les vannes sont fermées ; on peut choisir d'ouvrir l'une ou l'autre vanne en imposant un courant électrique. Le résultat est illustré sur la figure 3.15 : les deux fluides circulent côte à côte (a) lorsque les deux vannes sont activées, seule la fluorescéine (b) circule si on n'active que la vanne correspondante, de même que pour les *quantum dots* (c).

### Étude sur la résolution spatiale de l'échauffement

L'expérience est menée en appliquant la méthode de mesure de température par la fluorescence de la rhodamine B détaillée au paragraphe 2.3.2. Une tension de 3,2 V est appliquée aux bornes d'une micro-résistance chauffante de 250  $\mu\text{m}$  de large intégrée dans une puce placée sur un module Peltier faisant office de thermostat à 25 °C.

Sur la figure 3.16, on observe que la température n'est supérieure à la LCST que sur la zone de résistance chauffante, et qu'elle décroît rapidement autour. Le retour à la température ambiante se fait à environ 250  $\mu\text{m}$  du centre de la résistance.



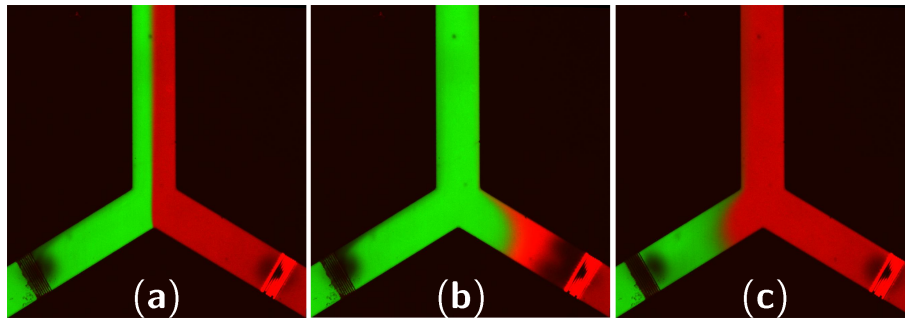


Figure 3.15 – Images par microscopie spinning-disk en deux fluorescences du dispositif d'activation locale de deux vannes sur un canal microfluidique en « Y ». (a) Les deux vannes sont actionnées : les fluides circulent côte à côte. (b) Seule la vanne fluorescéine à gauche est activée. (c) Seule la vanne *quantum dots* à droite est activée.

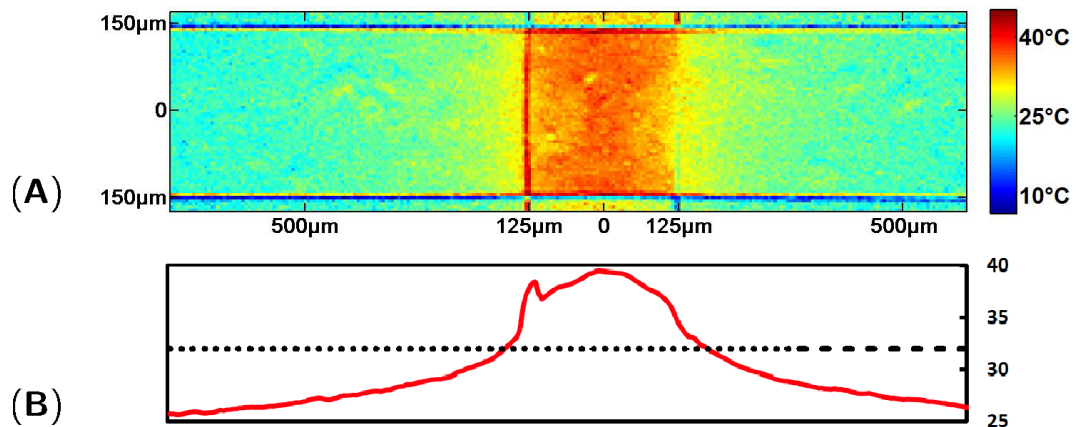


Figure 3.16 – (A) Mesure de température par intensité de fluorescence de la rhodamine B. (B) Profil de température dans la longueur du canal. La ligne pointillée représente la température de la LCST à 32 °C. D'après [1].

Ces résultats confirment l'idée selon laquelle on peut atteindre une grande densité d'actionneurs à base d'hydrogel dans cette configuration.

### Caractérisation du temps de réponse du système

Un des critères importants dans la réalisation des actionneurs est leur temps de réponse. D'après TANAKA et FILLMORE [2], il correspond au temps de diffusion visqueuse du solvant (l'eau) dans le réseau polymérique [3], et on peut l'écrire :

$$\tau \sim \frac{h^2}{D} \quad (3.3)$$

où  $h$  est la hauteur du canal et  $D$  le coefficient de diffusion du solvant dans le réseau polymérique.

On peut estimer l'ordre de grandeur de ce temps de réponse à partir de données de la littérature [4] ( $D \sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ) et on obtient pour un film de  $10 \mu\text{m}$  d'épaisseur à sec un temps de diffusion  $\tau \sim 100 \text{ ms}$ . Ce temps de réponse théorique ne prend en compte que la diffusion du solvant dans le gel, mais n'intègre pas la dynamique liée au changement de température autour de la LCST.

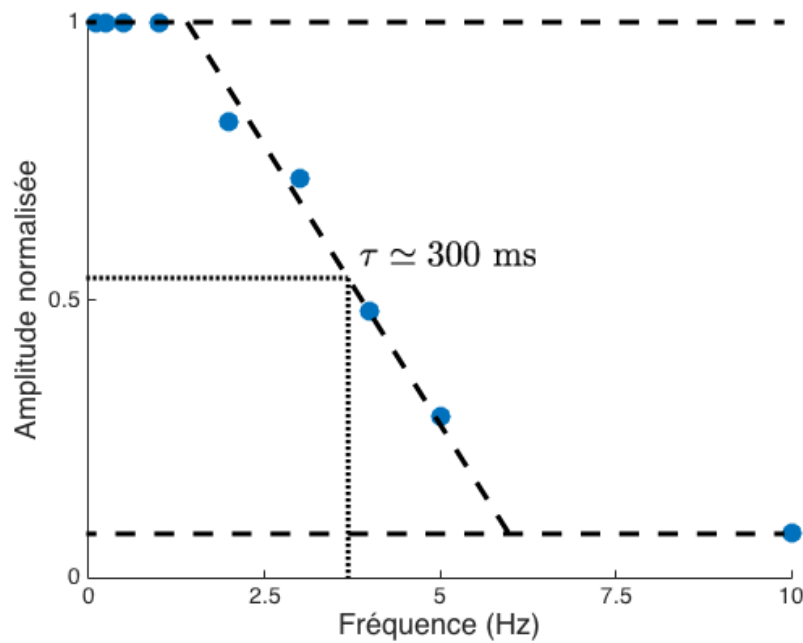
Nous avons voulu estimer le temps de réponse des actionneurs à base d'hydrogel activés localement par micro-résistance chauffante. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur la géométrie en « Y » en actionnant alternativement les deux micro-vannes à des fréquences variables.

En mesurant l'amplitude du déplacement du front de l'interface en fonction de la fréquence de l'activation, on peut déduire le temps de réponse du dispositif. En effet, lorsque l'amplitude du mouvement  $A$  est maximale ( $A/A_0 = 1$ , avec  $A_0$  l'amplitude maximale) aux plus faibles fréquences, le temps de réponse du système est inférieur au temps d'activation. Au contraire, lorsque l'amplitude du mouvement est minimale ( $A/A_0 \rightarrow 0$ ), le système n'est pas en mesure de suivre le rythme de l'activation. Le temps de réponse du système est ainsi défini par une méthode des tangentes, à la transition entre ces deux états (voir figure 3.17).

On obtient un temps de réponse  $\tau \simeq 300 \text{ ms}$ .

Cette mesure de temps de réponse peut être comparée avec les résultats obtenus par chauffage « global » sur module Peltier : avec le taux de chauffage maximal du matériel, la transition entre les deux états prend 6 secondes.

Ainsi, la localisation de l'activation des micro-vannes améliore le temps de réponse d'un facteur 20. Par ailleurs, on a vu que cela ne requérait que de faibles puissances d'activation. Ces deux points rendent la technologie intéressante pour la conception de LOC transportables.



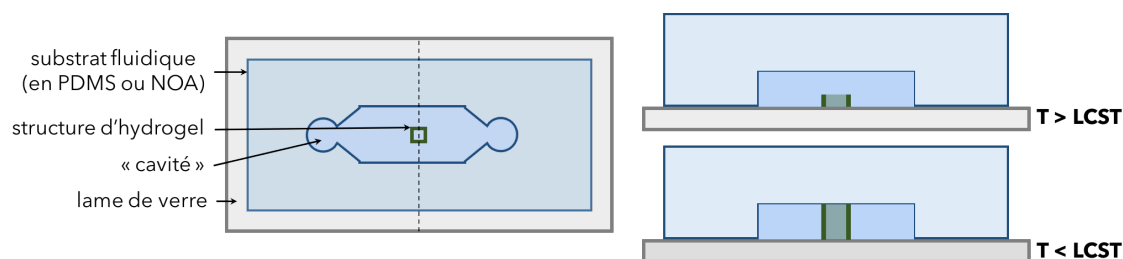
**Figure 3.17** – Mesure du temps de réponse en étudiant la réponse fréquentielle du dispositif en « Y ». On compare l'amplitude du déplacement du front de l'interface à différentes fréquence d'activation, avec pour référence la fréquence la plus basse, à savoir 0,1 Hz. Par une méthode des tangentes, on obtient un temps de réponse de l'ordre de 300 ms.

On a vu dans ce paragraphe que la technologie d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible permet de réaliser des micro-vannes dont les performances sont acceptables. En effet, si l'on choisit correctement les dimensions des bandes d'hydrogel qui matérialisent ces vannes, le système obtenu est robuste et son comportement reproductible sur de longues périodes. Cela nécessite de trouver un compromis sur la dimension et la géométrie : les bandes d'hydrogel doivent être assez longues pour faciliter l'alignement des substrats lors de la fabrication, mais sans trop dépasser des canaux de circulation des fluides pour éviter les fuites dues à la déformation du PDMS ou de la NOA.

Par ailleurs, nous avons montré qu'il est possible d'intégrer des circuits électriques et des micro-résistances chauffantes pour individualiser le comportement des micro-vannes. Ce dispositif, peu coûteux en énergie, apporte un degré de maîtrise supplémentaire dans l'utilisation de tels dispositifs. Il faut néanmoins nuancer ce propos par le fait que chaque résistance chauffante nécessite un circuit associé, ce qui pose un problème d'encombrement sur le substrat, ainsi que pour l'alimentation en puissance et les connexions électriques.

Enfin, en mettant à profit l'activation locale des vannes, le temps de réponse du système a pu être quantifié et amélioré puisqu'on parvient à mesurer une réponse en 300 ms des vannes, qui représente un gain d'un facteur 20 par rapport à l'activation globale sur un module Peltier.

Toutes ces observations sont à mettre en regard du comparatif établi lors de l'état de l'art du chapitre 1 : en plus de la fabrication, nous avons prouvé ici que l'efficacité, le temps de réponse, la robustesse et la méthode d'activation des micro-vannes à base d'hydrogel ont été améliorés.



**Figure 3.18** – Schéma du principe du compartiment hydrogel en cavité microfluidique. À gauche, vue de dessus. À droite vues de coupe. En haut, à  $T > LCST$ , la bordure d'hydrogel est effondrée et le compartiment est ouvert à l'écoulement ; en bas, à  $T < LCST$ , le compartiment est fermé et isole une portion de fluide.

### 3.3 Compartimentation libre en système microfluidique

Après avoir montré comment notre méthode pour réaliser des actionneurs microfluidiques permet de concevoir des micro-vannes qui répondent aux exigences de robustesse, de durabilité, de rapidité et de facilité d'activation, nous avons souhaité changer de point de vue pour proposer de nouvelles fonctions. Dans ce paragraphe, nous verrons comment la structuration UV permet d'intégrer des compartiments actionnables en micro-systèmes.

#### 3.3.1 Intérêt d'une telle disposition

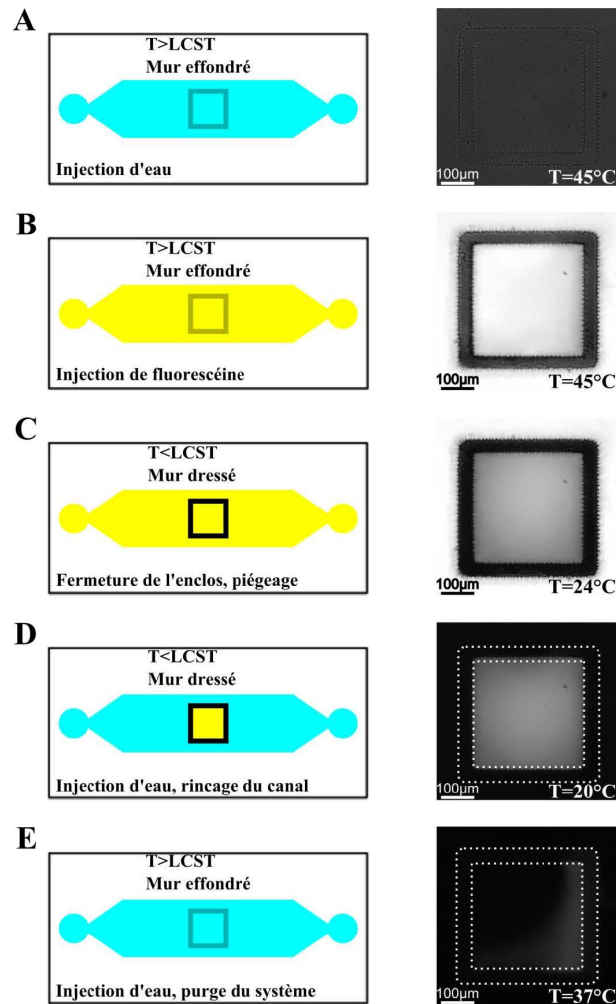
Le principe des compartiments, qu'on appelle aussi « pièges » ou « cages » est illustré sur la figure 3.18 : une portion de fluide est isolée du reste de l'écoulement par un contour fermé de gel de p(NIPAM) qui a la capacité de gonfler ou s'effondrer selon la température appliquée.

Leur fabrication ne requiert pas de précaution supplémentaire, contrairement aux micro-vannes. La structuration de contours fermés peut se faire soit par lithographie classique, soit pas lithographie laser directe, et l'indépendance de ces structures avec le reste du micro-canal permet de s'accorder plus de marge quant à l'alignement des motifs ainsi que résoudre les problématiques liées à l'étanchéité.

Une séquence d'images est montrée sur la figure 3.19. Elles correspondent à l'utilisation d'un compartiment carré de  $500\ \mu\text{m}$  de côté avec une bordure hydrogel large de  $100\ \mu\text{m}$  et d'épaisseur à sec de  $2,2\ \mu\text{m}$ , inclus dans une « cavité » en NOA de  $8\ \mu\text{m}$  de hauteur pour  $2,5\ \text{mm}$  en largeur. Le dispositif expérimental est identique à celui utilisé pour l'activation globale (avec module Peltier) d'une micro-vanne observée en fluorescence.

La séquence est la suivante :

1. le système est rempli d'eau pure à  $T = 45\ ^\circ\text{C} > LCST$  : la bordure d'hydrogel est effondrée et le liquide remplit l'intégralité de la cavité, y compris le compartiment (A).
2. on remplit ensuite le système de fluorescéine : l'intégralité de la cavité est fluorescente, y compris le compartiment (B).
3. on abaisse la température à  $T = 25\ ^\circ\text{C} < LCST$  : la bordure d'hydrogel gonfle et isole le compartiment. Elle vient en contact du plafond de la cavité et la fluorescence



**Figure 3.19** – Séquence d’images et schémas correspondant à l’isolement d’une portion de fluide dans un système de compartimentation libre. D’après [1].

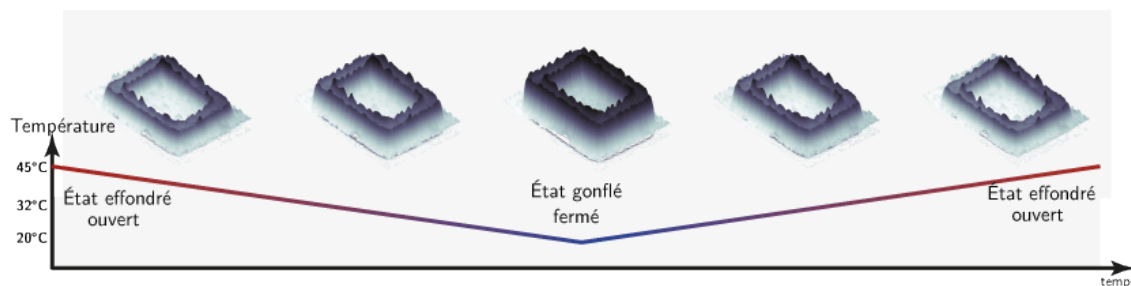
au niveau de la bordure s’annule (C).

4. Cette fermeture de la cage s’illustre par le fait que le volume de solution de fluorescéine piégé diminue en intensité de fluorescence par phénomène de photo-blanchiment (C).
5. Lorsque le compartiment est fermé, on peut injecter de l’eau à nouveau et observer que la fluorescence subsiste à l’intérieur du compartiment (D).
6. en rétablissant une température  $T = 45^\circ\text{C} > \text{LCST}$ , on lave l’intérieur du compartiment par l’eau et plus aucune fluorescence n’est visible (E).

Les différentes étapes ne durent que quelques minutes dans cette situation. Dans ces conditions, nous n’avons constaté aucune fuite dès lors que la structure en hydrogel était intègre dès le début de l’expérience.

On retrouve les mêmes informations en profilométrie par fluorescence. Afin de ne pas compliquer les mesures cependant, nous avons opté pour une cavité en NOA dont la hauteur dépasse de quatre fois l’épaisseur à sec de la structure d’hydrogel ; ainsi, la solution est toujours renouvelée même à l’intérieur du compartiment et le photo-blanchiment n’est plus à corriger — contrairement au cas de la vanne présenté plus tôt. La séquence est illustrée en figure 3.20.

On constate que l’hydrogel gonfle et s’effondre comme attendu autour de la LCST.



**Figure 3.20** – Reconstitution 3D par profilométrie par fluorescence d'un compartiment carré autour de la transition LCST.

### 3.3.2 Propriétés de perméabilité du p(NIPAM)

Les expériences précédentes ont été réalisées sur des temps courts. À cette échelle, il est impossible de dire s'il existe du transport à travers les parois du compartiment. Pourtant, cette donnée est importante pour la connaissance des propriétés des gels de p(NIPAM), mais aussi pour définir les fonctions que les compartiments peuvent remplir. En effet, selon les applications, on peut souhaiter ou non que le compartiment soit perméable à certaines molécules.

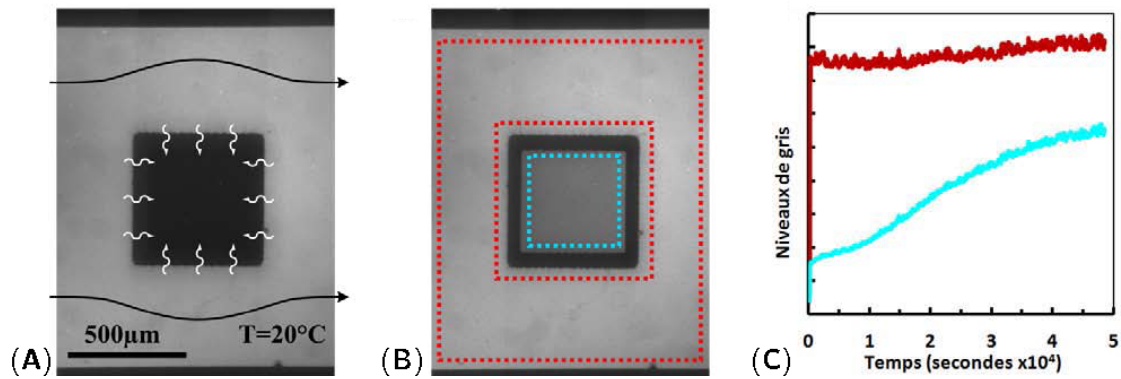
Intuitivement, si une molécule soluble dans l'eau est plus petite que les pores de la matrice d'hydrogel, il est possible qu'elle diffuse à travers le réseau, avec une diffusion toutefois gênée par ce dernier. Si l'on souhaite des compartiments totalement étanches, il faudra s'assurer que les dimensions latérales de leurs parois soient suffisamment grandes pour que durant l'expérience, aucun transport de l'extérieur vers l'intérieur du compartiment ne soit possible. Au contraire, dans d'autres applications où ce transport est souhaitable, il faudra adopter une géométrie adaptée et les parois du compartiments assureront une fonction de membrane semi-perméable.

À titre d'illustration, nous avons donc réalisé une expérience plus longue dédiée à l'étude de la perméabilité de l'hydrogel. Elle ne concerne que le cas de la fluorescéine (dans les conditions habituelles), molécule dont le rayon hydrodynamique est de l'ordre de  $5 \text{ \AA}$ , inférieur à la taille caractéristique des pores dans l'hydrogel dont on estime qu'elle correspond à la taille de 50 monomères de NIPAM, soit environ  $2,5 \text{ nm}$ .

L'expérience consiste à injecter la solution de fluorescéine dans une cavité microfluidique préalablement remplie d'eau pure et où on maintient fermé un compartiment carré de  $400 \mu\text{m}$  de côté et de largeur de bordure de  $50 \mu\text{m}$ . La hauteur de la cavité est choisie de sorte qu'elle soit inférieure à 4 fois l'épaisseur à sec de la structure de p(NIPAM). La solution de fluorescéine est ensuite injectée à pression constante durant toute l'expérience. Pendant près de 12 heures, on suit le niveau moyen de fluorescence à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment, comme illustré sur la figure 3.21.

L'analyse des données de l'expérience, détaillée dans la thèse de Benjamin Chollet [1], permet de connaître le temps  $\tau_{50}$  de la diffusion de la fluorescéine à travers la paroi de  $50 \mu\text{m}$  de largeur :  $\tau_{50} = 10^4 \text{ s} \sim 2,8 \text{ h}$ , et d'en déduire le coefficient de diffusion de la fluorescéine dans l'hydrogel. On obtient  $D_{\text{fluo/hydrogel}} \sim 2,5 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ , à comparer au coefficient de diffusion de la fluorescéine dans l'eau  $D_{\text{fluo/eau}} \sim 5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ .

Ainsi, on constate qu'une petite molécule comme la fluorescéine peut diffuser à travers les



**Figure 3.21** – Expérience de diffusion de la fluorescéine à travers les parois d'un compartiment hydrogel. (A) État initial de l'expérience. (B) Visualisation des deux zones de suivi de la fluorescence à un temps avancé de l'expérience : l'intensité de fluorescence a augmenté au sein du compartiment. (C) Courbes du suivi de la fluorescence sur toute la durée de l'expérience dans les deux zones d'intérêt. D'après [1].

parois en hydrogel. Cependant, la diffusion est très largement ralentie. L'estimation du coefficient de diffusion permet de dimensionner les compartiments de sorte qu'on profite ou non de la perméabilité de la paroi d'hydrogel.

Il faut bien noter que cette étude ne concerne que la fluorescéine et est à compléter pour d'autres molécules d'intérêt. Cependant, par des considérations d'encombrement stérique, on peut raisonnablement affirmer qu'à partir de 3 nm de rayon hydrodynamique, il est peu probable qu'une molécule puisse diffuser à travers les parois de cet hydrogel.

### 3.3.3 Intégration de compartiments à haute densité

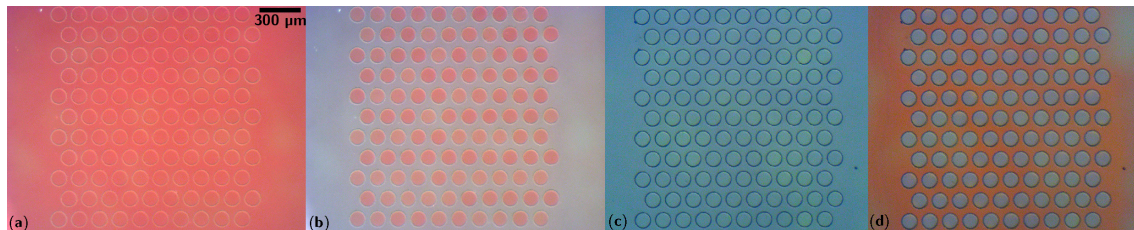
L'intérêt des compartiments est qu'ils peuvent être intégrés en très grand nombre au sein d'une cavité microfluidique. Sans autre dispositif de contrôle qu'un module Peltier, on peut contrôler plusieurs milliers de compartiments simultanément. Cela permet de pouvoir observer une grande statistique en un temps et un volume d'échantillon réduits.

Un premier exemple (figure 3.22) montre une séquence en couleur dans une puce contenant 1120 compartiments circulaires (la figure en montre 110) de 100 μm de diamètre intérieur avec une bordure d'hydrogel de 10 μm réalisée par lithographie laser, d'épaisseur à sec 2 μm. La cavité en NOA a pour dimensions 2,5 mm de largeur et 8 μm de hauteur.

La séquence est identique à celles évoquées précédemment, à savoir l'injection de la solution rouge à une température  $T = 45^\circ\text{C} > \text{LCST}$ . La température est ensuite abaissée à  $T = 20^\circ\text{C} < \text{LCST}$  et on injecte la solution bleue : les compartiments isolent la solution rouge, jusqu'à ce qu'on augmente de nouveau la température au-delà de la LCST. On répète l'opération en piégeant la solution bleue et injectant la solution rouge. Sur la dernière image figurent quelques pièges qui montrent la transition à l'ouverture des compartiments, où les couleurs se mélangent.

La densité de compartiments sur cette puce est de  $42/\text{mm}^2$ .





**Figure 3.22** – Séquence montrant 110 compartiments circulaires isolant des solutions colorées. (a) À  $T > LCST$ , la solution rouge est injectée. (b) À  $T < LCST$ , la solution rouge est piégée dans les compartiments, et lavée tout autour par la solution bleue. (c) À  $T > LCST$ , la solution bleue lave l'intérieur des compartiments. (d) À  $T < LCST$ , la solution bleue est piégée dans les compartiments, et lavée tout autour par la solution rouge. Des changements dans les réglages de saturation de la caméra expliquent les différences de couleur obtenues.

## 3.4 Applications dans le domaine des biotechnologies

Les actionneurs à base d'hydrogel sont destinés à intégrer des solutions de type LOC pour réaliser des analyses plus performantes en rapidité d'exécution, dans la réduction des volumes d'échantillons, et la densité d'analyses. Nous avons voulu montrer qu'ils peuvent avoir un impact dans le domaine des biotechnologies en l'illustrant par deux applications mettant en œuvre la compartimentation.

Cet intérêt pour les biotechnologies est motivé par le fait que ce secteur semble très porteur pour les applications de la microfluidique. Pourtant, d'après SACKMANN et coll. [5], son impact n'est pas assez fort. Ils insistent notamment sur le fait qu'une nouvelle technique microfluidique doit proposer de nouvelles fonctions utiles à la communauté biomédicale. C'est ce que nous avons voulu montrer ici, en proposant deux preuves de concept simples dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire.

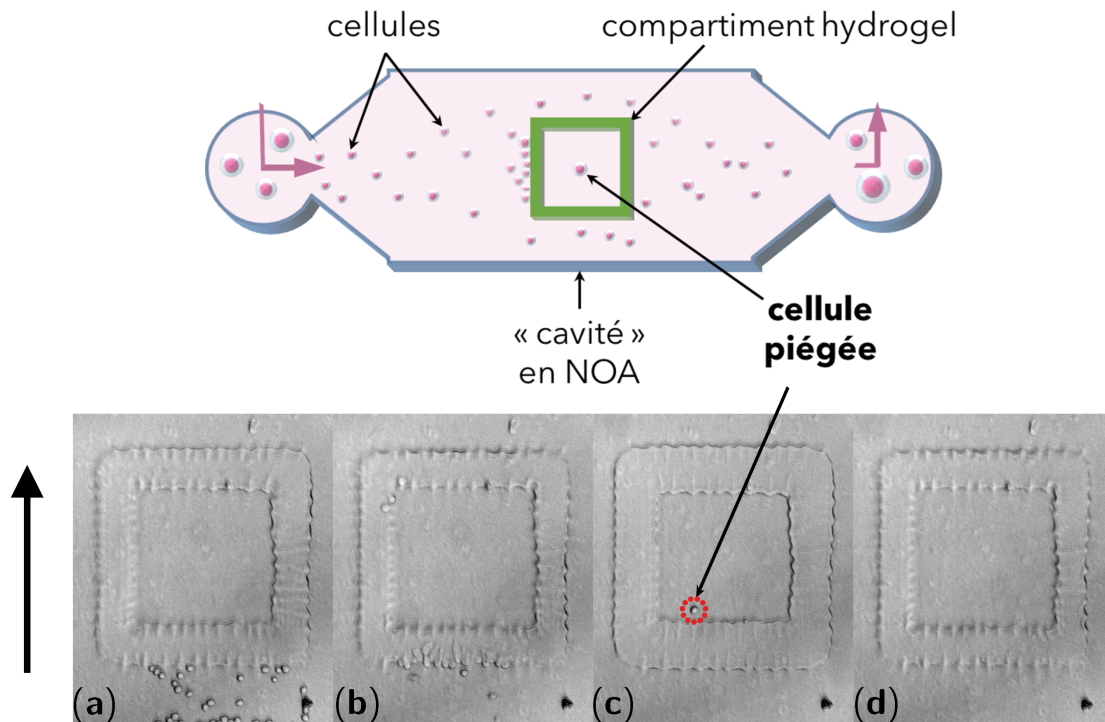
### 3.4.1 Piégeage de cellules uniques

En biologie cellulaire, les analyses peuvent être menées sur des groupes de cellules dont on fait l'hypothèse qu'étant de la même lignée, elles sont identiques. Cependant, en analysant des cellules de manière individuelles, on constate que leur expression peut être très variable de l'une à l'autre et que ces différences peuvent avoir une influence majeure sur leur phénotype et donc sur le comportement de l'ensemble des cellules d'un tissu [6].

Ainsi, en n'étudiant que globalement des ensembles de cellules, il peut être impossible de comprendre certains principes biologiques fondamentaux et il est donc important de proposer des solutions à même d'analyser les tissus à l'échelle de la cellule unique. Cela peut aussi permettre d'améliorer les techniques de détection de certaines pathologies lorsque ces dernières dépendent des particularités de quelques cellules et non du tissu entier.

Nous proposons donc de mettre à profit la compartimentation libre grâce aux hydrogels pour piéger des cellules uniques. Cette preuve de concept, réalisée avec le concours de Marie Leman de la société Microfactory, utilise une suspension de lymphocytes B du rat, cellules non-adhésives, en régime dilué dans leur milieu cellulaire. Leur taille moyenne est de  $8\ \mu\text{m}$  de diamètre sans cisaillement. Le matériel biologique a été fourni par l'équipe





**Figure 3.23** – En haut : schéma du dispositif de piégeage de cellules vu de dessus. En bas : la flèche noire représente le sens de l'écoulement de la suspension de cellules. (a) Amoncèlement de cellules contre la paroi d'un compartiment fermé ( $T > LCST$ ). (b) Les cellules se déforment pour franchir la bordure d'hydrogel. (c) Une cellule est piégée dans le compartiment ( $T < LCST$ ). (d) Une fois le compartiment ouvert, la cellule est libérée ( $T > LCST$ ).

Pôle Microfluidique (ENS) à l'Institut Pierre-Gilles de Genes.

La suspension de cellules est injectée dans une cavité microfluidique de  $10\ \mu\text{m}$  de hauteur comportant 8 compartiments carrés de  $300\ \mu\text{m}$  de côté, avec une bordure de  $50\ \mu\text{m}$ , et d'épaisseur à sec  $3,5\ \mu\text{m}$ . La méthode employée est perfectible, mais nous a permis d'isoler une cellule (voir figure 3.23) :

1. le système est rempli de milieu cellulaire à  $T = 45\ ^\circ\text{C} > LCST$  (compartiments ouverts).
2. on abaisse la température à  $T = 25\ ^\circ\text{C} < LCST$  : les compartiments se ferment, vides.
3. la suspension de cellules est injectée ; plusieurs cellules s'amassent sur la bordure du compartiment.
4. on augmente la température à  $T = 45\ ^\circ\text{C} > LCST$  : les cellules bloquées peuvent circuler à nouveau mais sont freinées par la bordure et doivent se déformer pour la franchir. La plupart d'entre elles s'échappent du compartiment très rapidement (moins de 100 ms). D'autres, probablement de plus grand diamètre, sont freinées par la deuxième bordure qu'elles rencontrent.
5. on abaisse à nouveau la température à  $T = 25\ ^\circ\text{C} < LCST$  pour fermer le compartiment ; pendant le gonflement de la cloison du compartiment, une cellule se retrouve piégée. Celles qui étaient en train de franchir la bordure en se déformant sont expulsées à nouveau du compartiment. En augmentant la pression d'injection, on peut progressivement laver la bordure de toute cellule.

Cette expérience, bien que sommaire, montre le potentiel de cette technologie pour isoler simplement des cellules de manière unique.

Il faut préciser néanmoins que cette expérience doit être poursuivie afin de montrer que les cellules peuvent être gardées en vie sur une longue durée. Cela implique de considérer à la fois la nécessité pour elles d'être conservées à une température adaptée (pas forcément compatible avec le comportement thermosensible de l'hydrogel), ainsi que la possibilité de faire parvenir des nutriments au sein des compartiments. Pour cela, on peut s'appuyer sur le fait démontré plus haut, selon lequel les barrières d'hydrogel étaient perméables à de petites molécules comme la fluorescéine. Ensuite, le p(NIPAM) est connu pour être biocompatible car il est déjà utilisé comme substrat pour la culture cellulaire [7]. Enfin, il serait possible d'alimenter les compartiments en nutriments en se servant d'une astuce géométrique : en ne fermant pas complètement le compartiment — c'est-à-dire en utilisant une cavité dont la hauteur est très légèrement supérieure à 4 fois l'épaisseur à sec de la bordure en p(NIPAM) —, un écoulement s'établit au dessus du compartiment sans que la cellule puisse s'en échapper, dans la mesure où la cellule n'est pas infiniment déformable.

### 3.4.2 Amplification isotherme d'ADN

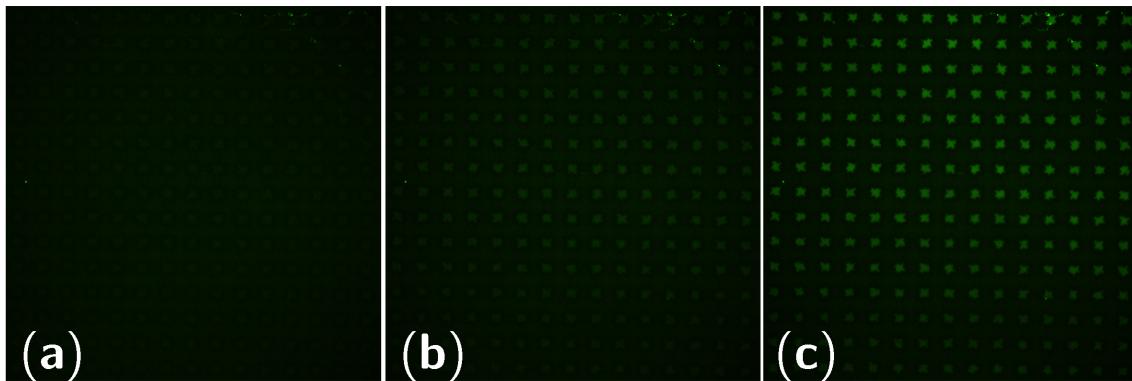
La deuxième application concerne la biologie moléculaire. Il est possible d'effectuer des tests de reconnaissance ciblée de gènes qui permettent de diagnostiquer des pathologies ainsi que des mutations génétiques. Dans la mesure où la quantité de gènes d'intérêt présent dans un échantillon est très faible, des techniques de réplication de l'ADN ont vu le jour pour améliorer la détection. La première d'entre elles est la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, amplification en chaîne par polymérase) ; plusieurs cycles thermiques sont imposés selon le schéma  $95\text{ °C} \rightarrow \sim 60\text{ °C} \rightarrow 72\text{ °C}$ , des températures toujours supérieures à la LCST du p(NIPAM), et auxquelles il est donc toujours effondré.

Cette incompatibilité a été levée par l'utilisation d'une autre technique dite isotherme. Nous avons utilisé une méthode d'amplification d'ADN appelée RCA (*Rolling Circle Amplification*, réplication circulaire de l'ADN) [8], habituellement appliquée à  $30\text{ °C}$ . Les expériences d'amplification d'ADN par RCA ont été menées par Marie Leman, et ont porté sur l'amplification du gène cible SYNJ1 humain (Human Synaptonjanin 1), impliqué dans la maladie de Parkinson [9]. Le protocole est détaillé en Annexe C.

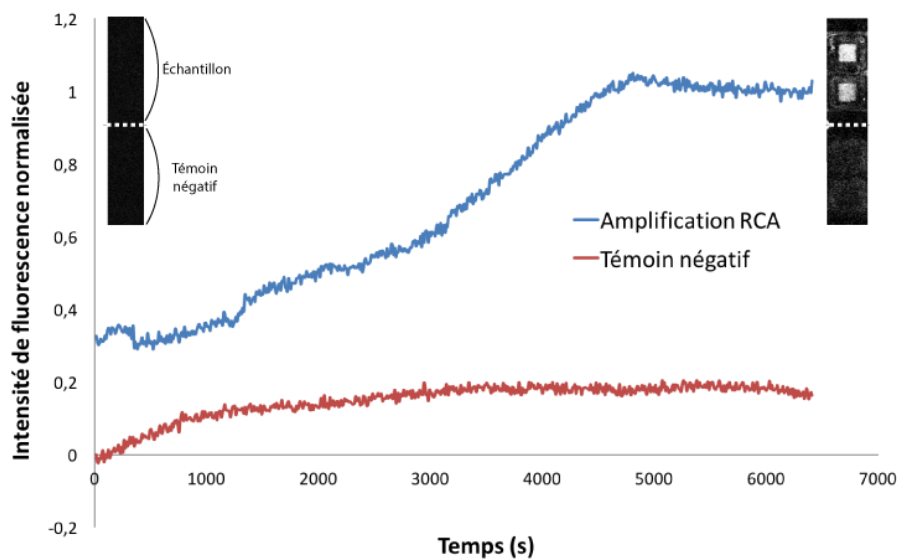
Dans notre cas, la réaction se déroule dans un système contenant 7740 compartiments contigus de  $50\text{ }\mu\text{m}$  de côté. La réaction est suivie de manière quantitative par fluorescence. Afin d'éviter le phénomène de photoblanchiment, les images sont acquises pendant l'ouverture d'un obturateur sur un temps d'exposition de l'ordre de 100 ms toutes les dix minutes. L'augmentation de fluorescence dans les compartiments correspond à l'augmentation de la quantité d'ADN par réplication RCA (figure 3.24).

Une autre expérimentation, menée sur une puce contenant moins de compartiments, a permis de suivre quantitativement l'évolution de la fluorescence, et ses résultats sont donnés sur la figure 3.25.

Ces deux expériences montrent que les compartiments adoptent le même comportement, à savoir une augmentation du signal avec le temps. Au bout d'une heure, l'augmentation



**Figure 3.24** – Suivi de l'intensité de fluorescence au sein de 225 compartiments hydrogels pendant une amplification isotherme d'ADN par RCA. (a) Après 1 heure, (b) 2 heures, (c) 3 heures. La puce entière contient quant à elle 7740 compartiments contigus de  $50\ \mu\text{m}$  de côté, pour une densité étendue à  $180/\text{mm}^2$ .



**Figure 3.25** – Résultat d'amplification isotherme d'ADN par RCA (en bleu), avec témoin négatif (en rouge). Les deux inserts sont des images en fluorescences de 4 compartiments répartis dans les canaux avec échantillon et le témoin négatif au début de l'expérience (à gauche) et au bout de 2 heures (à droite).

de fluorescence est claire (un facteur 3) et des vérifications usuelles par migration sur gel d'agarose montrent bien que le gène en question a été amplifié.

Cette application permet d'envisager l'utilisation de la technologie des actionneurs à base d'hydrogel, et plus particulièrement de la compartimentation libre d'une cavité microfluidique, dans la manipulation de matériel biologique et le diagnostic par amplification isotherme.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu comment mettre en œuvre des actionneurs à base d'hydrogel sous forme de film structuré dans des systèmes microfluidiques.

Dans un premier temps, nous avons montré que ces actionneurs sont adaptés à l'utilisation en tant que vanne dans des micro-canaux. En les intégrant par paire de micro-vannes entourées d'un canal de dérivation, il est possible d'isoler une partie de l'écoulement de manière efficace. Cela a cependant mis en avant des difficultés relatives à la fabrication : des matériaux durs doivent être utilisés, et la multiplication des structures rend l'assemblage moins robuste, avec l'apparition de fuites. Néanmoins, avec une géométrie et une densité adaptées, nous avons montré que le comportement d'une micro-vanne est durable (plusieurs heures d'activations successives) et robuste (bonne étanchéité de la vanne). Enfin, en ce qui concerne cette géométrie « vanne », nous avons montré la possibilité de localiser l'activation des actionneurs par un montage en « Y » intégrant des micro-résistances chauffantes. Ce dispositif, facilement pilotable, est très performant puisqu'il permet d'atteindre un temps de réponse de l'ordre de 300 ms, ce qui constitue un réel progrès par rapport à une activation globale.

Dans un second temps, nous avons exploré la possibilité d'utiliser le gel de p(NIPAM) dans une configuration nouvelle : la compartimentation libre. En effet, en structurant le dépôt de p(NIPAM) sous forme de contours fermés indépendants des parois latérales du micro-système, il est possible d'isoler des portions de fluide de manière plus simple. Cette disposition nous a permis d'étudier les propriétés de perméabilité de l'hydrogel avec la molécule de fluorescéine ; on obtient comme attendu une diffusion plus faible que dans l'eau, ce qui permet tout de même d'envisager le transport de petites molécules à travers une barrière d'hydrogel. Enfin, nous avons montré qu'il est possible, en utilisant les techniques de fabrication les plus efficaces et les mieux résolues comme la lithographie laser, d'intégrer plusieurs milliers de compartiments au sein d'une puce de taille usuelle.

Dans un dernier temps, nous avons brièvement abordé deux preuves de concept montrant l'intérêt de la compartimentation libre en microfluidique. La première montre qu'il est possible d'isoler une cellule dans un compartiment. L'idée sous-jacente, importante en biologie cellulaire, étant de pouvoir analyser des cellules uniques dans le but de mieux comprendre les mécanismes à l'échelle de la cellule et les conséquences d'un comportement singulier dans un tissu biologique. Le second, dans un esprit similaire et dans le cadre de la biologie moléculaire, démontre la possibilité de répliquer de l'ADN dans des compartiments par amplification isotherme RCA. L'amplification du matériel génétique étant au cœur des problématiques de diagnostic de pathologies infectieuses entre autres, la technologie des actionneurs à base d'hydrogel pourrait être un acteur de cet enjeu de société.

## Bibliographie du chapitre

- [1] Benjamin CHOLLET. « Hydrogels greffés stimulables comme actionneurs microfluidiques ». 2015PA066494. Thèse de doct. 2015.
- [2] Toyochi TANAKA et David J. FILLMORE. « Kinetics of swelling of gels ». In : *The Journal of Chemical Physics* 70.3 (1979), p. 1214–1218.
- [3] Andreas RICHTER et coll. « Review on hydrogel-based pH sensors and microsensors ». In : *Sensors* 8.1 (2008), p. 561–581.
- [4] Yoshinori TAMAI, Hideki TANAKA et Koichiro NAKANISHI. « Molecular dynamics study of polymer-water interaction in hydrogels. 2. Hydrogen-bond dynamics ». In : *Macromolecules* 29.21 (1996), p. 6761–6769.
- [5] Eric K. SACKMANN, Anna L. FULTON et David J. BEEBE. « The present and future role of microfluidics in biomedical research ». en. In : *Nature* 507.7491 (2014), p. 181–189.
- [6] Michael B ELOWITZ et coll. « Stochastic gene expression in a single cell ». In : *Science* 297.5584 (2002), p. 1183–1186.
- [7] Marta A COOPERSTEIN et Heather E CANAVAN. « Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and Poly (N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces ». In : *Biointerphases* 8.1 (2013), p. 19.
- [8] M Monsur ALI et coll. « Rolling circle amplification : a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine ». In : *Chemical Society Reviews* 43.10 (2014), p. 3324–3341.
- [9] Aline VERSTRAETEN, Jessie THEUNS et Christine VAN BROECKHOVEN. « Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era ». In : *Trends in Genetics* 31.3 (2015), p. 140–149.



Deuxième partie

Étude du glissement par  
nanovélocimétrie





---

## État de l'art et compléments à la publication

---

### Sommaire du chapitre

---

4.1	Le glissement hydrodynamique . . . . .	<b>86</b>
4.2	La méthode expérimentale utilisée : compléments . . . . .	<b>88</b>
4.2.1	Traitement de la source lumineuse . . . . .	88
4.2.2	Rendre la méthode quantitative . . . . .	89
4.3	La simulation de Langevin : compléments . . . . .	<b>89</b>
4.4	Conclusion . . . . .	<b>91</b>
	Bibliographie du chapitre . . . . .	<b>93</b>

---

Ce chapitre s'appuie sur un article joint au manuscrit, intitulé « Near-wall nanovelocimetry based on total internal reflection fluorescence with continuous tracking », et publié dans *Journal of Fluid Mechanics* en 2015 [1]. Le but du chapitre est de compléter cet article. Son volume se réduit à quelques pages, du fait que l'article comprend déjà un grand nombre de détails numériques et expérimentaux. Je soulignerai ici les aspects pour lesquels ma contribution a été la plus importante.

Le travail portant sur l'étude du glissement de fluides newtoniens, nous commencerons par rappeler succinctement l'état de l'art sur le sujet. Dans un deuxième temps, nous apporterons des compléments d'explications sur le dispositif expérimental de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (« Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy », TIRFM). Dans un troisième temps, nous préciserons le contexte et les hypothèses sous-jacentes aux simulations numériques utilisées dans l'étude. Enfin, nous conclurons sur les résultats et la technique employée.

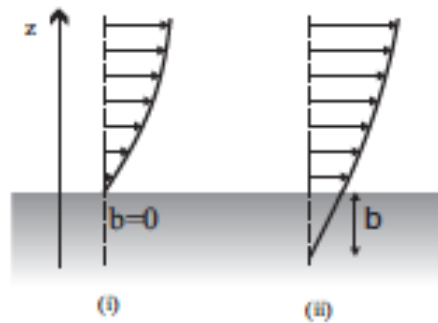
## 4.1 Le glissement hydrodynamique

Le glissement hydrodynamique se définit par la condition aux limites de Navier. Prenons un fluide newtonien circulant près d'une paroi ; la résolution de l'équation de Navier-Stokes qui régit le comportement de l'écoulement implique de fournir une condition limite sur la vitesse du fluide à l'interface liquide/solide. Cette condition peut s'écrire :

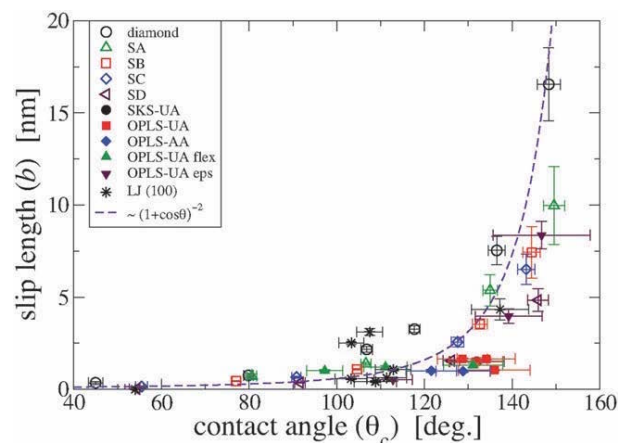
$$\vec{V} = b \frac{\partial \vec{V}}{\partial z} \quad (4.1)$$

où  $\vec{V}$  est la vitesse tangentielle du fluide à la paroi,  $z$  la coordonnée du repère normale à la paroi, et  $b$  la longueur de Navier, aussi appelée *longueur de glissement*. La longueur de glissement  $b$  peut être interprétée comme étant la distance à la paroi où l'extrapolation de la vitesse à l'intérieur du solide est nulle, comme représenté sur la figure 4.1.

L'hydrodynamique « standard », telle qu'enseignée dans les ouvrages, suppose souvent implicitement que  $b = 0$  : c'est la condition de non-glissement. Cette hypothèse, justifiée dans le cadre de la mécanique des milieux continus par Lamb, a été vérifiée dans un nombre considérable d'expériences, ce qui explique pourquoi l'enseignement traditionnel de l'hydrodynamique la considère comme établie, et affirme que les fluides, à la paroi, ont la même vitesse que celle-ci. Mais, dans les années 2000, un nombre croissant d'expériences et de simulations numériques portant sur des systèmes micro et nanoscopiques, appuyées par des arguments de physique statistique, ont montré que la longueur de glissement pouvait être micro ou sub-micrométrique, mais n'avait aucune raison, en général, d'être nulle.



**Figure 4.1** – Illustration de la longueur de glissement. (a) Cas de non-glissement,  $b = 0$ . (b) Cas avec glissement,  $b \neq 0$ .



**Figure 4.2** – En haut : résultats de simulations numériques de la longueur de glissement de l'eau sur différentes surfaces en fonction de la mouillabilité. En bas : compilation des résultats expérimentaux en 2010. D'après [2].

La détermination de cette longueur de glissement a été un défi numérique pendant la période 2000 - 2015. Numériquement, de nombreux travaux ont été effectués : BOCQUET ET CHARLAIX [2] ont fait l'inventaire des études numériques de simulations de dynamique moléculaire. Les résultats de l'un d'entre eux par HUANG et coll. [3] sont reportés sur le graphique de la figure 4.2

Par ailleurs, à l'époque où l'expérience a été entreprise, la situation expérimentale était confuse. Cet aspect est bien décrit dans l'introduction de l'article. Les mesures d'E. Charlaix, obtenues par microscopie à force atomique (AFM) [4], étaient les plus fiables, mais elles étaient globales. Compte tenu des difficultés pour obtenir des données expérimentales locales précises, dues à la présence de nombreux artefacts à analyser [5–8], il nous avait semblé nécessaire de compléter ce travail par des mesures locales, basées sur une méthode entièrement différente : la nano-vélocimétrie. Cela a motivé la mise en oeuvre de l'expérience décrite dans l'article joint. Elle aura permis de produire des estimations précises locales, débarrassés des artefacts ou limitations que nos prédécesseurs avaient soulignées mais n'avaient pas entièrement maîtrisées.

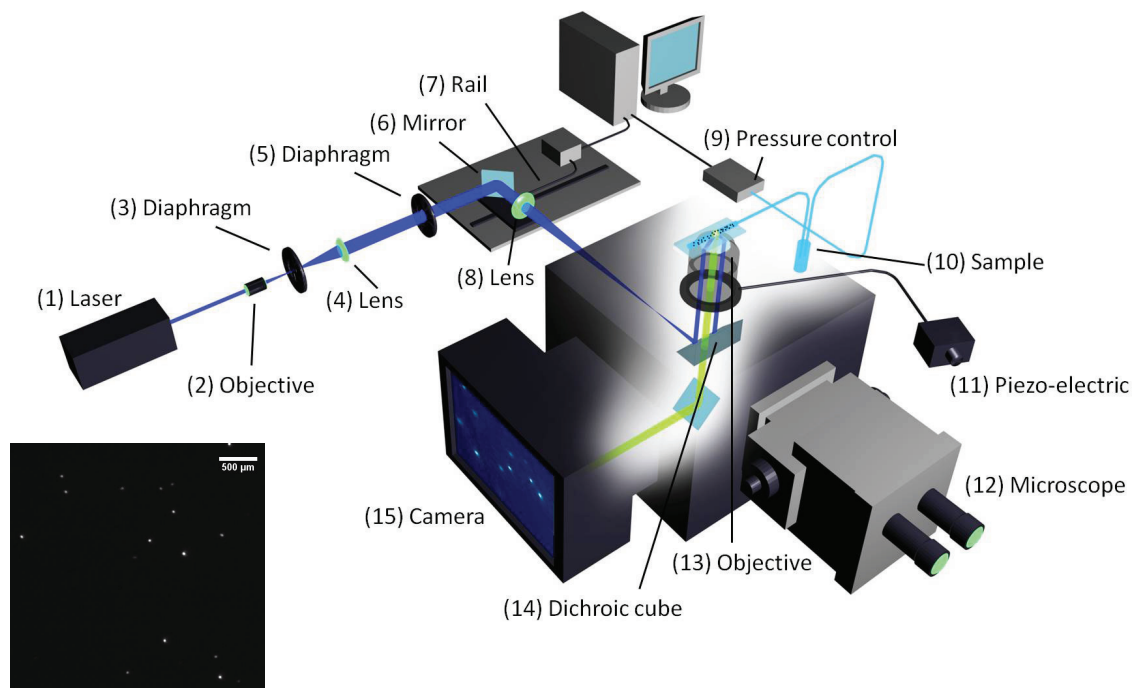


Figure 4.3 – Schéma du dispositif expérimental tel que décrit dans l'article au chapitre 5.

## 4.2 La méthode expérimentale utilisée : compléments

La méthode est bien décrite dans les pages 100 à 104 de ce manuscrit. Ici, je voudrais mettre en avant quelques points importants, après avoir décrit brièvement le dispositif.

### 4.2.1 Traitement de la source lumineuse

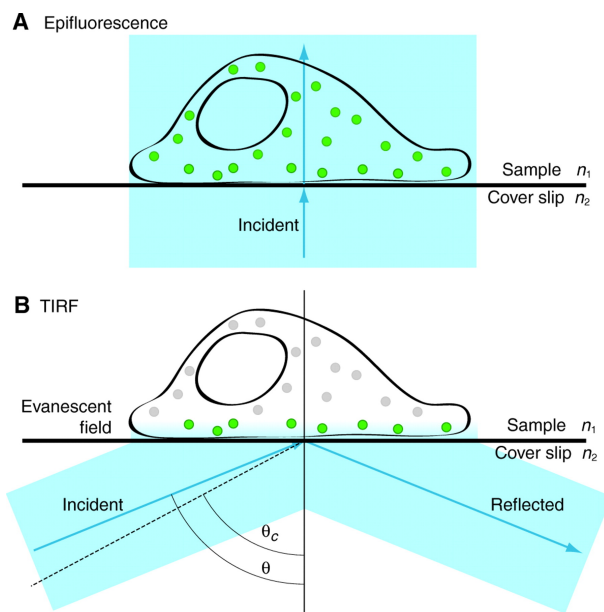
Afin de faciliter la lecture, on reprend ici le schéma du dispositif expérimental de l'article.

La source de lumière est un laser (1) dont le faisceau est mis en forme par différents éléments optiques. D'abord, un filtre spatial permet d'en réduire la divergence (éléments 2 à 5). Cela permet d'obtenir un faisceau bien parallèle, condition importante dans ce montage pour l'obtention d'images de qualité.

Ensuite, le faisceau peut être « déplacé » par la lentille (8) montée sur un rail motorisé. La position de cette lentille est déterminante : elle va *in fine* modifier l'incidence du faisceau sur l'échantillon, de sorte qu'on peut l'observer soit en épifluorescence, soit en réflexion totale interne (position dite « TIRF »). Ces deux modes d'illumination sont décrits sur la figure 4.4.

Désormais, nous considérerons toujours que le dispositif est en mode TIRF : une onde évanescente excite les fluorochromes sur seulement une fine épaisseur de l'échantillon, déterminée en fonction de l'incidence du faisceau. La méthode de calcul et les valeurs usuelles de l'angle d'incidence et de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sont décrites aux pages 101-102.

Par ailleurs, la position verticale de l'objectif (13) est elle aussi réglable avec une précision de 100 nm grâce à un module piézo-électrique (11). Cela permet d'ajuster finement la



**Figure 4.4** – Schéma comparant les deux modes d'illumination d'un échantillon (ici une cellule). (a) En épifluorescence, toute l'épaisseur de l'échantillon est éclairé. (b) En TIRF, seule une couche superficielle de l'échantillon est éclairée par une onde évanescente. D'après [9].

focalisation de l'image à l'interface solide/liquide.

Enfin, le signal émis par les fluorochromes dans l'échantillon est transmis à un détecteur sCMOS (15) décrit en détail dans l'article.

### 4.2.2 Rendre la méthode quantitative

Le point important de cette méthode est qu'elle est rendue quantitative en mesurant l'angle d'incidence du faisceau sur l'échantillon pour en déduire la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Pour ce faire, nous avons utilisé une demi-sphère en verre disposée à la place de l'échantillon : elle permet de projeter la déviation du faisceau par l'objectif sur une table de mesure à une distance  $D$  connue du centre de l'objectif. Ainsi, en mesurant la hauteur  $H$ , on peut déduire l'angle d'incidence  $\theta_i = \arctan \frac{H}{D}$ , comme représenté sur le schéma 4.5 :

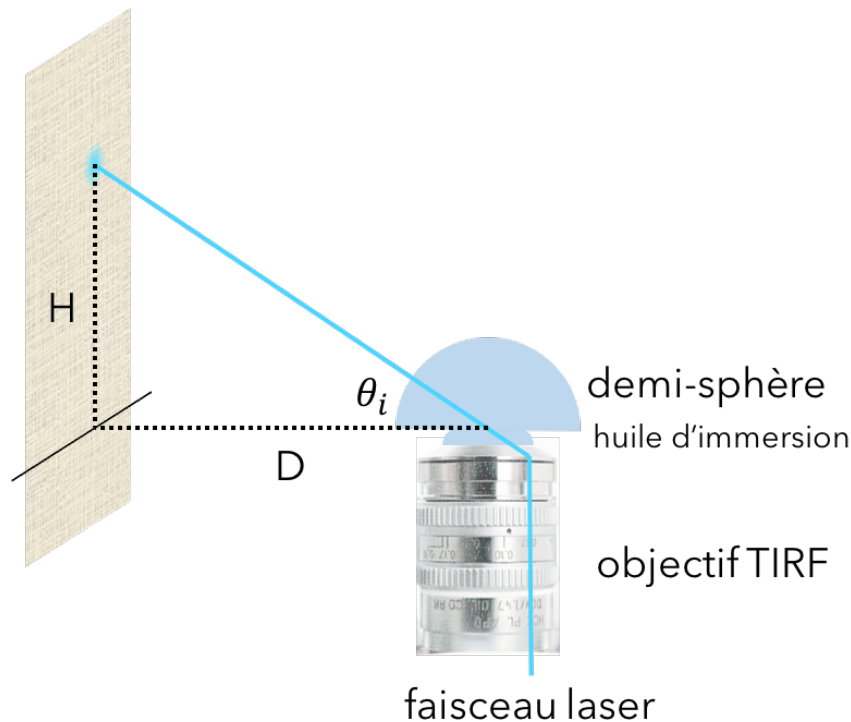
De plus, cette méthode impliquant de grandes distances (plusieurs dizaines de centimètres) réduit l'erreur sur la détermination de l'angle  $\theta_i$ . La profondeur de pénétration  $p$  est déduite par l'équation 4.2 :

$$p = \frac{\lambda}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2)^{-1/2} \quad (4.2)$$

## 4.3 La simulation de Langevin : compléments

La méthode est décrite dans les pages 105 à 108 du manuscrit.

Ici, nous aborderons un point relatif à la stationnarité des simulations. En effet, c'est un point que nous n'avons pas détaillé dans l'article et qui pose question.



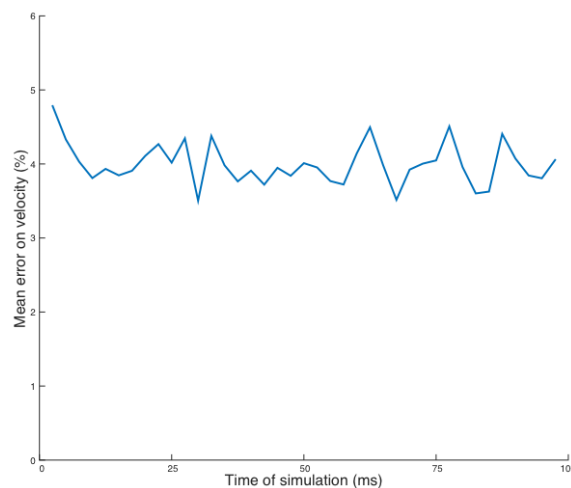
**Figure 4.5** – Schéma illustrant la mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser pour rendre les mesures quantitatives.

Les simulations sont menées de sorte que l'on suive le mouvement de toutes les particules sur un total de deux pas de temps d'exposition de la caméra, à savoir deux fois  $\tau = 2,5$  ms, comme cela est fait dans l'expérience en comparant deux images successives de la caméra. Mais, à la différence de l'expérience, au bout de  $2\tau$ , la situation est-elle « stationnaire » dans la simulation ? Il faut entendre par là non pas qu'il n'existe pas de dynamique du mouvement des particules, mais plutôt que les paramètres initiaux de positionnement font que le mouvement des particules simulées nécessite peut-être un certain temps à se stabiliser.

Nous avons donc étudié l'influence du nombre d'itérations de la simulation sur l'erreur moyenne calculée sur le profil des vitesses. Pour cela, nous avons simplement « prolongé » le temps de simulation en ajoutant des boucles de calcul, et calculé l'erreur moyenne sur le profil des vitesses. Cela permet de comparer les différents temps de simulation entre eux, et le résultat est donné par le graphique de la figure 4.6 :

Ce graphique montre que l'établissement d'un régime « stationnaire » est en fait rapide, et que les itérations successives n'améliorent pas nécessairement la précision de la simulation : l'erreur moyenne oscille toujours autour de 4%, mais est maximum avec une seule itération de 2,5 ms à presque 5%.

Afin de limiter le temps de calcul (qui peut atteindre plusieurs heures pour une vingtaine d'itérations), nous avons donc choisi de ne garder que deux itérations, soit un temps de simulation de 5 ms, qui représente un temps de calcul d'environ 15 minutes.



**Figure 4.6** – Graphique montrant l'évolution de l'erreur moyenne sur le profil des vitesses en fonction du nombre d'itérations de la simulation (soit le « temps de simulation »).

## 4.4 Conclusion

Nous avons apporté des évolutions à la méthode de nanovélocimétrie par microscopie de fluorescence par réflexion totale interne, tout en confirmant l'ensemble des données expérimentales existantes sur le sujet. Les résultats pour l'eau, à savoir  $9 \pm 10$  nm sur surface hydrophile et  $55 \pm 9$  nm sur surface hydrophobe, sont en effet en accord avec les mesures réalisées jusqu'alors. L'intérêt supplémentaire ici est que la méthode est rendue plus précise par la prise en compte des artéfacts expérimentaux dans des simulations numériques : elles permettent de discerner clairement les différences de glissement sur les surfaces hydrophile et hydrophobe.

Pour autant, il subsiste un écart important entre les simulations numériques de dynamique moléculaire et l'expérience. Les hypothèses souvent avancées (nano-bulles, impuretés aux parois, etc.) ne suffisent pas aujourd'hui à apporter une réponse satisfaisante justifiant cet écart.





## Bibliographie du chapitre

- [1] Zhenzhen LI et coll. « Near-wall nanovelocimetry based on total internal reflection fluorescence with continuous tracking ». In : *Journal of Fluid Mechanics* 766 (2015), p. 147–171.
- [2] « Nanofluidics, from bulk to interfaces. » In : *Chemical Society reviews* 39.3 (2010), p. 1073–95.
- [3] David M HUANG et coll. « Water slippage versus contact angle : a quasiuniversal relationship ». In : *Physical review letters* 101.22 (2008), p. 226101.
- [4] J. BAUDRY et coll. « Experimental Evidence for a Large Slip Effect at a Nonwetting Fluid?Solid Interface ». In : *Langmuir* 17.17 (2001), p. 5232–5236.
- [5] Reza SADR, Haifeng LI et Minami YODA. « Impact of hindered Brownian diffusion on the accuracy of particle-image velocimetry using evanescent-wave illumination ». In : *Experiments in Fluids* 38.1 (2004), p. 90–98.
- [6] C. COTTIN-BIZONNE et coll. « Boundary Slip on Smooth Hydrophobic Surfaces : Intrinsic Effects and Possible Artifacts ». In : *Physical Review Letters* 94.5 (2005), p. 056102.
- [7] Peter HUANG, Jeffrey S. GUASTO et Kenneth S. BREUER. « The effects of hindered mobility and depletion of particles in near-wall shear flows and the implications for nanovelocimetry ». In : *Journal of Fluid Mechanics* 637 (2009), p. 241–241.
- [8] Wei WANG, Jeffrey S. GUASTO et Peter HUANG. « Measurement bias in evanescent wave nano-velocimetry due to tracer size variations ». In : *Experiments in Fluids* 51.6 (2011), p. 1685–1694.
- [9] Alexa L MATTHEYSES, Sanford M SIMON et Joshua Z RAPPOPORT. « Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist ». In : *J Cell Sci* 123.21 (2010), p. 3621–3628.



## CHAPITRE 5

---

Article dans *Journal of Fluid Mechanics*

---



# Near-wall nanovelocimetry based on total internal reflection fluorescence with continuous tracking

Zhenzhen Li<sup>1</sup>, Loïc D'èramo<sup>1,†</sup>, Choongyeop Lee<sup>1</sup>, Fabrice Monti<sup>1</sup>,  
Marc Yonger<sup>1</sup>, Patrick Tabeling<sup>1</sup>, Benjamin Chollet<sup>2</sup>,  
Bruno Bresson<sup>2</sup> and Yvette Tran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MMN, CNRS, ESPCI Paris-Tech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>2</sup>PPMD-SIMM, CNRS, ESPCI Paris-Tech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

(Received 28 April 2014; revised 24 October 2014; accepted 6 January 2015;  
first published online 2 February 2015)

The goal of this work is to make progress in the domain of near-wall velocimetry. The technique we use is based on the tracking of nanoparticles in an evanescent field, close to a wall, a technique called TIRF (total internal reflection fluorescence)-based velocimetry. The particles are filmed continuously, with no time gap between two frames, so that no information on their trajectories is lost. A number of biases affect the measurements: Brownian motion, heterogeneities induced by the walls, statistical biases, photobleaching, polydispersivity and limited depth of field. Their impacts are quantified by carrying out Langevin stochastic simulations, in a way similar to Guasto & Breuer (*Exp. Fluids*, vol. 47, 2009, pp. 1059–1066). By using parameters calibrated separately or known, we obtain satisfactory agreement between experiments and simulations, concerning the intensity density distributions, velocity fluctuation distributions and the slopes of the linear velocity profiles. Slip lengths measurements, taken as benchmarks for analysing the performances of the technique, are carried out by extrapolating the corrected velocity profiles down to the origin along with determining the wall position with an unprecedented accuracy. For hydrophilic surfaces, we obtain  $1 \pm 5$  nm for the slip length in sucrose solutions and  $9 \pm 10$  nm in water, and for hydrophobic surfaces,  $32 \pm 5$  nm for sucrose solutions and  $55 \pm 9$  nm for water. The errors (based on 95% confidence intervals) are significantly smaller than the state of the art, but more importantly, the method demonstrates for the first time a capacity to measure slippage with a satisfactory accuracy, while providing a local information on the flow structure with a nanometric spatial precision and velocity errors of a few per cent. Our study confirms the discrepancy already pointed out in the literature between numerical and experimental slip length estimates. With the progress conveyed by the present work, TIRF-based technique with continuous tracking can be considered as a quantitative method for investigating flow properties close to walls, providing both global and local information on the flow.

**Key words:** micro-/nano-fluid dynamics, non-Newtonian flows, particle/fluid flows

---

† Email address for correspondence: [loic.deramo@espci.fr](mailto:loic.deramo@espci.fr)

## 1. Introduction

Velocimetry techniques based on total internal reflection fluorescence (TIRF) have enlightened our understanding of the behaviour of Newtonian flows and particles near boundaries. The method was pioneered by Yoda (Zettner & Yoda 2003; Sadr *et al.* 2004; Sadr, Li & Yoda 2005; Li, Sadr & Yoda 2006; Sadr *et al.* 2007; Li & Yoda 2008, 2010) and Breuer (Jin *et al.* 2004; Guasto, Huang & Breuer 2006; Huang, Guasto & Breuer 2006; Huang & Breuer 2007; Guasto & Breuer 2009; Huang, Guasto & Breuer 2009), and further developed or used by several authors (Bouzigues, Tabeling & Bocquet 2008; Kazoe *et al.* 2013). It consists of seeding the fluid with fluorescent nanoparticles and operate in an evanescent field near a wall/liquid interface. In such conditions, the fluorescent particles emit a light whose intensity is expected to decrease exponentially with their altitudes (i.e. their distances to the wall) and it becomes envisageable, by translating intensities into distances, to determine the location of each of them with respect to the wall without being subjected to diffraction limit. With the cameras available today on the market, the theoretical spatial precision on the determination of the altitudes obtained with this technique is subnanometric, but in practice, for a number of reasons that will be explained later, the best altitude accuracy reported thus far in the literature is 30 nm (Li & Yoda 2010). Still this represents an improvement by more than one order of magnitude in comparison with well-resolved techniques such as  $\mu$ PIV (micro particle image velocimetry) (Santiago *et al.* 1998; Meinhart, Wereley & Santiago 1999; Tretheway & Meinhart 2002; Joseph & Tabeling 2005; Zheng, Kong & Silber-Li 2013).

Measuring velocity, diffusion constant, speed distributions, etc. at various locations determined with a nanometric accuracy would be a breakthrough for flow instrumentation. It would open the possibility to analyse nanoflows in a great variety of contexts (Mijatovic, Eijkel & van den Berg 2005; Hu & Li 2007; Sparreboom, van den Berg & Eijkel 2009). Examples concern lubricating films in concentrated emulsions and foams (Kimura & Okada 1989; Schmid & Wilson 1995; Briceño & Joseph 2003), depleted layers in polymer solutions (De Gennes 1981; Vincent 1990), grain dynamics in microgel concentrated suspensions (Meeker, Bonnecaze & Cloitre 2004; Sessoms *et al.* 2009), Debye layers (Bouzigues *et al.* 2008), grafted brush structure (de Gennes 1980; Murat & Grest 1989) and polymer melt near-wall behaviour (Brochard & De Gennes 1992; Brazhnik, Freed & Tang 1994, etc.). TIRF-based velocimetry has thereby the potential to open new interesting avenues in fluid dynamics research.

Nonetheless, TIRF-based velocimetry suffers from a number of limitations and artefacts that have been analysed by a number of investigators (Choi, Westin & Breuer 2003; Sadr *et al.* 2005, 2007; Huang *et al.* 2006; Huang & Breuer 2007; Li & Yoda 2010). The main problems are as follows.

- (i) Brownian wandering. Nanoparticles are subjected to Brownian motion while the exposure times, or the delay times between two successive captures are limited by the performances of the camera. During the exposure time  $\tau$  (typically, 1 or 2 ms) particles explore a region equal  $\sqrt{2D\tau}$ , in which  $D$  is the diffusion coefficient of the particle in the fluid. Using an Einstein estimate of the diffusion constant, one finds that there is an optimal scale  $l_{opt}$ , defined by

$$l_{opt} = \left( \frac{kT\tau}{3\pi\mu} \right)^{1/3} \quad (1.1)$$

for which particle radius equals to Brownian standard-type deviation (here,  $k$  is the Boltzmann constant,  $T$  the absolute temperature and  $\mu$  the fluid viscosity). Particles much smaller than  $l_{opt}$  develop large Brownian excursions and therefore probe large volumes. Particles larger than  $l_{opt}$  also degrade the resolution because of their size. Therefore, expression (1.1) provides a reference scale for establishing the spatial resolution that TIRF-based velocimetry can achieve. It turns out that the best precision on the particle altitude measurement achieved today (30 nm) coincides, in terms of order of magnitude, with  $l_{opt}$ . In the future, progress on the spatial resolution of TIRF-based velocimetry will obviously be facilitated by progress in camera technology, but today the possibility of improving the situation with the existing cameras is worth being considered.

- (ii) Biases induced by the heterogeneities of the spatial distribution of the particles. The distribution of particles is not homogeneous in space, which generates difficulties in the establishment of the relationship between the particle trajectories and the fluid speed. In aqueous solutions, and in typical situations, the colloidal particles seeding the flow are negatively charged and the wall develops negative surface charges. A Debye layer builds up, repelling the colloids and thus depleting the near wall region in particles (Oberholzer, Wagner & Lenhoff 1997). Dielectrophoretic effects, pointed out recently by Yoda (Cevheri & Yoda 2014) may also contribute to shape the heterogeneity field. Other sources of inhomogeneities in the spatial distributions of the particles are diffusion gradients, inducing a drift oriented away from the wall, and closer to the walls, short-range forces (Koch 1989). Since all measurements involve spatial averaging, either for statistical reasons or because of Brownian wandering, the interpretation of the averages obtained with such heterogeneities is delicate (particles spatial distributions weight the functions that are spatially averaged). In the present state of the art, Yoda (Li *et al.* 2006; Li & Yoda 2010) partitioned the space into three regions, assuming homogeneity in each of them. The velocity profiles obtained with this approach, being composed, for reasons linked to Brownian motion, of only three points in the 200–500 nm range (Li & Yoda 2010), are modestly resolved. One question is whether it is possible to improve the situation, for instance by reducing the size of the intervals over which averages are determined, while ensuring acceptable statistical convergence and controlling or reducing statistical biases.
- (iii) Polydispersity of the particle characteristics. The particles currently used in the TIRF velocimetry experiments have polydispersivities in size, quantum efficiency and numbers of incorporated fluorophores. Since the determination of the position relies on intensity measurements, this variability impacts the accuracy at which the particles can be localized. In practice, using 100–200 nm fluorescent particles, for which polydispersivity lies between 5% and 10% is acceptable, while using 20 nm, with polydispersivities between 20% and 30% is problematic.
- (iv) Position of the wall. Determining the wall location accurately is critical, since errors made at this level impact directly the accuracy of the slip length determination. Determining the wall location necessitates separate measurements that must be made *in situ*, in order to keep the flow geometry and the instrumentation environment unchanged. One of the techniques consists in enhancing adsorption by adding salt (and then suppressing electrical screening), and measuring the intensity distribution of the particles adsorbed onto the wall (Li & Yoda 2010). In the present state of the art, these measurements are subjected to significant uncertainties, due, mostly, to an inaccurate analysis of the bleaching process.



- (v) Relating particle speeds to flow speeds. Even though the particle positions and speeds were accurately determined, the information would be not sufficient for determining the flow. Close to a wall, owing to various phenomena well documented in the literature (hindered diffusion, slowing down, etc.) the particle speed is not equal to the flow speed. Models must therefore be developed to convert particle speed data into flow speed data.

Today, TIRF velocimetry has enlightened our understanding of the behaviour of Newtonian fluids close to a wall by establishing the structure of the velocity profiles and investigating how particles are transported. However, the biases and artefacts discussed above severely affect its capability to discuss slippage phenomena. The quantity characterizing slippage is the slip length, i.e. for TIRF-based velocimetry, the length obtained by extrapolating the velocity profiles down to zero (thus, the 'extrapolated slip length'). Slip length measurements have attracted the interest of a community for more than one decade and it is now well documented for the case of Newtonian fluids (Bocquet & Barrat 2007; Bocquet & Charlaix 2010). Slip lengths can be taken to benchmark different techniques. At the moment, the best accuracy (based on standard-type deviation) obtained on the slip length measurements by TIRF is  $\pm 30$  nm (Huang *et al.* 2006; Li & Yoda 2010). This limited accuracy ranks TIRF velocimetry well below surface force apparatus (SFA) (SFA; Cottin-Bizonne *et al.* 2005), which currently achieves  $\pm 2$  nm, and other methods, such as pressure drop measurements (Choi *et al.* 2003) which achieves  $\pm 5$  nm, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) which has 5 nm of accuracy (Joly, Ybert & Bocquet 2006), and double-focus fluorescence cross-correlation, which attains of 10 nm accuracy (Vinogradova *et al.* 2009). Worse, the actual TIRF-based slippage measurements do not allow to distinguish between hydrophilic and hydrophobic surfaces (Li & Yoda 2010); in another work (Huang *et al.* 2006) slip lengths lying between 26 and 57 nm are found for hydrophilic surfaces, which disagrees with the generally accepted view that there is no slip on such surfaces. By failing to demonstrate a capacity to measure slip lengths with a satisfactory accuracy, one must admit that, at variance with most velocimetry techniques, TIRF-based nanovelocimetry cannot be envisioned yet as a quantitative tool for exploring flows in near-wall regions.

The objective here is to make progress on TIRF-based nanovelocimetry. By using a new methodology, based on continuous tracking of the particles, along with improving the precision of some determinations, we succeeded to significantly improve the performances of TIRF-based nanovelocimetry in terms of measurement accuracy. In a nutshell, coupled to the accurate determination of the wall position, along with Langevin simulations for estimating the systematic biases, we reached a  $\pm 5$  nm on the slip length measurements in sucrose solutions and a  $\pm 10$  nm in water (based on 95 % confidence intervals). This represents a substantial improvement compared with the state of the art (Li & Yoda 2010). With these improvements, we demonstrate that TIRF-based velocimetry is an outstanding quantitative tool for exploring accurately flow behaviours in the first hundreds of nanometres near a wall, and slippage of flow on solid surfaces.

## 2. Description of the experimental set-up

The illumination system is sketched in figure 1. A laser beam (1) is initiated from a Sapphire laser (Coherent Sapphire 488-50) of wavelength 488 nm at output power 350 mW. This paralleled beam goes through an objective with  $\times 10$  magnification (2) to be focused on the focal plane. A diaphragm (3) is placed on the same focal plane with 10  $\mu\text{m}$  of diameter to let pass only the focused light. A lens (4) with

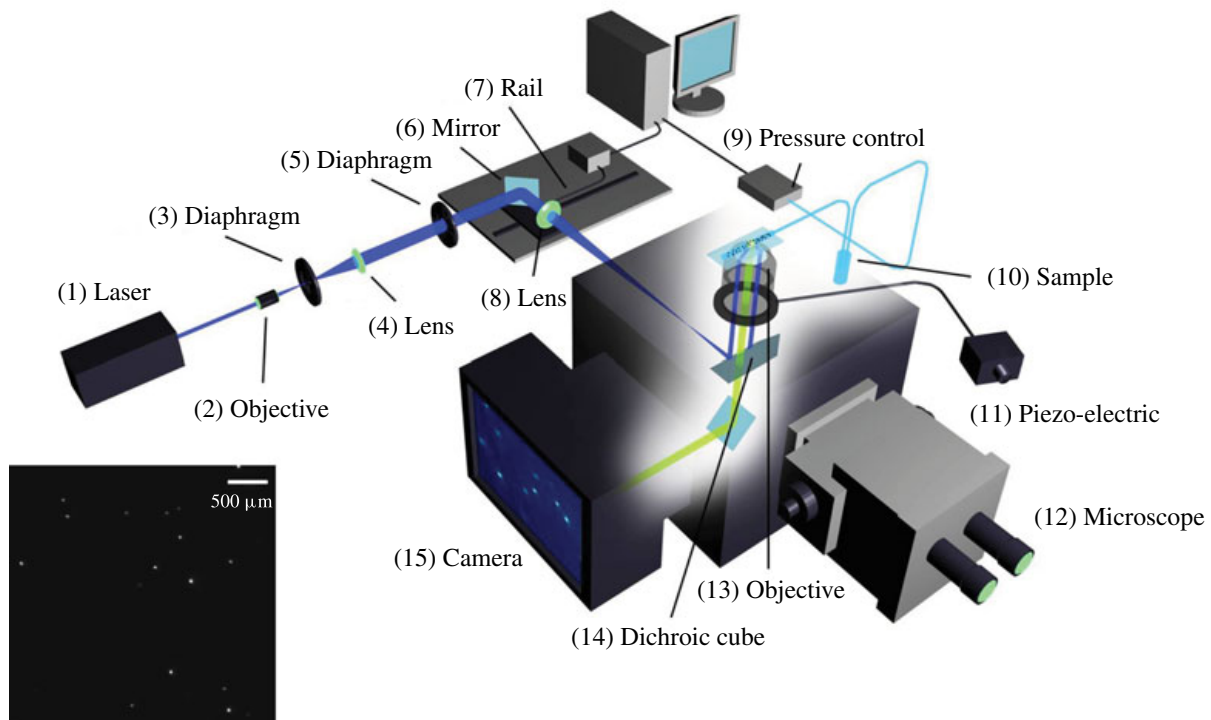


FIGURE 1. Scheme of the TIRF set-up. A laser beam is collimated through a high numerical aperture objective ( $\times 100$ ,  $NA = 1.46$ ) with an incidence angle higher than the critical angle for total reflection. Laser is focused in the back focal plane of the objective with an achromatic doublet (focal length = 200 mm) and the incidence angle is tunable by displacing a mirror in the optical path. The evanescent wave created within the channel restricts fluorescence to tracers (dots over the glass slide) in the vicinity of the surface, which is collected by the high-speed camera. The image on the left bottom corner is a typical acquisition.

focal length 150 mm is placed behind the orifice, with its focal plane superposed with that of the  $\times 10$  objective. The beam comes out from this lens being parallelled again but with an enlarged diameter at 2 cm. The implementation of (2), (3) and (4) is for producing a perfectly parallelled laser beam with enlarged diameter, and eliminating lights due to unparallelled incidence and diffraction. The parallelled beam goes through a diaphragm (5), which is fixed on the table during the first step of alignment of the laser and serves as a reference point of the beam. The component (6) is a mirror which reflects the beam at  $90^\circ$  and incident onto a lens (8) to be focused on its focal plane; this focal plane is shared by the lens (8) and the objective of the microscope. There is a dichroic filter cube (510 nm) situated between the lens (8) and the objective, in order to reflect the incident laser beam up to the objective. The components (6) and (8) are fixed on a rail in order to be moved together horizontally without relative displacement, the rail is regulated by a homemade Labview program. The fact of moving components (6) and (8) horizontally does not impede the laser beam to be focused on the focal plane of the objective, but results in a displacement of focusing point away from the optical line of the objective, which induces an angle of incidence different from  $90^\circ$  relatively to the microchannel.

The advantage of using an objective for TIRF measurement relies in the convenience of sending incident light at a supercritical angle without a prism, and retrieving fluorescence information at the same time (see Selvin & Ha 2008). The objective has

magnification  $\times 100$  and a high numerical aperture at 1.46. The numerical aperture is expressed by the following equation:

$$\text{NA} = n_i \sin(\Theta) \quad (2.1)$$

where  $n_i$  is the refractive index of the working medium of the objective, i.e. immersion oil ( $n_i = 1.518$ ).  $\Theta$  is the half-angle of the maximum light cone ( $\theta = 74.1^\circ$ ). The total reflection critical angle at the interface of water and glass slide (refractive index  $n = 1.52$  from Menzel-Gläser) is approximately  $61.4^\circ$  with the refractive index of water at 1.3327; and for the interface of sucrose solution at 40 wt% and glass slide it is  $67.1^\circ$  with the refractive index of sucrose solution at 1.3981. The incidence angle is measured by a glass hemisphere, which projects the light spot onto millimetre paper. This angle  $\theta$  is

$$\theta = \arctan(H/L) \quad (2.2)$$

where  $L$  is the horizontal distance between the objective and the millimetre paper board. The light spot height  $H$  is measured with a 1 mm precision, which corresponds to an error of 1 nm on the penetration length, i.e. less than 1% error on its determination.

Another advantage of using objective with large numerical aperture and oil immersion consists in the increasing number of orders of diffraction collected by the lens, which reduces the size of the Airy diffraction disk and increases the precision at which particle positions are measured.

The expression of the evanescent field we apply reads, within the liquid,

$$I = I_0 \exp(-z/p) \quad (2.3)$$

in which  $z$  is the distance from the glass/liquid interface (i.e. the channel wall),  $p$  is the field depth of penetration usually around 135 nm and  $I_0$  is the intensity of the evanescent field at  $z = 0$ . We use an Andor Neo sCMOS camera for the acquisition of data. It has several advantages. First, it is able to work with a good sensitivity at 16 bit, which means 65 536 grey levels accessible, and so allows the distinction of two slightly different intensities. Second, by using the rolling shutter mode, we can benefit from this lower noise and acquire data at high frame rate (400 f.p.s.), as 512 pixels  $\times$  512 pixels pictures are taken during the experiments, with a 2.5 ms exposure time. Operated in overlay mode, there is no time gap between two successive exposures, so that no information is lost. (The rolling shutter mode works in a way that adjacent rows of pixels are exposed at slightly different moment. This time delay is 9.24  $\mu$ s. The exposure duration of each line is set at 2.5 ms. This allows reading out of the first lines during the exposure of the following lines. On an image with size 512 pixels  $\times$  512 pixels, the moment of the top and bottom lines being exposed is delayed with respect to the centreline with 2.37 ms. As a consequence, the rolling shutter mode allows each line being exposed in two consecutive images with no time gap.) Third, the camera provides 4 GB of on-head image buffer, which overcomes the limitation of frame rate due to the eventually low write rate of hardware, and enables frame rates up to 400 images per second. Fourth, the camera offers a field-programmable gate array (FPGA)-generated hardware timestamp with the precision of 25 ns, i.e. 1% of the exposure time, which has a negligible effect on the velocity calculation. Finally, this sCMOS camera has an amplifier for each pixel, so that there might be a slight difference of amplification rate. However, the difference of amplification rate is 0.1% in intensity, which induces 0.1% error

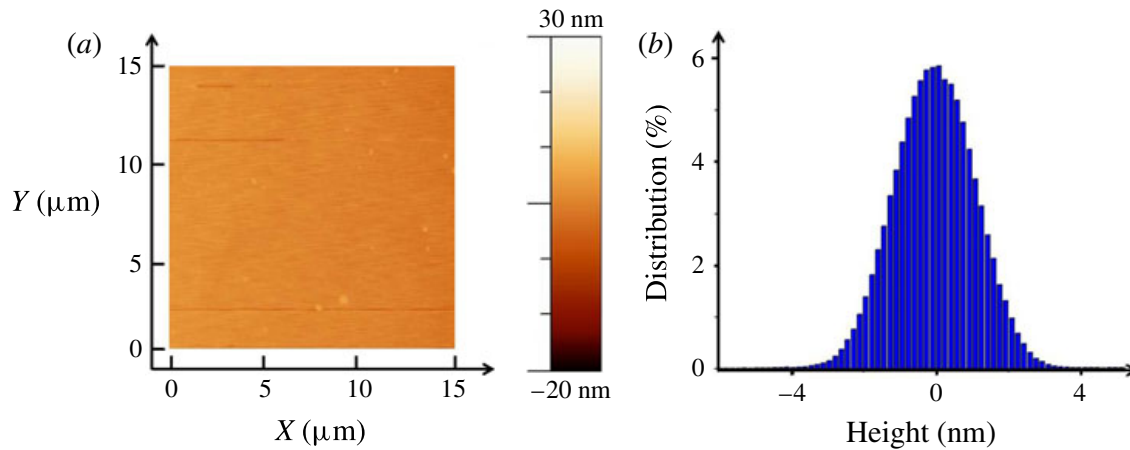


FIGURE 2. State of hydrophobic surface coated on glass slide by *n*-octadecyltrichlorosilane, thickness measured by AFM (a) and RMS (b) indicating the roughness distributes around  $0 \pm 1.3$  nm at half-height.

of altitude calculation, corresponding to 0.1 nm, which is a negligible effect in the experiments. The fluids are injected with a MFCS-FLEX pressure controller by Fluigent. The maximum pressure is 1000 mbar, with 1 mbar precision (0.1% of full scale). The minimum pressure applied in the water experiment is 20 mbar, which means that the source of error due to the pressure controller introduces an error on the stress calculation of maximum 5% for water and 1% for 40 wt% sucrose solution, inducing a maximal error on the deduced viscosity of 5% and 1% respectively. Deionized water (DIW) and 40 wt% of sucrose solution in DIW are studied. FluoSpheres particles from Invitrogen (carboxylate modified 100 nm yellow-green fluorescent particles F8803, solid 2 wt%,  $3.6 \times 10^{13}$  particles  $\text{ml}^{-1}$ ) are used as tracers. Their peak excitation and emission wavelengths are 505 and 515 nm. The particle concentration seeded in 40 wt% sucrose solution and DIW are 0.0004 and 0.002 wt% solid, respectively, so as to have up to 10 particles detected in each frame. The channel dimension is  $L = 8.8$  cm in length,  $w = 183$   $\mu\text{m}$  in width and  $h = 18.3$   $\mu\text{m}$  in height. With these dimensions, the hydrodynamic resistance has the right order of magnitude to operate with flow speeds well adapted to our particle tracking system. The channel is designed in a coil shape in order to save space. With a  $Re$  on the order of  $10^{-3}$ , inertia is neglected and the small turning points of the channel does not induce any recirculation nor instabilities. Both hydrophilic and hydrophobic surfaces are studied. Hydrophilic surfaces are prepared by treating glass slides with Piranha solution (30 vol% hydrogen peroxide and 70 vol% of sulfuric acid) heated at 300 °C until degassing ends. The obtained slides are bonded to PDMS channels with  $\text{O}_2$  plasma treatment. Hydrophobic surfaces are obtained by coating a layer of *n*-octadecyltrichlorosilane on a slide treated by Piranha solution (McGovern, Kallury & Thompson 1994). The coated hydrophobic layer is 20 Å thick according to ellipsometry measurements. The contact angle of a DIW drop on the coated layer is 105°, measured by a surface tension determination set-up KRÜSS DSA30. The roughness of the coated surface is measured by atomic force microscopy (AFM; figure 2): the relative roughness distributes around  $0 \pm 1.3$  nm at half-height. The hydrophobic slide is combined with channel printed in NOA (photocurable monomer) (Bartolo *et al.* 2008). NOA-made channels are preferred to PDMS to avoid the alteration of the hydrophobic coating by the plasma exposition.

Sample	$\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	$V$ (μm s <sup>-1</sup> )	$Re$	$Pe$	$\mu$ (mPa s)
Sucrose 40 wt%	200–600	560–1500	$[2; 7] \times 10^{-3}$	0.5–1.8	6.2
Water	200–800	560–1800	$[10; 40] \times 10^{-3}$	0.1–0.5	1

TABLE 1. Experimental conditions and non-dimensional numbers. Here,  $\dot{\gamma}$  the fluid shear rate. Reynolds number is defined as  $Re = \rho VH/\mu$  and Péclet numbers defined as  $Pe = \dot{\gamma}r_0^2/D_0$  (Guasto & Breuer 2009), where  $V$  is the average velocity of fluid in the channel,  $\rho$  density of the fluid,  $H$  height of the channel,  $D_0$  diffusion coefficient of particles in the fluids calculated by Stokes–Einstein equation and  $r_0$  the particle radius. Viscosity  $\mu$  is measured by conventional rheometer at 20 °C.

### 3. Method of measurement of the particle locations and speeds

During the acquisition, for each 5 s long experimental run, 2000 images are taken; and for each applied pressure, 6 runs are carried out to ensure a high enough number of detected particles (around 80 000), which will contribute to the statistics of the data analysis. The measurement of the intensity is the averaged intensity  $\bar{I}$  over the exposure time of the camera  $\tau$ , with  $\tau = 2.5$  ms. In this process, no information on particle trajectory is lost from the observation, since there is a negligible time gap between two consecutive images. This represents a crucial difference with previous work (e.g. Huang *et al.* 2006; Li & Yoda 2008). The experimental conditions and characteristic numbers are summarized in table 1. An interesting quantity that we used in the discussion of the results is the shear rate  $\dot{\gamma}$  which is determined by the following formula:

$$\dot{\gamma} = \frac{h\Delta P}{2\mu L} \quad (3.1)$$

where  $\Delta P$  is the applied pressure and  $\mu$  the fluid viscosity.

A custom-made Matlab program is used to analyse the detected particles intensity and displacements. We use the tracking method developed by Bonneau, Dahan & Cohen (2005). The subpixel  $x$  and  $y$  locations are obtained by convoluting the detected intensity spot with a two-dimensional Gaussian template, with standard deviation  $\sigma \approx 1.1$  pixels, and discretized on a support of size 5 pixels  $\times$  5 pixels. The accuracy of coordinates determination is 0.1 pixels with a signal-to-noise ratio greater than 10 (Bonneau *et al.* 2005). This represents a spatial uncertainty of 6 nm. In this study of TIRF, since the velocity close to the wall is small, and the time delay between two frames is short, the particle image shift of one particle between two frames is small compared with the image distance between two different particles. The system works in low-concentration particle tracking velocimetry (PTV) mode, considering that the number of particles detected in one image is around 10 in a window of 33 μm  $\times$  33 μm. Thus, an algorithm is implicated to identify the same particle which appeared in two successive images with a nearest-neighbour search (Guasto & Breuer 2009), taking into account the estimated displacement and the diffusion effect. The technique is efficient, and mismatches are extremely rare events.

After particle identification, displacement between two successive frames can be calculated with a theoretical precision of  $6\sqrt{2} \approx 8$  nm. The time-averaged velocities  $\bar{V}_X$  and  $\bar{V}_Y$  are calculated by displacement divided by time 2.5 ms. The time-averaged intensity  $\bar{I}$  is subtracted by camera background noise, and then normalized by the laser-only intensity at the pixel position. The apparent intensity of one identified particle  $\bar{I}_{app}$



is the average between two successive frames,  $\bar{I}_{app} = (\bar{I}_1 + \bar{I}_2)/2$ , where  $\bar{I}_1$  and  $\bar{I}_2$  are the time-averaged intensity measured in the first frame (called frame 1) and in the next one (called frame 2), respectively. In general, because of Brownian motion, the particle in frame 1 has not the same altitude as in frame 2. In order to check the effect of the altitude fluctuations on the results, we have compared velocity profiles constructed with a selection of particles travelling less than 50 nm in altitude between frames 1 and 2, with profiles obtained with particles travelling up to 200 nm in altitude between the same frames. We found that the two profiles are undistinguishable. We thus did not introduce any rule of selection of particles at this level.

The apparent altitude  $\bar{z}_{app}$  of the particle is inferred by using the following expression derived from (2.3):

$$\bar{z}_{app} = p \log \frac{I_0}{\bar{I}_{app}} \quad (3.2)$$

in which  $I_0$  is the intensity emitted by a particle located at the wall, a crucial parameter deserving a separate measurement (see § 6).

After these measurements are carried out for each individual particle, we proceed to statistical averaging over many particles. First, all of the particles are sorted out according to their apparent altitudes  $\bar{z}_{app}$ . A box is an interval, along the  $z$  axis, which contains particles whose apparent altitude belongs to the interval. The box sizes represents the spatial precision at which the velocity profile is measured. Throughout the experiments, we take box sizes of the order of a few nanometres for distances larger than 200 nm from the wall. At less than 200 nm from the wall, box sizes can reach 50 nm. The reason is that we impose that each box includes  $N = 1000$  particles, so as to guarantee statistical convergence. Thereby, since there are only a few particles very close to the wall, the box sizes must be increased in that region. Note that, thanks to temporal and spatial averaging, the accuracy on the determination of the averaged particle altitudes, and therefore the sizes of the boxes we take, is much smaller than the standard deviation of the Brownian movement.

The statistically averaged velocities and apparent altitudes, calculated in each box, are determined by the relations

$$\langle \bar{V}_X \rangle = \frac{1}{N} \sum_N \bar{V}_X; \quad \langle \bar{V}_Y \rangle = \frac{1}{N} \sum_N \bar{V}_Y; \quad \langle \bar{z}_{app} \rangle = \frac{1}{N} \sum_N \bar{z}_{app} \quad (3.3a-c)$$

$z$  in which  $X$  and  $Y$  are respectively the streamwise and cross-stream coordinates, and  $\bar{V}_X$  and  $\bar{V}_Y$  the corresponding time averaged speeds. The summations are carried out in each box over the 1000 particles belonging to it. The raw velocity profile is defined as  $\langle \bar{V}_X \rangle$  versus  $\langle \bar{z}_{app} \rangle$ .

At this stage, we can estimate the measurement accuracy of the apparent altitude using (3.2). A first source of error on  $z_{app}$  comes from  $I_0$  (see below) and  $p$ . Both are determined with a 2 nm precision. The second source of error, and the most important, is statistical. From the above discussion, with a 95 % confidence interval and 1000 particles, the error on  $z_{app}$  is 2 nm. To summarize, the error on  $z_{app}$  is of the order of 2 nm and that of particle image displacement is 5 nm.

#### 4. Langevin modelling of the particle trajectories and intensity measurements

In this section, we describe the stochastic Langevin equations we used to interpret our measurements. We used the same approach as Huang *et al.* (2006). We consider here a population of spherical particles, with a mean radius  $r_0$  and size dispersion  $\sigma_r$ ,

assuming a normal distribution for the radius  $r$ :

$$p_R(r) = \frac{1}{\sigma_r \sqrt{2\pi}} \exp - \frac{((r/r_0) - 1)^2}{2\sigma_r^2}. \quad (4.1)$$

These particles are transported by a pure no-slip shear flow  $V(z) = \dot{\gamma}z$  (where  $\dot{\gamma}$  is the shear rate) close to a wall located at  $z = 0$ .

The stochastic Langevin equations assign coordinates  $x(t)$ ,  $y(t)$ ,  $z(t)$ , to each particle centre at time  $t$ . The particles interact with the surface charges at the wall. We must introduce zeta potentials  $\zeta_p$  and  $\zeta_w$  for the particles and the wall, respectively, to describe this effect. We neglect van der Waals forces, which act on scales much smaller than those we consider here (we checked that adding them does not affect the results of the paper). For the sake of simplicity, we work with dimensionless quantities, using the following dimensionless variables  $X = x/r_0$ ,  $Y = y/r_0$ ,  $Z = z/r_0$  and  $T = t/(r_0^2/D_0)$ . Thus,  $\delta T = \delta t/(r_0^2/D_0)$  is the dimensionless time increment taken for the integration of the trajectories. The discretized equations that describe the particle dynamics, originally written by Ermak & McCammon (1978), are

$$X_{i+1} = X_i + F(Z_i) Pe Z_i \delta T + S \left( 0, \sqrt{2\beta_x(Z_i)\delta T} \right) \quad (4.2a)$$

$$Y_{i+1} = Y_i + S \left( 0, \sqrt{2\beta_y(Z_i)\delta T} \right) \quad (4.2b)$$

$$Z_{i+1} = Z_i + \frac{d\beta_z}{dZ} \Big|_{Z_i} \delta T + H(Z_i)\beta_z(Z_i)\delta T + S \left( 0, \sqrt{2\beta_z(Z_i)\delta T} \right) \quad (4.2c)$$

in which the streamwise ( $\beta_x$  and  $\beta_y$ ) and cross-stream ( $\beta_z$ ) diffusion coefficients are defined by

$$\beta_x(Z) = \beta_y(Z) = 1 - \frac{9}{16}Z^{-1} + \frac{1}{8}Z^{-3} - \frac{45}{256}Z^{-4} - \frac{1}{16}Z^{-5} + O(Z^{-6}), \quad (4.3a)$$

$$\beta_z(Z) = \frac{6(Z-1)^2 + 2(Z-1)}{6(Z-1)^2 + 9(Z-1) + 2}. \quad (4.3b)$$

The other dimensionless functions are defined by the following expressions:

$$F(Z_i) = \frac{U(z_i)}{z_i \dot{\gamma}}; \quad H(Z_i) = \frac{F_{pw}(Z_i)r_0}{k_B \Theta}; \quad Pe = \frac{\dot{\gamma}r_0^2}{D_0} \quad (4.4a-c)$$

in which  $U(z_i)$  is the fluid longitudinal velocity of a particle at the height  $z_i$ .

Assuming that the wall particle interaction is described by Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory, we obtain the following expression for  $F_{pw}(Z_i)$ :

$$F_{pw}^{el} = 4\pi\epsilon \frac{r_0}{\lambda_D} \left( \frac{k_B \Theta}{e} \right)^2 \left( \frac{\hat{\zeta}_p + 4\gamma \Omega \kappa r_0}{1 + \Omega \kappa r_0} \right) \left[ 4 \tanh \left( \frac{\hat{\zeta}_w}{4} \right) \right] \exp \left( -\frac{z-r_0}{\lambda_D} \right) \quad (4.5)$$

where

$$\hat{\zeta}_p = \frac{\zeta_p e}{k_B \Theta}; \quad \hat{\zeta}_w = \frac{\zeta_w e}{k_B \Theta}; \quad \gamma = \tanh \left( \frac{\hat{\zeta}_p}{4} \right); \quad \Omega = \frac{\hat{\zeta}_p - 4\gamma}{2\gamma^3} \quad (4.6a-d)$$

and in which  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $\epsilon = \epsilon_w \epsilon_0$  is the dielectric constant of water,  $\zeta_p$  and  $\zeta_w$  are zeta potentials of the particles and the wall, respectively, and  $\lambda_D$  is the Debye length.

The stochastic displacement of the particles due to Brownian motion is represented by the  $S$  function, following a normal distribution with a zero mean value and the dimensionless diffusion length  $L = \sqrt{2\beta(Z)\delta T}$  as its standard deviation.

The total fluorescence intensity  $I$  emitted by the particle at time  $t_i$  must then be calculated. Here, we consider that the particle is at some distance  $z_f$  from the object plane of the objective. Bleaching is neglected, owing to the fact that the time of interest (2.5 ms) is much smaller than the fastest bleaching time (see § 6). The total intensity emitted by the particle, being proportional to the incident light intensity it collects, is thus given by the following expression:

$$I(Z) = I_0 \left( \frac{r}{r_0} \right)^3 \exp \left( -\frac{z}{p} \right) \frac{1}{1 + \left( \frac{z-z_f}{P_c} \right)^2} \quad (4.7)$$

where the parameters have the following definition.

- (i) We use  $I_0$  to denote the intensity emitted by a particle of radius  $r_0$  located at the wall, i.e. at  $z = r_0$ , whose centre is placed at the image plane of the camera sensor, i.e. at  $z = z_f$ .
- (ii) We use  $P_c$  to denote the depth of field of the optical system that images the particles (Joseph & Tabeling 2005). This parameter is estimated with the following formula (4.8):

$$P_c = \frac{n\lambda_0}{\text{NA}^2} + \frac{na}{\text{NAM}} \quad (4.8)$$

in which  $n$  is the refractive index of the working medium ( $n = 1.518$ ),  $\lambda_0$  the excitation wavelength ( $\lambda_0 = 488$  nm),  $a$  the pixels size of the CMOS sensor ( $a = 6.5$   $\mu\text{m}$ ), NA the numerical aperture of the objective (NA = 1.46) and  $M$  the magnification ( $\times 100$ ). The formula gives 348 nm for  $P_c$ . Here,  $z_f$  represents the position of the image plane of the camera sensor, which is estimated to be 350 nm. The choice of this value is supported by calibration experiments (see appendix A). The position of the focal plane has 50 nm accuracy. According to (4.7), this error on focal plane position deduces 2% of error on detected intensity, which corresponds to 2 nm on altitude determination. The effect of defocusing has not been considered thus far by the previous investigators, which seems justified by the fact that their objectives have smaller numerical apertures.

The procedure we use mimics rigorously the experimental methodology. It decomposes into the following steps.

- (i) We generate particles whose initial positions span a range of altitudes between 100 and 700 nm, with uniform distributions. This interval corresponds to the range of altitudes within which particles are detected in the experiment. Outside this range, the particles are not detected either because of the existence of a depletion or the signal they emit is indistinguishable from the noise.
- (ii) Each particle wanders in space, and reaches some position (say, 1) after a time  $\tau$  equal to the exposure time of the camera, i.e. 2.5 ms. This position is calculated by using (4.2). After another time  $\tau$ , the particle reaches a second position (say, 2) which is calculated in the same way.
- (iii) For each particle, the intensity  $I(Z)$  is temporally averaged between the initial time  $t = 0$  and  $t = 2\tau$ , the result being  $I_{app}$ . A similar procedure applies for the altitude, leading to  $z_{mean}$  and for the horizontal coordinates of the particle.



158

Z. Li and others

(iv) The apparent altitude  $z_{app}$  is calculated similarly as in (3.2). The formula is

$$z_{app} = r_0 + p \log \frac{I_0}{I_{app}}. \quad (4.9)$$

Note that  $z_{app}$  is generally different from  $z_{mean}$ .

- (v) The horizontal displacement vector of the particle between its mean positions 1 and 2 is calculated. The components of this vector are divided by the separation time (i.e.  $\tau$ ) to obtain the components of the apparent fluid speed,  $V_{xapp}$  and  $V_{yapp}$  as a function of  $z_{mean}$ .
- (vi) Boxes similar to the experiment are defined (see § 3). The quantities of interest (altitudes, speeds) are further averaged out statistically over thousands of particles located in each boxes. Distributions are also obtained.

A final remark concerns the stationarity of our simulations. They are not stationary, since in the course of time, the particles tend to diffuse away. Nevertheless, the escape is extremely slow (its characteristic time is a fraction of seconds, i.e. several hundreds of times the time we consider here,  $\tau$ ). The escape process is also slow with respect to the speed of establishment of the Debye layer, which takes only a fraction of  $\tau$  to build up. Therefore, on the time scales we consider in the simulations, the leak of particles we evoke here can be neglected.

## 5. Using Langevin simulation to correct altitudes and speeds

Now we make use of the simulations to discuss the relation between the apparent altitude  $z_a = \langle z_{app} \rangle$  and the apparent longitudinal speed  $V_a = \langle V_{xapp} \rangle$  (where the brackets mean statistical averaging in the boxes). In fact, each apparent quantity is a function of  $\langle z_{mean} \rangle$ . Therefore, by eliminating  $\langle z_{mean} \rangle$ , we can plot  $V_a$  in function of  $z_a$ , thus mimicking the experimental measurements we perform. The plot is shown in figure 3.

One sees that the apparent profile  $V_a(z_a)$  departs from the true profile  $V(z_a) = \dot{\gamma} z_a$ . Close analysis shows that as a whole, the apparent profile is shifted towards the right by a few nanometres, for reasons related to the coupling between Brownian fluctuations and convexity of the function  $I(z)$ . On the other hand, the lower part of the apparent profile is curved upwards. This is due to the depletion in particles in the Debye layer. More explicitly, the explanation is as follows: with the values we have taken in the simulations shown in figure 3, the Debye layer thickness is 22 nm. Under such conditions, the depletion in particles is perceptible up to 150 nm. Particles located in the depleted layer develop smaller excursions near the wall than far from it. It follows that their apparent altitude, calculated from the nonlinear equation (4.9), is underestimated, while their apparent speed is overestimated. These particles thus stand apparently closer to the wall than they are, and move apparently faster than they do. This artefact gives rise to an apparent profile  $V_a(z_a)$  that tends to level off as the wall is approached.

Another deviation between the apparent and expected profiles is visible at large distances, where the upper part of the profile is curved downwards. This effect originates in the fact that as we move farther from the wall, the particles become more and more unfocused and consequently, they seem farther than they are. A consequence of defocusing is a slope reduction (down to 20%), which gives rise to an overestimate of the *in situ* viscosity when determined from formula (9.1). Note that these biases are small in amplitude. The consequence is that we do not need an outstanding accuracy on the calculation of the biases to correct the experimental data.

In practice, we use the function  $V_a(z_a)$  to convert apparent velocity profiles into corrected profiles, which are expected to approach the ‘true’ velocity profiles.

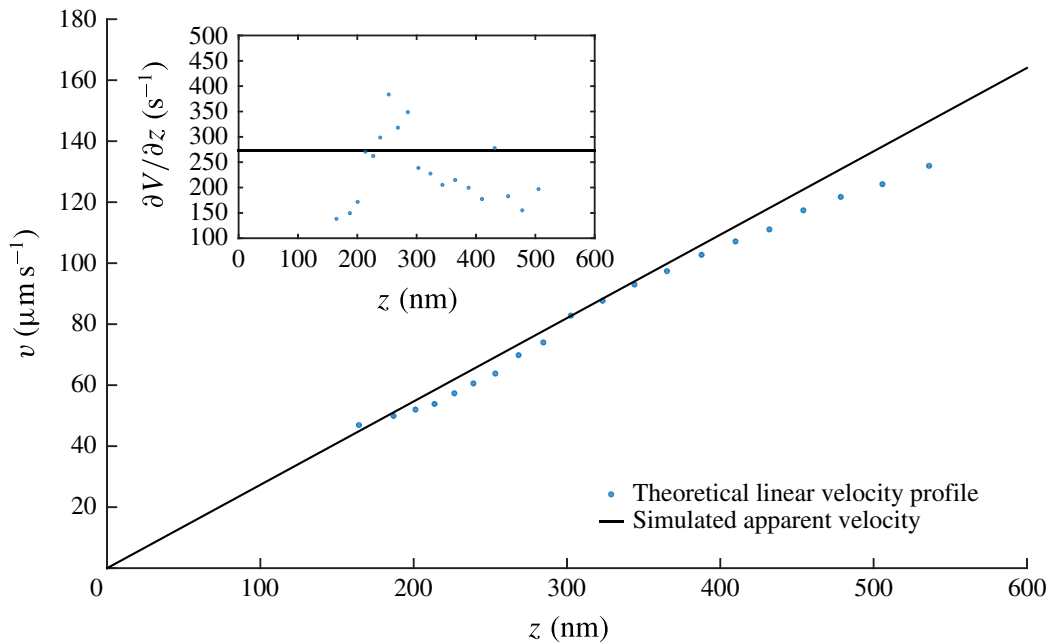


FIGURE 3. (Colour online) Simulated velocity profiles of sucrose 40 wt% solution on an hydrophilic surface for an inlet pressure  $p = 195$  mbar. The parameters of the simulation are  $\lambda_D = 22$  nm,  $P_c = 348$  nm,  $z_f = 300$  nm and  $p = 124$  nm. The inset shows the local slope of the velocity profile.

## 6. Experimental determination of $I_0$

The parameter  $I_0$  is crucial and necessitates an accurate measurement. In order to measure this parameter, we analysed populations of particles physically adsorbed to the wall, thus located at  $z = r$ . Adsorption of many particles onto the wall is achieved by adding 0.05 M NaCl to the working fluid, thus lowering the repelling electrostatic barrier between the particle and the wall. In our method, which is different from Li & Yoda (2010), we first turn off the laser, maintain a flow and wait for a few minutes (i.e. in the dark). This time is sufficient for the adsorption process to reach an equilibrium state, where all particles are immobilized. Then we turn the laser on, tune manually the objective position so as the particles lie in the focal plane of the TIRF objective. Throughout the procedure, a video is recorded so that the instant at which the laser is switched on, along with the time at which the first well-focused image of the particles is captured are known with a 23 ms accuracy. No significant amount of particles gets adsorbed to the wall nor desorbs during the time the analysis is carried out. This hypothesis is checked directly on the video. The inset of figure 4 shows an intensity distribution obtained 138 ms after the laser is switched on.

Such a distribution can be analysed theoretically. Assuming that the bleaching process is the same for all of the particles, the intensity  $I$  emitted by a particle of size  $r$ , located at  $z = r$ , and illuminated by the laser beam for a time  $t$ , is given by the formula

$$I = I_B(t) \left( \frac{r}{r_0} \right)^3 \quad (6.1)$$

in which  $I_B(t)$  is a function that characterizes the bleaching process, assumed to apply uniformly on the particle population, independently of their sizes. In this expression, we do not take into account the fact that the particles, being of different sizes, have their centres located at different distances from the wall and therefore are illuminated

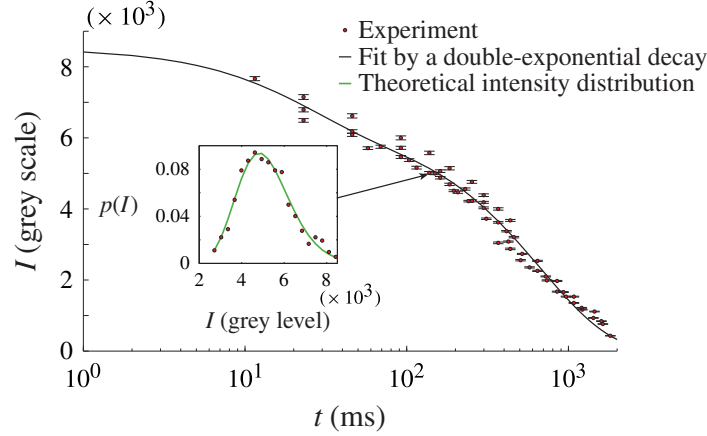


FIGURE 4. (Colour online) Temporal decay of the intensity  $I_B(t)$  emitted by particles physically adsorbed onto the wall, whose centre are thereby approximately located at  $z = r$ . Experimental results are fitted by (6.3) which corresponds to double-exponential photo-bleaching kinetics (Song *et al.* 1995, 1997), with  $A$ ,  $B$ ,  $t_1$  and  $t_2$  as free parameters. The fit parameters are  $A = 2283 \pm 359$  grey values,  $B = 6300 \pm 223$  grey values,  $t_1 = 22.4 \pm 9.5$  ms and  $t_2 = 675 \pm 49$  ms. The fit includes data obtained at  $t < 1$  ms. In the inset, the (red online) dots represent, for time  $t = 138$  ms, the intensity distribution emitted by the population of particles located at the surfaces; in the same inset, the (green online) line is a fit based on (6.2), from which  $I_B(t)$  and  $\sigma_r$  are determined.

with slightly different intensities. The corresponding error is on the order of  $(\sigma_r r/p)^2$  i.e.  $10^{-4}$ . Assuming further a normal distribution for the particle size, with standard-type deviation  $\sigma_r$ , one obtains the probability density function (p.d.f.) of the intensity emitted by an ensemble of particles located at  $z = r$  at time  $t$ :

$$p_W(I, t) = \frac{r_0}{3I_B(t)\sigma_r\sqrt{2\pi}} \left(\frac{I_B(t)}{I}\right)^{2/3} \exp - \frac{\left(\left(\frac{I}{I_B(t)}\right)^{1/3} - 1\right)^2}{2\sigma_r^2}. \quad (6.2)$$

Our expression is slightly different from Huang *et al.* (2006), because we restored a factor  $I^{-2/3}$  coming from a variable change, that was not taken into account. The inset of figure 4 shows that this distribution agrees well with the experiment. By comparing the theory and the experiments, we can extract  $\sigma_r$  and  $I_B(t)$  at each time. Regarding  $\sigma_r$ , the values range between 8 % and 9 % at all times, which is compatible with the data provided by the constructor (5 % for the size dispersity). As mentioned in Huang *et al.* (2006), the standard deviation we obtain incorporates fluctuations in the particle size, number of fluorophores and quantum efficiencies. This may explain why it stands above the sole size dispersity stated by the constructor.

The evolution of  $I_B(t)$  with time is shown in figure 4. We obtain a double-exponentially decreasing function, well represented by the following formula:

$$I_B(t) = Ae^{-t/t_1} + Be^{-t/t_2}. \quad (6.3)$$

This behaviour reflects that, in the range of time we consider, two time constants are needed to describe the bleaching process, consistently with the literature (Song *et al.* 1995, 1997) and at variance with Li & Yoda (2008). Figure 4 is important for the measurement we make, because it allows to check that the direct measurement of

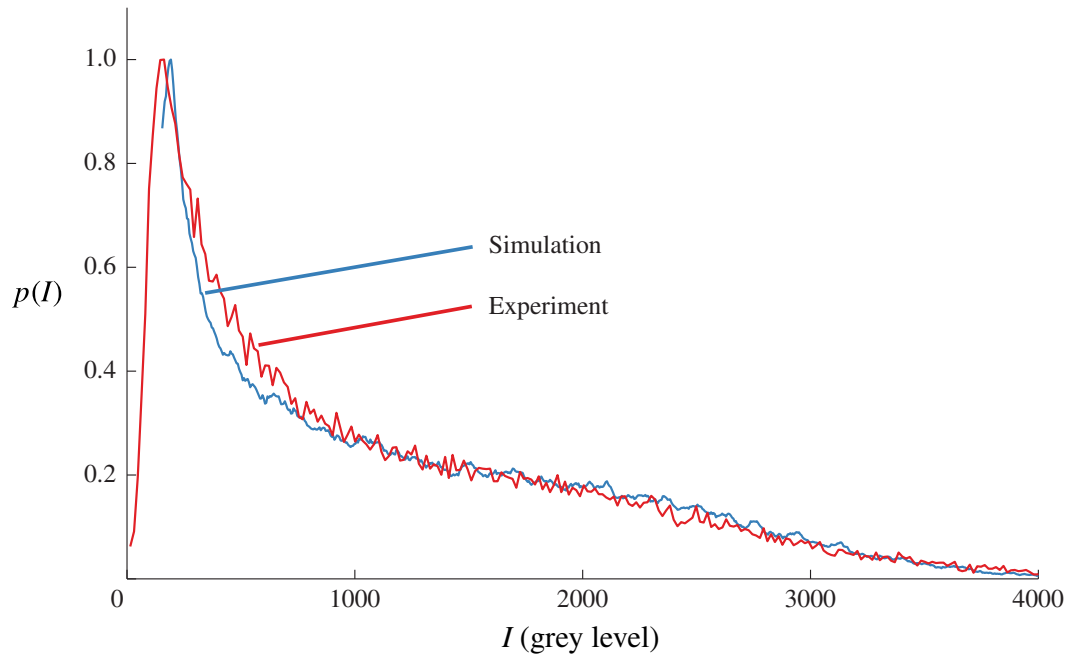


FIGURE 5. Experimental (red line) and related simulated (blue line) intensity distributions in the case of 40 wt% sucrose solution. Both situations correspond to an inlet pressure of 140 mbar. The simulation parameters are  $\lambda_D = 22$  nm,  $P_c = 348$  nm,  $z_f = 300$  nm and  $p = 124$  nm.

$I_0$  (i.e. that done at  $t < 1$  ms, not represented on the figure), is in excellent agreement with the value  $I_B(0)$  obtained with the fit. In practice, by repeating measurements at small times, the errors on the direct measurement of  $I_0$  are estimated on the order of  $\pm 123$  grey levels, which, translated in  $z$ -position by using formula (2.3), leads to a  $\pm 2$  nm accuracy.

In Li & Yoda (2008, 2010) the photo bleaching kinetics of fluorescent particles was not analysed with such a degree of precision. This induced a substantial error on the average value of  $I_0$ , and therefore on the measurement of the slip length.

## 7. Analysis of the intensity distributions and comparison with the Langevin simulations

The analysis of intensity distributions of populations of particles seeding the flow allows us to confront our simulation to the experiment. The distributions shown in figure 5 represent an experiment made with a sucrose solution. The distribution is strongly skewed. There are sharp peaks on the left side and bumps on the right wing.

The left side of the distribution represents the contributions of the dimmest particles, i.e. those located far from the wall. If particles were uniformly distributed in space, the evanescent form of the intensity field would induce a hyperbolic function for the intensity distribution, which is consistent with the observed shapes of the central part of  $p(I)$ . Below a certain level, no particle is detected anymore, and the distribution level collapses. The largest intensity levels probe the closest distances to the wall. The abrupt decrease of  $p(I)$  at high intensity levels is linked to the existence of depleted layers in the vicinity of the wall. These depleted layers result from the action of hindered diffusion and electrostatic repulsion.

The simulation represents well the overall shape of the observed distributions. There are some discrepancies on the left side of the distribution, where the distribution of

the dimmest particles seem to be imperfectly reproduced by the theory. We suggest that the discrepancy is due to the crude modelling of the conditions for which the particles cease to be observable by the camera. On the other hand, there are only small differences on the right part of the distribution, which correspond to the brightest particles, i.e. those located closer to the wall. This suggests that the simplifications made in the theoretical representation of this region are acceptable. One weakness of the DLVO theory we used is that the particles are assumed pointwise, while they occupy a significant fraction of the Debye layer. Another weakness is that some parameters (such as the  $\zeta$  potentials of the walls and particles) are poorly known. Still, from the viewpoint of the intensity distributions, these approximations seem acceptable.

As a whole, the agreement can be considered as satisfactory. This is an important observation, which supports the idea that our Langevin model represents well the experiment, and thereby can provide reliable estimates of the existing biases. We also tested the robustness of the agreement with respect to changes in the parameters of the simulations. The lower range of intensities is sensitive to the size of the pack of particles we took for prescribing the initial conditions of the simulation. Likewise, in the upper range of intensity levels, a similar comment can be made regarding the sensitivity of the form of the distribution to the choice of the Debye layer thickness  $\lambda_D$ . Nonetheless, although quantitative differences may exist when the simulation parameters are not adequately chosen, the structures of the calculated distributions shown in figure 5 are robust. Moreover, changing the aforementioned parameters within a realistic range of values does not affect the velocity profiles outside the Debye layer. As a consequence, for the rest of the paper, we will concentrate ourselves on a range of altitudes lying between 200 and 600 nm for sucrose, 150 and 500 nm for water, for which the particles are sufficiently far from the wall to be insensitive to the detailed characteristics of the Debye layer, and more generally, for which the simulated velocity profiles are robust with respect to moderate changes of the simulation parameters.

## 8. Analysis of the velocity distributions and comparison with the Langevin simulation

A typical transverse velocity distribution (i.e. along  $y$ ), averaged across the  $z$  interval 100–600 nm, is shown in figure 6 and compared with the Langevin simulation. Both agree well.

It is interesting to note that  $V_y$  distribution is more peaked than a Gaussian curve, indicating that small  $V_y$  events are more probable than they would be for a Gaussian process. In fact, here, we look at the travelled distance along  $y$  made by a large number of particles launched at the origin, after a time  $\tau$ . Within the range of time we considered, the process apparently keeps the memory of the initial condition, giving rise to a cusp of the p.d.f. around the origin. Since the distribution is not Gaussian, the diffusion constant associated to the  $V_y$  distribution, is given by the following formula:

$$D = \frac{\sigma_v^2 \tau}{\alpha} \quad (8.1)$$

with  $\sigma_v$  being the standard deviation corresponding to the Gaussian distribution and  $\alpha \approx 1.2$ . Applying this formula in the experiments, we found diffusion constants in satisfactory agreement with the expectations.

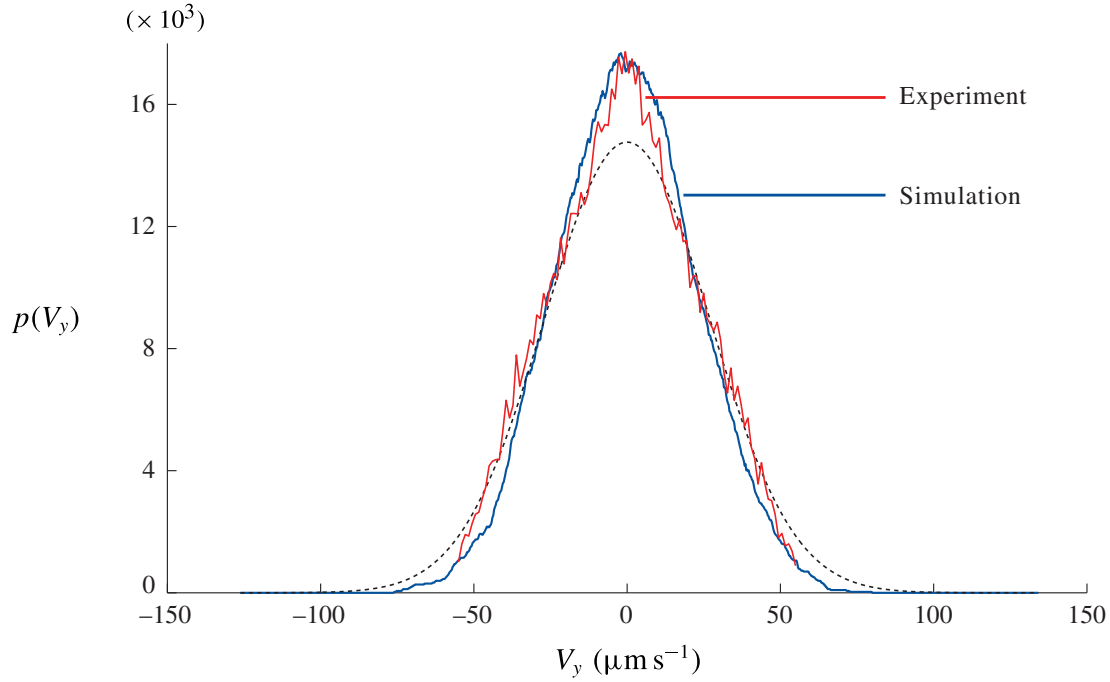


FIGURE 6. Transverse velocity  $V_y$  distribution. Red and blue lines correspond to experimental and simulated data, respectively. The dotted line is the Gaussian distribution with standard deviation  $\sigma_v = (2D/\tau)^{1/2}$ .

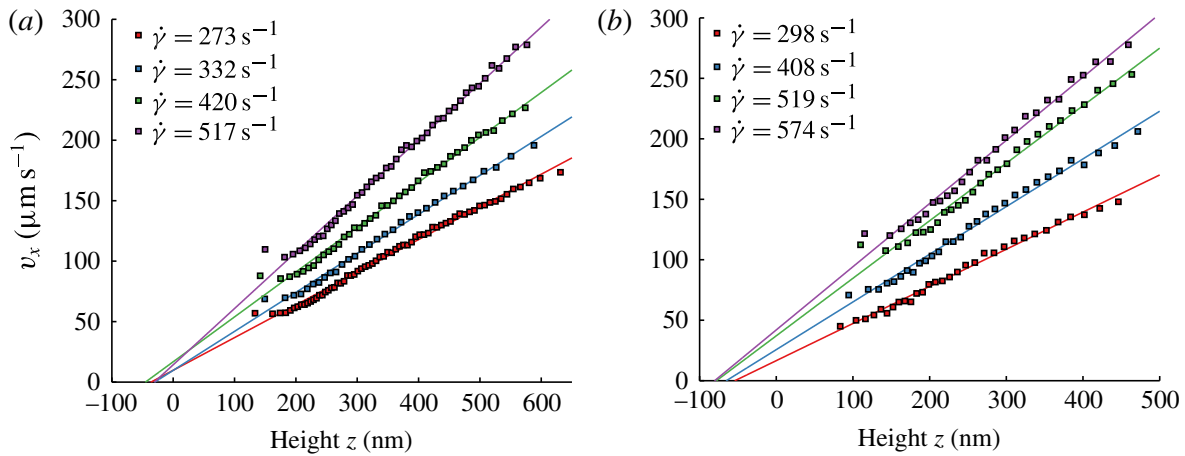


FIGURE 7. Uncorrected velocity profiles obtained with a 40 wt% sucrose solution, over a hydrophilic surface (a) and with water over a hydrophobic surface (b) for different pressures. Linear fits are made between 200 and 600 nm for sucrose and 150 and 500 nm for water.

## 9. Raw velocity profiles and raw viscosities

The raw velocity profiles  $V_x(z_a)$  are shown in figure 7 for the sucrose solution and water pressures, as a function of the apparent altitude  $z_a$ . These profiles represent the raw data we obtained, i.e. those without corrections. Between 200 and 500 nm, the profiles are approximately linear in  $z_a$ . This is explained by the fact that on the scales we consider, the curvature of the Poiseuille profile is not visible and consequently, the profiles must be straight.



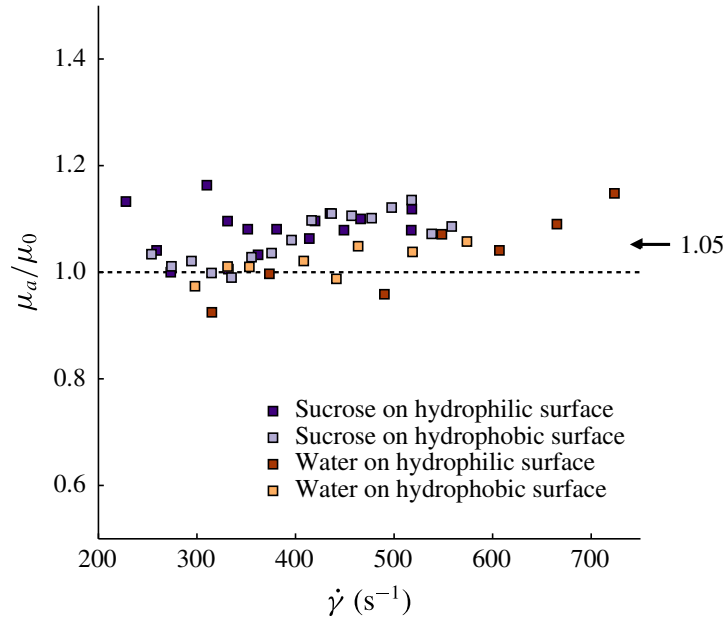


FIGURE 8. Uncorrected measurements of the ratio between the *in situ* apparent viscosity  $\mu_a$  (see (9.1)) over the bulk viscosity  $\mu_0$ , determined independently with a rheometer. The mean deviation between the apparent and the bulk viscosity is 5%.

Nonetheless, on looking in more detail, there is a systematic tendency to curve downwards above 500 nm. This is mainly due to defocusing, that weakens the intensity emitted by the particles and, in turn, increases their apparent altitude. Below 200 nm, the profiles tend to level off. This effect is due to the existence of a depletion zone close to the Debye layer, that favours a systematic underestimate in the measurement of the particle altitude and overestimated of speeds, as explained previously. According to the simulation, the levelling-off effect is more pronounced when the Debye length is increased. This effect tends to vanish out as we move away from the walls, where the electrostatic force is out of scale and particle concentration distribution tends to be homogeneous.

From the measurements of the profile slopes, in regions located between, typically, 200 and 600 nm (where both electrostatic and defocusing biases are reduced), one may determine an apparent viscosity  $\mu_a$ , through the formula (see (3.1)):

$$\mu_a = \frac{h\Delta P}{2\dot{\gamma}L}. \quad (9.1)$$

The measurements are shown in figure 8. There are fluctuations (presumably linked to the  $\pm 50$  nm uncertainties on the determination of the location of the focal plane) but it appears that viscosities systematically tend to stand above the expected values, by an amount of the order of 5%. The existence of this bias along with the order of magnitude of its importance, supports the analysis made in a precedent section.

## 10. Corrected velocity profiles and corrected viscosities

Figures 9 and 10 show the same set of data, but corrected, using formulas based on figure 3. The corrected data is close to the raw data, typical differences being on the order of 10%. The corrected profiles are straight above approximately 200 nm, indicating that the tendency to curve down, as a result of defocusing, has been

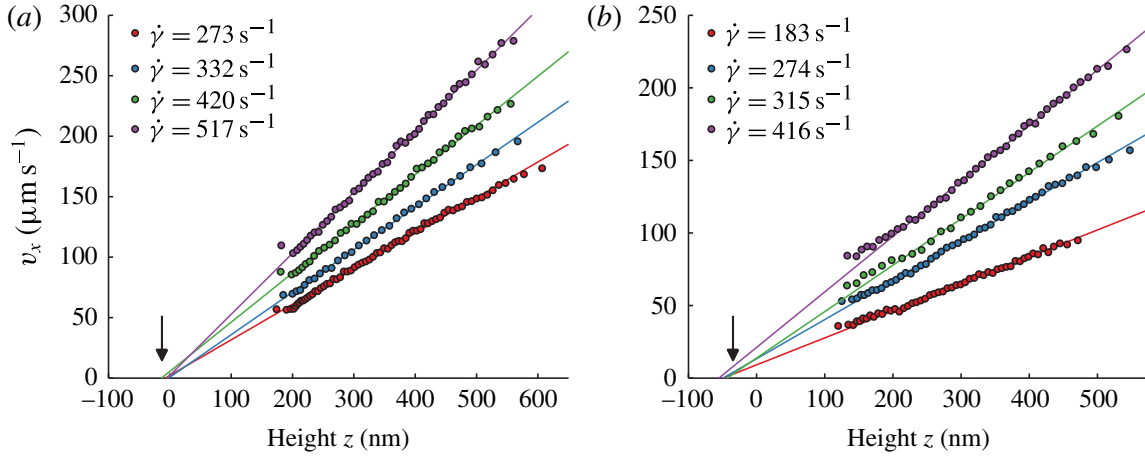


FIGURE 9. Corrected velocity profiles obtained with sucrose solution 40 wt%, on the hydrophilic surface (a) and the hydrophobic surface (b), for different pressures. The linear fit are calculated between 200 and 600 nm. For hydrophilic walls, all profiles converge to a no-slip condition; with hydrophobic walls, they confirm the existence of slippage, with a slip length of  $35 \pm 5$  nm.

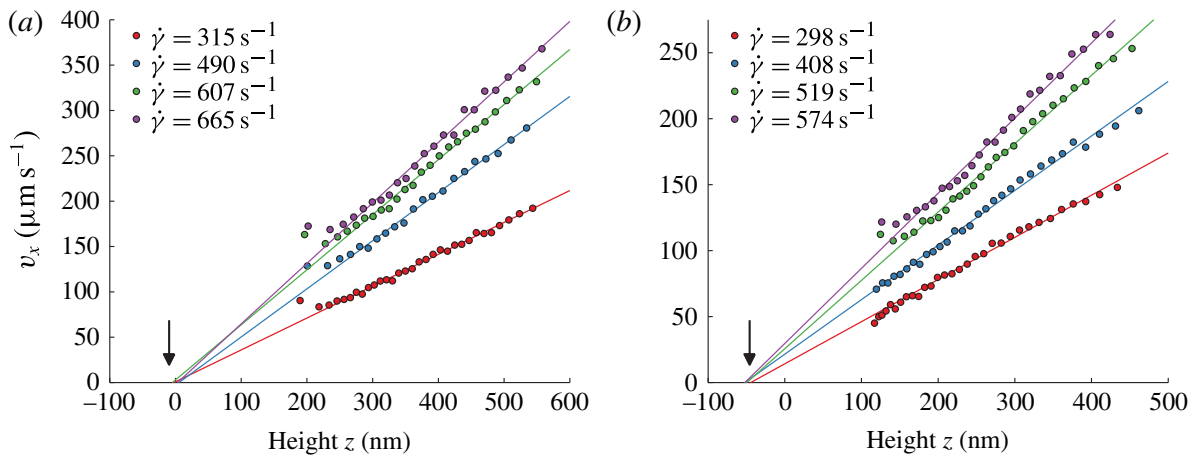


FIGURE 10. Corrected velocity profiles obtained with water, on the hydrophilic surface (a) and the hydrophobic surface (b), for different pressures. The linear fits are calculated between 250 and 500 nm for the hydrophilic case and 150 and 500 nm for the hydrophobic one.

captured by the Langevin simulation and satisfactorily corrected. Moreover, the tendency to level off at small altitudes is less pronounced on the corrected than on the raw profiles.

The viscosities, obtained by using formula (9.1), with shear rates estimated by fitting linearly the corrected profiles, are significantly closer to the expected values, the remaining discrepancy being of the order of 1%, as shown in figure 11. These results, associated to the remarks previously made on the shapes of the corrected profiles, support the validity of our method of correction.

## 11. Slip length measurements

We are now in a position to carry out slip length measurements. As for the viscosity, slip lengths are obtained by fitting the corrected velocity profiles with straight lines,



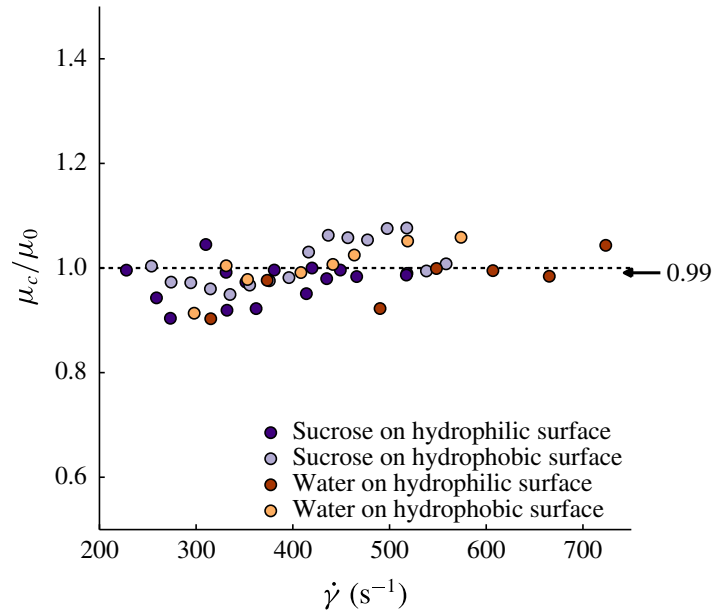


FIGURE 11. Data showing corrected values of the *in situ* measured viscosity  $\mu_c$  divided by the bulk viscosity  $\mu_0$  determined independently. The graph includes data obtained with hydrophilic and hydrophobic walls. The mean statistical deviation is 1 %.

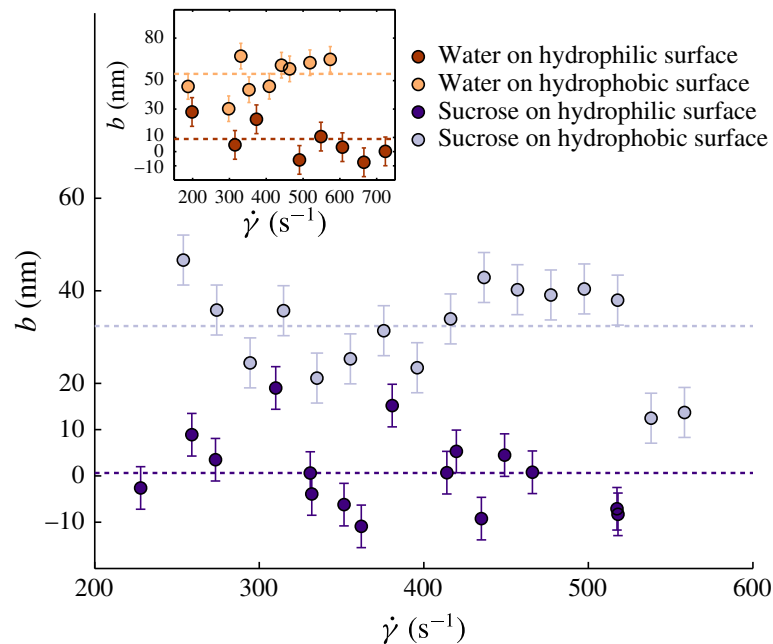


FIGURE 12. Slip lengths measurements, obtained with the sucrose solution. The inset is the case of water. In all cases, one can easily detect a difference between hydrophilic (dark dots) and hydrophobic (light dots) walls.

usually restricting ourselves to the 200–600 nm range, and extrapolate them down to the  $z$  axis. The (extrapolated) slip lengths are then measured as a function of the shear rate by localizing the intersections of this line with the horizontal axis, using the fit expressions.

The results are plotted in figure 12, for hydrophilic, hydrophobic walls, using water and sucrose. For hydrophilic walls, one obtains, both for water and sucrose solutions, a slip length indistinguishable from zero. For hydrophobic walls, the slip lengths are

Surface		Sucrose 40 wt%		Water	
		Hydrophilic	Hydrophobic	Hydrophilic	Hydrophobic
$b$	(nm)	1	32	9	55
$\Delta b$	(nm)	5	5	10	9
Error on viscosity	(%)	2.7	0.6	2.8	0.1

TABLE 2. Summary of our measurements made on slip lengths and viscosity errors.

clearly above the horizontal axis. It thus appears that the nature of the wetting property of the wall (i.e. whether it is hydrophilic or hydrophobic) is well captured by our slip length measurements, a result still not established firmly in the literature with TIRF-based velocimetry, owing to the importance of the experimental uncertainties reported in the corresponding papers.

Taking the rule of 95 % confidence interval, and neglecting possible variations with the shear rate of the measured quantities, an hypothesis being acceptable owing to the small range of flow rate we explored, we obtain  $1 \pm 5$  nm and  $9 \pm 10$  nm for hydrophilic walls (for the case of sucrose and water, respectively) and  $32 \pm 5$  nm and  $55 \pm 9$  nm for hydrophobic walls (again for sucrose and water, respectively), as shown in table 2. This estimate of the errors does not include that made on  $I_0$ , which was found close to 2 nm (see § 6), and which therefore can be neglected if we assume statistical independency. The hydrophilic data agrees well with the literature (Cottin-Bizonne *et al.* 2005). Hydrophobic slip lengths stand in the right order of magnitude with published works: (Huang *et al.* 2006; Joly *et al.* 2006; Vinogradova *et al.* 2009).

## 12. Conclusion

The first outcome of this paper is about the technique. We showed that nanoPTV technique, associated to Langevin stochastic calculations, achieves accuracies ( $\pm 5$  nm) on the determination of slip lengths, while delivering a local information on the structure of the velocity profile. For the domain of nanoPTV technique, this marks a substantial progress as compared with the state of the art, where error bars were such that it was difficult to draw out a firm conclusion on the existence of slippage over hydrophilic or hydrophobic walls. Other methods lead to comparable accuracies but, being global, they do not provide information on the local structure of the flow profile.

Our work also suggests that the exploration of distances less than 200 nm seems difficult. Below 200 nm, the particles are subjected to a variety of influences (diffusive drift, electrostatic field, strong particle concentration gradients, etc.) that make the interpretation of their trajectories challenging; consequently the relationship between the average particle movement and the flow speed, along with their apparent altitude and their true distance to the wall, are difficult to quantify. In this region, the biases tend to have an amplitude comparable with the signal. This aspect has been overlooked in Bouzigues *et al.* (2008), coauthored by one of the authors of the present paper (P.T.).

We envision applications of our approach to non-Newtonian flows, such as polymer solutions, microgels concentrated suspensions or living micelles, where the technique can readily be applied. These systems, in particular the polymer solutions, deserve a confirmation of slippage measurements made in the past with less-sophisticated techniques.

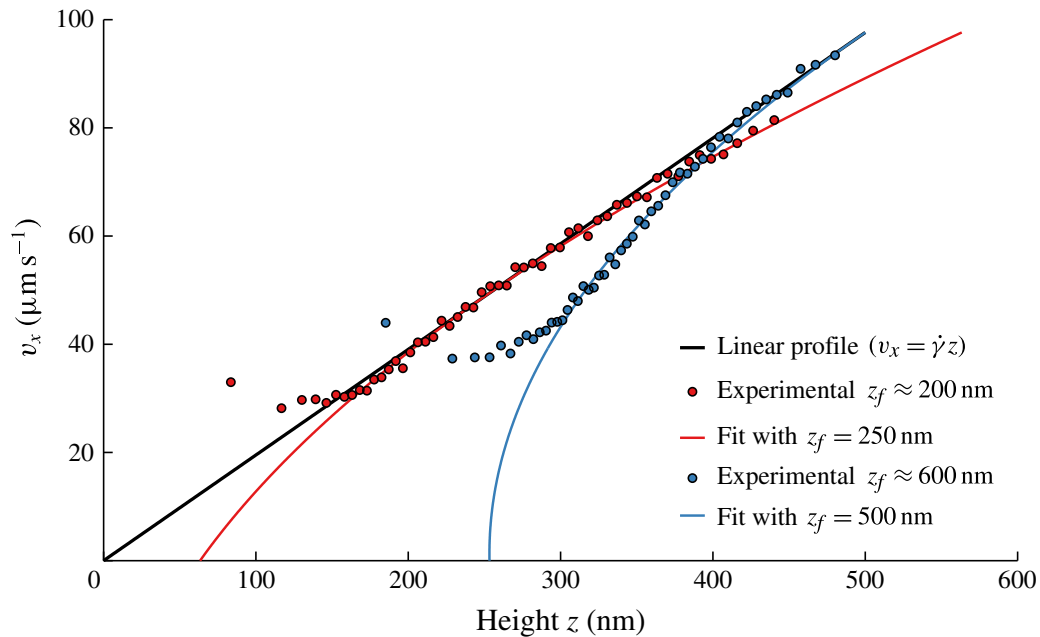


FIGURE 13. Experiments showing the velocity profiles obtained at different positions of the TIRF objective, thus at different  $z_f$ . Red dots are obtained for  $z_f \approx 200$  nm and blue dots correspond to  $z_f \approx 600$  nm. Full lines show good agreement between experimental data and (A 1) within a range of altitudes where it is expected to apply, for the depth of field  $a = 348$  nm of the objective.

Moreover, our work leads to interesting results concerning slip lengths. The slip lengths we found for hydrophobic surfaces have the same order of magnitude as the literature. They also stand much above the numerical simulations. We thus confirm the unresolved discrepancy between experiments and numerical simulations (Cottin-Bizonne *et al.* 2005). It challenges our understanding of the flow dynamics at nanometric distances from an interface, which in turn questions our ability to understand the physics of transport at solid/liquid interfaces in many systems, including natural ones. Owing to its importance, this unresolved issue deserves being addressed experimentally with different techniques, owing to the formidable difficulties that must be faced to perform quantitative measurements in a range of scales that touch or pertain to the nanofluidic realm.

### Acknowledgements

The authors thank L. Bocquet, E. Charlaix, C. Cottin-Bizonne, T. Kitamori, D. Lohse, Z. Silber-Li, M. Tatoulian and C. Ybert for fruitful discussions and exchanges. Support from AEC, ESPCI, CNRS and UPMC is acknowledged.

### Appendix A. Experiments dedicated to checking the analysis of the defocusing effect

In order to support the theoretical analysis of the effect of defocusing made in § 4, we carried out dedicated experiments. We moved the position of the focal plane  $z_f$  by translating the TIRF objective with a piezo actuator (P-721 PIFO nanositioner controlled by E-662 LVPZT servo-amplifier, PI). At each position, we determined velocity profiles. Here, red and blue dots represent experimental data obtained with

a 40 wt% sucrose solution for an hydrophilic wall, for two different  $z_f$ ,  $200 \pm 50$  and  $600 \pm 50$  nm. The results are fitted with an expression derived from (4.7):

$$V_x(z_{app}) = \dot{\gamma} \left[ z_{app} - p \log \left( 1 + \left( \frac{z_{app} - z_f}{P_c} \right)^2 \right) \right] \quad (\text{A } 1)$$

which captures the essence of the theoretical description made in § 4. As shown in figure 13, we found that formula (A 1) captures well the effect, within a range of altitudes where it is expected to apply, i.e. outside the Debye layer. These experiments provided an experimental check of the theoretical description of the defocusing effect made in § 4.

In practice, we tuned  $z_f$  between 200 and 360 nm in our Langevin model so as to minimize the curvature observed at long distances on the velocity profiles. The interval of  $z_f$  that is chosen is justified by the experimental procedure we took, which consists of adjusting the position of the objective to obtain a number of bright particles well in focus. Owing to the existence of a depletion in the Debye layer, the particles we focus on with this procedure are located, typically, between 200 and 400 nm from the wall.

#### REFERENCES

- BARTOLO, D., DEGRÉ, G., NGHE, P. & STUDER, V. 2008 Microfluidic stickers. *Lab on a Chip* **8** (2), 274–279.
- BOCQUET, L. & BARRAT, J.-L. 2007 Flow boundary conditions from nano- to micro-scales. *Soft Matt.* **3** (6), 685–693.
- BOCQUET, L. & CHARLAIX, E. 2010 Nanofluidics, from bulk to interfaces. *Chem. Soc. Rev.* **39** (3), 1073–1095.
- BONNEAU, S., DAHAN, M. & COHEN, L. D. 2005 Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume. *IEEE Trans. Image Process.* **14** (9), 1384–1395.
- BOUZIGUES, C. I., TABELING, P. & BOCQUET, L. 2008 Nanofluidics in the debye layer at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Phys. Rev. Lett.* **101** (11), 114503.
- BRAZHNİK, P. K., FREED, K. F. & TANG, H. 1994 Polymer melt near a solid wall. *J. Chem. Phys.* **101** (10), 9143–9154.
- BRICEÑO, M. I. & JOSEPH, D. D. 2003 Self-lubricated transport of aqueous foams in horizontal conduits. *Intl J. Multiphase Flow* **29** (12), 1817–1831.
- BROCHARD, F. & DE GENNES, P. G. 1992 Shear-dependent slippage at a polymer/solid interface. *Langmuir* **8** (12), 3033–3037.
- CEVHERI, N. & YODA, M. 2014 Electrokinetically driven reversible banding of colloidal particles near the wall. *Lab on a Chip* **14**, 1391–1394.
- CHOI, C.-H., WESTIN, K. J. A. & BREUER, K. S. 2003 Apparent slip flows in hydrophilic and hydrophobic microchannels. *Phys. Fluids* **15** (10), 2897–2902.
- COTTIN-BIZONNE, C., CROSS, B., STEINBERGER, A. & CHARLAIX, E. 2005 Boundary slip on smooth hydrophobic surfaces: intrinsic effects and possible artifacts. *Phys. Rev. Lett.* **94** (5), 056102.
- DE GENNES, P. G. 1980 Conformations of polymers attached to an interface. *Macromolecules* **13** (5), 1069–1075.
- DE GENNES, P. G. 1981 Polymer solutions near an interface. adsorption and depletion layers. *Macromolecules* **14** (6), 1637–1644.
- ERMAK, D. L. & MCCAMMON, J. A. 1978 Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *J. Chem. Phys.* **69** (4), 1352–1360.
- GUASTO, J. S. & BREUER, K. S. 2009 High-speed quantum dot tracking and velocimetry using evanescent wave illumination. *Exp. Fluids* **47** (6), 1059–1066.

- GUASTO, J. S., HUANG, P. & BREUER, K. S. 2006 Statistical particle tracking velocimetry using molecular and quantum dot tracer particles. *Exp. Fluids* **41** (6), 869–880.
- HU, G. & LI, D. 2007 Multiscale phenomena in microfluidics and nanofluidics. *Chem. Engng Sci.* **62** (13), 3443–3454.
- HUANG, P. & BREUER, K. S. 2007 Direct measurement of anisotropic near-wall hindered diffusion using total internal reflection velocimetry. *Phys. Rev. E* **76** (4), 046307.
- HUANG, P., GUASTO, J. S. & BREUER, K. S. 2006 Direct measurement of slip velocities using three-dimensional total internal reflection velocimetry. *J. Fluid Mech.* **566**, 447–464.
- HUANG, P., GUASTO, J. S. & BREUER, K. S. 2009 The effects of hindered mobility and depletion of particles in near-wall shear flows and the implications for nanovelocimetry. *J. Fluid Mech.* **637**, 241–265.
- JIN, S., HUANG, P., PARK, J., YOO, J. Y. & BREUER, K. S. 2004 Near-surface velocimetry using evanescent wave illumination. *Exp. Fluids* **37** (6), 825–833.
- JOLY, L., YBERT, C. & BOCQUET, L. 2006 Probing the nanohydrodynamics at liquid–solid interfaces using thermal motion. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 046101.
- JOSEPH, P. & TABELING, P. 2005 Direct measurement of the apparent slip length. *Phys. Rev. E* **71** (3), 035303.
- KAZOE, Y., ISEKI, K., MAWATARI, K. & KITAMORI, T. 2013 Evanescent wave-based particle tracking velocimetry for nanochannel flows. *Analyt. Chem.* **85** (22), 10780–10786.
- KIMURA, Y. & OKADA, K. 1989 Lubricating properties of oil-in-water emulsions. *Tribol. Trans.* **32** (4), 524–532.
- KOCH, D. L. 1989 On hydrodynamic diffusion and drift in sheared suspensions. *Phys. Fluids A* **1** (10), 1742–1745.
- LI, H., SADR, R. & YODA, M. 2006 Multilayer nano-particle image velocimetry. *Exp. Fluids* **41** (2), 185–194.
- LI, H. F. & YODA, M. 2008 Multilayer nano-particle image velocimetry (MnPIV) in microscale poiseuille flows. *Meas. Sci. Technol.* **19** (7), 075402.
- LI, H. & YODA, M. 2010 An experimental study of slip considering the effects of non-uniform colloidal tracer distributions. *J. Fluid Mech.* **662**, 269–287.
- MCGOVERN, M. E., KALLURY, K. M. R. & THOMPSON, M. 1994 Role of solvent on the silanization of glass with octadecyltrichlorosilane. *Langmuir* **10** (10), 3607–3614.
- MEEKER, S. P., BONNECAZE, R. T. & CLOITRE, M. 2004 Slip and flow in soft particle pastes. *Phys. Rev. Lett.* **92** (19), 198302.
- MEINHART, C. D., WERELEY, S. T. & SANTIAGO, J. G. 1999 PIV measurements of a microchannel flow. *Exp. Fluids* **27** (5), 414–419.
- MIJATOVIC, D., EIJKEL, J. C. T. & VAN DEN BERG, A. 2005 Technologies for nanofluidic systems: top-down versus bottom-up – a review. *Lab on a Chip* **5** (5), 492–500.
- MURAT, M. & GREST, G. S. 1989 Structure of a grafted polymer brush: a molecular dynamics simulation. *Macromolecules* **22** (10), 4054–4059.
- OBERHOLZER, M. R., WAGNER, N. J. & LENHOFF, A. M. 1997 Grand canonical brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. *J. Chem. Phys.* **107** (21), 9157–9167.
- SADR, R., HOHENEGGER, C., LI, H., MUCHA, P. J. & YODA, M. 2007 Diffusion-induced bias in near-wall velocimetry. *J. Fluid Mech.* **577**, 443–456.
- SADR, R., LI, H. & YODA, M. 2005 Impact of hindered Brownian diffusion on the accuracy of particle-image velocimetry using evanescent-wave illumination. *Exp. Fluids* **38** (1), 90–98.
- SADR, R., YODA, M., ZHENG, Z. & CONLISK, A. T. 2004 An experimental study of electro-osmotic flow in rectangular microchannels. *J. Fluid Mech.* **506**, 357–367.
- SANTIAGO, J. G., WERELEY, S. T., MEINHART, C. D., BEEBE, D. J. & ADRIAN, R. J. 1998 A particle image velocimetry system for microfluidics. *Exp. Fluids* **25** (4), 316–319.
- SCHMID, S. R. & WILSON, W. R. D. 1995 Lubrication of aluminum rolling by oil-in-water emulsions. *Tribol. Trans.* **38** (2), 452–458.
- SELVIN, P. R. & HA, T. 2008 *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- SESSOMS, D. A., BISCHOFBERGER, I., CIPELLETTI, L. & TRAPPE, V. 2009 Multiple dynamic regimes in concentrated microgel systems. *Phil. Trans. R. Soc. A* **367** (1909), 5013–5032.
- SONG, L., HENNINK, E. J., YOUNG, I. T. & TANKE, H. J. 1995 Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **68** (6), 2588–2600.
- SONG, L., VAN GIJLSWIJK, R. P. M., YOUNG, I. T. & TANKE, H. J. 1997 Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Cytometry* **27** (3), 213–223.
- SPARREBOOM, W., VAN DEN BERG, A. & EIJKEL, J. C. T. 2009 Principles and applications of nanofluidic transport. *Nat. Nanotechnol.* **4** (11), 713–720.
- TRETHERWAY, D. C. & MEINHART, C. D. 2002 Apparent fluid slip at hydrophobic microchannel walls. *Phys. Fluids* **14** (3), L9–L12.
- VINCENT, B. 1990 The calculation of depletion layer thickness as a function of bulk polymer concentration. *Colloids Surf.* **50**, 241–249.
- VINOGRADOVA, O. I., KOYNOV, K., BEST, A. & FEUILLEBOIS, F. 2009 Direct measurements of hydrophobic slippage using double-focus fluorescence cross-correlation. *Phys. Rev. Lett.* **102**, 118302.
- ZETTNER, C. & YODA, M. 2003 Particle velocity field measurements in a near-wall flow using evanescent wave illumination. *Exp. Fluids* **34** (1), 115–121.
- ZHENG, X., KONG, G.-P. & SILBER-LI, Z.-H. 2013 The influence of nano-particle tracers on the slip length measurements by microPTV. *Acta Mechanica Sin.* **29** (3), 411–419.



---

## Conclusion générale

---

La première partie de cette thèse montre le potentiel des hydrogels sensibles en tant qu'actionneurs en microfluidique.

Pour cela, nous avons défini une nouvelle approche qui permet d'améliorer la technologie sur plusieurs critères :

- la fabrication : en utilisant une fabrication *ex situ*, la structuration de l'hydrogel et le contrôle de ses propriétés sont facilités.
- la robustesse : le greffage des structures d'hydrogel permet d'assurer une bonne tenue de l'hydrogel dans le temps et sous de fortes contraintes de cisaillement.
- l'efficacité : dans le cas des vannes comme des compartiments, l'étanchéité et la perméabilité des structures ont été respectivement optimisée et caractérisée.
- l'activation : dans notre cas, l'hydrogel obtenu est thermosensible. Cela garantit une activation simple par un contrôle de la température que nous avons amélioré en miniaturisant la stimulation thermique grâce à des micro-résistances chauffantes.
- le temps de réponse : cette miniaturisation de la stimulation a également permis de faire progresser la technologie sur sa rapidité en atteignant un temps de réponse de l'ordre de 300 ms.
- la polyvalence : si la majorité des actionneurs actuels sont basés sur des vannes, nous apportons une fonctionnalité supplémentaire avec la compartimentation libre.

Cette approche *ex situ* qui garantit un contrôle précis des opérations de fabrication, associée à la chimie du thiol-ène qui permet le greffage des chaînes de polymères au substrat, résout donc nombre de problèmes soulevés dans la littérature quant à l'utilisation des hydrogels sensibles en tant qu'actionneurs. D'autant que la structuration par UV, notamment en utilisant une lithographie directe par laser, donne beaucoup de flexibilité sur les géométries adoptées.

La stratégie a ensuite été mise à profit dans deux configurations.

La première est celle des micro-vannes. Nous avons abordé des subtilités de fabrication afin d'optimiser leur géométrie pour éviter les fuites : en utilisant la colle NOA81 et des dimensions appropriées, on obtient de bons résultats. Elles ont également pu être testées pendant plusieurs heures avec plusieurs dizaines de cycles de gonflement/effondrement



sans constater de dégradation de leur fonctionnement.

Par ailleurs, nous nous sommes attachés à intégrer des éléments chauffants au substrat des micro-systèmes. Cela permet de rendre le dispositif plus autonome en premier lieu, puisque l'activation de ces micro-résistances chauffantes ne nécessite que peu de puissance. De plus, en réduisant les échelles, nous avons obtenu un gain en rapidité : alors que le temps de réponse des vannes contrôlées par un module Peltier est de l'ordre de plusieurs secondes, celui des vannes contrôlées par micro-résistances chauffantes ne prend que quelques centaines de millisecondes.

La deuxième configuration mise en œuvre est celle des compartiments. Cette manière de partitionner une cellule microfluidique est relativement inédite puisqu'elle permet de dissocier complètement la structure fluidique de la structure des actionneurs. Cela permet d'abord de simplifier la fabrication des micro-systèmes en libérant des contraintes sur l'alignement des substrats. Aussi, les compartiments sont plus facilement intégrables à haute densité : nous avons atteint une densité de plus de 100 compartiments par millimètre carré à la fin de nos travaux.

Nous en avons profité pour proposer deux preuves de concept en biologie. La première traite du piégeage de cellules uniques, et ouvre la voie à une analyse plus précise des expressions cellulaires qui pourra être bénéfique à la compréhension subtile des mécanismes en jeu. La seconde permet de réaliser des opérations d'amplification de l'ADN et laisse envisager la possibilité de réaliser ces opérations de manière digitale : en diluant suffisamment la solution d'ADN, on pourra se retrouver dans une situation où les pièges contiendront au plus une seule molécule d'ADN. On pourra ainsi cribler plus précisément la présence ou non de mutations sur certains gènes d'intérêt, impliqués dans des pathologies comme la maladie de Parkinson.

À partir de ces conclusions, nous évoquerons deux perspectives au projet.

Tout d'abord, nous pouvons constater que tous ces travaux ont été réalisés à partir d'un seul polymère, le p(NIPAM), dont la température de transition autour de 32 °C ne convient pas nécessairement aux standards de la culture cellulaire qui impose souvent une température d'incubation à 37 °C. Ce qui signifie qu'en l'état, les structures de p(NIPAM) ne sont pas compatibles avec le piégeage de cellules incubées. Des études sont donc en cours pour adapter la méthode expliquée en détails dans cette thèse et celle de mes prédécesseurs à d'autres hydrogels thermosensibles dont la température de transition se situerait à une température supérieure à 37 °C. Le meilleur candidat à l'étude est le PEGMA (poly(éthylène glycol) méthacrylate) dont la température de transition dépend de la longueur des chaînes de polymère. Cela fait en partie l'objet de la thèse d'Ekkachai Martwong au laboratoire SIMM à l'ESPCI.

Enfin, nous avons évoqué l'idée d'intégrer un grand nombre de résistances chauffantes sur les substrats de verre pour multiplier les possibilités d'activation des structures d'hydrogel. Cela pose cependant un problème à la fois d'encombrement et de complexité du montage électrique. Pour pallier à cette limitation, il est possible d'opter pour une source d'énergie différente, à savoir un échauffement provoqué par la focalisation d'un laser sur un substrat métallisé absorbant son énergie. Une fois le montage optique motorisé, on obtiendrait une source unique et mobile à grande vitesse capable d'activer spécifiquement des vannes ou des compartiments du micro-système.

En ce qui concerne le deuxième projet de ces travaux de thèse, il était consacré à l'étude du glissement par nanovélocimétrie. Nous avons à cette occasion amélioré la méthodologie associée aux mesures de longueurs de glissement réalisées *via* la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne, en suivant des nanoparticules fluorescentes dans une couche de fluide allant jusqu'à environ 800 nm de distance de la paroi du micro-canal.

L'amélioration des mesures a été obtenue grâce à la prise en compte de plusieurs artéfacts expérimentaux inhérents à la technique : le mouvement Brownien à proximité d'une paroi solide, le photo-blanchiment des nanoparticules, les effets de dérive ainsi que ceux de la profondeur de champ de l'objectif ont été intégrés dans des simulations numériques de Langevin. En appliquant des corrections issues de la simulation aux résultats expérimentaux, nous avons obtenu des mesures d'une précision encore jamais atteinte avec cette technique, de l'ordre de quelques nanomètres. Nous confirmons ainsi l'absence de glissement de l'eau sur surface hydrophile et la présence d'un glissement de plusieurs dizaines de nanomètres sur surface hydrophobe. Ces travaux ont donné lieu à une publication en 2015 dans *Journal of Fluid Mechanics*.

Cette méthodologie pourra être utilisée à l'avenir pour le cas de fluides complexes, afin de contribuer aux travaux avançant des effets de glissement de grande ampleur.



---

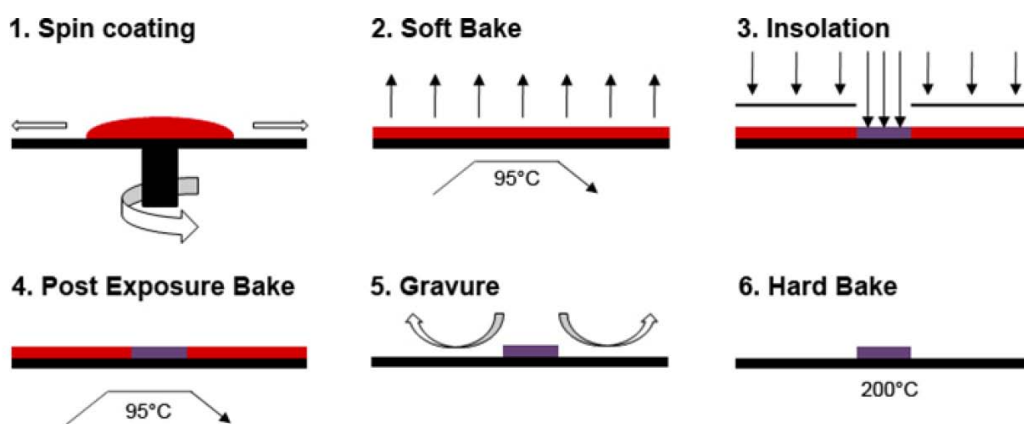
## Fabrication de substrats micro-structurés en PDMS

---

Cette annexe est dédiée aux protocoles de fabrication des substrats micro-structurés en PDMS, qu'ils soient directement les substrats de circulation fluide ou les timbres utilisés pour la structuration de la NOA81.

### A.1 Fabrication d'un moule en silicium avec des structures SU8

La fabrication du moule sur wafer de silicium se déroule comme suit :



**Figure A.1** – Protocole de fabrication d'un moule en silicium avec des structures en SU8, d'après la thèse de B. Chollet.

1. Préparation du wafer de silicium : on commence par mettre le wafer pendant quelques minutes à 200 °C pour évaporer les éventuelles traces de solvant de nettoyage résiduelles et déshydrater le wafer.

2. *Spin-coating* de la résine SU8 : la résine est déposée sur la moitié de la surface du wafer que l'on fait tourner 40 secondes entre 500 et 4000 tours/min, selon l'épaisseur souhaitée. Différentes gammes d'épaisseur sont accessibles selon la viscosité de la résine. À cet effet, des tables sont fournies par le fabricant (MicroChem).
3. *Soft bake* : le wafer est ensuite placé sur une plaque chauffante pendant un temps dépendant de son épaisseur (de 1 à 30 minutes) afin de faire évaporer le solvant et obtenir une couche sèche. Il est amené avec un premier palier à 65 °C, puis à 95 °C afin de minimiser les contraintes mécaniques dans la couche.
4. *Insolation UV* : le wafer est ensuite insolé par une source UV avec un filtre *i-line* à 365 nm d'une puissance de 12 mW/cm<sup>2</sup>, quelques dizaines de secondes en fonction de l'épaisseur de résine, et à travers un masque de contraste. Les parties transparentes du masque laissent passer le rayonnement UV, ce qui initie la réticulation de la résine. Les zones situées sous les parties opaques du masque ne sont pas irradiées et seront dissoutes au développement.
5. *Post-exposure bake* : cette étape de chauffage est réalisée de la même manière que précédemment. Le chauffage à 95 °C catalyse la réaction de réticulation sur les zones insolées et les révèle.
6. *Développement* : le wafer est plongé dans un développeur (PGMEA, SigmaAldrich) qui va dissoudre les zones non insolées. Un rinçage à l'isopropanol permet d'arrêter le processus de développement et de laver le wafer sans laisser de traces après séchage à l'azote.
7. *Hard bake* : un chauffage final à 200 °C pendant environ 15 à 20 min permet de faire disparaître d'éventuelles craquelures en faisant légèrement fondre la résine.

## A.2 Moulage des structures en PDMS

Le moule préparé selon le protocole du paragraphe précédent est utilisé pour structurer le PDMS :

1. un mélange de base de PDMS et de réticulant liquides (9 :1) est versé sur le moule. L'ensemble est placé sous une cloche à vide pour retirer les bulles du liquide, puis est mis à l'étuve à 75 °C pendant 2h pour obtenir une réticulation complète.
2. l'élastomère obtenu est détaché délicatement du wafer de silicium, puis les structures sont découpées avec un scalpel.
3. pour l'acheminement des fluides, des trous sont percés à travers l'épaisseur du matériau.

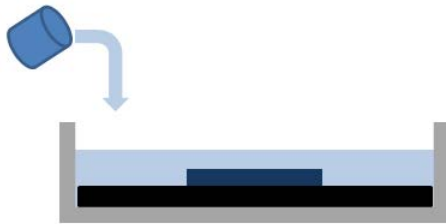
## A.3 Cas particulier des timbres en PDMS

Les timbres utilisés pour structurer la NOA81 sont obtenus de la même manière. Seulement, les micro-structures des timbres doivent être en « bosse » et non en creux. On réalise alors une nouvelle réplique à partir du substrat en PDMS précédent, appelé contre-moule :

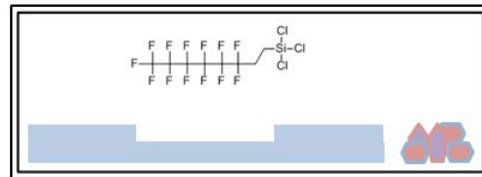
1. Pour mouler du PDMS sur du PDMS, le contre-moule est silanisé afin d'éviter la fusion des deux parties : après un plasma d'oxygène de 45 secondes, il est placé dans une boîte hermétique déshydratée par des cristaux de silice, et mis en présence de vapeurs de perfluorooctyl-trichlorosilane.
2. le mélange base + réticulant de PDMS est versé sur le contre-moule et réticulé pendant 45 minutes à 75 °C.
3. Le timbre est ensuite délicatement décollé du contre-moule, puis est découpé.

Le moulage et la fabrication du timbre sont illustrés sur la figure A.2 :

**A – Contre-moule**



**B - Silanisation**



**C – Moulage PDMS/PDMS**



**D - Timbre**



**Figure A.2** – (A) Protocole de fabrication d'un substrat micro-structuré en PDMS, qui peut servir de contre-moule. (B) Silanisation du PDMS. (C) Réplication PDMS/PDMS. (D) Obtention du timbre en PDMS pour la fabrication de la NOA.



---

## Dépôts métalliques par évaporation

---

Pour l'intégration de circuits électriques ou pour la confection de masques en chrome, nous avons déposé des couches fines métalliques sur des substrats de verre, selon deux procédés : l'évaporation métallique et la pulvérisation cathodique.

### B.1 Préparation des surfaces

Pour obtenir les meilleurs résultats, nous nettoyons les surfaces de verre avec une solution Piranha : elles sont immergées dans un mélange 3 : 1 v/v d'acide sulfurique (>95%) et d'eau oxygénée (35%), porté à ébullition par chauffage à 200°C jusqu'à ce que le dégazage de la solution s'estompe (15 à 30 minutes). Les plaques sont ensuite abondamment rincées dans l'eau ultrapure et séchées sous jet d'azote.

### B.2 Évaporation métallique pour le dépôt d'or

L'évaporation métallique consiste à porter un échantillon de métal à la fusion dans une enceinte sous vide. Les échantillons sont placés en regard du métal qui s'évapore. Le dispositif utilisé est l'AUTO500 de HHV (figure B.1).





**Figure B.1** – Dispositif d'évaporation métallique AUTO500.

Pour obtenir une couche d'or stable sur le verre, il est nécessaire de déposer d'abord une fine couche de chrome. Deux creusets d'évaporation équipent donc ce dispositif : l'un est rempli de fil d'or, l'autre de poudre de chrome.

L'enceinte est ensuite mise sous vide, et il faut environ deux heures pour atteindre une pression de l'ordre de  $10^{-6}$  mbar.

Le dépôt de chrome nécessite une alimentation de l'ordre de 50% de la puissance du bâti. Une balance piézo-électrique permet de mesurer l'épaisseur déposée. On dépose habituellement 2 à 3 nm.

Le dépôt d'or nécessite quant à lui une alimentation de l'ordre de 20% de la puissance, et il faut environ 10 minutes pour déposer 100 nm.

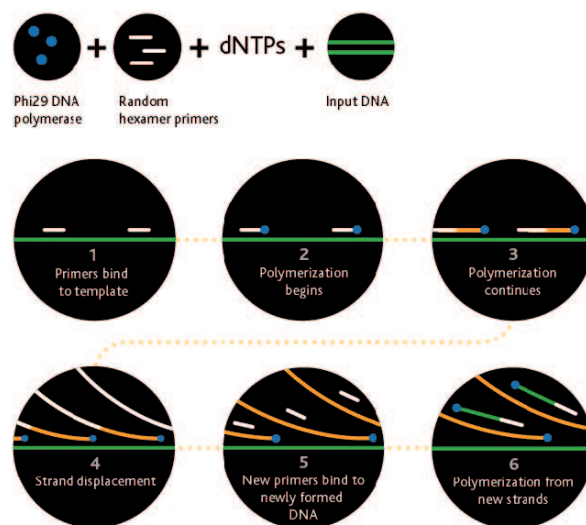
L'enceinte est ensuite remise à l'atmosphère et les échantillons sont récupérés.

---

## Amplification d'ADN isotherme par RCA

---

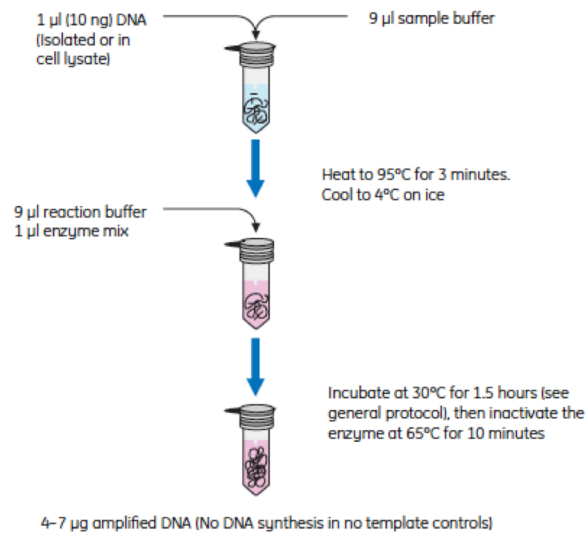
Pour réaliser les expériences d'amplification d'ADN par RCA du gène cible SYNJ1 humain (Human Synaptonjanin 1), on utilise un kit Illustra Genomiphi V2 (GE Healthcare), dont le principe est résumé sur la figure C.1 :



**Figure C.1** – Principe du kit d'amplification Illustra Genomiphi V2, d'après le fournisseur GE Healthcare.

Les différentes étapes de préparation du kit sont illustrées sur la figure C.2. On mélange d'abord l'échantillon d'ADN avec son tampon (1 :9). L'ensemble est porté à 95 °C en tube pour dénaturer l'ADN.

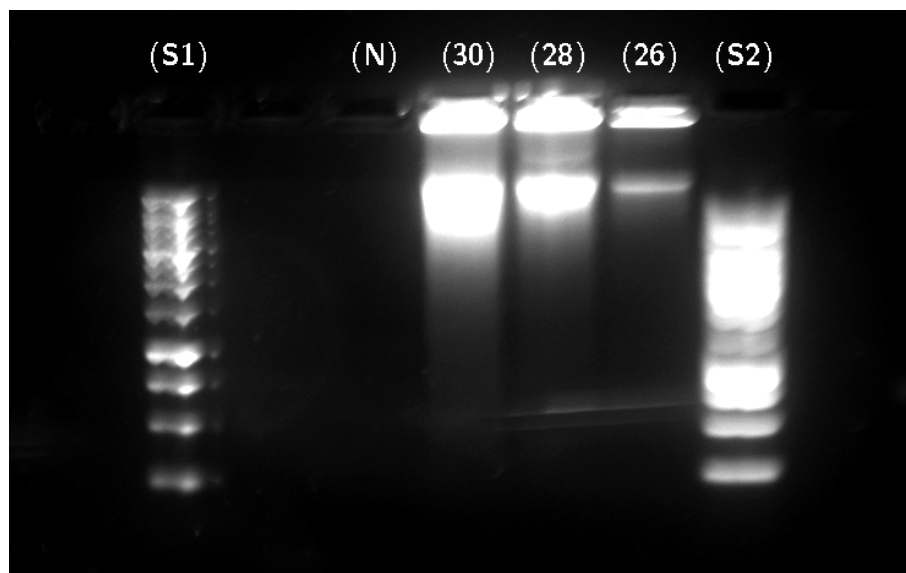
L'enzyme réactionnelle (Phi29 polymérase) est ensuite ajoutée avec son tampon (1 :9) avant de rapidement injecter le tout dans le micro-système. Il faut noter qu'au kit d'amplification, on ajoute 1 µL de sonde spécifique Solaris qPCR (Thermoscientific, SYNJ1-FAM, 20x).



**Figure C.2** – Protocole pour l'amplification d'ADN par le kit Illustra Genomphi V2.

La concentration en ADN est de 88 pg/µL, ce qui correspond en théorie à 40 molécules d'ADN par compartiment de 40 pL.

S'il est conseillé de réaliser la réaction d'amplification à 30 °C, nous avons vérifié qu'elle était également possible et efficace à 28 °C (figure C.3). Cela permet de s'éloigner de la transition en température, et de réaliser l'amplification dans la zone où les structures d'hydrogel seront parfaitement gonflées.



**Figure C.3** – Résultat de la migration sur gel d'agarose d'échantillons-test d'amplification RCA en « bulk » à 30, 28 et 26 °C après 2 heures. On constate que les résultats à 28 et 30 °C sont très semblables, ce qui autorise à réaliser les expériences dès 28 °C. À gauche (S1) et à droite (S2), l'échelle des tailles. Le témoin négatif (N) ne donne logiquement pas de signal.

Pour ce qui est du micro-système, on le remplit préalablement par une solution de Pluronic F127 à 2% en faisant des cycles de température entre 25 et 45 °C sur un thermocycleur

PTC-200 pendant 1 heure. Cette étape sert à éviter la présence de bulles piégées dans les compartiments.

Le mélange d'amplification est injecté avec un contrôleur de pression MFCS (Fluigent) à 40 °C, avant d'abaisser la température à 28 °C pour deux heures d'incubation.

La manipulation est suivie en fluorescence sur un dispositif de macrofluorescence avec une prise de vue toutes les 7 minutes pour éviter le phénomène de photo-blanchiment.



---

## Résumé — Abstract

---

Cette thèse traite de deux projets en rapport avec la microfluidique.

Le premier est consacré à la réalisation d'actionneurs à base d'hydrogel thermosensible. Avec une approche technologique basée sur le greffage et la structuration d'un hydrogel thermosensible sur des surfaces en verre, nous montrons comment un matériau capable de subir de fortes variations de volume peut être utilisé comme actionneur microfluidique dans les milieux aqueux. D'abord, en tant que vanne, nous démontrons que la stratégie de greffage des structures permet d'obtenir des actionneurs robustes et durables capables de réguler la circulation de fluides en micro-canaux avec une réponse rapide en miniaturisant la stimulation thermique. Ensuite, une autre configuration, dite de compartimentation libre, est mise en œuvre et appliquée en biologies moléculaire et cellulaire.

Le second est quant à lui dédié à l'étude du glissement par nanovélocimétrie en utilisant la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne. Cette technique permet de suivre les écoulements de nanoparticules à proximité immédiate de la paroi d'un micro-canal (dans les premiers 800 nm de fluide). En utilisant les modèles de Langevin, nous avons été en mesure de prendre en compte différents artefacts expérimentaux et les corriger. Nous confirmons l'absence de glissement de l'eau pure sur surface hydrophile et l'existence du glissement sur surface hydrophobe. Cette partie est traitée sous la forme d'une brève introduction, suivie d'un article publié dans *Journal of Fluid Mechanics*.

---

In this work, we have addressed two projects related to microfluidics.

The first one is dedicated to the integration of hydrogel-based actuators in microsystems. Thanks to a technological approach based on the grafting and patterning of a thermosensitive hydrogel on glass substrates, we show how a material that can undergo large volume changes can be embedded as an actuator for aqueous solutions. First as a valve, we prove that the strategy consisting in grafting patterns of hydrogel enables us to obtain robust actuators able to regulate flows in micro-channels, and with a fast response by miniaturising the thermal stimulation. Then we report another configuration called free compartmentalization, applied to molecular and cellular biology.

The second part of this manuscript deals with the study of slippage by nanovelocimetry using the total internal reflection fluorescence microscopy technique. This method enables us to follow fluorescent nanoparticles flowing near the wall of a microchannel (within the first 800 nm). Using Langevin simulations, we have been able to take several experimental biases into account and correct them. We can confirm the no-slip condition of water on hydrophilic surfaces and the actual slippage over hydrophobic surfaces. This part is made of a brief introduction followed by a publication in *Journal of Fluid Mechanics*.