



Vers un dispositif de diagnostic point of care intégré : utilisation de la capillarité ainsi que des procédés de thermoformage et de sérigraphie.

David Gosselin

► To cite this version:

David Gosselin. Vers un dispositif de diagnostic point of care intégré : utilisation de la capillarité ainsi que des procédés de thermoformage et de sérigraphie.. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAI111 . tel-01798278

HAL Id: tel-01798278

<https://theses.hal.science/tel-01798278>

Submitted on 23 May 2018

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Mécanique des fluides, Procédés, Energétique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« David GOSSELIN »

Thèse dirigée par **Didier CHAUSSY**, Professeur des universités, LGP2 UMR 5518,
codirigée par **Naceur BELGACEM**, Professeur des universités, LGP2 UMR 5518, et
coencadrée par **Jean BERTHIER**, Ingénieur de recherche, CEA Grenoble DRT/LETI/DTBS/SBSC/LBAM

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie et d'Architecture Microfluidique (CEA Grenoble DRT/LETI/DTBS/SBSC/LBAM)**
et du **Laboratoire Génie des Procédés Papetiers (LGP2)**
dans l'**École Doctorale I-MEP2 (Ingénierie - Matériaux, Mécanique, Environnement, Energétique, Procédés, Production)**

Vers un dispositif de diagnostic point of care intégré: utilisation de la capillarité ainsi que des procédés de thermoformage et de sérigraphie.

Thèse soutenue publiquement le **vendredi 6 octobre 2017**
devant le jury composé de :

Mme Stéphanie BRIANCON

Professeur, Univ. Claude Bernard Lyon 1, LAGEP, Président

Mme Chantal FOURNIER-WIRTH

Directeur de recherche, EFS Pyrénées-Méditerranée, Rapporteur

M Jean-Christophe BARET

Professeur, CNRS, Univ. Bordeaux, CRPP, Rapporteur



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Jean-Christophe Baret, Stéphanie Briançon et Chantal Fournier-Wirth, en premier lieu, avoir accepté de faire partie de mon Jury de thèse mais également pour l'ensemble de leurs retours et pour les discussions intéressantes et constructives que l'on a pu avoir autour de cette thèse.

Ensuite je voudrais fortement remercier l'équipe encadrante, composée de Naceur Belgacem, Jean Berthier et Didier Chaussy, pour leur accompagnement au cours de ces trois années. Ils ont su m'apporter un subtil équilibre entre autonomie et encadrement me permettant de m'épanouir dans mon sujet sans pour autant m'égarer.

Mes remerciements vont également à Guillaume, Fabrice et Claude pour leur accueil au sein du LBAM et du SBSC du CEA de Grenoble; et à Nathalie pour toute l'aide qu'elle a pu m'apporter ainsi que sa bonne humeur.

Un grand merci à Anne-Gaëlle, Pascal, Maxime, Frédéric, Myriam et l'ensemble des personnes qui ont contribué au travail qui a été réalisé tout au long de cette thèse. J'ai la chance d'avoir pu échanger et apprendre dans de multiples disciplines, et ce, grâce à vous tous.

Je souhaiterais de même remercier la société Arjowiggins et plus particulièrement Blandine et Jean-Marie pour toute leur aide et l'intérêt qu'ils ont portés aux développements effectués au cours de notre collaboration.

Ces trois années n'auraient pas pu être aussi joyeuses et épanouissante que ce qu'elles ont été sans l'ensemble des thésards, Post-docs, CDD et stagiaires qui s'y sont mêlés. Que ce soit le « Bar du jeudi soir » devenu incontournable grâce à notre Gary préféré, les pauses café ou encore les heures passées à sauver le monde d'une certaine souche mutante ou à combattre les cylons...

Aussi, je souhaite sincèrement remercier Damien pour son soutien et sa présence sans lesquels ces années de thèse n'auraient pas été aussi agréables.

Enfin, je remercie ma famille, la famille Tourneboeuf ainsi que les Moul(inoi)s pour leur soutien et tous les moments passés avec eux permettant des ressourcements réguliers. Un remerciement tout particulier à Léonor qui m'a accompagné (et supporté) au quotidien durant ces 1101 jours qui se sont écoulés entre mes premiers pas de thésard et l'obtention de ce doctorat.

Sommaire

Introduction Générale	15
1 État de l'art	21
1.1 Vers un instrument de diagnostic Point-of-Care : Prérequis pour un tel dispositif	21
1.2 Les principaux types de diagnostics	22
1.2.1 Les immunoassays	22
1.2.2 L'amplification d'ADN	24
1.2.2.1 Quelques mots sur l'ADN	24
1.2.2.2 Les techniques d'amplifications	25
1.2.2.3 La méthode d'amplification LAMP (loop-mediated isothermal amplification)	27
1.2.3 Tableau comparatif	28
1.3 Les matériaux utilisés en microfluidique et les techniques de fabrications associées.	28
1.3.1 Le silicium et le verre	29
1.3.2 Les polymères	30
1.3.2.1 Les procédés photolithographiques	30
1.3.2.2 Le micro-usinage	30
1.3.2.3 Les procédés basés sur la réplique de moules	31
1.3.2.4 Impression 3D et fabrications additives	35
1.3.2.5 Back end processing	35
1.3.3 Les papiers et autres substrats hydrophiles	36
1.3.4 Tableau comparatif	37
1.4 Les différentes techniques d'écoulement	39
1.4.1 Génération de pression ou de débit	39
1.4.2 La microfluidique centrifuge	39
1.4.3 La microfluidique en gouttes	40
1.4.3.1 Les technologies hydrodynamiques	40
1.4.3.2 La technologie EWOD (Electro-Wetting On Dielectric)	41
1.4.4 Les systèmes microfluidiques capillaires	41
1.4.4.1 L'écoulement par imprégnation	41
1.4.4.2 L'écoulement capillaire spontané	41
1.4.5 Tableau comparatif	42
1.5 Portabilité : "Lab-on-a-chip" ou "Chip-in-a-lab"?	44
1.6 Récapitulatif et organisation de la thèse	44

2 Écoulements Capillaires spontanés	53
2.1 Notions élémentaires : Tension de surface, Angle de contact et Force capillaire	53
2.1.1 La tension de surface	53
2.1.2 L'angle de contact	54
2.1.3 La loi de Young	55
2.1.4 La force capillaire	55
2.2 Théorie des écoulements capillaires spontanés	57
2.2.1 Conditions pour un écoulement capillaire	58
2.2.1.1 Cas d'un canal uniforme	58
2.2.1.2 Cas d'un canal s'évasant	63
2.2.1.3 Écoulement capillaire dans les angles et filaments de Concus-Finn	65
2.2.1.4 Les vannes capillaires	67
2.2.2 Étude dynamique des écoulements capillaires spontanés	68
2.2.2.1 Angle de contact dynamique	69
2.2.2.2 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal uniforme	70
2.2.2.3 Cas d'un fluide non-Newtonien s'écoulant dans un canal uniforme	72
2.2.2.4 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal non-uniforme	74
Cas d'une unique constriction ou d'un unique élargissement	74
Discussion sur les changements de vitesses associés aux changements de sections.	76
Cas d'un canal ayant une succession de changements de sections.	77
2.2.2.5 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal tournant	79
2.3 Simulation d'écoulements capillaires spontanés	81
2.4 Conclusion	83
3 Fabrication d'un système microfluidique par embossage de papier et réaction de LAMP	87
3.1 Fabrication de circuits microfluidiques par embossage papier	87
3.1.1 L'embossage : Focus bibliographique	87
3.1.2 La fabrication des systèmes microfluidiques papiers : Focus bibliographique	88
3.1.3 Le procédé de fabrication développé	89
3.2 Optimisation du système papier pour la réalisation d'une réaction de LAMP	92
3.2.1 Premiers tests de bio-compatibilité avec la réaction	92
3.2.1.1 Le protocole de bio-compatibilité	92
3.2.1.2 Les tests de bio-compatibilité réalisés	93
3.2.2 Chauffage et confinement du liquide	94
3.2.3 Réaction de LAMP sur papier	98
3.3 Conclusion	101
4 Développement des fonctions nécessaires au diagnostic : le chauffage et la détection.	105
4.1 Le dispositif de chauffage	105
4.1.1 Focus bibliographique	105
4.1.1.1 Le chauffage par effet Joule	106
4.1.1.2 Le chauffage par réaction chimique exothermique	106
4.1.2 Les éléments chauffants développés	106
4.1.2.1 Étude basée exclusivement sur la convection naturelle.	108
4.1.2.2 Étude intégrant les phénomènes de conduction et de rayonnement.	110

Le modèle COMSOL	110
Validation du modèle COMSOL	111
Implémentation des flux thermiques manquants dans le modèle COMSOL	112
Prise en compte de ces flux dans l'étude analytique	113
4.1.3 Impact de l'intégration système de ces éléments	116
4.2 La détection	118
4.2.1 Focus bibliographique	119
4.2.1.1 Détection d'une amplification d'ADN	119
Les méthodes de fluorescence	119
Les méthodes électrochimiques	121
Le couplage entre amplification d'ADN et test bandelette	123
La détection de la réaction d'amplification <i>via</i> celle des produits secondaires . .	124
4.2.1.2 La détection pH et la PolyAniline	126
4.2.2 La détection par potentiométrie	127
4.2.2.1 Caractérisation des électrodes	128
Effet du confinement microfluidique	130
La réponse temporelle : impact de la quantité de PANi déposée.	130
La sensibilité des électrodes	131
Impact de la température	133
4.2.2.2 Le protocole de "LAMP pHmétrique"	135
4.2.2.3 Détection d'une réaction de LAMP	137
Optimisation des électrodes pour une réaction de LAMP	137
Le suivi d'une réaction de LAMP par potentiométrie	138
Un système permettant une "double" détection.	140
4.3 Conclusion	140
5 Vers un système intégré : Premiers pas et perspectives.	147
5.1 Focus bibliographique	147
5.2 L'intégration des briques élémentaires	149
5.2.1 Les premiers pas vers un système sur support papier	151
5.2.2 Démonstration de l'approche sur un support plastique	151
5.2.3 Vers un système totalement intégré et sur papier	154
5.3 Conclusion	154
Conclusion	157
Annexes	161
A1 Vue supérieure des masques de sérigraphies	161
A2 Annexe : Calcul des concentrations des différentes espèces dans les solution de PBS	164
A3 Annexe : Evolution du pH de l'eau avec la température	166
Résumé en français	172
English summary	172

Table des figures

1	Évolution du nombre de publications sur le thème de la microfluidique au cours des 26 dernières années. Données recueillies sur le moteur de la base de donnée Scopus.	15
2	Représentation des différents types d'écoulement en fonction du nombre de Reynolds.	16
3	Schéma illustrant le concept de laboratoire sur puce [3].	17
1.1	Un exemple d'application médicale des tests bandelettes : Test bandelette urinaire [4].	22
1.2	Les différents formats d'immunoassays. A) Test direct. B) Test indirect. C) Test en sandwich. D) Test par compétition.	23
1.3	Schéma de fonctionnement d'un test de grossesse [5].	24
1.4	Schéma de principe d'une réaction enzymatique [6].	24
1.5	A) Schéma de la structure en double hélice de l'ADN [8]. B) Structure chimique de l'ADN [9].	25
1.6	Étape d'élongation d'un primer par une ADN polymérase [11].	26
1.7	Schéma de principe d'une réaction de PCR [11].	27
1.8	Schéma représentant les mécanismes de la réaction de LAMP. Adapté de [20]	29
1.9	Principe de la photolithographie. A) Création d'un canal ouvert. B) Création d'un canal fermé en utilisant une couche sacrificielle.	31
1.10	Étapes de réalisation d'un canal microfluidique en PDMS par procédé de casting.	32
1.11	Schéma d'une extrudeuse utilisée pour le procédé d'injection moulage [35].	33
1.12	Schéma de principe du procédé de thermoformage.	34
1.13	Schémas de principe de l'embossage. A) Embossage avec un moule et un contre moule. B) Embossage avec un unique moule et un gaz sous pression.	34
1.14	Schéma de principe de la stéréolithographie [43].	35
1.15	Un diagnostic basé sur l'imprégnation d'un substrat papier : le test de grossesse [48].	36
1.16	Exemple d'un dispositif dit "Paper-based". Adapté de [50]	37
1.17	Exemple d'un Lab-on-a-disc [59].	40
1.18	Schéma expliquant la formation de gouttes selon trois principes hydrodynamiques. Adapté de [67]	40
1.19	Schéma de principe de l'électromouillage.	41
1.20	Illustration d'un écoulement capillaire spontanée. Images obtenues avec Surface Evolver [75].	42
2.1	A l'interface liquide/gaz les molécules du liquide possèdent moins d'interactions que dans le volume du liquide. Cela est traduit macroscopiquement par le notion de tension de surface γ	54
2.2	A) Minimisation de l'énergie de surface d'un film d'eau savonneuse fixé à un cadre dont une des parois est mobile. B) Représentation de la tension de surface par une force linéique.	54
2.3	Schéma définissant la grandeur d'angle de contact θ	54
2.4	Une surface est caractériser d'hydrophile ou d'hydrophobe suivant son angle de contact.	55

2.5	A) Schéma explicitant la notion de ligne triple. B) Équilibre atteint par les forces de tensions de surface au niveau d'un point de la ligne triple.	55
2.6	Phénomène de montée capillaire. A) Cas d'un liquide mouillant. B) Cas d'un liquide non mouillant.	56
2.7	Importance de la gravité et caractérisation avec le nombre de Bond. A) Cas où la gravité est négligeable ($Bo < 1$). B) Cas où la gravité n'est pas négligeable ($Bo > 1$).	57
2.8	Rayons de courbures principaux d'une interface (R_1 et R_2).	58
2.9	Formation d'une caténoïde par un film de savon étiré entre deux anneaux.	59
2.10	Photo du réservoir d'un système microfluidique à écoulement capillaire spontané.	59
2.11	Schéma d'un canal microfluidique suspendu.	60
2.12	Déformation l'interface inférieure du liquide par la gravité lorsque la largeur du canal augmente.	60
2.13	Illustration de l'augmentation de surface dA_i des différentes surfaces de contact lorsque le liquide avance d'une distance dx dans le canal.	61
2.14	Graphiques représentant la condition d'écoulement capillaire spontané pour un canal ouvert de section rectangulaire.	62
2.15	Graphique représentant la condition d'écoulement capillaire spontané pour un canal suspendu.	63
2.16	Observations expérimentales des filaments de Concus-Finn.	65
2.17	Schéma de la présence d'un filament capillaire dans un angle de demi mesure α	65
2.18	Vue en coupe d'un canal rectangulaire ouvert présentant des filaments de Concus-Finn mais pas d'écoulement capillaire spontané.	66
2.19	Exemple de géométrie de canal permettant d'obtenir des filaments capillaire sans écoulement capillaire spontané bien que la condition de l'équation 2.23 soit respectée.	66
2.20	Rétablissement de l'écoulement capillaire spontané, lorsque la géométrie permet aux deux filaments de se rejoindre. Phénomène observé avec des simulations (à gauche) et expérimentalement (à droite).	67
2.21	Graphique répertoriant les différents types d'écoulements pour un canal rectangulaire ouvert. Adapté de [18]	67
2.22	Les filaments de Concus-Finn ne sont pas arrêtés par une vanne stop classique.	68
2.23	La présence d'une marche permet d'arrêter également les filaments de Concus-Finn.	68
2.24	Dépendance de l'angle de contact dynamique à la vitesse de propagation de l'interface liquide.	69
2.25	Schéma définissant la longueur de friction λ à partir du profil de vitesse de l'écoulement.	70
2.26	Validation expérimentale de la loi théorique de l'Eq 2.34.	71
2.27	Définition de la longueur de frottement équivalente L_{eq}	76
3.1	Procédé d'embossage en Roll-to-Roll (adaptée de [8])	88
3.2	Illustration d'un dispositif microfluidique papier (extrait de [10])	88
3.3	Illustration d'un dispositif microfluidique papier (extrait de [25])	89
3.4	L'EvaGreen comme marqueur fluorescent de l'ADN.	93
3.5	Courbes de fluorescence de témoins positif et négatif d'une amplification LAMP.	93
3.6	Étapes de fermeture d'un circuit embossé sur papier.	94
3.7	Suivi de l'évaporation lorsque le papier SBR-SA est porté à 65°C.	95
3.8	Dispositif de mesure du Varimasse.	95
3.9	Schéma des différentes surfaces d'échange de l'échantillon avec l'environnement.	96
3.10	Courbes de sorption/desorption obtenues avec le varimasse pour le papier SBR-SA.	96
3.11	Réponse linéaire du changement de masse au changement d'humidité.	97
3.12	Courbes de sorption/desorption obtenues avec le Varimasse pour le papier Alu-SA.	98

3.13 Suivi de l'évaporation lorsque le papier Alu-SA est porté à 65°C.	98
3.14 Analyse de témoins positif et négatif sur gel d'électrophorèse.	99
3.15 Fermeture d'un circuit embossé sur papier avec du scotch double face découpé.	99
3.16 Analyse sur gel d'électrophorèse d'une réaction de LAMP dans un dispositif Alu-SA.	100
3.17 Analyse sur gel d'électrophorèse d'une réaction de LAMP dans un dispositif Alu-SA coaté avec de la BSA.	100
3.18 Test de bio-compatibilité du revêtement Alu-SA : Courbes en fluorescence.	100
3.19 Test de bio-compatibilité du revêtement Alu-SA : Gel d'electrophorèse.	101
4.1 Schéma d'un élément chauffant.	107
4.2 Photographie des différents éléments chauffants réalisés.	107
4.3 Schéma des flux thermiques aux frontières du carbone.	110
4.4 Vue en coupe du modèle implémenté dans COMSOL Multiphysics	110
4.5 Influence de la répartition des flux de convections.	112
4.6 Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte uniquement la convection.	112
4.7 Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte la convection et la conduction latérale.	113
4.8 Résultats d'une simulation : A) Carte couleur de la température de l'élément chauffant. B) Profil de température associé à la ligne noire de A)	114
4.9 Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte la convection, la conduction latérale et le rayonnement du carbone.	115
4.10 Valeurs du flux de conduction latérale simulées avec COMSOL.	115
4.11 Normalisation du flux de conduction latérale par la surface d'échange de convection.	116
4.12 Une chambre microfluidique est collée sur l'élément chauffant. Un thermocouple y est intégré.	117
4.13 Influence de la présence de la chambre microfluidique sur la température de l'élément chauffant.	117
4.14 Représentation 1D, en schéma équivalent électrique, d'un élément chauffant sans (A) ou avec (B) la chambre microfluidique.	118
4.15 Influence de la présence de la chambre microfluidique sur la dynamique de l'élément chauffant.	118
4.16 Quantification de l'ADN présent dans l'échantillon par une détection en temps réel.	119
4.17 Fonctionnement de la détection par fluorescence en utilisant une sonde TaqMan.	120
4.18 Schéma d'un montage de mesure en voltampérométrie cyclique.	121
4.19 Exemple de courbe obtenue en voltampérométrie cyclique.	121
4.20 Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique en phase solide proposée dans la référence [27]	122
4.21 Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique, <i>via</i> une sonde immobilisée marquée RedOx, proposée dans la référence [31]	123
4.22 Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique, <i>via</i> une sonde marquée avec une enzyme. Extrait et traduit de la référence [35]	123
4.23 Schéma du cycle de réactions conduisant à l'incorporation d'une base nucléique lors de l'élongation d'un brin d'ADN. Extrait de [39].	124
4.24 Détection colorimétrique d'une réaction de LAMP grâce à des indicateurs pH colorés. Extrait de [43]	125
4.25 Courbe de voltampérométrie cyclique de la PolyAniline. Extrait de [46]	126

4.26 Schéma des différents états de la PolyAniline. Extrait de [48]	127
4.27 Les quatre designs d'électrodes proposées au cours de cette thèse.	128
4.28 Photographie d'un système d'acquisition potentiométrique ultra-portable.	128
4.29 Photographie d'un système d'électrodes sérigraphiées et de son intégration microfluidique.	129
4.30 Courbes de réponses potentiométriques lors de l'injection ponctuelle de PBS.	130
4.31 Courbes de réponses potentiométriques à la première hydratation, pour différentes quantités de PANi déposées.	131
4.32 Courbes de réponses potentiométriques à un saut de trois unités pH, pour différentes quantités de PANi déposées.	131
4.33 Courbes de réponses potentiométriques à une succession de saut de pH.	132
4.34 Droite de calibration des électrodes développées.	133
4.35 Courbes de réponses potentiométriques à une succession de saut de température.	134
4.36 Réponses des électrodes développées aux changements de températures avec une solution de PBS à $pH = 6,4$	134
4.37 Réponses des électrodes développées aux changements de températures avec des solution de PBS à différents pH.	135
4.38 Echelle colorimétrique du rouge de Crésol. Extrait de [56].	136
4.39 Photographies de la gamme de mélange réactionnel LAMP colorimétrique à différents moments de la réaction d'amplification.	136
4.40 Premiers instants de la réponse potentiométrique des différentes solutions de PANi.	138
4.41 Courbes de réponses potentiométriques lors de réactions de LAMP positive (en bleu) et négative (en jaune).	140
4.42 Schéma de principe de la double mesure possible avec les électrodes de PANi.	141
5.1 Exemple de systèmes microfluidiques utilisant un boîtier indépendant pour effectuer et détecter la réaction d'amplification d'ADN. Extraits de [4] (A) et [5] (B).	148
5.2 Séquences des étapes manuelles pour la réalisation d'une réaction d'amplification d'ADN avec le système présenté en référence [6].	149
5.3 Exemples de systèmes où toutes les étapes nécessaires au diagnostic par amplification d'ADN sont intégrées. Extraits de [12] (A) et [13] (B).	150
5.4 Observation de fissures sur les éléments chauffants sérigraphiés sur support papier.	151
A1.1 Schéma de l'ensemble de la planche des éléments chauffants sérigraphiés.	162
A1.2 Schéma de l'ensemble de la planche de sérigraphie comprenant électrodes et éléments chauffants.	163

Liste des tableaux

1.1	Tableau comparant les principaux types de diagnostics évoqués dans ce paragraphe.	28
1.2	Tableau comparant les différents matériaux évoqués dans ce paragraphe.	38
1.3	Tableau comparant les principaux procédés de fabrication de systèmes microfluidiques. . . .	38
1.4	Tableau comparant les principales techniques d'écoulement utilisées en microfluidique. . . .	43
2.1	Expressions des longueurs de frictions moyennes pour les géométries les plus courantes. Ex- trait de [27].	71
3.1	Récapitulatif des différents polymères testés.	94
4.1	Dimensions des éléments chauffants de la série " <i>a</i> ".	107
4.2	Dimensions des éléments chauffants de la série " <i>b</i> ".	108
4.3	Dimensions des éléments chauffants de la série " <i>c</i> ".	108
4.4	Les différentes dilutions de PANi utilisées.	130
4.5	Gamme de volume de KOH utilisée pour l'optimisation du mélange réactionnel LAMP colori- métrique.	136
4.6	Tableau résumant les différentes quantités de KOH ajoutées à la solution de PANi pour son optimisation.	137
A2.1	Tableau résumant la composition des espèces utilisées pour la préparation d'une solution de PBS.	164
A2.2	Tableau résumant les réactions se produisant dans la solution ainsi que leur constante de ré- action.	164

Introduction Générale

La microfluidique est un domaine scientifique caractérisé par la manipulation d'un fluide dans un système ayant une dimension caractéristique sub-millimétrique. Il s'agit d'un domaine très vaste puisqu'un grand nombre de secteurs d'activités, telles que la chimie, l'industrie alimentaire, l'environnement, ou encore la biologie et les biotechnologies, peut être amenés à se servir de systèmes microfluidiques. En effet, l'utilisation de ces derniers peut conférer de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de systèmes macroscopiques. Cette thématique connaît ainsi une forte émulation depuis une quinzaine d'années (Figure 1) : le nombre de publications annuelles référencées dans Scopus est passé de 172 en 2000 à 4865 en 2015.

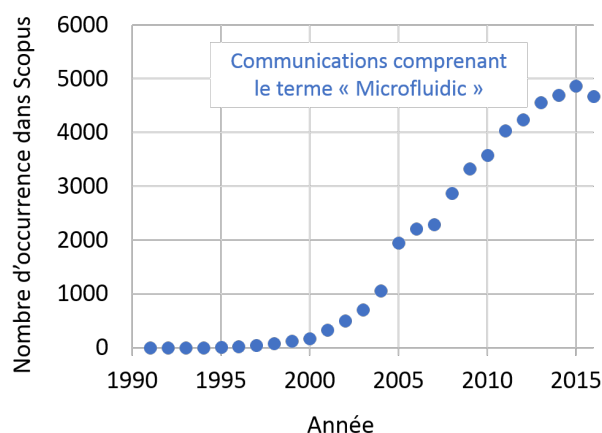


FIGURE 1 – Évolution du nombre de publications sur le thème de la microfluidique au cours des 26 dernières années. Données recueillies sur le moteur de la base de donnée Scopus.

Parmi les avantages des systèmes microfluidiques, on peut par exemple citer le fait que l'écoulement des liquides au sein de ceux-ci est principalement laminaire, à l'opposé des écoulements dits turbulents. L'importance relative de ces différents régimes est caractérisée par une grandeur adimensionnelle appelé nombre de Reynolds :

$$Re = \frac{V * D}{\nu} \quad (1)$$

où V est la vitesse moyenne de l'écoulement (en m/s), D une longueur caractéristique du canal (en m) et ν la viscosité cinématique du fluide s'y écoulant (en m^2/s). Ce nombre permet de quantifier le rapport entre les forces d'inerties et les forces de viscosités. Lorsque l'importance des forces d'inerties sont assez faibles (typiquement $Re \lesssim 50$), l'écoulement est laminaire. C'est-à-dire que les lignes de courant sont stables temporellement et reproductibles d'un écoulement à un autre. Parmi les écoulement laminaires, on peut distinguer l'écoulement de Stokes ($Re < 1$) de l'écoulement inertiel ($1 < Re < 50$). Dans le premier cas l'écoulement est totalement réversible alors que dans le second cas, des recirculations stables peuvent

apparaître (Figure 2). Lorsque les forces d'inerties sont au contraire très élevées (typiquement $Re \gtrsim 1000$), l'écoulement devient turbulent et chaotique. Il n'est alors plus possible de simuler un état stationnaire pour l'écoulement de ces systèmes et seul un écoulement moyenné est accessible. Il est alors intéressant de remarquer que même pour un canal microfluidique large (1 mm) dans lequel de l'eau s'écoulerait rapidement (1 cm/s), le nombre de Reynolds vaut 0,01 et l'écoulement y est laminaire. Un des grands avantages de ce type d'écoulement, est que les profils de vitesses peuvent être calculés ou simulés avec précisions. Ainsi la compréhension des phénomènes se déroulant dans ces systèmes se trouve simplifiée.

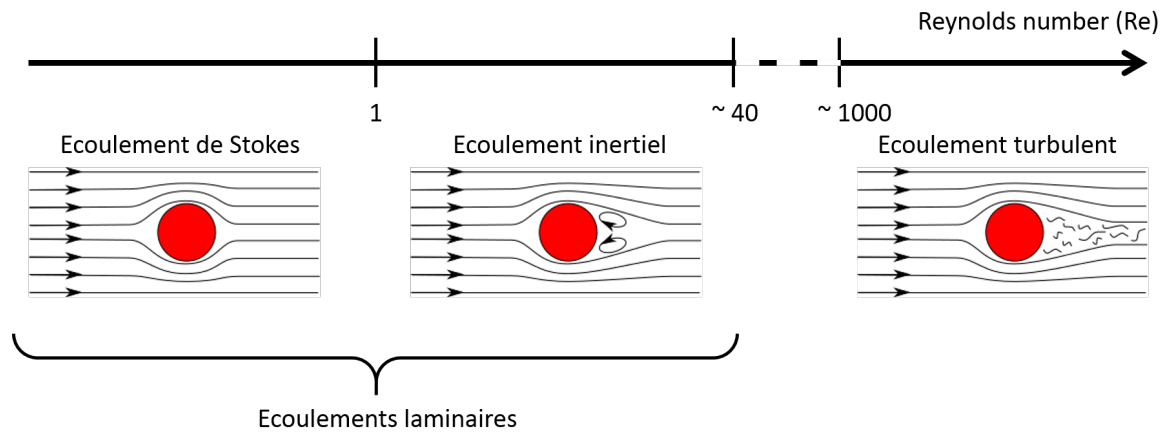


FIGURE 2 – Représentation des différents types d'écoulement en fonction du nombre de Reynolds.

Outre les avantages liés aux propriétés physiques des écoulements laminaires, le fait d'utiliser de petites quantités de fluides a d'autres bénéfices inhérents en chimie et biochimie [1, 2]. En effet, les volumes étant faibles, peu de réactifs sont nécessaires pour effectuer des réactions. Cela engendre donc une réduction des coûts du système car ces derniers peuvent être très onéreux. Une autre conséquence est la faible quantité de déchets en sortie du système, ce qui va rendre plus simple leurs traitements. D'autre part, des opérations telles que le chauffage ou le refroidissement de ces petits volumes de liquides sont plus efficaces, plus précises et moins énergivores que lorsqu'il s'agit de grands volumes. Cela peut ainsi permettre de se positionner à un point de fonctionnement précis afin de permettre une réaction chimique ou biologique, ou encore d'en améliorer le rendement. Cela est, par exemple, particulièrement intéressant pour les réactions enzymatiques qui possèdent un fonctionnement optimal à une température bien précise.

Une forte émulation avait déjà eu lieu autour d'un autre type de miniaturisation : celle des systèmes électroniques. Cette dernière a notamment permis la miniaturisation des composants électroniques et leur intégration sur des circuits électroniques (aussi appelés puces électroniques), conduisant *in fine* aux appareils électronique que l'on connaît aujourd'hui : ordinateurs, téléphones, tablettes, ... Cette approche d'intégration est également présente avec la microfluidique et les systèmes développés sont couramment appelés laboratoires sur puce ("Lab-on-a-chip" en anglais). En effet, grâce aux technologies de la microfluidique, il est alors possible d'imaginer intégrer l'ensemble des fonctions ordinairement réalisées en laboratoire dans un système microfluidique (Figure 3).

La microfluidique se présente alors comme un excellent outil pour des études fondamentales. Grâce à ses avantages et dans le cadre des études liées à la biologie, la microfluidique va permettre d'effectuer des études plus précises dans des domaines tels que la cellomics, la proteomics, la genomics, etc.

Conscient du bénéfice que les systèmes microfluidiques pourraient également apporter à des études plus appliquées, G. M. Whitesides propose, dans un éditorial pour la revue "Lab on Chip" [4], deux thématiques qu'il considère comme clefs. La première est la pharmacologie et le développement des médi-

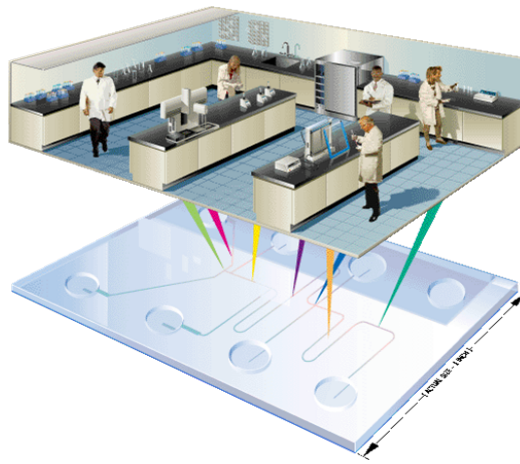


FIGURE 3 – Schéma illustrant le concept de laboratoire sur puce [3].

caments. En effet, le coût engendré par les différents essais nécessaires pour tester les réactions des êtres humains aux nouveaux médicaments rend leur développement extrêmement cher. Dans ce sens, la reconstruction de tissus biologiques, d'organes, de vaisseaux sanguins, et leur association pourraient apporter un second souffle à ces études. Grâce à cette technologie couramment appelée "Organ-on-a-chip", les molécules développées pourraient alors être testées directement in-vitro sur des tissus/organes humains reconstruits.

Le second sujet mis en avant par G. M. Whitesides est le développement d'outils de diagnostics médicaux pour les pays en voie de développement. En effet, l'utilisation de systèmes microfluidiques pourrait permettre d'allier l'efficacité et le bas-coût requis pour ces derniers. De plus, il est à noter que le développement de tels systèmes serait également bénéfique pour les pays développés car cela participerait au développement de systèmes Home-Care que tout un chacun pourrait acheter en pharmacie. Ces systèmes de diagnostics qui peuvent être utilisés en dehors d'infrastructure médicalisée sont souvent dénommés systèmes Point-of-Care (ou PoC) car ce sont des outils qui peuvent être utilisés directement au chevet du patient. Cependant, malgré l'apparition d'un fort engouement pour cette thématique, à l'heure actuelle, de tels dispositifs n'arrivent que lentement sur le marché. Une des explications données par Sackmann et al. [5] à ce manque de produit fini est le peu d'interactions entre les différents acteurs. En effet la pluridisciplinarité importante de tels sujets (physique, biologique, clinique, matériaux, procédés, etc) nécessite des collaborations entre des personnes de ces différentes spécialités. Or il se trouve que beaucoup d'aspects (matériaux, génie des procédés, contrôles de l'écoulement, systèmes de détection, ...) restent développés sans lien entre eux. Cela conduit principalement à des résultats visant à résoudre des problèmes spécifiques et non pas à développer des applications biotechnologiques. En d'autres termes, cela conduit généralement à des systèmes complexes qui ne sont pas transposables en des outils de type Point-of-Care ou Home-Care. Cette approche implique donc de devoir prendre en compte les contraintes associées au dispositif de type Point-of-Care dès les premières ébauches d'un système. En particulier, il semble important de concevoir l'intégration des différents composants du système d'une façon cohérente, et en prenant en compte l'ensemble des contraintes imposées par l'application finale ciblée. Le travail effectué au cours de cette thèse a donc été réalisé dans l'optique de proposer une réponse à cette problématique d'intégration dans le cadre du développement d'un système microfluidique de diagnostic Point-of-Care basé sur une réaction d'amplification isotherme : la LAMP. Cette thèse sera ainsi axée sur le développement d'un dispositif de diagnostic à bas-coût par des procédés de fabrication permettant de faciliter l'intégration des différentes briques technologiques nécessaires pour ce diagnostic.

Afin de répondre au mieux à cette problématique, le premier chapitre sera dédié à l'analyse des contraintes liées à l'application ciblée. Ce chapitre permettra notamment de justifier les choix de procédé de fabrications utilisés au cours de cette thèse, à savoir thermoformage et impression sérigraphique, mais également d'expliquer le choix de procéder à la réalisation de ces systèmes sur papier ou film plastique. Nous verrons également dans ce premier chapitre que l'utilisation des forces capillaires pour déplacer les fluides dans de tels systèmes paraît nécessaire.

Le deuxième chapitre est ainsi consacré à l'étude des écoulements capillaires spontanés. Tout d'abord, la condition d'établissement d'un tel écoulement dans un canal de section uniforme sera présentée puis étendue au cas des canaux divergents. Ensuite la dynamique de ces écoulement sera étudiée et plus particulièrement le cas des fluides non Newtoniens tels que le sang ainsi que le cas de canaux de section non uniforme. Finalement la possibilité d'effectuer des simulations des écoulements capillaires spontanés avec le logiciel COMSOL Multiphysics sera discutée.

Le troisième chapitre est ensuite dédié à la présentation du procédé de fabrication de systèmes microfluidiques développé au cours de cette thèse. Ce dernier utilise le papier comme support et le thermoformage pour la réalisation du système microfluidique. En effet, l'association de ces deux éléments permet d'allier faible coût et possibilité de production en série.

Le quatrième chapitre traitera de la réalisation et de l'optimisation de deux éléments fonctionnels nécessaires à la réalisation d'un diagnostic par amplification d'ADN : le chauffage et la détection. Afin de simplifier l'intégration de ces deux éléments, il a été choisi de les réaliser, tout deux, par procédé d'impression sérigraphique. En effet, ce procédé est compatible avec les supports envisagés (papier et film plastique) ainsi qu'avec une production en série. Au cours de ce chapitre, les deux éléments fonctionnels seront étudiés de façon séparée. Concernant les éléments chauffants, il sera montré qu'un échauffement par effet Joule des éléments sérigraphiés peut permettre d'atteindre la température de 65°C nécessaire pour la réaction de LAMP avec un faible voltage (<5V), mais également que la température de chauffage est prédictible, en fonction de leur dimension ainsi que de la tension appliquée. La seconde partie de ce chapitre est ensuite consacrée à la détection de la réaction de LAMP. Pour celle-ci, une méthode électrochimique, plus précisément la potentiométrie est utilisée. Cette dernière permet, grâce à des électrodes sérigraphiées à base de PolyAniline, de suivre en temps réel la réaction d'amplification *via* le suivi de la production d'ions hydroniums par l'ADN polymérase. Finalement, il sera montré que cette méthode électrochimique offre une sensibilité comparable avec la méthode classiquement utilisée en laboratoire : le suivi par fluorescence.

Finalement le dernier chapitre de ce manuscrit décrira l'intégration des différents éléments étudiés et développés au cours des chapitres précédents dans un système microfluidique. Il sera montré que l'utilisation d'une méthode d'impression pour la réalisation des éléments fonctionnels permet la superposition de ces derniers. De plus, il sera démontré que le choix de coupler le procédé de sérigraphie avec celui de thermoformage permet une intégration des éléments fonctionnels à l'intérieur du système microfluidique. En effet les éléments sérigraphiés pourront être thermoformés sans perdre leur fonctionnalités.

Bibliographie

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms : Requirements, characteristics and applications," vol. 39, pp. 1153–1182, Feb. 2010.
- [2] B. H. Weigl, R. L. Bardell, and C. R. Cabrera, "Lab-on-a-chip for drug development," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, pp. 349–377, Feb. 2003.
- [3] "Lab-on-Chip | biorigami." <http://www.biorigami.com/?tag=lab-on-chip>.
- [4] G. M. Whitesides, "Cool, or simple and cheap? Why not both?," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 1, pp. 11–13, 2013.
- [5] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, "The present and future role of microfluidics in biomedical research," *Nature*, vol. 507, pp. 181–189, Mar. 2014.

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Vers un instrument de diagnostic Point-of-Care : Prérequis pour un tel dispositif

Malgré les avancées de la médecine, les maladies infectieuses posent encore de grands problèmes dans les pays en voie de développement [1]. Un des éléments clés, si ce n'est le plus important, pour traiter une maladie est son diagnostic. S'il est primordial d'administrer un traitement aux patients le nécessitant, il faut éviter que le traitement ne soit donné aux autres. En effet si un traitement non nécessaire est administré, cela peut accélérer la mutation des micro-organismes pathogènes en des espèces plus résistantes. Il faut donc que le diagnostic soit fiable et robuste.

D'autre part, même si la pauvreté des populations dans les pays en voie de développement est un facteur important à prendre en compte pour le développement des outils de diagnostics, le manque d'infrastructure spécialisée l'est tout autant. Dans certains cas, des ressources élémentaires telles que l'eau potable ou même l'électricité ne sont pas disponibles sur les lieux où sont effectués les diagnostics [2]. C'est pourquoi le bas-coût et l'efficacité ne sont pas les seuls critères pour de tels outils de diagnostics.

En 2003 l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a introduit une liste de pré-requis qu'un outil de diagnostic devait posséder pour être totalement adapté à ces utilisations. Cette liste est souvent citée par son abréviation "ASSURED" [3] :

- Affordable : Tous ceux qui en ont besoin ont les moyens de se le procurer.
- Sensitive : Les faux-négatifs doivent être évités.
- Specific : Les faux-positifs doivent être évités.
- User-friendly : Le dispositif de diagnostic doit pouvoir être utilisé sans (ou avec très peu) de formation préalable.
- Rapid and Robust : Le résultat doit être procuré rapidement et le stockage ne doit pas être un souci et ce, quelles que soient les conditions.
- Equipment-free : Le dispositif ne doit pas nécessiter de source d'alimentation ou d'appareillage extérieur.
- Delivered : Le dispositif doit être disponible pour les populations qui en ont besoin.

Les prochaines sections de l'introduction présentent, à la lumière de ces pré-requis, les principaux types de diagnostics, les matériaux et les techniques de fabrication utilisés en microfluidique, ainsi que les moyens d'actionnement de l'écoulement. Ensuite la problématique de l'intégration des différentes fonctions nécessaires aux diagnostics sera évoquée. La dernière section récapitulera les choix faits pour cette thèse et présentera l'organisation de ce manuscrit.

1.2 Les principaux types de diagnostics

Il existe des diagnostics très faciles d'utilisations qui permettent, grâce à une réaction provoquant un changement de couleur, une détection semi-quantitative de certaines molécules ou marqueurs biologiques. Un exemple d'un tel test est la bandelette urinaire qui, après une brève immersion dans un échantillon d'urine, permet d'y mesurer de façon semi-quantitative la concentration en glucose, protéines, leukocytes, etc (Figure 1.1). Certains problèmes de santé tels que, par exemple, des infections urinaires, des troubles rénaux ou hépatiques, peuvent ainsi être dépistés rapidement. Cependant l'utilisation de tels tests reste limitée à une petite quantité de molécules et de marqueurs pour lesquels une réaction (ou une suite de réactions) chimique et/ou enzymatique induisant un changement de couleur est connue. Afin d'effectuer des diagnostics plus variés et notamment pour détecter la présence d'éléments pathogènes spécifiques, des tests basés sur la reconnaissance spécifique entre anticorps et antigènes ou entre des brins d'ADN sont généralement utilisés.



FIGURE 1.1 – Un exemple d'application médicale des tests bandelettes : Test bandelette urinaire [4].

1.2.1 Les immunoassays

Le terme d'immunoassay est générique et fait référence aux différents tests qui reposent sur la spécificité de l'interaction entre anticorps et antigènes. La détection est quant à elle effectuée par le biais d'un marqueur attaché à l'anticorps (ou à l'antigène). Ce marquage peut être effectué par différentes méthodes : par exemple avec des marqueurs électrochimiluminescents, fluorescents ou colorimétriques, mais également par des isotopes radioactifs, des sondes ADN, ou encore avec une enzyme. Les immunoassays les plus couramment utilisés sont ceux basés sur un marqueur colorimétrique, comme le test de grossesse, ou ceux basés sur un marquage enzymatique, appelés tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Cependant avant de donner un peu plus de détails sur ces deux types de diagnostics, nous allons voir que différents protocoles de test sont réalisables : Un immunoassay peut être *direct*, *indirect*, en *sandwich* ou en *compétition*.

Dans le cas d'un test *direct* la solution dans laquelle on souhaite tester la présence d'un antigène est tout d'abord laissée en incubation afin que les différents antigènes et anticorps s'adsorbent sur la surface du test. Dans un second temps une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) est utilisée pour passiver la surface et éviter toute adsorption non-spécifique des anticorps marqués qui sont ensuite ajoutés. Ces anticorps vont se lier spécifiquement à l'antigène que l'on souhaite détecter si celui-ci est présent, permettant sa détection. (Figure 1.2 A)).

Le second format décrit ici est dit *indirect*. Il est composé des mêmes premières étapes qu'un test direct dans le cas où l'on souhaite détecter un antigène, *i.e.* adsorption non spécifique de la solution à tester, blocage de la surface par de la BSA, et ajout de l'anticorps spécifique de l'antigène à détecter. La différence

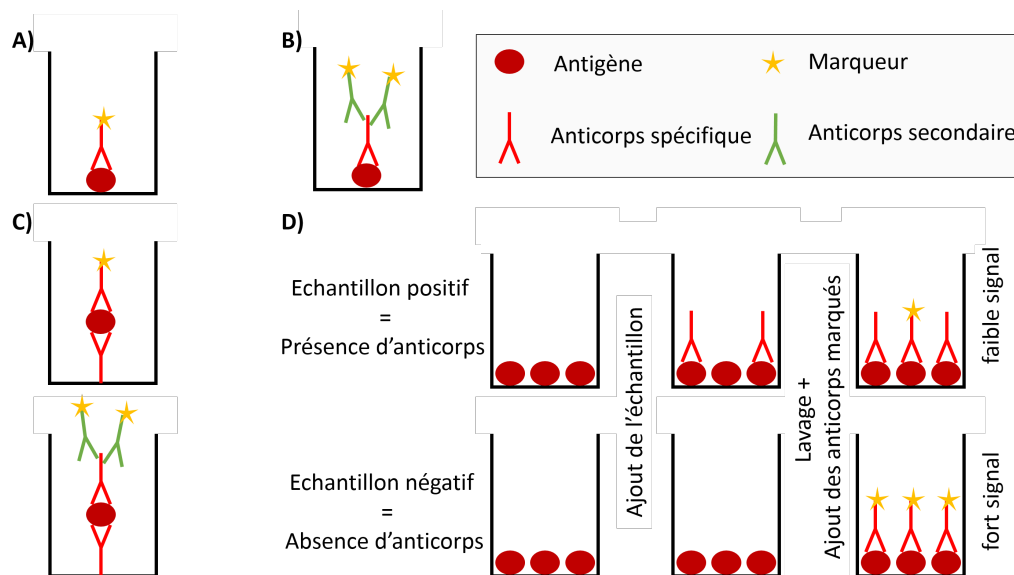


FIGURE 1.2 – Les différents formats d'immunoassays. **A)** Test direct. **B)** Test indirect. **C)** Test en sandwich. **D)** Test par compétition.

réside dans le fait que cet anticorps spécifique dit anticorps primaire n'est pas marqué. La détection se fait après l'ajout d'un deuxième anticorps dit anticorps secondaire, qui lui est marqué et qui se lie à l'anticorps primaire. Bien qu'elle possède une étape de plus, cette technique présente un important avantage par rapport à un test *direct* : l'anticorps marqué peut être générique et ainsi être utilisé avec différents anticorps primaires. De plus, comme plusieurs anticorps secondaires peuvent s'attacher à un anticorps primaire, la sensibilité s'en trouve augmentée (Figure 1.2 **B**).

Un troisième format est le test en *sandwich*. Ici des anticorps dit de captures, spécifiques à l'élément que l'on souhaite détecter, couvrent la surface du test. Cela permettra la capture des antigènes présents dans l'échantillon lors de son passage. Ensuite un immunoassay direct ou indirect peut être effectué afin de visualiser le résultat (Figure 1.2 **C**). Cette méthode permet d'avoir une meilleure spécificité car il y a deux étapes de reconnaissance spécifique antigènes/anticorps.

Le dernier type de test est dit *par compétition*. Pour ce format, les anticorps que l'on cherche à détecter sont en compétition avec des anticorps marqués. Ainsi plus l'échantillon à tester possède d'anticorps moins il y aura d'anticorps marqués qui se lieront aux antigènes spécifiques présents en surface du test (Figure 1.2 **D**). Contrairement aux tests précédents, pour un immunoassay par compétition, la présence d'anticorps dans l'échantillon se traduit par une diminution de signal.

Parmi ces différentes catégories d'immunoassays, les tests les plus répandus sont les tests *en sandwich*. En effet, comme évoqué dans les descriptions précédentes, ils procurent une meilleure spécificité que les autres tests du fait de la présence de deux étapes de reconnaissance antigène/anticorps. C'est d'ailleurs sur ce principe qu'est basé le bien connu test de grossesse (Figure 1.3).

Dans le cas du test de grossesse, le marquage est généralement effectué grâce à des billes de latex colorées ce qui permet une détection simple, à l'oeil nu, mais également des coûts de fabrication relativement faibles. Ce type de tests convient particulièrement bien à cette application car la molécule ciblée (l'hormone chorionique gonadotrope humaine, souvent abrégée hCG) est présente en très grande quantité dans l'urine lors d'une grossesse. Lorsque la molécule cible est présente en moins grande quantité, une méthode indirecte peut être utilisée afin d'augmenter le nombre de marqueurs par molécule cibles. Cependant cette augmentation n'étant pas très conséquente, cette méthode est généralement couplée à l'utilisation d'un marquage enzymatique. Il s'agit alors d'un test ELISA indirect. En effet l'utilisation d'un marquage

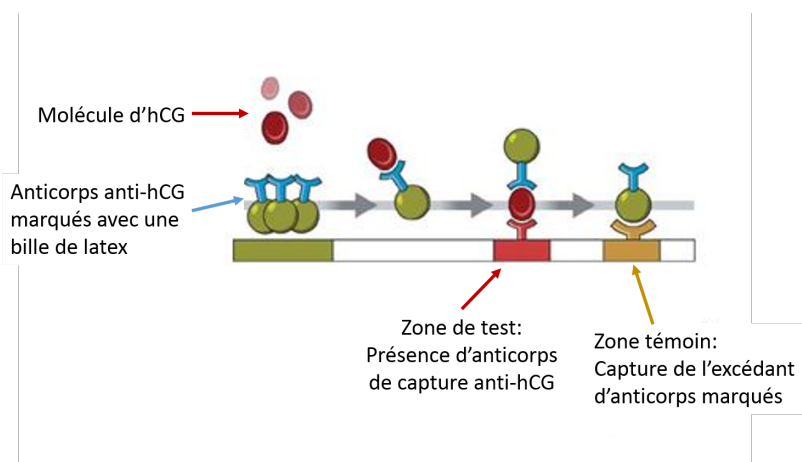


FIGURE 1.3 – Schéma de fonctionnement d'un test de grossesse [5].

enzymatique va permettre une amplification du signal.

Dans le cas d'un test ELISA, la détection est faite par un changement de couleur induit par l'action de l'enzyme sur un réactif (appelé substrat) présent dans la solution (Fig 1.4). Comme une seule enzyme permet la transformation d'un grand nombre de substrats, le signal s'en trouve amplifié.

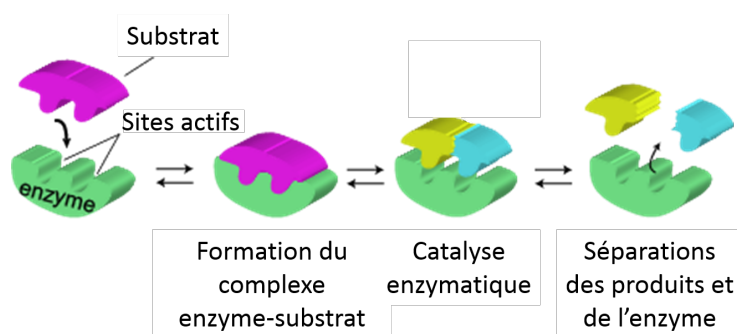


FIGURE 1.4 – Schéma de principe d'une réaction enzymatique [6].

D'une façon générale ces types de diagnostics sont très bien adaptés aux spécificités requises pour les instruments dits Point-of-Care puisque leurs utilisations sont simples, qu'ils ne nécessitent pas d'instrumentation particulière et qu'ils sont peu chers. En revanche ce type de diagnostic montre des limitations en terme de sensibilité ou de spécificité [7]. En particulier le seuil de détection peut être assez élevé car ces tests (y compris les tests ELISA) nécessitent la présence d'un nombre suffisamment élevé de molécules cibles dans l'échantillon afin de permettre la visualisation du résultat. Pour pallier à cette limitation, des diagnostics basés sur une amplification d'ADN peuvent être utilisés. En effet l'étape d'amplification va permettre d'augmenter très largement (généralement de façon exponentielle) le nombre d'éléments à détecter, permettant ainsi une détection même si le nombre initial de cibles est très faible.

1.2.2 L'amplification d'ADN

1.2.2.1 Quelques mots sur l'ADN

L'ADN, ou Acide DésoxyriboNucléique, est une macromolécule présente dans le noyau des cellules ou chez les virus. Une molécule d'ADN est formée par deux brins d'ADN s'enroulant l'un autour de l'autre, formant ainsi une structure en hélice (Figure 1.5 A). Chacun de ces brins est un polymère formé de désoxyribonucléotides, chacune d'elles constituées

- D'une des quatres bases nucléiques : L'Adénine (A), la Guanine (G), la Cytosine (C) ou la Thymine (T).
- D'un ose, plus précisément un désoxyribose
- D'un groupe phosphate

La polymérisation de l'ADN se fait par liaison covalente entre l'ose d'une désoyribonucléotide et le groupe phosphate de la suivante.

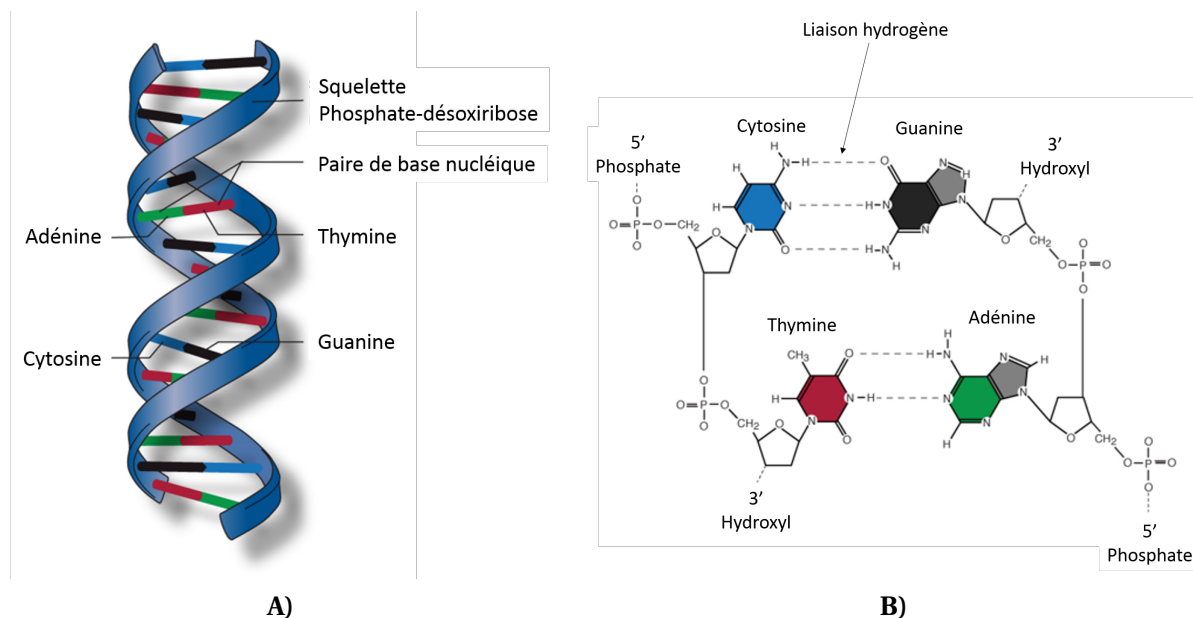


FIGURE 1.5 – **A)** Schéma de la structure en double hélice de l'ADN [8]. **B)** Structure chimique de l'ADN [9].

Les brins d'ADN sont dits complémentaires car les bases nucléiques s'apparient deux à deux par liaisons hydrogènes (Figure 1.5 **B**). Ainsi l'adénine forme deux liaisons hydrogènes avec la thymine, et la guanine forme trois liaisons hydrogènes avec la cytosine. Ces liaisons sont faibles et peuvent être cassées lorsque le double brin d'ADN est chauffé. Du fait du nombre de liaisons hydrogènes plus important, l'énergie nécessaire au désappariement des bases C et G est plus importante que pour les bases A et T. Ainsi la température à laquelle un double brin d'ADN est dissociée en deux simples brins (appelée température de fusion et notée T_m) dépend de la séquence ADN.

Il est à noter également que les brins d'ADN sont orientés. En effet le groupe phosphate liant deux désoxyriboses n'est pas lié au même atome sur chacun des oses, l'atome n°3 pour l'un et l'atome n°5 pour l'autre. Du fait de cette asymétrie les brins d'ADN ont un sens, on parle de sens 3' vers 5' ou de sens 5' vers 3'. Les deux brins d'ADN formant la double hélice sont alors orientés en sens inverse, on dit qu'ils sont antiparallèles.

1.2.2.2 Les techniques d'amplifications

La première amplification d'ADN in vitro a été effectuée par Müllis et son équipe en 1986 [10]. L'importance de cette découverte, nommée Polymerase Chaine Reaction (PCR), lui vaudra notamment le prix Nobel de chimie en 1993. Cette technique repose sur des cycles en température d'une solution (appelé mix) contenant :

- Des primers : Ce sont de courts brins d'ADN, généralement d'une dizaine de bases, dont la séquence est spécifique à l'ADN que l'on souhaite amplifier.

- Des désoxyribonucléotides tri-phosphates (abrégiés dNTP) : C'est un mélange des quatres desoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN, associée à trois groupes phosphates.
- Une enzyme polymérase dans un tampon adapté : Cette enzyme permettra la synthèse des nouveaux brins d'ADN par élongation des primers.
- L'échantillon dans lequel on souhaite tester la présence d'un ADN.

Dans un premier temps la solution est chauffée à 95°C pour l'étape de dénaturation. A cette température, les doubles brins d'ADN se déshybrident ($95^{\circ}\text{C} > T_m$) et on ne retrouve plus que de l'ADN simple brin en solution. La température est baissée à 65°C pour permettre l'hybridation des primers sur les simples brins d'ADN. La spécificité de l'amplification se trouve à cette étape. En effet, les primers ne vont s'hybrider qu'à leur séquence complémentaire. Cela permet ainsi de cibler une séquence ADN spécifique, et donc un élément pathogène spécifique. Enfin le mélange est porté à 72°C pour l'étape d'élongation pendant laquelle l'enzyme polymérase va effectuer l'élongation du primer en y incorporant les bases nucléiques complémentaires du brin d'ADN sur lequel il s'est fixé (Figure 1.6). De cette façon seul l'ADN complémentaire aux primers est répliqué. Les brins d'ADN répliqués sont appelés des amplicons.

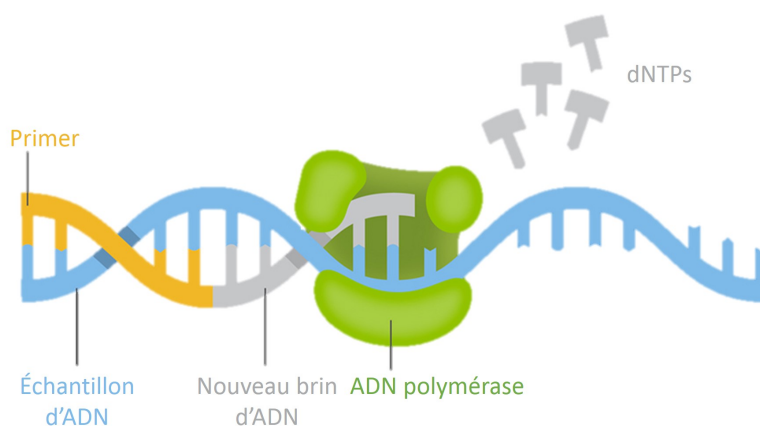


FIGURE 1.6 – Étape d'élongation d'un primer par une ADN polymérase [11].

L'amplification est effectuée par un cyclage de ces trois étapes (Figure 1.7). Idéalement à chaque cycle le nombre de brins d'ADN est doublé et ainsi au n -ième cycle, le nombre de brins d'ADN initialement présents est multiplié par 2^n . La détection de l'amplification se fait le plus couramment par fluorescence. Un marqueur tel que l'EvaGreen (Jena Bioscience, Germany). est alors utilisé. Cette molécule, non fluorescente en soi, devient fluorescente lorsqu'elle se lie à de l'ADN double brin. Ainsi en introduisant ce marqueur dans le mix, la fluorescence de la solution augmentera avec le nombre d'amplicons. Une augmentation de la fluorescence, traduira une amplification d'ADN, qui traduira alors la présence de l'ADN recherché. En absence de l'ADN ciblé, il n'y aura pas d'amplification et donc pas d'augmentation du signal de fluorescence.

Grâce à l'amplification, ce test permet d'obtenir des limites de détection extrêmement basses. Des réactions de PCR permettant de détecter la présence d'une unique copie d'ADN ont été publiées [12, 13]. Du fait de cette grande efficacité, de nombreuses variantes de PCR ont été développées au cours des années. On peut par exemple citer la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) dans laquelle l'échantillon de départ est constitué de brin d'ARN (Acide RiboNucléique) ou encore la qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) qui permet une détection quantitative de l'ADN via l'observation de l'amplification en temps réel.

Cependant ces techniques basées sur la PCR présentent plusieurs inconvénients pour des tests de type Point-of-Care. En effet la préparation de l'échantillon à analyser peut être complexe, l'instrumentation né-

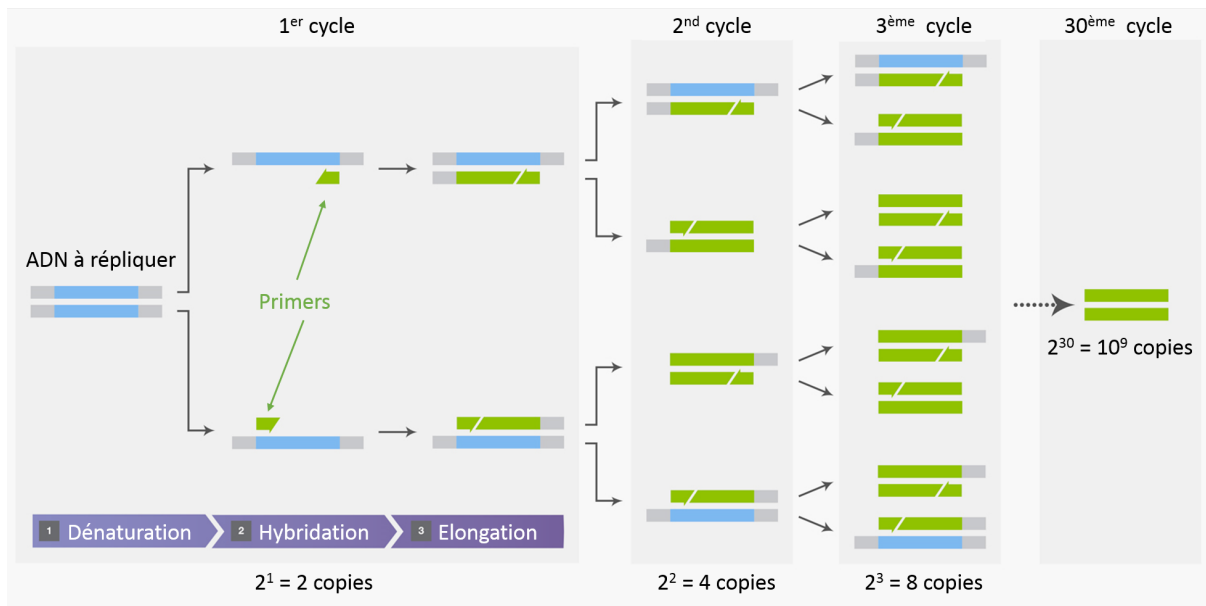


FIGURE 1.7 – Schéma de principe d'une réaction de PCR [11].

cessaire est relativement importante et les coûts sont relativement élevés. Un des challenges de la PCR est lié au fait d'effectuer des cycles en température et donc d'avoir une régulation temporelle de la température. Afin d'intégrer et de maîtriser ces cycles de températures, plusieurs stratégies ont été développées. Certaines utilisent plusieurs zones de chauffages avec des températures différentes sur la même puce [14]. D'autres utilisent des phénomènes de convection pour faire circuler l'ADN entre les différentes températures [15, 16, 17].

Depuis quelques années, de nombreuses techniques d'amplification d'ADN isothermes ont été développées [18]. Du fait de leur fonctionnement à température constante, ces techniques simplifient grandement l'aspect thermique des systèmes les utilisant. Cela les rend ainsi plus facilement intégrables sur des dispositifs microfluidiques [19]. Elles peuvent être classifiées en trois catégories selon leur cinétique d'amplification :

- Les techniques d'amplification exponentielles
- Les techniques d'amplification linéaires
- Les techniques d'amplification en cascades

Les amplifications exponentielles permettent d'amplifier beaucoup plus rapidement l'ADN que les techniques d'amplifications linéaires, et donc offre une meilleure sensibilité, mais sont, en contre partie, plus sujettes aux amplifications non spécifiques. Les techniques d'amplifications dites en cascades utilisent des combinaisons de différentes amplifications afin d'en tirer le meilleur de chacune mais sont de ce fait plus complexes à mettre en oeuvre. Dans le cadre de cette thèse nous utiliserons la technique d'amplification isotherme appelé LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Cette technique est une des plus utilisées car elle offre une grande spécificité et fait partie des amplifications exponentielles, permettant donc d'obtenir un résultat rapidement (en moins d'une heure). Cette méthode d'amplification est décrite plus en détail dans la section suivante.

1.2.2.3 La méthode d'amplification LAMP (loop-mediated isothermal amplification)

La LAMP (loop-mediated isothermal amplification) est une technique d'amplification d'ADN isotherme développée par Notomi et al [20] il y a une quinzaine d'années. Cette amplification s'effectue à une tempé-

rature constante voisine de 65°C. En utilisant 4 primers et 6 séquences de reconnaissance, cette technique d'amplification isotherme offre une très grande spécificité. En comparaison, la technique de PCR n'utilise que 2 primers et 2 séquences de reconnaissance.

De plus l'amplification produite par la LAMP est extrêmement rapide et efficace puisqu'elle produit jusqu'à 50 fois plus d'amplicons que la technique de PCR [21]. Cette efficacité est due au design des primers qui sont conçus de façon à pouvoir former des boucles sur les amplicons (Figure 1.8 étape 6). Du fait de ces boucles, au fur et à mesure de l'amplification, la longueur des amplicons augmente (Figure 1.8 étapes 7-15). Comme le facteur limitant lors de la réplication des brins d'ADN est l'appariement de l'ADN polymérase sur le brin d'ADN, le fait d'avoir des amplicons de tailles de plus en plus importantes permet d'augmenter la vitesse de synthèse d'ADN double brins. Les mécanismes de la LAMP restent cependant très complexes et ne feront donc pas l'objet d'une étude plus avancée.

Un autre avantage de la LAMP est sa robustesse. En effet la LAMP est bien moins sujette à l'inhibition que ne pouvait l'être la PCR [22]. Cela, allié avec sa grande efficacité d'amplification, permet l'utilisation d'un indicateur pH coloré pour effectuer la détection de l'amplification [23]. En effet à chaque intégration d'un dNTP (désoxyribonucléotide tri-phosphates) au brin d'ADN en cours de synthèse, un ion hydronium est relâché [24], diminuant ainsi le pH de la solution. La détection se fait alors par observation du virage de l'indicateur coloré. Cette détection colorimétrique permet ainsi de simplifier la détection en regard d'une détection par fluorescence et d'augmenter la portabilité du système.

1.2.3 Tableau comparatif

Le tableau 1.1) résume les principaux types de diagnostics avec, pour chacun, les principaux avantages et inconvénients.

Type de diagnostic	Avantages	Inconvénients
Tests type "bandelette urinaire"	Facile d'utilisation Très portable	Cibles limitées
Immunoassays	Facile d'utilisation Très portable	Sensibilité faible
PCR	Forte sensibilité	Cycles en température Détection principalement en fluorimétrie Préparation d'échantillon complexe
LAMP	Forte sensibilité Rapide Détection par pHmétrie possible	Chauffage à 65°C Préparation d'échantillon complexe

Tableau 1.1 – Tableau comparant les principaux types de diagnostics évoqués dans ce paragraphe.

Compte tenu des avantages proposés par la méthode d'amplification LAMP, nous avons fait le choix de nous concentrer sur la réalisation d'un système basé sur ce type de diagnostic. Afin de répondre au mieux au critère ASSURED proposé par l'OMS, une attention particulière sera portée à l'autonomie et à la portabilité du système final.

1.3 Les matériaux utilisés en microfluidique et les techniques de fabrications associées.

La fabrication de canaux aux dimensions sub-millimétriques a tout d'abord été possible grâce aux développements effectués pour la micro-électronique. En effet la précision des procédés de fabrication liés à

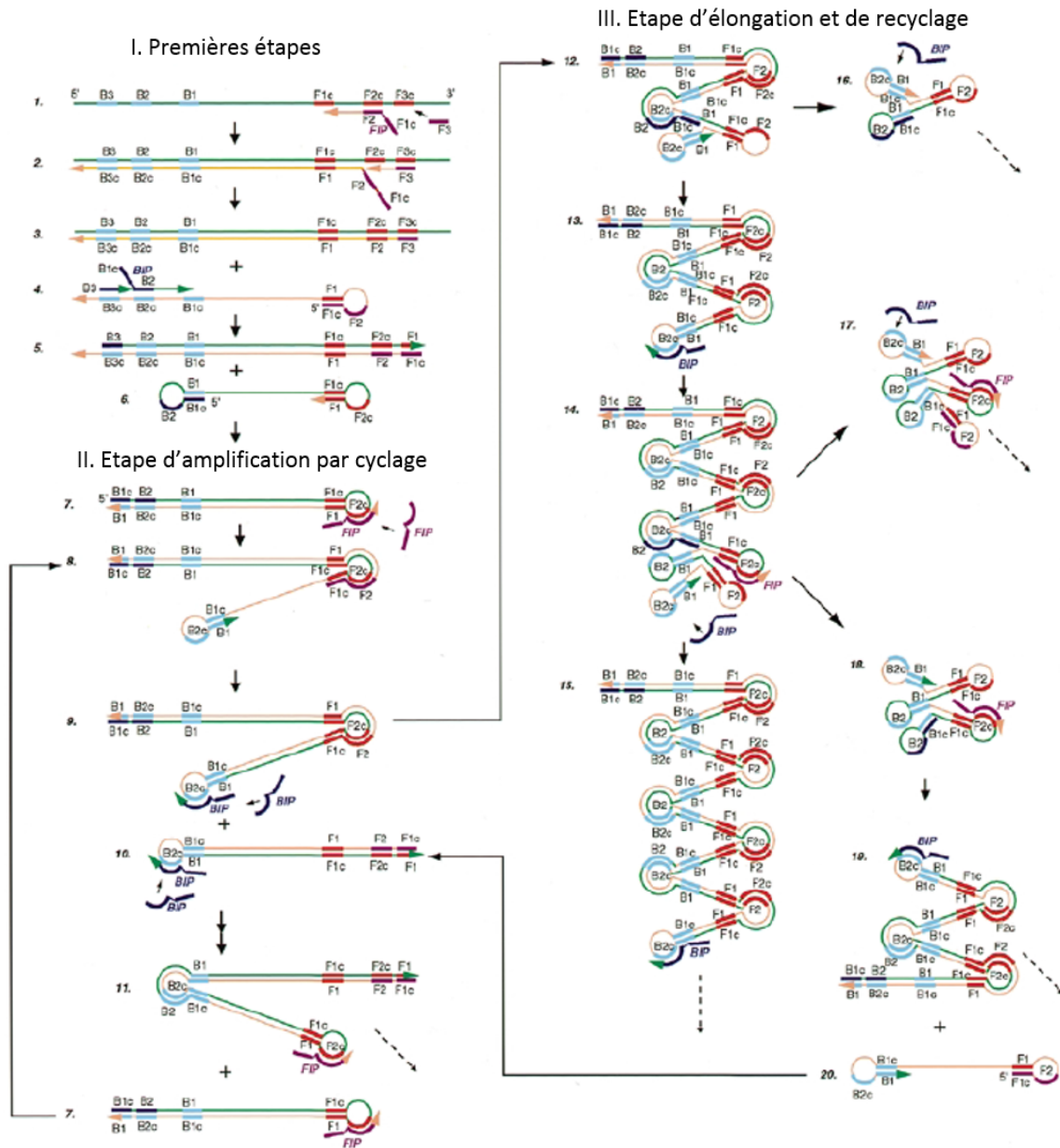


FIGURE 1.8 – Schéma représentant les mécanismes de la réaction de LAMP. Adapté de [20]

l'industrie du silicium a augmenté considérablement au cours des années afin de développer des microprocesseurs toujours plus puissants. Cependant compte tenu du coût de ces technologies des alternatives utilisant d'autres matériaux, comme des polymères ou du papier, ont ensuite été développées.

1.3.1 Le silicium et le verre

Historiquement le silicium a été le support du premier système microfluidique [25]. Cependant compte tenu du coût du matériau et des technologies de fabrications associées (principalement la gravure sèche avec la RIE - Reactive Ion Etching), le silicium est de moins en moins utilisé en microfluidique. Il reste toutefois privilégié lorsque de très hautes résolutions (par exemple en nanofluidique) ou quand de très grands facteur de forme (20 :1) sont nécessaires [26]. Il est à noter également que le caractère semi-conducteur du silicium peut également offrir des avantages lorsque l'électronique fait partie intégrante du système.

Le verre est un matériau intéressant en premier lieu pour sa transparence. De plus, dans le cas du verre

quartz l'auto fluorescence est très basse, permettant ainsi de faire des mesures précises en fluorescence. D'autre part, la compatibilité de ce matériau avec les procédés de la micro-électronique permet l'intégration d'électrodes de façon aisée. Le procédé de fabrication généralement utilisé pour la production de puces microfluidiques en verre est la gravure humide. Cette technologie permet d'atteindre de bonnes résolutions mais est une gravure isotropique, ce qui ne permet d'obtenir que des formes de canaux arrondis [27].

Un autre avantage du verre est sa compatibilité avec différentes méthodes de scellements permettant de l'utiliser facilement en tant que capot avec d'autres matériaux tels que le silicium ou des polymères.

Cependant, tout comme le silicium, le verre reste un matériau onéreux et les procédés de fabrications sont complexes à mettre en place. C'est pourquoi l'utilisation d'autres matériaux tels que les polymères s'est largement répandu entraînant le développement des procédés de micro-fabrication associés.

1.3.2 Les polymères

L'utilisation de polymères pour la fabrication de systèmes microfluidiques s'est largement substitué à celui d'autres matériaux. En effet la grande diversité des polymères existants, la transparence d'une grande partie d'entre eux, leur faible coût sont autant d'arguments en leur faveur [28] lorsque la très haute résolution atteinte avec les technologies silicium ne sont pas nécessaires. Le faible coût de revient d'un système permet facilement la création de consommables, c'est-à-dire d'une partie du système non réutilisable d'un test à l'autre. Cela est très intéressant dans le cadre des dispositifs de diagnostics Point-of-Care car le fait de pouvoir éliminer les tests au fur et à mesure permet d'éviter au maximum la contamination des diagnostics suivants.

Parmi les polymères utilisés pour des systèmes microfluidiques on peut notamment citer le Polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le copolymère d'oléfine cyclique (COC), le polymère d'oléfine cyclique (COP) ou encore le Polydiméthylsiloxane (PDMS).

De nombreux procédés de micro-fabrication sur polymères se sont développés permettant d'aboutir à des systèmes de plus en plus résolus et complexes. Les plus utilisés d'entre eux sont décrits dans les paragraphes suivants.

1.3.2.1 Les procédés photolithographiques

Dans la continuité des procédés silicium, le développement, dans le milieu des années 1990, de la résine de type epoxy SU-8 a permis la fabrication de puces microfluidiques par photolithographie (Figure 1.9 A). Cette résine offre la possibilité de créer des circuits microfluidiques avec des canaux ayant un grand facteur de forme (1 :10) [29]. Un autre avantage de cette technique de fabrication est la possibilité de créer des canaux fermés en utilisant une couche sacrificielle (Figure 1.9 B). Cette dernière est utilisée après la formation de canaux ouverts pour recréer une surface plane pour l'étape de photolithographie suivante. Une fois cette deuxième étape achevée, la couche sacrificielle est dissoute afin d'obtenir les canaux microfluidiques fermés. Ces procédés de fabrication peuvent cependant être complexes à mettre en place car ils nécessitent une (ou plusieurs) étape(s) de photolithographie et de développement chimique. Grâce aux développements effectués dans le domaine de la micro-fabrication, d'autres techniques plus simples à mettre en place sont maintenant couramment utilisées.

1.3.2.2 Le micro-usinage

Une des techniques les plus simples à utiliser est le micro-usinage. Il s'agit d'un procédé mécanique par enlèvement de matière. Une fraise (ou plus généralement un outil de coupe) vient découper le matériau

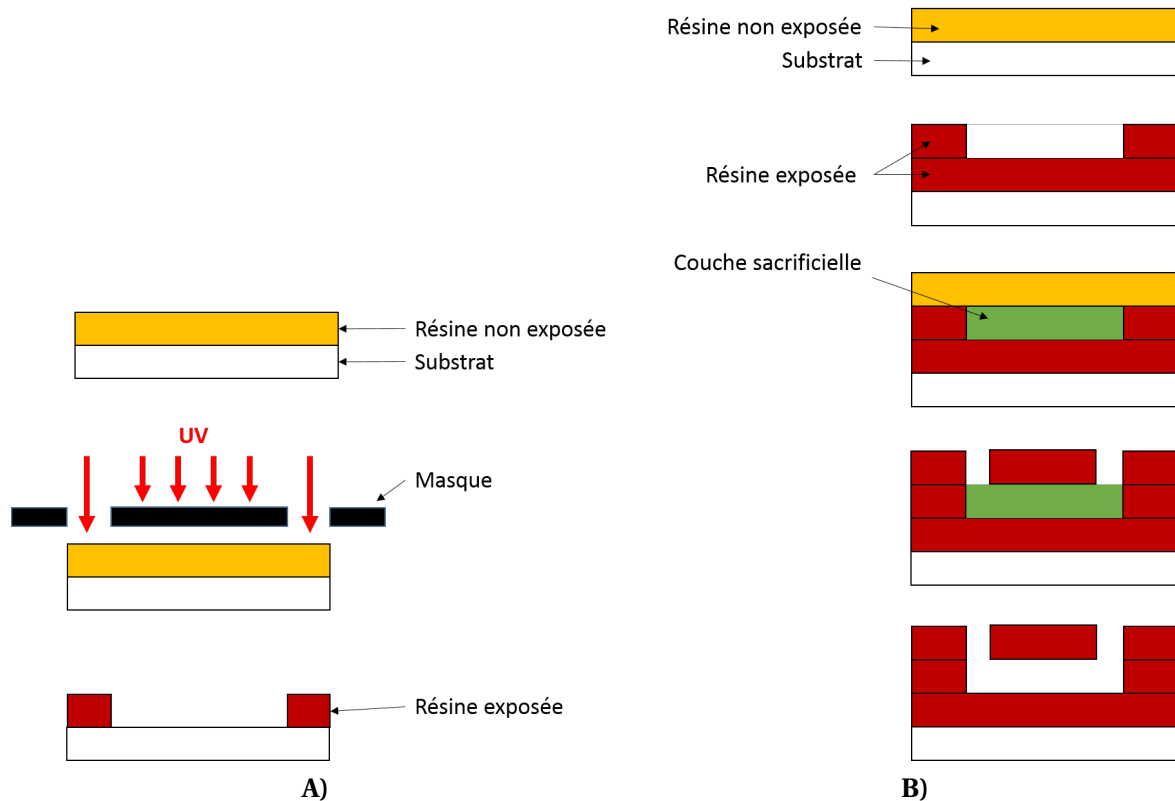


FIGURE 1.9 – Principe de la photolithographie. **A)** Création d'un canal ouvert. **B)** Création d'un canal fermé en utilisant une couche sacrificielle.

support selon un motif dessiné sur logiciel de CAO (Conception Assisté par Ordinateur). Des éléments microfluidiques peuvent ainsi être réalisés [30, 31]. De plus, le développement et l'amélioration de ce procédé de fabrication permet d'atteindre des dimensions de canaux de plus en plus petites. Des structures de 30 micromètres ont ainsi récemment été reportées [32]. Une des forces de ce procédé de fabrication est la facilité de créer de nouvelles géométries. En effet, pour effectuer un usinage, seul le dessin sur logiciel de CAO est nécessaire ; ainsi dès qu'un nouveau design imaginé est dessiné, il peut directement être fabriqué.

Cependant cette flexibilité de fabrication implique un point faible de ce procédé lorsqu'il s'agit de produire un grand nombre de dispositifs. Ce procédé ne permet pas la production en parallèle de plusieurs dispositifs et ne peut donc produire des dispositifs qu'un par un. Cela induit un temps de fabrication important et un coût associé élevé. Ainsi le miro-usinage est principalement limité au prototypage et au recherche et développement. D'autres procédés plus propices à l'industrialisation existent. Ces derniers reposent généralement sur la réplique d'un moule ce qui permet un flux de production plus élevé et des coûts moindres. Ces techniques font l'objet des prochains paragraphes.

1.3.2.3 Les procédés basés sur la réplique de moules

De nombreux procédés de fabrications sont basés sur la réplique d'un moule. Ces techniques sont intéressantes lorsque plusieurs dispositifs identiques sont nécessaires, que ce soit pour quelques dizaines d'exemplaires pour des essais en laboratoire ou pour une production en série. Pour ces méthodes de fabrication, l'élaboration du moule est une étape clé [28]. En effet le degré de résolution du moule impacte directement le degré de résolution des dispositifs créés avec celui-ci. En particulier les dispositifs ne peuvent pas avoir une meilleure résolution que le moule. Ainsi le moule est souvent fabriqué avec une grande précision. Les coûts associés à fabrication du moule sont par la suite amortis par l'utilisation répétée de celui-ci pour

la fabrication de multiples exemplaires du dispositif. Les moules destinés à fabriquer de grandes séries sont principalement réalisés par usinage de haute précision ou par galvanoplastie. Pour des plus petites séries, de l'ordre de quelques dizaines ou centaines d'exemplaires, des moules peuvent également être réalisés avec des polymères comme une résine epoxy ou encore du PDMS.

Casting

Le casting est une des méthodes de fabrication les plus utilisés en laboratoire de recherche. Le polymère le plus utilisé avec cette technique est le PDMS qui a pour avantage d'être peu cher tout en permettant d'avoir une résolution micrométrique. De plus il peut être facilement collé à un autre élément de PDMS ou à du verre [33]. La Figure 1.10 illustre les étapes de fabrication d'un système microfluidique en PDMS par casting. Tout d'abord le PDMS liquide est versé sur le moule et est ensuite réticulé. Cette réticulation peut s'effectuer à température ambiante ou à une température plus élevée si on souhaite accélérer le procédé. Finalement le circuit microfluidique est démoulé avant d'être scellé pour fermer les micro-canaux.

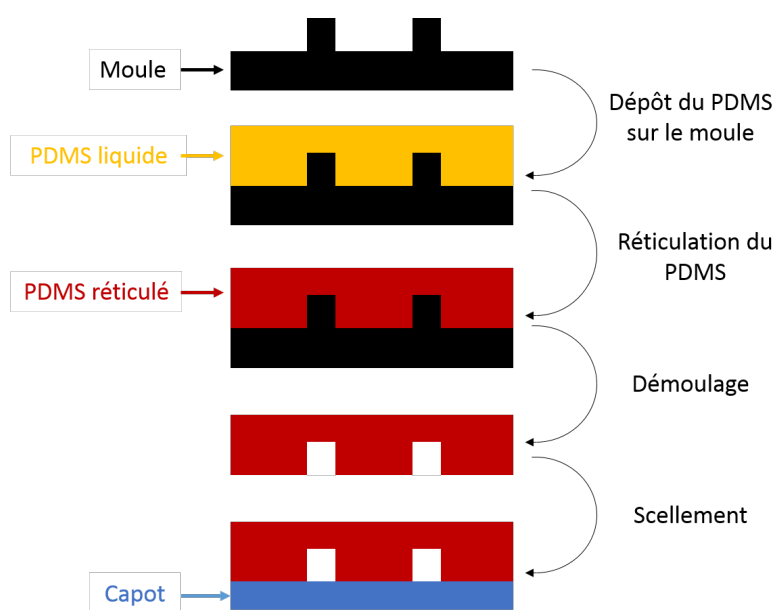


FIGURE 1.10 – Étapes de réalisation d'un canal microfluidique en PDMS par procédé de casting.

En superposant différents éléments réalisés par casting de PDMS, des structures plus complexes comme des vannes ou des pompes peuvent être réalisées [34]. Cependant, à cause d'un temps de réticulation du PDMS assez long (cela peut prendre plusieurs heures), cette technique n'est pas adaptée à une production industrielle et reste principalement utilisée en laboratoire.

Une autre caractéristique du PDMS est sa perméabilité aux gaz. Cela peut être un avantage lorsque l'on souhaite développer un capteur gaz ou pour de la culture cellulaire où la circulation des gaz est importante; en revanche lorsque l'application visée est une amplification d'ADN, cette propriété est un défaut majeur. En effet cette perméabilité va permettre une évaporation de la solution dans le milieu environnant lors du chauffage entraînant la perte d'une partie de l'échantillon mais surtout créant une possible contamination de l'environnement.

Le moulage par injection

Le moulage par injection est le procédé le plus communément utilisé en industrie pour produire des éléments en polymères. Bien que l'équipement et le moule nécessaire pour ce procédé soient très chers, son temps de cycle très court (quelques dizaines de secondes) ajouté à la grande durée de vie du moule

permettent la production de grandes séries à de faibles coûts. Cette technique de fabrication fait appel à l'utilisation d'une extrudeuse tel que présenté dans la Figure 1.11. La matière première se présente sous forme de granulés qui sont acheminés jusqu'au moule par le biais d'une vis sans fin. Cet acheminement se fait à température élevée afin de faire fondre les granules de polymère, permettant l'injection dans le moule du polymère dans son état fluide. Après une phase de maintien sous pression du polymère dans le moule, ce dernier est refroidi permettant la solidification de la pièce (ou des pièces si le moule contient plusieurs motifs). Cette dernière est ensuite éjectée et un nouveau moulage peut alors être réalisé.

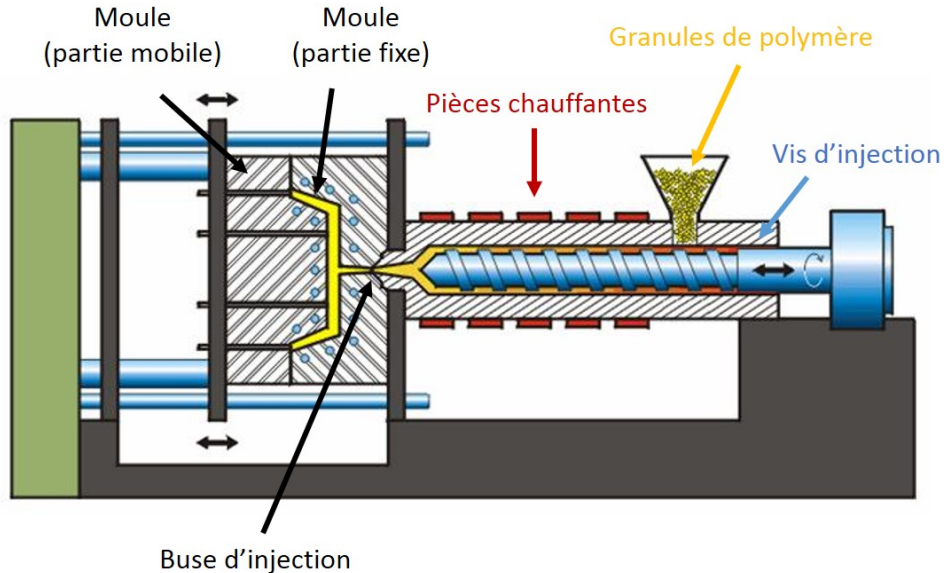


FIGURE 1.11 – Schéma d'une extrudeuse utilisée pour le procédé d'injection moulage [35].

Le moulage par injection est une technique très attrayante pour des séries de plusieurs dizaines (ou centaines) de milliers d'éléments. En revanche pour de plus petites séries, l'investissement initial (équipement et moules) ne permet pas de produire des éléments à faible coût. Dans ce cas, la technique d'embossage peut être une bonne solution.

Le thermoformage

Le thermoformage consiste à transférer un relief d'un moule sur un matériau déformable. Ce procédé de fabrication s'applique plus particulièrement aux thermoplastiques, comme le PMMA ou le PC (Polycarbonate), qui ont la propriété de devenir ductile au-delà d'une certaine température. Cette température est appelée température de transition vitreuse (T_g) et caractérise la transition d'un état vitreux (c'est-à-dire solide) à un état viscoélastique.

Le thermoformage est réalisé par pression du moule sur le matériau à chaud, de façon à dépasser sa T_g (Figure 1.12). Cette technique de fabrication permet d'obtenir des motifs avec une très bonne résolution [36]. Des structures ayant des dimensions inférieures au micromètres peuvent être obtenues, on parle alors souvent de nanoimpression [37].

Une variante du thermoformage, communément nommée embossage, consiste en ce que le substrat se résume à une feuille de matériau déformable. Lors de la mise en forme, cette feuille est mise en contact avec deux moules complémentaires (Figure 1.13 A). Dans certains cas, un des moules peut être remplacé par une pression positive qui vient alors plaquer la feuille sur le contre-moule (Figure 1.13 B). Avec cette méthode, la feuille se déforme entièrement pour épouser la géométrie du moule. La feuille est donc soumise à de forts cisaillements et une attention particulière doit être portée sur les conditions d'embossage afin de ne pas

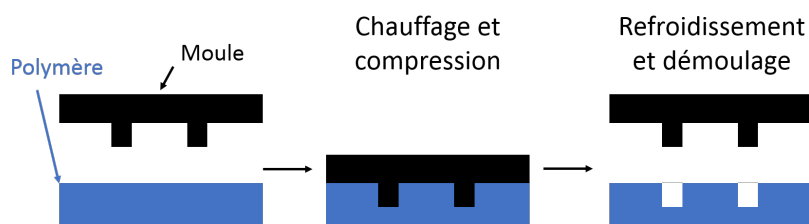


FIGURE 1.12 – Schéma de principe du procédé de thermoformage.

provoquer la rupture du matériau.

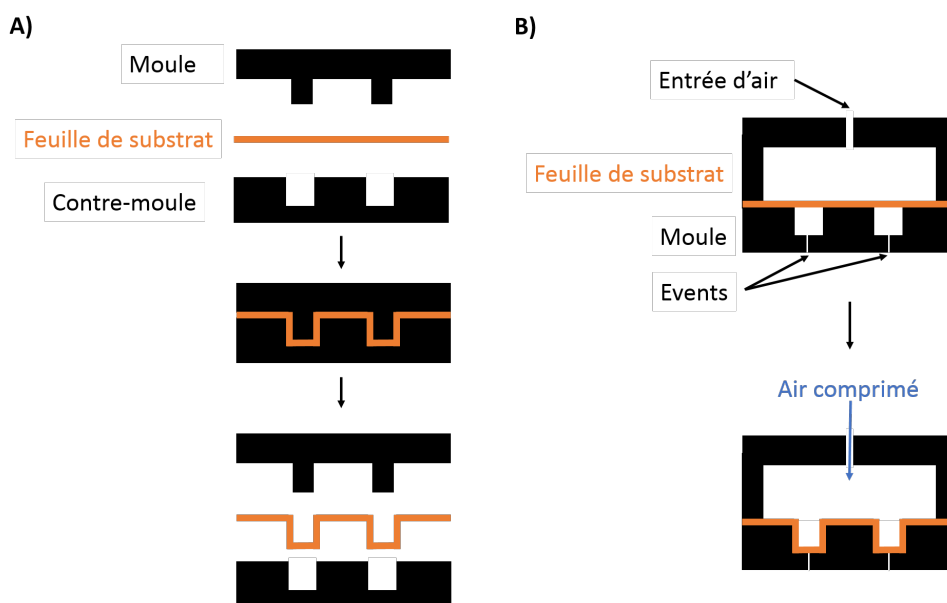


FIGURE 1.13 – Schémas de principe de l'embossage. A) Embossage avec un moule et un contre moule. B) Embossage avec un unique moule et un gaz sous pression.

Les équipements étant peu coûteux et les outillages relativement simples à réaliser, cela permet de lancer une production plus rapidement et à plus faible coût. L'embossage peut ainsi être le procédé de fabrication privilégié dans le cas de production en petite ou moyenne série.

Les techniques de thermoformages utilisent des équipements relativement peu coûteux (notamment en regard du moulage par injection) et des outillages simples à réaliser et également peu coûteux. Ainsi ces procédés sont intéressants lorsqu'il s'agit de production en petite ou moyenne série. La simplicité du procédé d'embossage le rend même attractif pour la production en grande série (c'est par exemple le procédé utilisé en industrie pour la fabrication des pots de yaourt).

Dans le cadre de la microfluidique et des laboratoires sur puces, si le thermoformage est quelques fois utilisé, l'embossage d'un fin substrat reste très peu courante [38]. Cela est probablement dû au fait que ce dernier procédé résulte en des systèmes souples, plus fragiles et aptes à être déformés de façon non souhaitée. Il est à noter que le groupe de G. M. Whitesides a utilisé cette technique de fabrication sur un matériau autre qu'un polymère : le papier [39]. En effet cela permet d'allier le bas-coût de ce substrat avec la simplicité de fabrication associée à ces méthodes de fabrication.

1.3.2.4 Impression 3D et fabrications additives

Depuis quelques années, avec la démocratisation des imprimantes 3D, on voit émerger des circuits microfluidiques réalisés par fabrication additive. La technique couramment utilisée pour ces réalisations est la stéréolithographie [40, 41, 42] car elle permet une bonne précision ainsi qu'un bon état de surface. Cette technique de fabrication repose sur le même principe que la photolithographie mais, dans ce cas, la pièce en cours de réalisation peut se déplacer verticalement. Cela permet ainsi de réticuler successivement différentes couches de résines (Figure 1.14).

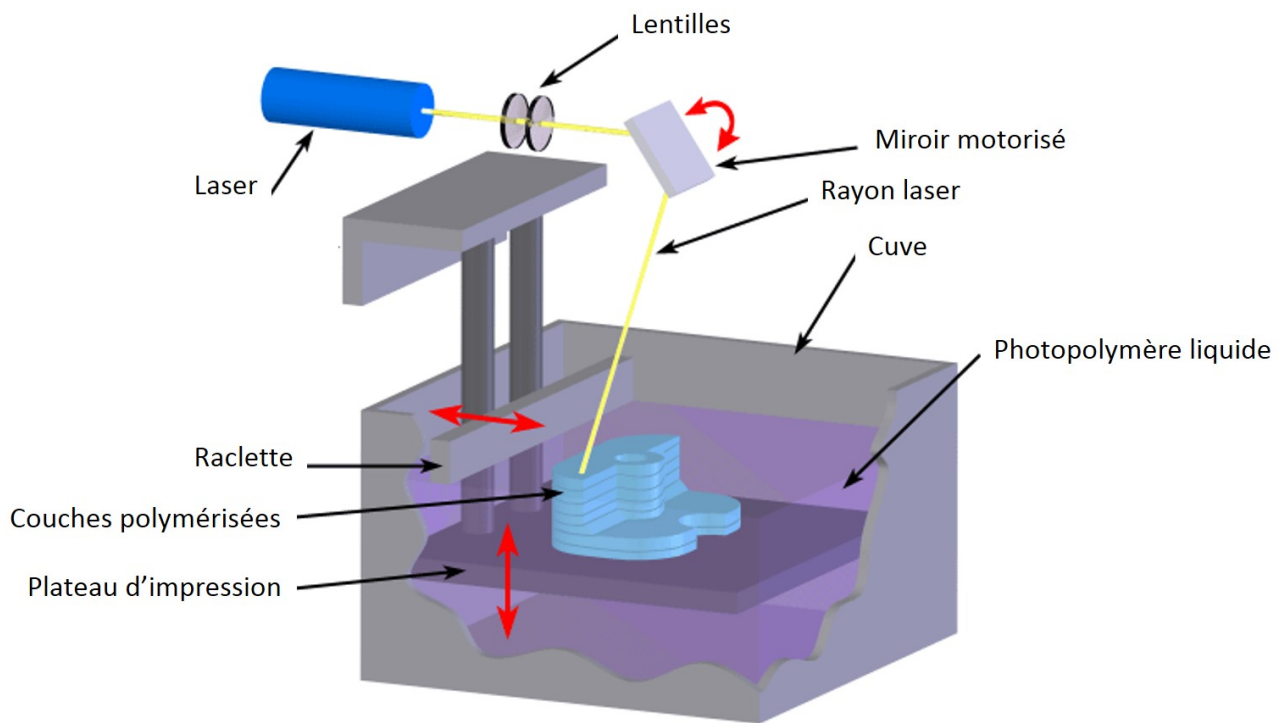


FIGURE 1.14 – Schéma de principe de la stéréolithographie [43].

Un des grands avantages de cette technique est la grande liberté de conception apportée. En effet elle permet la réalisation de canaux microfluidiques complexes et fermés en une unique étape [44]. De plus, la fabrication additive peut également être utilisée pour la réalisation d'éléments fonctionnels comme des vannes ou des pompes [45, 46]. En revanche cette technique étant à ses débuts dans le domaine de la microfluidique, des développements, principalement en terme de matériaux (transparence, biocompatibilité, résolution, ...) sont encore nécessaires pour que cette technologie soit plus communément utilisée. De plus, les temps de fabrication sont assez long (plusieurs heures peuvent être nécessaires pour la réalisation d'une impression). Ainsi les procédés de fabrications additives sont principalement pour le prototypage, et ne permettent pas une production en volume à bas coût

1.3.2.5 Back end processing

Le back-end processing englobe l'ensemble des actions à effectuer après la fabrication des canaux afin d'obtenir un dispositif fonctionnel. Par exemple, de plus en plus de systèmes microfluidiques utilisent des éléments conducteurs. C'est notamment le cas des dispositifs nécessitant des électrodes pour effectuer une mesure électrochimique ou bien pour séparer des particules par électrophorèse. De nombreux systèmes nécessitent également des opérations de traitement de surface. Il peut s'agir de traitement pour gérer la

mouillabilité des surfaces, ou encore de traitements pour fonctionnaliser une partie du système avec des molécules spécifiques comme des brins d'ADNs ou des anticorps. D'autre part, à l'exception de la photolithographie et de la fabrication additive, toutes les méthodes évoquées précédemment, ne permettent que la fabrication de systèmes microfluidiques ouverts. Afin d'avoir des canaux microfluidiques fermés, une étape supplémentaire de scellement est alors nécessaire. Toutes ces étapes sont souvent négligées, à tort, lors de la conception d'un système. En effet ces étapes ne sont pas forcément anodines et nécessitent le plus souvent un alignement afin d'intégrer les différentes fonctionnalités au bon endroit dans le circuit microfluidique. Cela se répercute sur le coût, non négligeable, associé à ces étapes. En effet ce dernier peut représenter jusqu'à 80% du coût final [28]. Une attention particulière doit ainsi être portée sur ces étapes dès le début de la conception des systèmes, et encore plus particulièrement lorsqu'il s'agit de fabriquer des systèmes à bas-coût.

D'une façon générale, il est important de noter qu'il existe généralement un décalage entre les technologies de fabrication utilisées par les laboratoires de recherche (comme le casting de PDMS) et celles utilisées par l'industrie lors de production en grand volume (comme l'injection moulage ou le thermoformage). Ainsi afin de concevoir un système qui pourra être facilement industrialisé, il est important de se rapprocher au maximum des technologies utilisées de façon industrielle dès les premières phases de conception.

1.3.3 Les papiers et autres substrats hydrophiles

Le papier est devenu un support extrêmement utilisé en microfluidique notamment car il s'agit d'un matériau extrêmement peu coûteux. De plus, une fois utilisés, les dispositifs microfluidiques à base de papier peuvent être facilement détruits par incinération, afin d'éviter toutes contaminations avec l'environnement. Et lorsque cela est possible (dispositifs non utilisés, tests non dangereux, ...) ces dispositifs pourraient être recyclés avec très bon rendement (jusqu'à 80% de la cellulose peut être recyclée).

D'autre part, grâce à sa constitution en fibres de cellulose très hydrophiles, il permet aux liquides de s'écouler par capillarité. C'est d'ailleurs avec ce matériau qu'est aujourd'hui réalisé le test "Home-Care" le plus connu : le test de grossesse (fig 1.15). Ce test fait partie d'une catégorie plus large de diagnostics appelés les tests bandelettes, parmi lesquels on peut, par exemple, trouver des instruments de diagnostic vétérinaire, de contrôle alimentaire ou de contrôle environnemental [47].



FIGURE 1.15 – Un diagnostic basé sur l'imprégnation d'un substrat papier : le test de grossesse [48].

Une autre catégorie de tests, toujours basée sur l'écoulement par imprégnation de papier, se développe fortement : les "Lab on Paper" ou "Paper-Based Microfluidics". Contrairement aux tests bandelettes dans lesquels le liquide imbibe tout le papier, ces dispositifs comportent des barrières hydrophobes délimitant des canaux (Figure 1.16). Ainsi le liquide ne s'écoule qu'entre ces barrières qui définissent alors un canal

microfluidique. L'idée d'utiliser des barrières hydrophobes entre différents tests en papier remonte à 1902 [49], mais ce n'est qu'en 2007 lorsque le groupe de Whitesides a exposé une méthode de fabrication simple et a mis en avant les avantages de ce type de dispositifs pour la microfluidique bas-coût et portable [50] que l'intérêt pour ces derniers s'est fortement accrue. Ce procédé de fabrication repose sur l'imprégnation d'un papier avec de la résine SU-8 qui est ensuite réticulée de façon localisée par photolithographie. Après un rinçage, seule la résine réticulée reste présente, formant ainsi les parois hydrophobes au sein de la matrice papier. Depuis lors beaucoup de nouvelles techniques pour l'élaboration de tels dispositifs ont été imaginées [47, 51]. De plus, l'industrie papetière étant d'ores et déjà bien développée, les procédés de fabrications pour de nombreux types de papiers sont établis. Ainsi on peut imaginer combiner différents papiers, aux propriétés diverses, afin d'aboutir à des dispositifs plus complexes. Cependant les procédés de fabrication pour ce type de dispositifs microfluidiques sont difficilement utilisables pour une production en moyenne ou grande série.

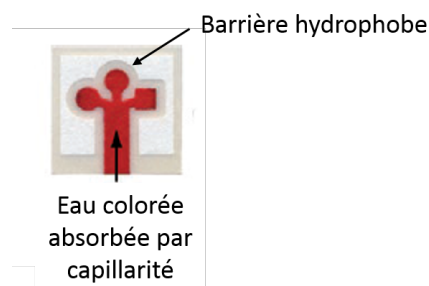


FIGURE 1.16 – Exemple d'un dispositif dit "Paper-based". Adapté de [50]

Bien que le papier est la matrice fibreuse la plus utilisée, il est à noter que d'autres matériaux comme le coton [52, 53], bien que nécessitant un traitement d'hydrophilisation, ont également été utilisés.

1.3.4 Tableau comparatif

Le tableau 1.2 résume les matériaux les plus utilisés avec, pour chacun, les principaux avantages et inconvénients.

Étant donné le souhait d'aboutir à des dispositifs ayant un faible coût, pour cette thèse nous nous concentrerons sur le papier et les polymères. Le tableau 1.3 résume, pour ces deux matériaux, les techniques de fabrications les plus utilisés avec leurs principaux avantages et inconvénients.

Matériau	Avantages	Inconvénients
Silicium	Très grande résolution Intégration facile d'électronique	Onéreux Opaque
Verre	Très grande résolution Transparent	Onéreux
Polymères	Peu onéreux Transparent	Les procédés de fabrication industriels ne sont généralement pas utilisables en laboratoire
Papier	Très bas-coût Hydrophile Facilement détruit Recyclable	
		Opaque Principalement pour les petites séries

Tableau 1.2 – Tableau comparant les différents matériaux évoqués dans ce paragraphe.

Techniques de fabrication	Avantages	Inconvénients
Micro usinage Casting	Facilement reconfigurable Simple Bonne résolution	Onéreux pour les séries Onéreux pour des grandes séries
Moulage par injection	Peu cher pour les grandes séries Très grande résolution Temps de cycle court	Onéreux pour les petites et moyennes séries
Stéréo-lithographie	Réduit le back-end processing Liberté de design	Encore peu développé Outil de prototypage
Thermoformage	Coût acceptable pour les moyennes séries Procédé industriel existant Temps de cycle court	Moins adapté aux grandes séries que le moulage par injection
Design sur papier	Possibilité d'utiliser une feuille papier comme substrat Substrat hydrophile	Pas adapté pour des production en moyenne ou grande série

Tableau 1.3 – Tableau comparant les principaux procédés de fabrication de systèmes microfluidiques.

Concernant le procédé de fabrication, nous nous concentrerons lors de cette thèse sur le thermoformage, et plus particulièrement sur la variante de l'embossage. En effet cette technique est compatible avec les deux matériaux sélectionnés et permet la fabrication de dispositifs en moyenne série à des coûts raisonnables.

1.4 Les différentes techniques d'écoulement

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour générer un écoulement au sein de canaux microfluidiques. Cette section offre un aperçu des méthodes les plus utilisées.

1.4.1 Génération de pression ou de débit

Un moyen classique de mettre en mouvement un fluide est de lui appliquer une pression en amont. Pour cela des systèmes de génération de pression peuvent être utilisés comme le Microfluidic Flow Control System de Fluigent [54] ou le Microfluidic Flow Controller d'Elveflow [55]. Un écoulement peut également être généré en imposant son débit avec des systèmes de pousse-seringues. Par rapport aux générateurs de pression, ces systèmes imposent un débit fixé, et ce quelle que soit la résistance rencontrée dans la carte microfluidique. Cela peut être un avantage car le débit au sein de la carte microfluidique est connu mais cela peut également être un inconvénient car la gestion de l'écoulement devient plus compliquée. Par exemple, il n'est pas possible de stopper temporairement un écoulement par le biais de vannes.

D'une façon générale, l'utilisation de tels systèmes réduit fortement la portabilité des systèmes microfluidiques associés par la présence d'un contrôleur externe qui, de plus, nécessite une alimentation électrique. Un autre désavantage, non négligeable, associé à ces appareils est la nécessité de devoir les connecter aux cartes microfluidiques. Cela nécessite alors un système de connectiques adaptées et rend le système propice aux fuites ainsi qu'aux erreurs de connections.

Une plus grande portabilité peut être atteinte en intégrant la génération de pression directement dans le composant [56, 57], mais cela complexifie de façon conséquente la fabrication du système.

1.4.2 La microfluidique centrifuge

En microfluidique centrifuge, le déplacement du liquide dans le système est obtenu par force centrifuge. Le système microfluidique est fabriqué sous la forme d'un disque (Figure 1.17) mis en rotation afin d'utiliser l'effet centrifuge pour déplacer le liquide. Le liquide initialement déposé au centre du disque, va ainsi se déplacer vers l'extérieur. Ces systèmes sont plus couramment nommés "lab-on-a-disc" ou "lab-on-a-CD".

Cette technologie est intéressante car il n'y a pas de connections fluidiques à effectuer avec un appareil externe et que le déplacement du liquide est directement relié à la vitesse de rotation du disque [58]. Ainsi il est facile d'avoir une machine générique sur laquelle on peut positionner différents disques suivant le test que l'on souhaite effectuer. Cependant une limite de ce mécanisme est le fait que le liquide ne peut s'écouler que dans un unique sens, du centre du disque vers sa périphérie, ce qui peut limiter les designs.

Si l'on souhaite faire revenir le liquide vers le centre du disque cela implique une complexification du système. De tels systèmes ont été développés en intégrant un système de pompes à la plateforme en rotation [60]. Grâce à celles-ci une plus grande liberté des déplacements de fluides est possible (retour du liquide vers le centre, actionnement de vannes pneumatiques, ...). De plus par le biais d'un souffle d'air, le mélange de plusieurs solutions liquide est largement amélioré. Cependant, contrairement aux lab-on-a-CD classique, il est ici nécessaire de connecter les différentes cartes microfluidiques au système de pompes.

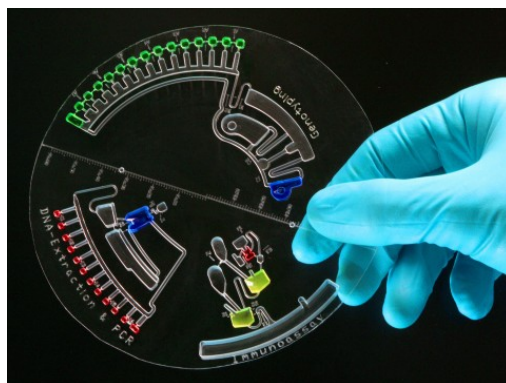


FIGURE 1.17 – Exemple d'un Lab-on-a-disc [59].

Cela rend ainsi le système sujet aux mêmes problèmes de connectiques que les systèmes basés sur des générateurs de pression ou de débit.

1.4.3 La microfluidique en gouttes

La microfluidique en gouttes fait référence à l'ensemble des techniques microfluidiques qui utilisent des gouttes pour confiner de petits volumes de fluides. Cela a pour grand intérêt de pouvoir considérer les différentes gouttes comme des volumes indépendants et ainsi d'effectuer des analyses parallèles en grand nombre au sein d'une même carte microfluidique tout en ayant un risque de contaminations croisées très faibles. Cela ouvre notamment la voie à la microfluidique digitale qui permet la détection d'une espèce très diluée [61, 62]. La génération et la manipulation de telles gouttes peut se faire par différentes techniques. Les paragraphes suivants décriront les méthodes hydrodynamiques et la technologie EWOD (Electro-Wetting On Dielectric).

1.4.3.1 Les technologies hydrodynamiques

Il existe différentes techniques hydrodynamiques pour la création d'émulsions, c'est-à-dire la production de gouttes liquide dans une seconde phase liquide non miscible. Ces gouttes sont produites par des effets de cisaillement entre les différents fluides (Figure 1.18). Cela est par exemple utilisé pour encapsuler des cellules pancréatiques dans des gouttes d'alginate [63, 64], ou encore pour compartimenter des cellules mammaliennes à l'intérieur de gouttes de phase aqueuse [65]. Cependant ces systèmes ne possèdent généralement pas une grande portabilité car ils nécessitent la gestion de différents écoulements, via des pompes ou des pousse-seringues, pour parvenir à la formation des gouttes. A noter qu'un système basé sur une vis sans fin a récemment été développé afin d'augmenter la portabilité de ces systèmes [66].

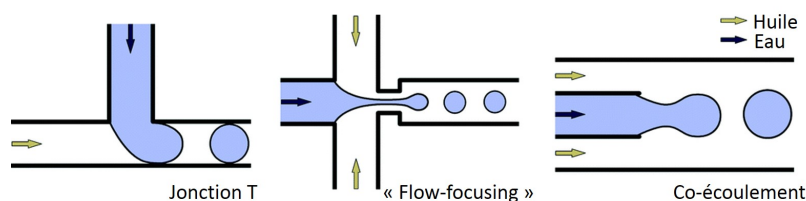


FIGURE 1.18 – Schéma expliquant la formation de gouttes selon trois principes hydrodynamiques. Adapté de [67]

1.4.3.2 La technologie EWOD (Electro-Wetting On Dielectric)

Contrairement à ces techniques qui utilisent des forces hydrodynamiques pour former les gouttes, la technologie EWOD utilise les forces électriques et repose sur le principe d'électromouillage. Ce dernier décrit le fait qu'en générant un champ électrique entre une goutte et son support, le mouillage de cette goutte sur ce support peut être modifié [68]. En pratique, en appliquant un potentiel à une goutte située sur un support isolant, un champ électrique va être créé, accumulant des charges à l'interface liquide-solide ainsi qu'à l'interface liquide-air à proximité du solide. De cette dernière accumulation de charge va résulter une force électrostatique tendant à "tirer la goutte" lui conférant alors un angle de contact apparent plus faible (Figure 1.19).

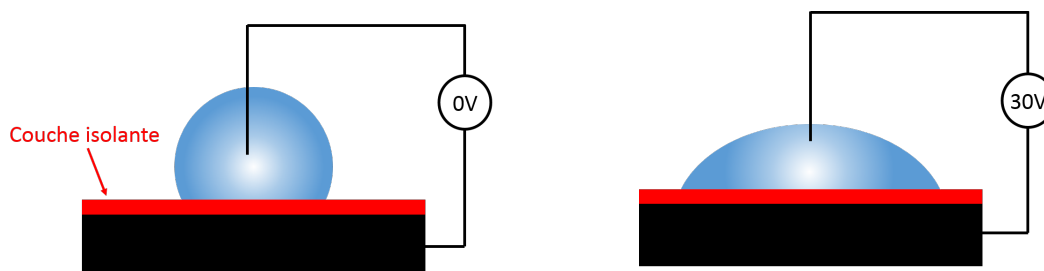


FIGURE 1.19 – Schéma de principe de l'électromouillage.

Cette interaction peut notamment être utilisée pour générer, déplacer et mélanger des gouttes [69, 70]. Un avantage de cette technique par rapport au flow focusing est qu'elle peut permettre la manipulation des différentes gouttes de façon séparée grâce à un quadrillage d'électrodes. En revanche c'est une technique assez lourde à mettre en place du fait de la nécessité d'un grand nombre d'électrodes et repose donc principalement sur des circuits en silicium. De plus les tensions nécessaires aux phénomènes d'électromouillages sont généralement plusieurs dizaines de volts et nécessitent donc une alimentation externe.

1.4.4 Les systèmes microfluidiques capillaires

1.4.4.1 L'écoulement par imprégnation

L'écoulement par imprégnation au sein d'une matrice hydrophile est connu de tous. C'est par exemple le principe du papier buvard ou du papier essuie-tout. L'utilisation de cette propriété de mouillabilité pour provoquer l'écoulement d'un liquide est extrêmement intéressante puisqu'elle permet de s'affranchir d'un équipement annexe ainsi que de toute source énergétique. C'est d'ailleurs le type d'écoulement qui est utilisé dans les dispositifs PoC actuellement commercialisés comme le test de grossesse ou le test de glycémie.

Toutefois, il faut noter certaines limitations inhérentes à ce type d'écoulement. L'écoulement se faisant par imprégnation au sein d'une matrice fibreuse, ces dispositifs présentent une grande surface développée pouvant conduire à de potentielles adsorptions non-spécifiques. D'autre part, l'écoulement au sein de telles matrices fibreuses est bien plus compliqué qu'un écoulement dans un canal classique [71] et de plus il est largement conditionné par l'environnement extérieur et en particulier l'humidité.

1.4.4.2 L'écoulement capillaire spontané

Bien que la microfluidique capillaire fasse souvent référence à des systèmes fonctionnant par l'imprégnation des liquides dans des matrices hydrophiles, un écoulement capillaire peut également avoir lieu au sein de micro-canaux ayant des parois hydrophiles 1.20. Ce type d'écoulement a pour avantages d'éviter au fluide de s'écouler dans une matrice fibreuse, tout en conservant l'avantage de l'indépendance à des

appareils externes. On parle alors d'écoulement capillaire spontané (abrévié SCF, pour Spontaneous Capillary Flow). Ce type d'écoulement a été décrit dès 1929 avec la loi de Lucas-Washburn-Rideal [72, 73, 74] dans le cas de l'écoulement dans un tube. L'utilisation d'écoulements capillaires spontanés pour des systèmes microfluidiques reste cependant assez récente. Pour ce type d'écoulement, la géométrie des canaux est extrêmement importante. En effet, la présence ou non d'un SCF ainsi que sa dynamique, dépendent en grande partie des dimensions des canaux. Cela peut ainsi contraindre le design des systèmes utilisant ce type d'écoulement.

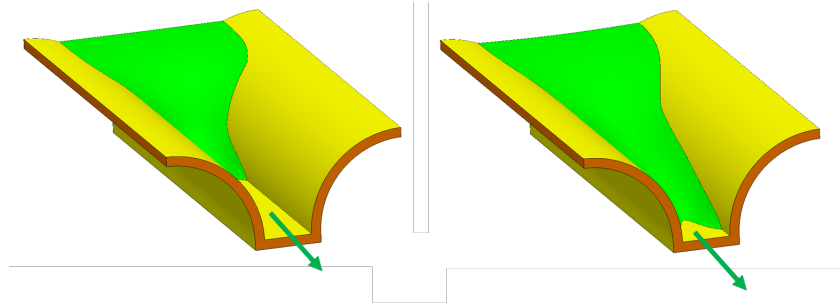


FIGURE 1.20 – Illustration d'un écoulement capillaire spontané. Images obtenues avec Surface Evolver [75].

1.4.5 Tableau comparatif

Le tableau 1.4 résume les techniques les plus utilisées pour générer des écoulements avec, pour chacune, leurs principaux avantages et inconvénients.

Le souhait d'aboutir à un dispositif autonome nous a orienté vers l'utilisation d'écoulements capillaires. D'autre part, compte tenu de la meilleure robustesse par rapport aux conditions environnementales, nous utiliserons des écoulements capillaires spontanés plutôt qu'un écoulement par imprégnation.

Méthode de génération d'écoulement	Avantages	Inconvénients
Générateur de pression / Débit	Réglable	Appareil externe Connectiques fluidiques nécessaires
La microfluidique centrifuge	Pas de connectiques fluidiques	Appareil externe Design de la puce contraint
Flow focusing	parallélismes	Appareil externe Connectiques fluidiques nécessaires
EWOD	Parallélismes Pas de connectiques fluidiques	Techno silicium Appareil externe
Écoulement par imprégnation	Pas d'appareil	Écoulement dans une matrice fibreuse
Écoulement capillaire spontanée	Pas d'appareil	Géométrie et écoulement lié

Tableau 1.4 – Tableau comparant les principales techniques d'écoulement utilisées en microfluidique.

1.5 Portabilité : "Lab-on-a-chip" ou "Chip-in-a-lab" ?

Le critère d'autonomie et de portabilité "Equipment-free" est l'un des critères les plus contraignants parmi la liste "ASSURED" proposée par l'OMS. En effet il vise à créer des dispositifs microfluidiques pouvant être utilisés n'importe où, c'est-à-dire même en l'absence d'électricité ou d'accès à l'eau potable. Cela implique notamment que le système ne doit pas reposer sur l'utilisation d'appareils externes qui sont généralement difficiles à transporter et nécessitent une source d'énergie. Or il se trouve que beaucoup de circuits microfluidiques ne sont en fait qu'une partie du système complet. D'autres appareils, comme des pompes ou des capteurs divers, sont nécessaires pour son bon fonctionnement. C'est pourquoi les systèmes "Lab-on-a-chip" sont parfois appelés des "Chip-in-a lab". En effet, bien qu'une partie du système soit miniaturisée et implémentée dans la carte microfluidique, des instruments de laboratoire sont toujours nécessaires pour pouvoir la faire fonctionner. La suite de cette section s'intéresse plus particulièrement aux moyens utilisés pour améliorer cette portabilité.

Dans la section précédente, nous avons vu que la gestion de l'écoulement peut être rendue autonome en utilisant la capillarité. Cela est un premier pas vers l'autonomie des systèmes et ce type d'écoulement est maintenant largement utilisé. En revanche, disposer d'un système totalement autonome implique également l'intégration d'autres fonctions comme par exemple le stockage et la reprise des réactifs nécessaires au test, le chauffage dans le cas d'une amplification d'ADN, ou encore la possibilité d'effectuer des mesures (optiques, électrochimique, etc).

Concernant les méthodes de mesure et de lecture de résultats, de plus en plus de tests s'orientent vers des systèmes colorimétriques. En effet les résultats peuvent ainsi être interprétés qualitativement, i.e. avec une réponse positif/négatif (cas du test de grossesse), ou semi-quantitativement par un utilisateur quelconque (cas du papier pH). Certains systèmes colorimétriques peuvent même être interprétés qualitativement en prenant une photographie avec un smartphone [76]. La généralisation de l'utilisation des smartphones permet d'ouvrir la voie à la télémédecine, où les analyses sont effectuées par le patient mais les résultats sont interprétés par du personnel médical délocalisé [77].

Lorsque l'intégration d'éléments actifs (nécessitant un apport d'énergie) est nécessaire pour le diagnostic, comme c'est le cas du chauffage pour une amplification d'ADN, le critère de portabilité est souvent élargi à la possibilité d'utiliser le système avec un smartphone (ou un port USB) [78]. Cette extension est compatible avec la télémédecine et du fait de la grande présence des smartphones dans le monde actuel, ne restreint pas l'accès au diagnostic final.

Lorsque des éléments conducteurs (comme des électrodes ou des éléments chauffants) sont nécessaires pour le fonctionnement du système, un moyen simple de les intégrer est de les réaliser par sérigraphie (ou par impression jet d'encre). C'est en effet un procédé industriel de dépôt d'encres pouvant être conductrices. Le panel d'encres conductrices s'est largement développé avec l'arrivée de l'électronique flexible. En effet la possibilité d'utiliser des supports organiques souples pour la production par sérigraphie de divers composants électroniques tel que des LEDs [79], des capteurs de pression [80], des capteurs de température [81] et autres éléments, ouvre la voie de la réalisation de systèmes électroniques à plus faible coût que les systèmes basés sur le silicium et qui seraient, de plus, flexible, voire pliable.

1.6 Récapitulatif et organisation de la thèse

Lors de cette thèse nous avons choisis de nous concentrer sur la réalisation d'un dispositif de diagnostic Point-of-Care basé sur une réaction d'amplification d'ADN isotherme LAMP. Une attention particulière

a été prêté au respect du critère ASSURED proposé par l'OMS et plus spécifiquement à la portabilité et l'autonomie du système afin qu'il puisse être utilisable en toutes conditions.

Le premier élément qui a été défini est le type d'écoulement que l'on a souhaité utiliser. De façon à assurer l'autonomie du système, un écoulement par capillarité est nécessaire. Nous avons fait le choix de nous tourner vers les écoulements capillaires spontanés plutôt que vers les écoulements par imprégnation afin d'améliorer la robustesse du système par rapport aux conditions environnementales et en particulier l'humidité. En effet suivant la région du monde où un tel système pourrait être utilisé, l'humidité relative de l'air peut être très différente. D'autre part, les écoulements capillaires spontanés ont l'avantage d'avoir lieu au sein de canaux exempt de fibre et sont donc d'une complexité moins importante. Cela permet de pouvoir les caractériser et les modéliser plus facilement. Le chapitre 2 est ainsi consacré à l'étude de ce type d'écoulement.

Ensuite, afin de pouvoir proposer un système peu cher et dont l'industrialisation ne pose pas de problème, nous nous sommes tournés vers le papier comme support et le thermoformage comme moyen de production pour nos systèmes microfluidiques. En effet à la fois l'industrie papetière et le procédé de thermoformage sont d'ores et déjà existant et proposent des fabrications en série. De plus, le faible coût du matériau et du procédé en question permettent d'envisager un dispositif final à bas-coût. Le chapitre 3 est ainsi dédiée au développement d'un nouveau procédé de fabrication permettant d'obtenir par le thermoformage d'un support papier des canaux ouverts permettant un écoulement capillaire spontané.

Un diagnostic par amplification d'ADN peut être délicat à intégrer totalement dans un dispositif portable car il nécessite un chauffage ainsi qu'une détection. Le choix d'utiliser une amplification de type LAMP va notamment permettre de simplifier la détection par rapport à une amplification de type PCR car une détection par pHmétrie est possible. Deux voies de détection par pHmétrie ont été étudiées au cours de cette thèse. La première consiste en une détection colorimétrique via l'utilisation d'un indicateur coloré. La seconde détection sera faite par voie électrochimique. Cette seconde technique de détection est plus complexe à mettre en place car elle nécessite l'insertion d'électrodes dans la système mais, comme nous le verrons dans le chapitre dédié à cette étude, elle offre la possibilité d'effectuer un suivi en temps réel de l'amplification, présageant des mesures quantitatives. Ces électrodes seront intégrées dans le système par procédé sérigraphique. En effet ce dernier est peu onéreux et est compatible avec la voie de production envisagée. L'élément chauffant nécessaire pour effectuer l'amplification d'ADN sera ainsi, lui aussi, intégré par voie sérigraphie. Dans un premier temps, afin de simplifier les études, le choix a été fait d'étudier ces deux éléments fonctionnels de façon séparée et sur support plastique (Chapitre 4). L'intégration de ces éléments se fera ensuite progressivement, en augmentant de façon échelonnée la complexité du système final (Chapitre 5).

Bibliographie

- [1] "WHO | Fact sheets : Infectious diseases." http://www.who.int/topics/infectious_diseases/factsheets/en/, 2014.
- [2] M. Urdea, L. A. Penny, S. S. Olmsted, M. Y. Giovanni, P. Kaspar, A. Shepherd, P. Wilson, C. A. Dahl, S. Buchsbaum, G. Moeller, and others, "Requirements for high impact diagnostics in the developing world," *Nature*, vol. 444, pp. 73–79, 2006.
- [3] H. Kettler, K. White, and S. Hawkes, "Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections," tech. rep., 2004.
- [4] "Bandelette Urinaire - Interpreter les Resultats." http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=interpreter_analyse_urine-les-resultats-de-l-examen-par-bandelette-urinaire#.
- [5] "Travaux dirigés Immunologie BIOL 360 : Anticorps monoclonaux - ppt telecharger." <http://slideplayer.fr/slide/1678636/>.
- [6] "Biology Enzymes in Detail - Shmoop Biology." <http://www.shmoop.com/energy-flow-enzymes/enzymes.html>.
- [7] S.-C. Liao, J. Peng, M. G. Mauk, S. Awasthi, J. Song, H. Friedman, H. H. Bau, and C. Liu, "Smart cup : A minimally-instrumented, smartphone-based point-of-care molecular diagnostic device," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 229, pp. 232–238, June 2016.
- [8] "Talking Glossary of Genetic Terms." <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=53>.
- [9] "Talking Glossary of Genetic Terms." <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=16>.
- [10] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro : The Polymerase Chain Reaction," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 51, pp. 263–273, Jan. 1986.
- [11] "PCR Basics | Thermo Fisher Scientific." <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>.
- [12] E. T. Lagally, I. Medintz, and R. A. Mathies, "Single-Molecule DNA Amplification and Analysis in an Integrated Microfluidic Device," *Analytical Chemistry*, vol. 73, pp. 565–570, Feb. 2001.
- [13] Y. Matsubara, K. Kerman, M. Kobayashi, S. Yamamura, Y. Morita, and E. Tamiya, "Microchamber array based DNA quantification and specific sequence detection from a single copy via PCR in nanoliter volumes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1482–1490, Feb. 2005.
- [14] D. Moschou, N. Vourdas, G. Kokkoris, G. Papadakis, J. Parthenios, S. Chatzandroulis, and A. Tserepi, "All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 199, pp. 470–478, Aug. 2014.

-
- [15] M. Krishnan, V. M. Ugaz, and M. A. Burns, "PCR in a Rayleigh-Bénard Convection Cell," *Science*, vol. 298, pp. 793–793, Oct. 2002.
 - [16] W. Chou, P. Chen, M. Miao Jr, L. Kuo, S. Yeh, and P. Chen, "Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater," *BioTechniques*, vol. 50, pp. 52–57, Jan. 2011.
 - [17] E. K. Wheeler, W. Benett, P. Stratton, J. Richards, A. Chen, A. Christian, K. D. Ness, J. Ortega, L. G. Li, T. H. Weisgraber, K. Goodson, and F. Milanovich, "Convectively Driven Polymerase Chain Reaction Thermal Cycler," *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 4011–4016, July 2004.
 - [18] Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, and C. Fan, "Isothermal Amplification of Nucleic Acids," *Chemical Reviews*, vol. 115, pp. 12491–12545, Nov. 2015.
 - [19] L. Zanolli and G. Spoto, "Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices," *Biosensors*, vol. 3, pp. 18–43, Dec. 2012.
 - [20] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, p. e63, June 2000.
 - [21] M. Safavieh, M. K. Kanakasabapathy, F. Tarlan, M. U. Ahmed, M. Zourob, W. Asghar, and H. Shafiee, "Emerging Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Microchip and Microdevice Technologies for Nucleic Acid Detection," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 2, pp. 278–294, Mar. 2016.
 - [22] R. Kodzius, K. Xiao, J. Wu, X. Yi, X. Gong, I. G. Foulds, and W. Wen, "Inhibitory effect of common microfluidic materials on PCR outcome," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 161, pp. 349–358, Jan. 2012.
 - [23] N. A. Tanner, Y. Zhang, and T. C. Evans, "Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes," *BioTechniques*, vol. 58, Feb. 2015.
 - [24] C.-Y. Chen, "DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies : Both past and present," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, June 2014.
 - [25] S. Terry, J. Jerman, and J. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *Electron Devices, IEEE Transactions on*, vol. 26, pp. 1880–1886, Dec. 1979.
 - [26] C. Iliescu, H. Taylor, M. Avram, J. Miao, and S. Franssila, "A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, p. 016505, 2012.
 - [27] D. Microfluidics, "Information sheet : Glass chip design guide," 2016.
 - [28] H. Becker and C. Gärtner, "Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, pp. 89–111, Jan. 2008.
 - [29] K. Y. Lee, "Micromachining applications of a high resolution ultrathick photoresist," *Journal of Vacuum Science & Technology B : Microelectronics and Nanometer Structures*, vol. 13, p. 3012, Nov. 1995.
 - [30] D. C. Duffy, H. L. Gillis, J. Lin, N. F. Sheppard, and G. J. Kellogg, "Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems : Characterization and Multiple Enzymatic Assays," *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 4669–4678, Oct. 1999.
 - [31] A. Ampara, K. C. S. Shaw, and K. Liu, "Micro Milling for Polymer Materials Used in Prototyping of Microfluidic Chip Application," *Advanced Materials Research*, vol. 565, pp. 552–557, 2012.
 - [32] R. Lopes, R. O. Rodrigues, D. Pinho, V. Garcia, H. Schütte, R. Lima, and S. Gassmann, "Low cost microfluidic device for partial cell separation : Micromilling approach," in *2015 IEEE International Conference on Industrial Technology (ICIT)*, pp. 3347–3350, Mar. 2015.
-

-
- [33] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4974–4984, Dec. 1998.
 - [34] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S. R. Quake, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," *Science*, vol. 288, pp. 113–116, Apr. 2000.
 - [35] "ZPP-injection des matieres plastiques, marquage a chaud, tampographie - Injection des matieres plastiques, surmoulage. Marquage Å chaud, tampographie.." <http://www.zpp-plastiques.com/Injection-matieres-plastiques>.
 - [36] N. S. Cameron, H. Roberge, T. Veres, S. C. Jakeway, and H. J. Crabtree, "High fidelity, high yield production of microfluidic devices by hot embossing lithography : Rheology and stiction," vol. 6, pp. 936–941, June 2006.
 - [37] Y. H. Cho, J. Park, H. Park, X. Cheng, B. J. Kim, and A. Han, "Fabrication of high-aspect-ratio polymer nanochannels using a novel Si nanoimprint mold and solvent-assisted sealing," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 9, pp. 163–170, Nov. 2009.
 - [38] R. Truckenmüller, S. Giselbrecht, N. Rivron, E. Gottwald, V. Saile, A. van den Berg, M. Wessling, and C. van Blitterswijk, "Thermoforming of Film-Based Biomedical Microdevices," *Advanced Materials*, vol. 23, pp. 1311–1329, Mar. 2011.
 - [39] M. M. Thuo, R. V. Martinez, W.-J. Lan, X. Liu, J. Barber, M. B. J. Atkinson, D. Bandarage, J.-F. Bloch, and G. M. Whitesides, "Fabrication of Low-Cost Paper-Based Microfluidic Devices by Embossing or Cut-and-Stack Methods," *Chemistry of Materials*, vol. 26, pp. 4230–4237, July 2014.
 - [40] K. C. Bhargava, B. Thompson, and N. Malmstadt, "Discrete elements for 3D microfluidics," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, pp. 15013–15018, Oct. 2014.
 - [41] K. G. Lee, K. J. Park, S. Seok, S. Shin, D. H. Kim, J. Y. Park, Y. S. Heo, S. J. Lee, and T. J. Lee, "3D printed modules for integrated microfluidic devices," *RSC Advances*, vol. 4, no. 62, pp. 32876–32880, 2014.
 - [42] P. F. O'Neill, A. Ben Azouz, M. Vázquez, J. Liu, S. Marczak, Z. Slouka, H. C. Chang, D. Diamond, and D. Brabazon, "Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications," *Biomicrofluidics*, vol. 8, p. 052112, Sept. 2014.
 - [43] "Impresion 3D por estereolitografia, te explicamos todo! - 3Dnatives." <http://www.3dnatives.com/es/impresion-3d-por-estereolitografia-les-explicamos-todo/>.
 - [44] A. K. Au, W. Lee, and A. Folch, "Mail-order microfluidics : Evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 7, pp. 1294–1301, 2014.
 - [45] S. Begolo, D. V. Zhukov, D. A. Selck, L. Li, and R. F. Ismagilov, "The pumping lid : Investigating multi-material 3D printing for equipment-free, programmable generation of positive and negative pressures for microfluidic applications," *Lab Chip*, vol. 14, pp. 4616–4628, Sept. 2014.
 - [46] A. K. Au, N. Bhattacharjee, L. F. Horowitz, T. C. Chang, and A. Folch, "3D-printed microfluidic automation," vol. 15, pp. 1934–1941, Mar. 2015.
 - [47] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 12, p. 2210, 2013.
 - [48] "Tests de grossesse - Pharmacie en ligne Pharmacie Expert - page 1." <http://www.pharmacie-expert.com/catalogue/bebe-grossesse/grossesse/tests-de-grossesse?page=all>.
 - [49] K. Dieterich, "Testing-paper and method of making same,." 1902. Classification coopérative G01N31/22.
-

-
- [50] A. Martinez, S. Phillips, M. Butte, and G. Whitesides, "Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, pp. 1318–1320, Feb. 2007.
- [51] D. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak, and C. S. Henry, "Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices," *Analytical Chemistry*, vol. 87, pp. 19–41, Jan. 2015.
- [52] D. Agustini, M. F. Bergamini, and L. H. Marcolino-Junior, "Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application," *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 345–352, Jan. 2016.
- [53] X. Li, J. Tian, and W. Shen, "Thread as a Versatile Material for Low-Cost Microfluidic Diagnostics," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 2, pp. 1–6, Jan. 2010.
- [54] "Flow Controller MFCS™-EZ : Microfluidic Flow Control System | Fluigent." <http://www.fluigent.com/microfluidic-flow-control-system/>.
- [55] "OB1 - 4 channels microfluidic flow controller - elveflow." <http://www.elveflow.com/microfluidic-flow-control-products/flow-control-system/pressure-controller/>.
- [56] C. Parent, Y. Fouillet, N. Verplanck, and J.-L. Achard, "Validation and integration of an effervescent reaction for fluid actuation in a microfluidic platform.," (Dublin), 2016.
- [57] P.-H. Cazorla, O. Fuchs, M. Cochet, S. Maubert, G. Le Rhun, P. Robert, Y. Fouillet, and E. Defay, "Piezoelectric Micro-pump with PZT Thin Film for Low Consumption Microfluidic Devices," *Procedia Engineering*, vol. 87, pp. 488–491, 2014.
- [58] M. J. Madou and G. J. Kellogg, "LabCD : A centrifuge-based microfluidic platform for diagnostics," vol. 3259, pp. 80–93, 1998.
- [59] "QIAGEN Lake Constance : a disk player for rapid diagnoses." <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de>.
- [60] L. Clime, D. Brassard, M. Geissler, and T. Veres, "Active pneumatic control of centrifugal microfluidic flows for lab-on-a-chip applications," vol. 15, pp. 2400–2411, May 2015.
- [61] L. Mazutis, A. F. Araghi, O. J. Miller, J.-C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B. J. Miller, J. B. Hutchison, D. Link, A. D. Griffiths, and M. Ryckelynck, "Droplet-Based Microfluidic Systems for High-Throughput Single DNA Molecule Isothermal Amplification and Analysis," *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 4813–4821, June 2009.
- [62] D. Pekin, Y. Skhiri, J.-C. Baret, D. L. Corre, L. Mazutis, C. B. Salem, F. Millot, A. E. Harrak, J. B. Hutchison, J. W. Larson, D. R. Link, P. Laurent-Puig, A. D. Griffiths, and V. Taly, "Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 2156–2166, June 2011.
- [63] P. de Vos, M. M. Faas, B. Strand, and R. Calafiore, "Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5603–5617, Nov. 2006.
- [64] P. Dalle, S. Morales, J. Berthier, P.-Y. Benhamou, A. Bellemin Comte, F. Boizot, G. Costa, and F. Rivera, "New microfluidic chip for the production of spherical gelled capsules for cell encapsulation," pp. 298–301, 2012.
- [65] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.-C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, "Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms," *Chemistry & Biology*, vol. 15, pp. 427–437, May 2008.
-

-
- [66] S.-U. Hassan, A. M. Nightingale, C. L. Leong, Y. Zhang, G. Evans, M. G. Boutelle, and X. Z. Niu, "WEARABLE DROPLET-BASED MICROFLUIDIC SENSOR DEVICE FOR CONTINUOUS SAMPLING AND REAL-TIME ANALYSIS," in *ResearchGate*, Oct. 2016.
 - [67] D. J. Collins, A. Neild, A. deMello, A.-Q. Liu, and Y. Ai, "The Poisson distribution and beyond : Methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation," vol. 15, pp. 3439–3459, Aug. 2015.
 - [68] F. Mugele and J.-C. Baret, "Electrowetting : From basics to applications," *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 17, no. 28, p. R705, 2005.
 - [69] M. G. Pollack, A. D. Shenderov, and R. B. Fair, "Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics," vol. 2, pp. 96–101, May 2002.
 - [70] J. Berthier and K. A. Brakke, "Digital Microfluidics," in *The Physics of Microdroplets*, pp. 293–339, John Wiley & Sons, Inc., 2012.
 - [71] J. R. Buser, J. E. Atwood, and P. Yager, "Nothing is saturated : Correcting the assumptions made while predicting flow in paper microfluidics.," (Dublin), 2016.
 - [72] E. W. Washburn, "The dynamics of capillary flow," *Physical review*, vol. 17, no. 3, p. 273, 1921.
 - [73] R. Lucas, "Ueber das Zeitgesetz des kapillaren Aufstiegs von Flussigkeiten," *Kolloid-Zeitschrift*, vol. 23, pp. 15–22, July 1918.
 - [74] E. K. Rideal, "On the flow of liquids under capillary pressure," *Philosophical Magazine Series 6*, vol. 44, pp. 1152–1159, Dec. 1922.
 - [75] K. A. Brakke, "The surface Evolver," *Experimental Mathematics*, vol. 1, no. 2, pp. 141–165, 1992.
 - [76] M. T. Koesdjojo, S. Pengpumkiat, Y. Wu, A. Boonloed, D. Huynh, T. P. Remcho, and V. T. Remcho, "Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom," *Journal of Chemical Education*, vol. 92, pp. 737–741, Apr. 2015.
 - [77] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple Telemedicine for Developing Regions : Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 3699–3707, May 2008.
 - [78] T. Laksanasopin, T. W. Guo, S. Nayak, A. A. Sridhara, S. Xie, O. O. Olowookere, P. Cadinu, F. Meng, N. H. Chee, J. Kim, C. D. Chin, E. Munyazesa, P. Mugwaneza, A. J. Rai, V. Mugisha, A. R. Castro, D. Steinmiller, V. Linder, J. E. Justman, S. Nsanzimana, and S. K. Sia, "A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care," *Science Translational Medicine*, vol. 7, pp. 273re1–273re1, Feb. 2015.
 - [79] M. A. Baldo, S. Lamansky, P. E. Burrows, M. E. Thompson, and S. R. Forrest, "Very high-efficiency green organic light-emitting devices based on electrophosphorescence," *Applied Physics Letters*, vol. 75, pp. 4–6, June 1999.
 - [80] T. Someya, T. Sekitani, S. Iba, Y. Kato, H. Kawaguchi, and T. Sakurai, "A large-area, flexible pressure sensor matrix with organic field-effect transistors for artificial skin applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, pp. 9966–9970, June 2004.
 - [81] A. Aliane, V. Fischer, M. Galliari, L. Tournon, R. Gwoziecki, C. Serbutoviez, I. Chartier, and R. Coppard, "Enhanced printed temperature sensors on flexible substrate," *Microelectronics Journal*, vol. 45, pp. 1621–1626, Dec. 2014.
-

Chapitre 2

Écoulements Capillaires spontanés

Afin de rendre les systèmes élaborés le plus autonome et portable possible, comme il l'a été discuter au chapitre précédent, il est intéressant d'utiliser les phénomènes capillaires pour générer les écoulements dans ces dispositifs. Ce chapitre est ainsi consacré à l'étude de ces écoulements. Cela se fera principalement par une approche théorique, qui validée au fur et à mesure par des expériences menée au cours de cette thèse. La possibilité d'effectuer des simulation en éléments finis avec le logiciel COMSOL Multiphysics sera également discuté à la fin de ce chapitre. Cependant avant d'entamer la théorie des écoulements capillaires, il convient de définir quelques notions élémentaires, telles que la tension de surface, l'angle de contact, ou encore la force capillaire.

2.1 Notions élémentaires : Tension de surface, Angle de contact et Force capillaire

2.1.1 La tension de surface

La première notion définie dans cette section est la tension de surface (notée γ). Cette dernière est une grandeur macroscopique qui traduit un déséquilibre des interactions au niveau microscopique d'une interface. En effet, si l'on considère une goutte d'eau, on se rend compte qu'à l'interface de celle-ci les molécules d'eau disposent de moins d'interactions que leurs semblables qui se trouvent dans le volume de la-dite goutte [1] (Figure 2.1). Ainsi à l'interface, les molécules ont environ deux fois moins de molécules d'eau voisines qu'au sein du volume (la moitié du voisinage est constituée par l'air), est donc environ deux fois moins d'interactions. Cela a pour conséquence la cohésion de la goutte. Macroscopique cela peut être caractérisée par la présence d'une énergie de surface, étroitement liée à la tension de surface selon l'équation 2.1.

$$E_S = \gamma * S \quad (2.1)$$

où S est la surface du contact entre les deux milieux.

D'après l'équation 2.1, afin de minimiser son énergie, une interface va tendre à réduire sa surface. C'est la raison pour laquelle les gouttes ont une forme sphérique. Cette minimisation de l'énergie de surface peut également se vérifier à l'aide d'une expérience avec un film d'eau savonneuse [2]. Pour cette expérience, un film d'eau savonneuse est formé dans un cadre dont un des cotés est mobile. Le film va, afin de réduire sa surface, tirer le coté mobile du cadre (Figure 2.2 A). Ce mouvement peut être compensé en appliquant une force proportionnelle à la longueur du coté libre de se déplacer. Ainsi la tension de surface peut être représentée comme une force linéique le long de la frontière du périmètre de contact, orientée de manière

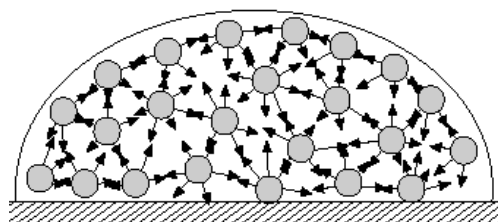


FIGURE 2.1 – A l'interface liquide/gaz les molécules du liquide possèdent moins d'interactions que dans le volume du liquide. Cela est traduit macroscopiquement par le notion de tension de surface γ

à réduire la surface l'interface (Figure 2.2 B).

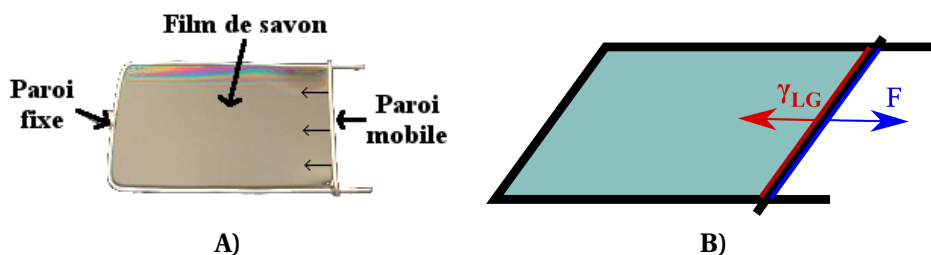


FIGURE 2.2 – **A)** Minimisation de l'énergie de surface d'un film d'eau savonneuse fixé à un cadre dont une des parois est mobile. **B)** Représentation de la tension de surface par une force linéique.

Dans les paragraphes précédents, la notion de tension de surface a été définie entre un liquide et un gaz, mais cette dernière est présente à toutes interfaces. C'est-à-dire qu'il existe de la même façon une tension de surface entre un liquide et un solide, entre un solide et un gaz mais également entre deux liquides. Notons que la tension de surface est une grandeur positive, qui s'annule dans le cas de deux milieux miscibles (il n'y a alors pas d'interface). Compte tenu des différentes tensions de surfaces évoquées, des indices sont généralement utilisés pour expliciter les interfaces. Par exemple, on notera γ_{S-L} la tension de surface entre un solide et un liquide ou γ_{S-G} celle entre un solide et un gaz. Bien que la notation γ_{L-G} soit utilisée pour la tension de surface liquide-gaz, il est courant de ne la noter simplement que γ lorsqu'il n'y a pas d'ambiguïté.

2.1.2 L'angle de contact

La seconde grandeur définie dans cette section est l'angle de contact et est notée θ . Elle est définie comme l'angle entre l'interface solide/liquide et l'interface liquide/gaz (Figure 2.3) et caractérise la mouillabilité d'un liquide sur un solide. Dans le cas d'un angle de contact inférieur à 90° le liquide est dit mouillant sur le solide en question. Il sera dit non-mouillant dans le cas contraire. Dans le cas particulier où le liquide est de l'eau, on parle de surface hydrophile dans le cas où l'eau est mouillante et de surface hydrophobe sinon (Figure 2.4).

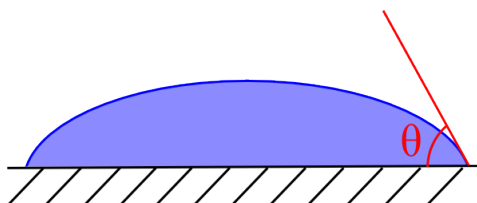


FIGURE 2.3 – Schéma définissant la grandeur d'angle de contact θ .

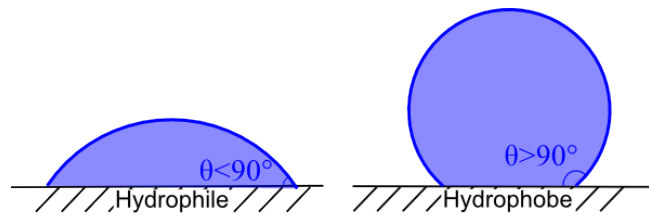


FIGURE 2.4 – Une surface est caractériser d'hydrophile ou d'hydrophobe suivant son angle de contact.

2.1.3 La loi de Young

La notion d'angle de contact est définie, dans le paragraphe précédent, lorsque que trois phases (une liquide, une solide et une gazeuse) sont en contact. La présence de ces différentes phases induit donc la présence de tensions de surface à l'interface entre chacune d'elles. En particulier, lorsque l'on se place en un point de la ligne triple, *i.e.* la frontière où les trois phases sont en contact (Figure 2.5 A), un équilibre entre ces différentes tensions de surface est atteint (Figure 2.5 B). Une projection sur l'axe horizontal de ces forces à l'équilibre permet de d'exprimer la loi de Young selon l'équation 2.2.

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \cos(\theta)\gamma_{LG} \quad (2.2)$$

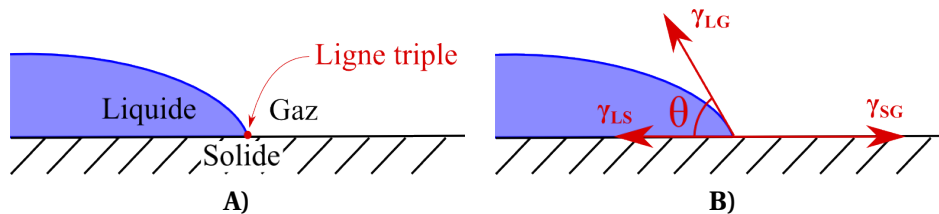


FIGURE 2.5 – A) Schéma explicitant la notion de ligne triple. B) Équilibre atteint par les forces de tensions de surface au niveau d'un point de la ligne triple.

La loi de Young démontre ainsi que les notions d'angle de contact et de tension de contact sont étroitement liées. Cette loi sera par la suite utilisée pour s'affranchir des grandeurs de tension de surface entre des interfaces solide/liquide et solide/gaz, au profit des grandeurs de tension de surface liquide/gaz et d'angle de contact qui sont plus facilement mesurable expérimentalement.

2.1.4 La force capillaire

Comme évoqué au début de ce chapitre, l'objet de celui-ci est l'étude des écoulements capillaires spontanés. Ce type d'écoulement est possible grâce à la présence de forces capillaires dans les systèmes en question. La présence de telles forces est, par exemple, observée avec le phénomène de montée capillaire [3] (Fig 2.6) : lorsqu'un tube est placé verticalement en contact avec un liquide mouillant sa surface, le liquide "monte" dans le tube (Figure 2.6 A). Si au contraire le liquide n'est pas mouillant, le liquide "descend" dans le tube (Figure 2.6 B).

L'origine de cette force capillaire, peut être expliquée grâce aux notions définies dans les premiers paragraphes de ce chapitre. En effet, cette force capillaire traduit le gain énergétique induit par le remplacement d'une interface solide-gaz par une interface solide-liquide [4]. Elle peut être exprimée sous la forme d'une

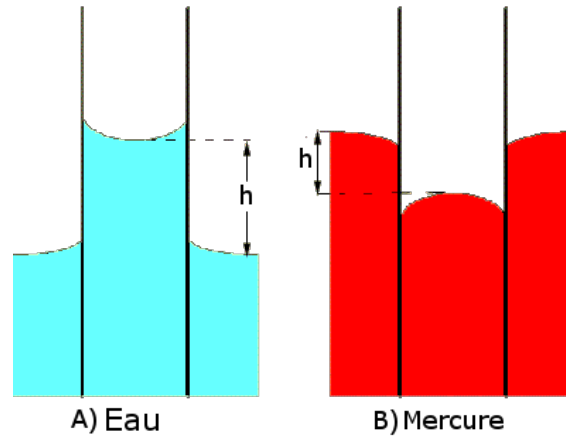


FIGURE 2.6 – Phénomène de montée capillaire. A) Cas d'un liquide mouillant. B) Cas d'un liquide non mouillant.

force linéique (en N/m) selon l'équation 2.3.

$$F_{caplin} = -(\gamma_{SL} - \gamma_{SG}) \stackrel{\text{Eq (2.2)}}{=} \gamma * \cos(\theta) \quad (2.3)$$

$$F_{cap} = 2 * \pi * R * \gamma * \cos(\theta) \begin{cases} > 0 & \text{si le liquide est mouillant,} \\ < 0 & \text{si le liquide n'est pas mouillant.} \end{cases} \quad (2.4)$$

où R est le rayon du tube.

Dans le cas d'un tube, l'équation 2.3 se réduit à l'expression 2.4. Pour un liquide mouillant, la force capillaire est positive et elle va donc tirer le liquide. Pour un liquide non mouillant, la force capillaire est négative et elle va donc pousser le liquide. Notons que si l'on réalise de telles expériences, on remarque que cette montée capillaire ne se fait pas de façon infinie, elle atteint une hauteur limite h . En effet, lorsque le liquide monte dans le tube, la colonne d'eau générée est alors soumise à la gravité. Il arrive ainsi un moment où, la force capillaire qui tire le liquide vers le haut est compensée par le poids de la colonne d'eau créée (équation 2.5).

$$F_{cap} = P \quad (2.5)$$

$$\Leftrightarrow 2 * \pi * R * \gamma * \cos(\theta) = \rho * \pi * R^2 * h * g$$

$$\Leftrightarrow h = \frac{2 * \gamma * \cos(\theta)}{\rho * R * g} \quad (2.6)$$

Cela montre que la capillarité, et plus généralement les phénomènes liés à la tension de surface, peuvent être altérés par la gravité. Afin de quantifier l'importance de la gravité vis-à-vis de la tension de surface, une grandeur adimensionnelle appelée nombre de Bond (définie par l'équation 2.7) est utilisée.

$$Bo = \frac{\Delta\rho * g * L^2}{\gamma} \quad (2.7)$$

où $\Delta\rho$ est la différence de densité entre le liquide et le fluide environnant (généralement l'air), g est l'accélération de la gravité et L est une longueur caractéristique du système.

Lorsque le nombre de Bond est inférieur à 1, les forces gravitationnelles sont négligeables devant la

tension superficielle. Cela conduit à gouttes sphériques (Figure 2.7 A), forme due uniquement à la minimisation de l'énergie de surface de la goutte [5]. Dans le cas où la gravité n'est plus négligeable, *i.e.* $Bo > 1$, les gouttes ont alors une forme aplatie (Figure 2.7 B). La dimension (L_c) à partir de laquelle la gravité devient non négligeable (*i.e.* $Bo = 1$) est appelée longueur capillaire, et est définie par l'équation 2.8.

$$L_c = \sqrt{\frac{\gamma}{\Delta\rho * g}} \quad (2.8)$$

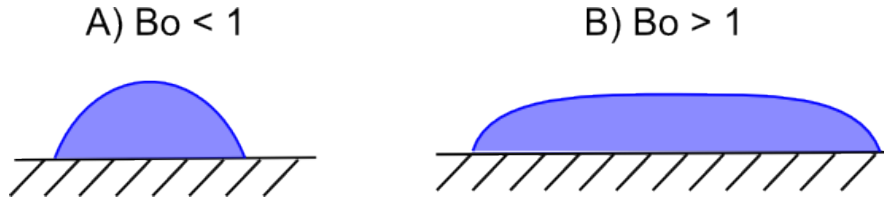


FIGURE 2.7 – Importance de la gravité et caractérisation avec le nombre de Bond. A) Cas où la gravité est négligeable ($Bo < 1$). B) Cas où la gravité n'est pas négligeable ($Bo > 1$).

Dans le cas particulier où l'on considère de l'eau dans l'air, la longueur capillaire est égale à 2.7 mm . Notons que cette longueur étant grande devant les dimensions typiques en microfluidique. Cela a donc pour conséquence, que la gravité peut généralement être négligée dans un système microfluidique (du moment que celui-ci est placé horizontalement). Comme nous allons le voir dans la section suivante, c'est grâce à cette prédominance des phénomènes interfaciaux que les écoulements capillaires spontanés apparaissent dans les systèmes microfluidiques.

2.2 Théorie des écoulements capillaires spontanés

Comme évoqué précédemment, l'utilisation d'écoulements capillaires spontanés permet d'apporter de l'autonomie et de la portabilité aux systèmes microfluidique. C'est une pourquoi l'utilisation de tels écoulements pour des dispositifs de type Poin-of-Care, ou plus généralement pour des tests biologiques/chimiques, se développe depuis quelques années [6, 7, 8, 9, 10]. Cependant afin de produire des dispositifs les plus robustes et précis possibles, la connaissance des écoulements au sein de ces derniers est essentielle. Cette section porte ainsi sur l'étude théorique des écoulements capillaires spontanés.

Dans la première sous-section plus de détails seront donnés sur les facteurs favorisant ou non la présence d'un écoulement capillaire spontané. Nous verrons que la géométrie du canal joue un rôle primordial avec le (ou les) matériau(x) composant le-dit canal. Dans un premier temps, le cas d'un canal de section uniforme composé d'un unique matériau sera étudié. Ensuite le problème sera complexifier en considérant des canaux composés de plusieurs matériaux mais toujours de section uniforme, puis le cas de canaux s'évasant sera analysé. Les dernières sous-sections discuteront quant à elles du cas particulier des écoulements capillaires sous forme de filaments et des vannes capillaires.

La seconde sous-section va quant à elle présenter la dynamique des écoulements capillaires spontanés. En effet, après une première discussion sur l'importance de l'angle de contact dynamique pour de tels écoulements, les lois de propagation d'un liquide transporté par écoulement capillaire spontané seront dérivées selon différentes conditions. Tout d'abord, cette dynamique sera étudiée pour un fluide Newtonien dans un canal de section uniforme et rectiligne. Puis ces équations seront généralisées aux fluides non-Newtoniens. Enfin, les effets de la géométrie sur la dynamique de ces écoulement seront discutés, en étudiant les cas des canaux ayant une section non-uniforme ainsi que des canaux possédant une courbure. Ces deux dernières

études seront menées dans le cas de l'écoulement de fluides Newtoniens pour plus de simplicité.

2.2.1 Conditions pour un écoulement capillaire

2.2.1.1 Cas d'un canal uniforme

Un écoulement capillaire spontané résulte de la différence de pression entre le réservoir de liquide (notée P_{res}) et le front du liquide. La pression au front du liquide est appelée pression capillaire et est notée P_{cap} . La condition pour qu'un écoulement ait lieu peut donc s'écrire selon l'équation 2.9.

$$P_{res} > P_{cap} \quad (2.9)$$

Ces pressions étant localisées au niveau d'interfaces liquide-air, elles peuvent être exprimées par la loi de Laplace. Cette dernière indique qu'à une interface entre deux fluides, la différence de pression entre ceux-ci est liée à la courbures de l'interface par la relation 2.10.

$$\Delta P = P_{intérieure} - P_{extérieure} = \gamma * \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.10)$$

où γ est la tension de surface entre les fluides et R_1 et R_2 sont deux rayons de courbures principaux de l'interface, i.e. pris dans des directions perpendiculaires (Figure 2.8).

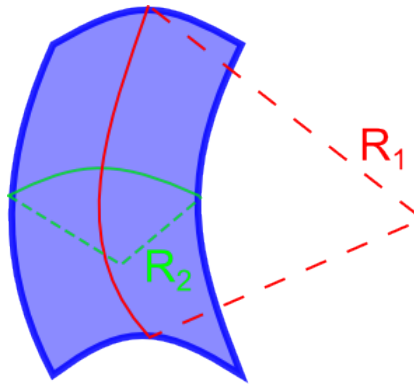


FIGURE 2.8 – Rayons de courbures principaux d'une interface (R_1 et R_2).

Cette loi est facilement utilisable lorsque la géométrie de l'interface est simple. On remarque ainsi qu'une goutte (ou une bulle) est toujours en surpression par rapport à son environnement (les deux rayons de courbures sont positifs). Cette loi permet également d'expliquer la forme qu'adopte un film de savon lorsqu'il est attaché à deux cercles éloignés l'un de l'autre (Figure 2.9). En effet l'air est à la même pression des deux côtés du film de savon. On a donc un ΔP nul, ce qui implique que les deux rayons de courbure principaux s'annulent et cela résulte en la surface minimale (au sens strict) qu'est la caténoïde.

Afin de résoudre la condition stipulée dans l'Eq 2.9, nous allons maintenant chercher à déterminer les deux pressions mises en jeu.

La pression du réservoir est généralement considérée comme constante dans le temps et nulle par rapport à la pression atmosphérique. Afin de valider ces hypothèses l'interface entre le liquide et l'air doit donc être plate (c-à-d avoir un rayon de courbure infini) et ne pas varier dans le temps. Pour cela le réservoir doit notamment être assez volumineux pour que la perte de liquide du réservoir lors de l'écoulement ne modifie pas cette interface. D'autre part, le réservoir ne doit pas être trop haut pour ne pas induire une pression hydrostatique supplémentaire à la pression de Laplace. Cela conduit donc généralement à des réservoirs assez larges et peu hauts (Figure 2.10). Les grandes dimensions latérales du réservoir vont ainsi largement

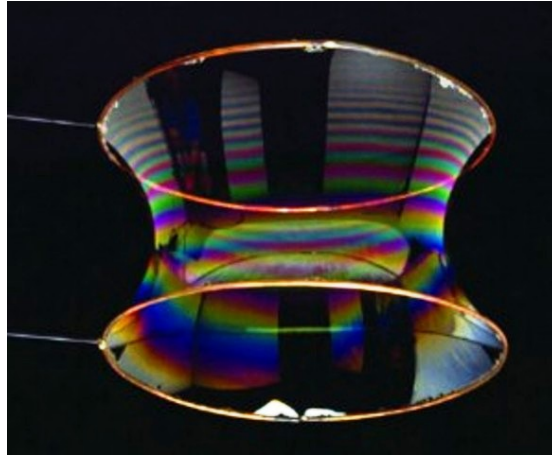


FIGURE 2.9 – Formation d'une caténoïde par un film de savon étiré entre deux anneaux.

dépasser la longueur capillaire et la gravité va aplanir l'interface conférant au réservoir une différence de pression avec l'atmosphère tendant vers zéro.

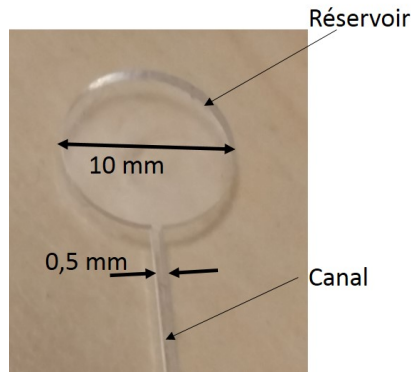


FIGURE 2.10 – Photo du réservoir d'un système microfluidique à écoulement capillaire spontané.

L'équation 2.9 se réduit alors au fait que la pression capillaire doit être négative pour qu'un écoulement ait lieu. Dans le cas d'un écoulement dans un tube composé d'un unique matériau la loi de Laplace peut encore facilement être utilisée grâce à la symétrie du système. Le rayon de courbure de l'interface est alors donné par l'équation 2.11 et la pression capillaire par l'équation 2.12.

$$R_{courbure} = \frac{R_{tube}}{\cos(\theta)} \quad (2.11)$$

$$P_{cap} = \frac{2 * \gamma * \cos(\theta)}{R_{tube}} \quad (2.12)$$

Ainsi un écoulement capillaire au sein d'un tube composé d'un unique matériau apparaît dès lors que le liquide est mouillant sur ce matériau. En effet pour un matériau hydrophile on a $\theta < 90^\circ$ ce qui conduit à une pression capillaire négative. Dans ce cas la condition d'écoulement capillaire spontané est donc respectée. Cette condition se généralise facilement à toute géométrie de canal composé d'un unique matériau. En effet il est assez aisé de comprendre que pour que l'interface du liquide soit concave, c'est-à-dire que la pression capillaire soit négative, il faut que l'angle de contact soit inférieur à 90° .

Lorsque plusieurs matériaux rentrent en jeu dans la composition du canal, les choses se complexifient. Il est à noter que la présence de plusieurs matériaux au sein d'un canal est cependant une chose relativement commune. En effet, la majorité des procédés de fabrication produisent des canaux ouverts. Le cas le

plus classique est alors de sceller un capot sur le dispositif. Dans le cas où ce capot n'est pas fait du même matériau que le canal, un canal multi-matériaux est alors obtenu. On voit également apparaître un intérêt pour ce qui est appelé la microfluidique capillaire ouverte [8, 4]. Dans ce cas le canal n'est pas fermé, un des côtés du canal est alors directement au contact avec l'air environnant. Ce type de dispositif est intéressant car il permet d'éviter le confinement de bulles dans les canaux microfluidiques mais également, car il offre un accès direct au fluide. L'ouverture des canaux peut également se faire de deux côtés du canal, on parle alors de microfluidique suspendue [11]. Dans ces systèmes le canal n'est alors plus composé que de deux parois latérales (Figure 2.11) et le liquide est maintenu suspendu à ces parois par les forces de tension de surface. Cela est possible, encore une fois, grâce aux petites dimensions du système et donc à la prédominance des forces de tension de surface vis-à-vis de la force gravitationnelle. On remarque d'ailleurs que lorsque la largeur du canal augmente et dépasse la longueur capillaire (Eq 2.8), l'interface inférieure du liquide se bombe, montrant que le poids du liquide commence à contrebalancer la force de tension de surface (Figure 2.12). Dans le cas de canaux ouverts ou suspendus, les canaux sont effectivement multi-matériaux car ils sont composés du matériau des parois et de l'air environnant.

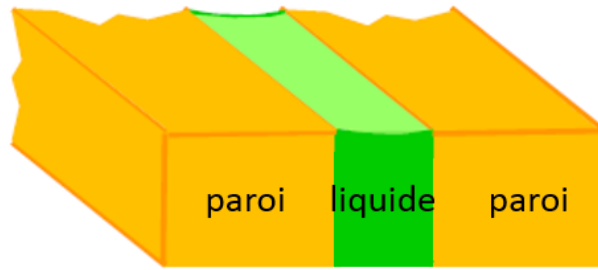


FIGURE 2.11 – Schéma d'un canal microfluidique suspendu.

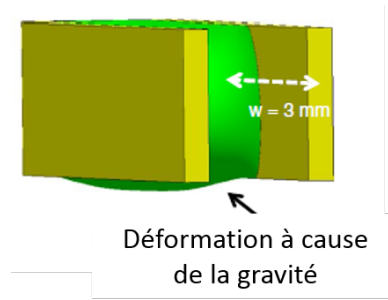


FIGURE 2.12 – Déformation l'interface inférieure du liquide par la gravité lorsque la largeur du canal augmente.

Dans le cas de canaux composites, la pression capillaire est difficilement calculable à partir de la loi de Laplace car les courbures principales de l'interface ne sont plus géométriquement intuitives. Afin de permettre son calcul, l'énergie de Gibbs de l'interface peut alors être utilisée [12]. Considérons la variation de cette énergie lorsque l'on souhaite augmenter le volume du liquide dans le canal d'un volume dV (Figure 2.13). Cette variation est donnée par l'équation 2.13,

$$dE_{interface} = -P_{cap} * dV + \sum_i (\gamma_{S_i-L} - \gamma_{S_i-G}) * dA_i \quad (2.13)$$

où les termes " $+\gamma_{S_i-L} * dA_i$ " prennent en compte le coût en énergie dû à la création d'une nouvelle interface solide-liquide, alors que les termes " $-\gamma_{S_i-G} * dA_i$ " traduisent le gain énergétique lié à la réduction

de l'interface solide-gaz.

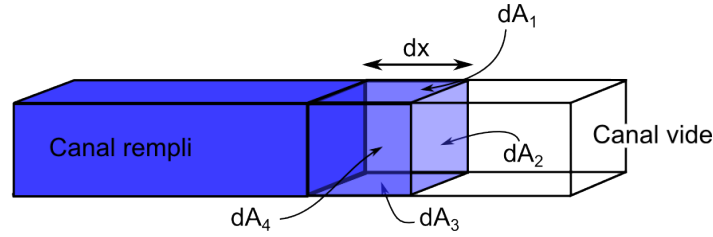


FIGURE 2.13 – Illustration de l'augmentation de surface dA_i des différentes surfaces de contact lorsque le liquide avance d'une distance dx dans le canal.

Pour continuer ce calcul il est important de remarquer que la géométrie de l'interface du front du liquide peut être considérée à l'équilibre. Afin de justifier cela, le temps de Tomotika peut être calculé (équation 2.14).

$$\tau_{Tomotika} = \frac{\mu L}{\gamma} \quad (2.14)$$

où L est une dimension caractéristique de la section du canal et μ la viscosité du fluide.

Cette grandeur quantifie le temps nécessaire à l'interface liquide-air pour atteindre son équilibre. Dans le cas de l'eau et d'un canal de 1 mm de large, on obtient $\tau_{Tomotika} = 1.4E^{-5} s$. Ce temps est extrêmement court et on peut ainsi raisonnablement considérer que l'interface du liquide est toujours à l'équilibre. On a alors $dE_{interface} = 0$ et l'expression de la pression capillaire est donnée par l'équation 2.15

$$P_{cap} = \sum_i (\gamma_{S_i-L} - \gamma_{S_i-G}) * \frac{dA_i}{dV} \quad (2.15)$$

En utilisant la relation de Young (Eq 2.2) cette dernière équation se réduit à l'expression 2.16.

$$P_{cap} = - \frac{\sum_i \gamma * \cos(\theta_i) * dA_i}{dV} \quad (2.16)$$

Comme le canal possède une section constante, l'interface se déplace par translation au sein du canal. Ainsi en notant dx la longueur du canal occupé par un volume dV , les variations élémentaires de surface et de volume peuvent être écrites selon les équations 2.17 et 2.18

$$dA_i = p_i * dx \quad (2.17)$$

et

$$dV = A_{section} * dx \quad (2.18)$$

Et finalement la pression capillaire est donnée par l'expression 2.19.

$$P_{cap} = - \frac{\gamma * \sum_i p_i * \cos(\theta_i)}{A_{section}} \quad (2.19)$$

Il est intéressant de noter que l'on retrouve au numérateur l'expression de la force capillaire (ou plus précisément de la somme des forces capillaires) présente dans le canal. Cette force est divisée par l'aire de la section du canal donnant alors l'expression de la pression capillaire.

La condition d'écoulement capillaire spontané peut donc s'écrire selon l'équation 2.20.

$$\sum_i p_i * \cos(\theta_i) > 0 \quad (2.20)$$

L'utilisation de l'angle de contact généralisé de Cassie, défini par l'équation 2.21, peut être utilisé afin de simplifier la condition d'écoulement capillaire spontané qui se réduit alors à l'expression 2.22 [12].

$$\cos(\theta^*) = \sum_i \frac{p_i}{\Gamma} * \cos(\theta_i) \quad (2.21)$$

où $\Gamma = \sum_i p_i$ est la longueur du périmètre de la section du canal.

$$\cos(\theta^*) > 0 \quad (2.22)$$

Cela signifie donc que pour qu'un écoulement capillaire spontané ait lieu, il faut qu'en moyenne l'angle de contact soit inférieur à 90° . En d'autres termes, il faut que le canal présente assez de parois hydrophiles pour compenser les possibles parois hydrophobes. A noter que cette relation peut être utilisée dans le cas de canaux ouverts ou suspendus en prenant l'angle de contact du liquide avec l'air égal à 180° .

Dans les cas particuliers d'un canal rectangulaire ouvert ou d'un canal suspendu, les conditions d'écoulement capillaire spontané peuvent s'écrire comme une condition sur le facteur de forme du canal en fonction de la mouillabilité du canal (équations 2.23 et 2.24).

$$\frac{w}{h} < \frac{2\cos(\theta)}{1 - \cos(\theta)} \quad \text{Pour un canal rectangulaire ouvert} \quad (2.23)$$

$$\frac{w}{h} < \cos(\theta) \quad \text{Pour un canal suspendu} \quad (2.24)$$

où w et h sont respectivement la largeur et la hauteur du canal (en m).

Ces deux relations sont représentées sur les figures 2.14 et 2.15. Comme nous pouvons le voir, la condition d'écoulement est bien plus contraignante pour un canal suspendu que pour un canal rectangulaire ouvert. Cela est cohérent avec l'interprétation précédente. En effet, un canal suspendu présente plus de parois hydrophobes (ici, en contact avec l'air) qu'un canal rectangulaire ouvert. Ainsi la présence de parois hydrophiles est d'autant plus nécessaire. En particulier pour un canal suspendu, le rapport w/h ne peut jamais dépasser 1.

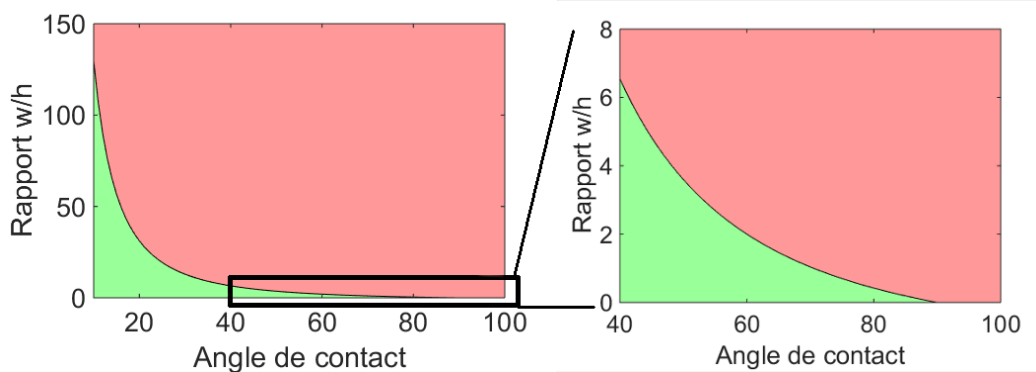


FIGURE 2.14 – Graphiques représentant la condition d'écoulement capillaire spontané pour un canal ouvert de section rectangulaire.

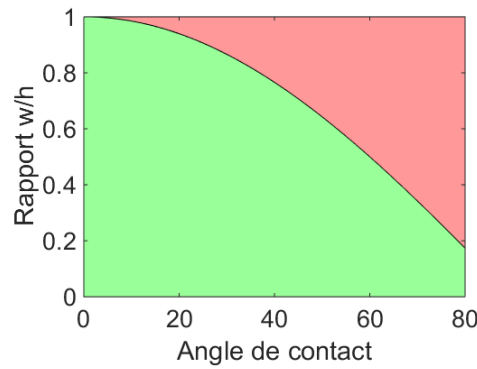


FIGURE 2.15 – Graphique représentant la condition d'écoulement capillaire spontané pour un canal suspendu.

2.2.1.2 Cas d'un canal s'évasant

Dans l'article suivant, publié dans la revue "Medical Engineering and Physics", la condition de présence d'un écoulement capillaire spontané dans un canal ouvert s'évasant est dérivée en utilisant la même approche que décrite dans les paragraphes précédents. Il y est montré que cette condition est différente par rapport à celle présentée ci-dessus. La condition d'écoulement dans un canal s'évasant est alors plus stricte que dans le cas d'un canal de section uniforme. En effet, la présence d'un angle entre les parois et la direction de l'écoulement a un impact direct sur la courbure de l'interface, et a tendance à aplanir cette dernière.

Références de la publication

Berthier J., Brakke K.A., Gosselin D., Navarro F., Belgacem N., Chaussy D., Berthier E., 2017. On the halt of spontaneous capillary flows in diverging open channels. *Medical Engineering and Physics* 48, 75-80.

Lien web : [http://www.medengphys.com/article/S1350-4533\(17\)30136-4/abstract](http://www.medengphys.com/article/S1350-4533(17)30136-4/abstract)

Nous avons vu jusqu'à présent dans cette section des conditions pour qu'un écoulement capillaire spontané ait lieu dans un canal microfluidique. Cependant les phénomènes de capillarité peuvent également provoquer des écoulements sous forme de filaments dans les angles des canaux. Ce type d'écoulement et les conditions associées sont discutés dans la sous-section suivante.

2.2.1.3 Écoulement capillaire dans les angles et filaments de Concus-Finn

La présence de filaments capillaires dans les angles formés par deux parois hydrophiles est un phénomène bien connu et a fait l'objet de plusieurs études [13, 14, 15, 16, 17]. Des exemples de tels filaments sont présentés dans la figure 2.16.

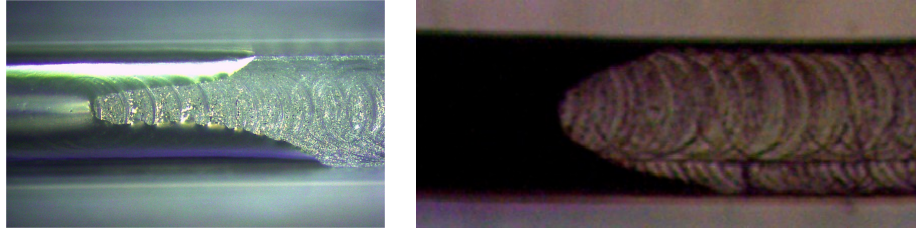


FIGURE 2.16 – Observations expérimentales des filaments de Concus-Finn.

Ces filaments sont souvent dénommés filaments de Concus-Finn d'après les noms des premiers chercheurs à avoir rapporté leur existence [13]. Ces derniers ont également établi une condition, décrite par l'équation 2.25 ,pour leur présence.

$$\theta < \frac{\pi}{2} - \alpha \quad (2.25)$$

où θ est l'angle de contact et α la mesure du demi-angle de l'angle formé par les parois (Figure 2.17). Ainsi dans le cas d'un canal rectangulaire des filaments de Concus-Finn apparaissent si l'angle de contact du liquide est inférieur à 45° .

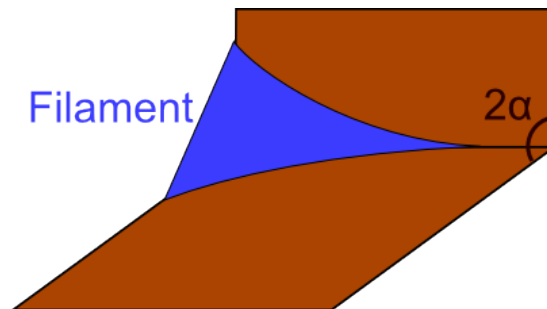


FIGURE 2.17 – Schéma de la présence d'un filament capillaire dans un angle de demi mesure α .

A noter que cette condition (Eq 2.25) peut être respectée de façon indépendante à la condition d'écoulement capillaire spontané (2.22). En particulier, il peut y avoir des filaments de Concus-finn alors qu'il n'y a pas d'écoulement capillaire spontané, ou il peut y avoir un écoulement capillaire spontané sans qu'il n'y ait de filaments. Afin d'étudier plus précisément les différentes possibilités d'écoulement, la suite de ce paragraphe se place dans le cas particulier d'un canal ouvert de section rectangulaire.

Intéressons-nous au cas où des filaments sont présents dans les angles du canal, mais où le liquide ne remplit pas totalement le canal (Figure 2.18). Dans ce cas, on obtient facilement la condition géométrique donnée par l'inéquation 2.26 qui traduit le fait que les deux filaments ne se rejoignent pas au centre du

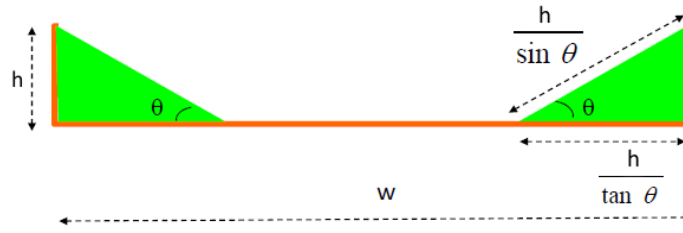


FIGURE 2.18 – Vue en coupe d’un canal rectangulaire ouvert présentant des filaments de Concus-Finn mais pas d’écoulement capillaire spontané.

canal.

$$\frac{w}{h} > \frac{2}{\tan(\theta)} \quad (2.26)$$

Il est alors intéressant de remarquer que l’on peut avoir une géométrie qui respecte à la fois la condition de séparation des filaments (Eq 2.26) et la condition d’écoulement capillaire spontané (Eq 2.23). En effet cette dernière condition est moins stricte que la première (équation 2.27).

$$\frac{2\cos(\theta)}{1 - \cos(\theta)} > \frac{2}{\tan(\theta)} \quad (2.27)$$

Dans le cas le plus classique cela se traduit par la présence de filaments précurseurs à l’écoulement (figure 2.16). Cependant il peut être imaginé des situations où, suite à un élargissement, seuls les filaments de concus-Finn parviennent dans le canal [18] (Figure 2.19). Dans ce cas particulier, bien que la condition d’écoulement capillaire soit respectée, l’écoulement ne remplit pas le canal intégralement. Toutefois si par la suite la largeur du canal diminue et ne respecte plus la condition de l’Eq 2.26, cela amène les deux filaments en contact et l’écoulement capillaire spontané est de nouveau présent (Figure 2.20). La condition d’écoulement capillaire spontané étant respectée dans le canal précédent la constriction, un écoulement va également se produire dans ce canal en direction de l’amont.

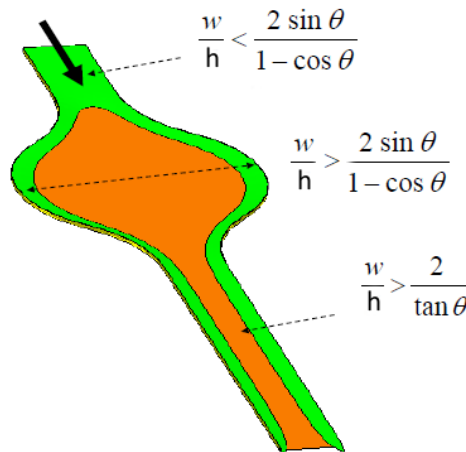


FIGURE 2.19 – Exemple de géométrie de canal permettant d’obtenir des filaments capillaire sans écoulement capillaire spontané bien que la condition de l’équation 2.23 soit respectée.

Ainsi il existe certaines géométries de canal pour lesquelles, la présence d’écoulement capillaire spontané dépend de l’histoire de l’écoulement et en particulier de la façon dont le liquide atteint le-dit canal (en écoulement capillaire spontané ou seulement sous forme de filaments). Cela peut être résumé par une

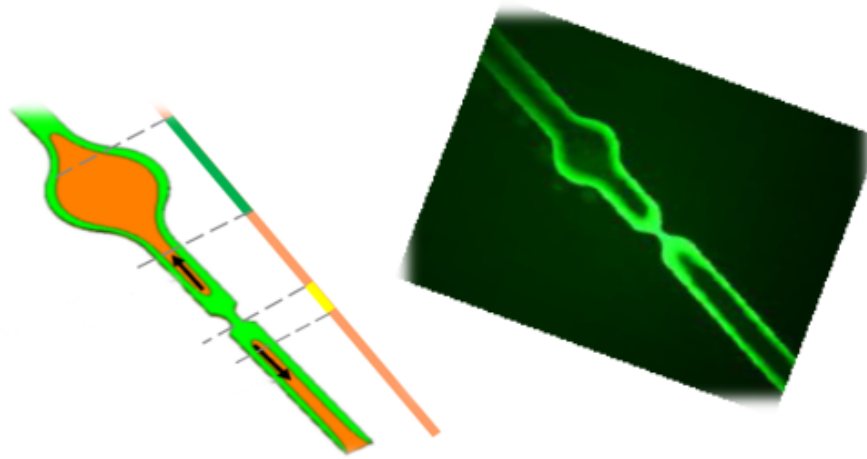


FIGURE 2.20 – Rétablissement de l'écoulement capillaire spontané, lorsque la géométrie permet aux deux filaments de se rejoindre. Phénomène observé avec des simulations (à gauche) et expérimentalement (à droite).

région métastable dans la figure 2.21 répertoriant les différents types d'écoulements en fonction de la géométrie et de l'angle de contact [18].

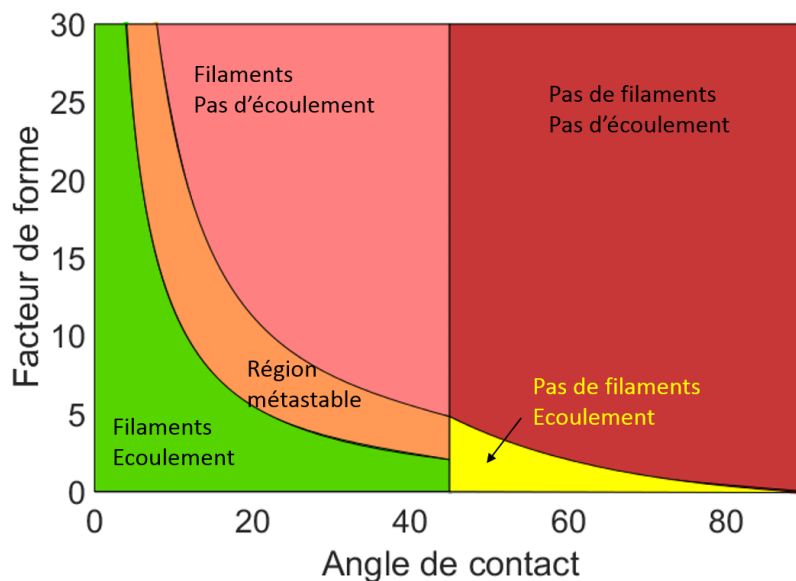


FIGURE 2.21 – Graphique répertoriant les différents types d'écoulements pour un canal rectangulaire ouvert. Adapté de [18]

2.2.1.4 Les vannes capillaires

L'élaboration de vannes capillaires a d'ores et déjà été abordé avec la condition d'écoulement capillaire spontané pour un canal s'évasant. Il a été montré qu'un élargissement du canal peut provoquer un arrêt de l'écoulement. En associant cette vanne stop avec un second canal il a également été montré que l'écoulement du liquide peut être rétabli grâce au passage d'un second liquide provoquant la rupture de l'effet vanne stop. Ces différents éléments sont très intéressants pour les systèmes microfluidiques capillaires car ils peuvent permettre un contrôle de l'écoulement. Ainsi des études sur ces différentes vannes et leurs ca-

pacités à retenir des liquides sont présentes dans la littérature [19, 20, 21, 22]. De plus, en les couplant avec un bon dimensionnement des canaux microfluidiques associés, des écoulements successifs peuvent être établis ouvrant la voie à la réalisation de tests multi-étapes [22].

On notera toutefois que pour le bon fonctionnement de ces vannes, un évasement du canal microfluidique n'est pas le seul élément clé. En effet, si la géométrie du canal est favorable à l'apparition de filaments de Concus-Finn, ces derniers peuvent conduire à la rupture de la vanne stop (Figure 2.22). Afin d'empêcher cela, l'élargissement du canal doit se faire selon toutes les directions. C'est-à-dire qu'il est nécessaire d'avoir une marche au sein du canal microfluidique, en plus de l'élargissement latéral de celui-ci (Figure 2.23).

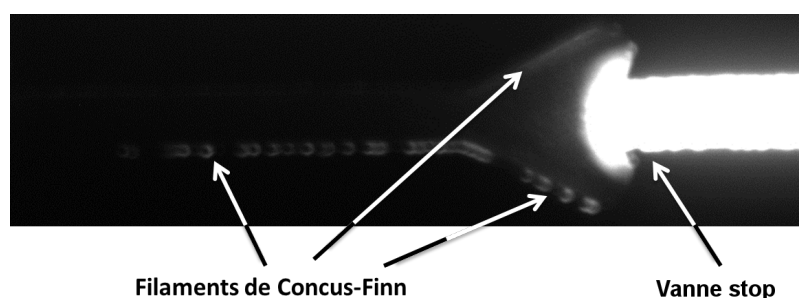


FIGURE 2.22 – Les filaments de Concus-Finn ne sont pas arrêtés par une vanne stop classique.

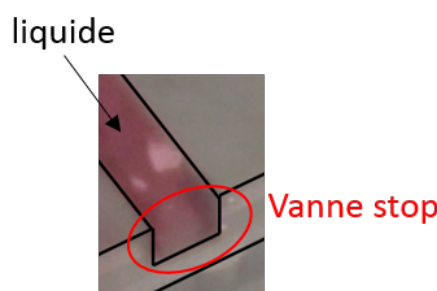


FIGURE 2.23 – La présence d'une marche permet d'arrêter également les filaments de Concus-Finn.

Nous avons vu dans cette section qu'un écoulement capillaire peut se produire, ou non, au sein d'un canal microfluidique en fonction de sa géométrie et de sa mouillabilité (Figures 2.14 et 2.15). Ces deux facteurs déterminent de même la présence d'écoulement sous forme de filaments, dit de Concus-Finn, dans les angles des canaux (Figure 2.21). La géométrie des canaux pour les systèmes microfluidiques capillaires apparaît donc comme un élément clé à dimensionner correctement lors de la création d'un dispositif. Mais son influence ne s'arrête pas là. En effet, comme nous allons le voir dans les sections suivantes, elle va également conditionner la cinétique de l'écoulement, rendant encore plus important le bon dimensionnement des canaux mis en jeu dans le système.

2.2.2 Étude dynamique des écoulements capillaires spontanés

La dynamique d'un écoulement capillaire spontané résulte d'un équilibre entre la force de traction capillaire et la force de frottement aux parois. Chacune de ces deux forces dépend d'un certain nombre de paramètres :

- La force capillaire va dépendre de la géométrie du canal, de l'angle de contact du liquide ainsi que de sa tension de surface.

- La force de frottement va dépendre de la géométrie du canal, de la rhéologie du fluide ainsi que de la vitesse d'écoulement.

Ainsi, après avoir discuté l'influence de l'angle de contact dynamique, nous allons étudier dans cette section la dynamique des écoulements capillaires selon la géométrie du canal et la rhéologie du fluide. Dans un premier temps nous allons nous restreindre au cas d'un canal de section uniforme. Les équations gouvernant l'écoulement d'un fluide Newtonien seront rappelées avant d'étudier le cas plus complexe des fluides non-Newtoniens. Ensuite, nous reprendrons le cas particulier des fluides Newtoniens pour étudier le comportement des écoulements capillaires spontanés lorsque le canal présente une section non-uniforme puis dans le cas de canaux tournants.

2.2.2.1 Angle de contact dynamique

Avant de déterminer la dynamique des écoulements capillaires spontanés, l'importance de l'angle de contact dynamique va être étudiée. Il est connu que lorsqu'une interface liquide progresse sur un substrat solide, son angle de contact n'est pas constant [23, 24, 25]. On parle d'angle de contact dynamique θ_d en comparaison avec l'angle de contact statique utilisé jusqu'à présent. Pour éviter les confusions, l'angle de contact statique sera noté θ_s dans cette sous-section.

L'angle de contact dynamique dépend de la vitesse de propagation du liquide, et lorsque l'interface avance sur le solide on parle d'angle de contact d'avancée $\theta_a > \theta_s$, lorsqu'au contraire l'interface recule sur le solide on parle d'angle de contact de récession $\theta_r < \theta_s$ (fig 2.24).

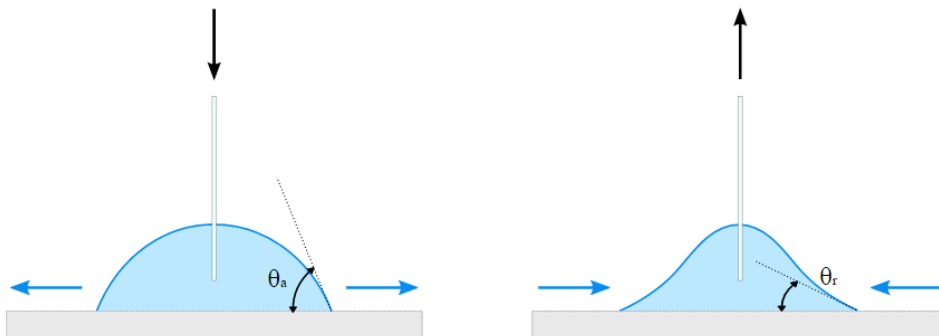


FIGURE 2.24 – Dépendance de l'angle de contact dynamique à la vitesse de propagation de l'interface liquide.

La force capillaire étant directement liée à l'angle de contact (Eq 2.3), il convient de s'intéresser à l'influence de la dynamique de ce dernier sur les écoulements capillaires spontanés. Une telle étude a été menée par Berthier et al. [26]. Il y est démontré qu'une variation non négligeable de la valeur de l'angle de contact n'est présente que pour les premiers millimètres de l'écoulement, où la vitesse d'écoulement varie beaucoup. Ensuite l'écoulement capillaire peut être modélisé en utilisant une valeur constante pour l'angle de contact. En pratique les premiers millimètres sont très rapidement remplis et l'étude de la dynamique des écoulements porte sur les longueurs de canal plus importantes. De ce fait l'angle de contact dynamique ne sera pas utilisé pour l'étude dynamique des écoulements au sein des paragraphes suivants.

2.2.2.2 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal uniforme

Considérons tout d'abord le cas d'un canal de section uniforme dans lequel s'écoule un fluide Newtonien. Dans ce cas la force de traction capillaire et la force de frottement s'écrivent, respectivement, selon les équations 2.28 et 2.29

$$F_{cap} = \gamma * \sum_i p_i * \cos(\theta_i) \quad (2.28)$$

$$F_{frot} = -x(t) * \oint_{\Gamma} \tau \quad (2.29)$$

où τ est la contrainte de cisaillement (en Pa), x la longueur du canal remplie par le liquide (en m) et t le temps (en sec).

La longueur de friction λ (Fig 2.25) est définie par l'équation 2.30.

$$\lambda = \frac{V}{\left(\frac{\partial V}{\partial \vec{n}}\right)} = \frac{V * \mu}{\tau} \quad (2.30)$$

La longueur de friction moyenne (notée $\bar{\lambda}$) est ensuite calculée selon l'équation 2.31.

$$\frac{1}{\bar{\lambda}} = \frac{1}{\Gamma} \oint_{\Gamma} \frac{1}{\lambda} \quad (2.31)$$

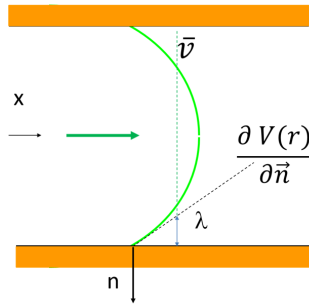


FIGURE 2.25 – Schéma définissant la longueur de friction λ à partir du profil de vitesse de l'écoulement.

Ces définitions permettent d'écrire la force de frottement selon l'équation 2.32.

$$F_{frot} = -\mu * V * x(t) * \frac{\Gamma}{\lambda} \quad (2.32)$$

Le bilan de ces forces est alors décrit par l'équation 2.33.

$$m * a = \gamma * \Gamma * \cos(\theta^*) - \mu * V * x(t) * \frac{\Gamma}{\lambda} \quad (2.33)$$

où m est la masse de liquide (en kg) et a l'accélération (en m/s^2).

Nous avons vu précédemment que dans les systèmes microfluidiques l'inertie est négligeable face aux forces de viscosités ($Re \ll 1$). Grâce à cette hypothèse, des expressions analytiques peuvent être obtenues pour la longueur de remplissage du canal (équation 2.34) ainsi que pour sa vitesse de remplissage (équation 2.35 ou 2.36) [27]

$$x(t) = \sqrt{\frac{\gamma}{\mu}} * \sqrt{\cos(\theta^*)} \sqrt{2 * \bar{\lambda} * t} \quad (2.34)$$

$$V(t) = \sqrt{\frac{\gamma}{\mu}} * \sqrt{\cos(\theta^*)} \sqrt{\frac{\bar{\lambda}}{2 * t}} \quad (2.35)$$

$$V(x) = \frac{\gamma}{\mu} * \cos(\theta^*) * \frac{\bar{\lambda}}{x} \quad (2.36)$$

Dans ces différentes équations, la géométrie du canal est représenté par la longueur de friction moyenne $\bar{\lambda}$. Cette grandeur peut être difficile à déterminer analytiquement. Dans la référence [27], il est démontré que dans le cas de canaux fermés, son expression peut être lié au diamètre hydraulique D_H et à la résistance hydraulique R_H par la relation

$$\bar{\lambda} = \mu \frac{4}{R_H D_H} \quad (2.37)$$

Le tableau 2.1 présente les expressions de la longueur de friction moyenne pour différentes géométries de canal.

Géométrie de la section	Circulaire R : Rayon	Carrée c : Côté	Rectangulaire aplatie w : largeur h (<< w) : hauteur	Rectangulaire ouvert w : largeur h : hauteur	Suspendue w largeur h : hauteur
$\bar{\lambda}$	$\frac{R}{6}$	$\frac{c}{7.1}$	$\frac{h}{6}$	$\frac{1}{6} \frac{w+2h}{w/h+2h/w}$	$\frac{w}{6}$

Tableau 2.1 – Expressions des longueurs de frictions moyennes pour les géométries les plus courantes. Extrait de [27].

Il peut être vérifié que cette loi de remplissage se réduit bien à la loi de Lucas-Washburn-Rideal (équation 2.38) [28, 29, 30] dans le cas d'un canal cylindrique.

$$x(t) = \sqrt{\frac{\gamma}{\mu}} * \sqrt{\cos(\theta)} \sqrt{\frac{R}{2} * t} \quad (2.38)$$

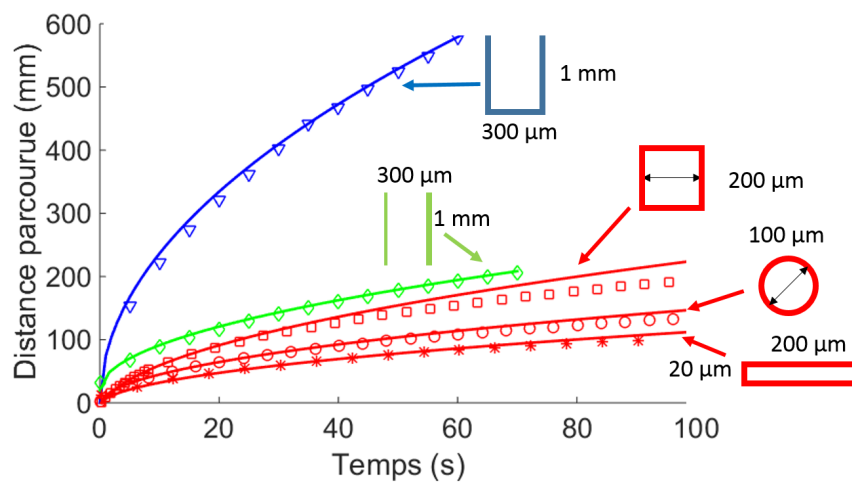


FIGURE 2.26 – Validation expérimentale de la loi théorique de l'Eq 2.34.

Cette loi a été testée avec différentes géométries de canaux microfluidiques (Fig 2.26). À noter que différents liquides et différents matériaux ont été utilisés pour ces expériences. Pour les deux géométries ouvertes, le matériau du canal était du PMMA. Comme ce dernier n'a pas une bonne hydrophilicité il doit

subir un traitement de surface si le liquide utilisé est de l'eau. Dans le cas du canal rectangulaire ouvert, un traitement plasma O_2 a été utilisé (marques triangulaires bleues). Pour le canal suspendu, il n'y a pas eu de traitement de surface d'effectué car le liquide utilisé était un mélange d'eau et d'IPA (IsoPropyl Alcohol). En effet ce mélange permet d'abaisser la tension de surface du liquide permettant une bonne mouillabilité sur le PMMA[31] (marques vertes en forme de losanges). Dans le cas des géométries fermées, le liquide était du sang et le matériau des canaux était du borosilicate (courbes rouges avec des marques rondes, carrées ou en étoiles). Alors que les canaux en PMMA ont été réalisés par usinage au sein du laboratoire, les canaux en borosilicate ont fait l'objet d'un achat chez *CM Scientific*.

De bonnes corrélations entre les résultats expérimentaux et la loi théorique sont observées mais on notera toutefois que pour les courbes en rouge (marques carrées, rondes et en étoiles) les points expérimentaux suivent bien cette loi dans un premier temps puis semblent en dévier. Cela est dû au fait que ces expériences ont été réalisées avec du sang qui est un fluide non-Newtonien. Il a ainsi semblé important d'étudier plus précisément les écoulements capillaires spontanés des fluides non-Newtoniens, d'autant plus que les dispositifs de diagnostic médicaux sont souvent amenés à utiliser une goutte de sang comme fluide échantillon.

2.2.2.3 Cas d'un fluide non-Newtonien s'écoulant dans un canal uniforme

L'article suivant, publié dans "AIMS Biophysics", a pour objectif d'étudier la dynamique des écoulements capillaires spontanés dans le cas des fluides non-Newtoniens. Pour cela, l'équation de la dynamique d'un tel écoulement est dérivée à partir de l'équation de Navier-Stokes. De plus, la loi de Herschel-Bulkley est utilisée afin de prendre en compte les phénomènes non-Newtoniens. Il est montré que la loi obtenue se réduit bien aux lois connues pour l'écoulement dans un tube : la loi de Lucas-Washburn-Rideal dans le cas de fluides newtoniens et la loi de Rabinowitsch-Mooney pour des fluides d'Ostwald. Des écoulements capillaires d'échantillons sanguins sont ensuite utilisés pour valider l'équation établie. En effet, un très bon accord entre l'équation théorique dérivée et les points expérimentaux est obtenu.

Références de la publication

Gosselin D., Huet M., Cubizolles M., Rabaud D., Belgacem N., Chaussy D., Berthier J., 2016. Viscoelastic capillary flow : the case of whole blood. *biophysics* 2016, Vol. 3, Pages 340-357.

Lien web : <http://www.aimspress.com/article/10.3934/biophy.2016.3.340>

2.2.2.4 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal non-uniforme

Au cours des paragraphes précédents, nous nous sommes intéressés à la dynamique des écoulements microfluidiques capillaires au sein de canaux ayant une section uniforme. Cependant dans un système microfluidique il n'est pas rare d'avoir des sections de canaux ayant des dimensions différentes, comme par exemple pour une chambre de réaction. Ce paragraphe va ainsi étudier l'impact de l'insertion de telles sections sur la dynamique de l'écoulement.

Nous allons tout d'abord étudier l'impact d'un unique élargissement ou d'une unique constriction sur l'écoulement dans un canal microfluidique, puis nous généraliseront l'approche à un canal comportant plusieurs changements de sections successifs.

Cas d'une unique constriction ou d'un unique élargissement Dans l'article présenté ci-après, publié dans "Langmuir", le cas d'un canal possédant une unique constriction ou d'un unique élargissement est étudié. Il est montré dans cet article que la présence d'un tel changement de section peut avoir un effet, soit local, soit global sur l'écoulement. En effet si une constriction aura une forte répercussion tout au long de l'écoulement *via* la force de frottement, un élargissement n'influencera cette dernière que peu. Il en résulte qu'une constriction aura un rôle de résistance globale sur l'écoulement, alors qu'un élargissement ne ralentira l'écoulement que localement, lors du passage de l'interface à travers ce dernier.

Références de la publication

Berthier J., Gosselin D., Pham A., Delapierre G., Belgacem N., Chaussy D., 2016. Capillary Flow Resistors : Local and Global Resistors. *Langmuir* 32, 915?921.

Lien web : <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02090>

Discussion sur les changements de vitesses associés aux changements de sections. Dans l'article précédent, il a été présenté qu'une restriction avait pour effet d'augmenter localement la vitesse de l'écoulement alors qu'au contraire un élargissement la diminuait. Cela peut tout d'abord sembler en contradiction avec les équations établies pour un canal de section uniforme. En effet nous avons vu (Eq 2.35) que la vitesse, dans un canal cylindrique, était proportionnelle à la racine carré du rayon du canal. Une augmentation de rayon aboutit donc à une augmentation de la vitesse de l'écoulement, et cela est cohérent avec l'augmentation de la force capillaire due au fait que le périmètre mouillant est plus important. Or c'est bien l'inverse que l'on observe lorsque l'on agrandit le canal, c'est-à-dire une diminution de la vitesse.

Pour comprendre cela il faut se rappeler que la dynamique de l'écoulement résulte d'un équilibre entre la force de traction capillaire et la force de frottement. Alors que la force de traction capillaire ne dépend que de la géométrie du canal où se trouve l'interface, la force de frottement comporte un "effet mémoire" et dépend de la géométrie de l'ensemble du canal.

Résonnons par l'absurde. Prenons le cas d'un élargissement et imaginons que la vitesse de l'écoulement augmente dans la section plus large du fait de l'augmentation de la force capillaire. Par conservation du débit, la vitesse de l'écoulement dans le canal avant l'élargissement serait encore plus importante, et ce d'un facteur $(R_{large}/R_{etroit})^2$. Cette forte augmentation de vitesse dans le canal précédent l'élargissement, augmenterait alors fortement les frottements liés à l'écoulement (ces derniers étant proportionnels à la vitesse, Eq 2.32). Or l'augmentation de la force de traction capillaire ne se fait que d'un facteur R_{large}/R_{etroit} et ne permet donc pas de compenser l'augmentation de la force de frottement. On a donc bien une diminution de la vitesse lorsqu'un liquide arrive à un élargissement. Le même raisonnement peut être effectué pour démontrer qu'une constriction du canal aboutit bien à une augmentation de la vitesse de l'écoulement.

Un autre moyen de se rendre compte de cela est de déterminer une longueur de frottement équivalente L_{eq} pour la portion du canal précédent le changement de section qui correspondrait à la longueur de cette portion de canal s'il était de section constante et égale à celle de la seconde portion. Avec cette définition, lorsqu'un liquide qui s'écoule dans un canal cylindrique de rayon R_1 arrive à un changement de section, les frottements qu'il subit sont identiques à celles d'un liquide ayant parcouru une distance L_{eq} dans un canal cylindrique de rayon R_2 (Figure 2.27).

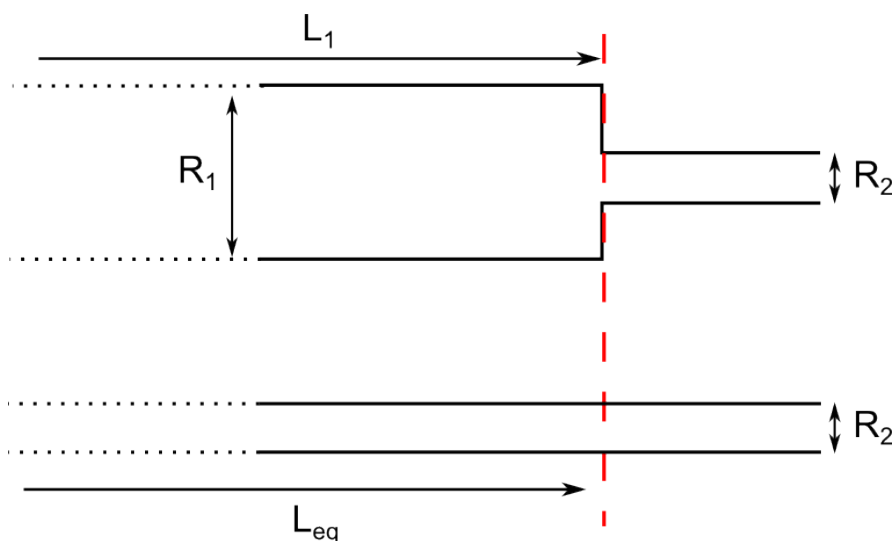


FIGURE 2.27 – Définition de la longueur de frottement équivalente L_{eq} .

Ainsi la force de frottement correspondant à la première portion du canal peut s'écrire de deux façons,

comme indiqué par les équations 2.39.

$$\begin{aligned} F_{drag} &= \mu \frac{L_1}{\lambda_1} p_{w1} V_1 = \mu * L_1 * 8 * \pi * V_1 \\ &= \mu \frac{L_{eq}}{\lambda_2} p_{w2} V_2 = \mu * L_{eq} * 8 * \pi * V_2 \end{aligned} \quad (2.39)$$

En utilisant la conservation du débit, l'égalité de ces deux expressions peut également s'écrire selon l'équation 2.40.

$$F_{drag} = \mu * L_1 * 8 * \pi * V_2 * \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^2 = \mu * L_{eq} * 8 * \pi * V_2 \quad (2.40)$$

Finalement l'expression de la longueur équivalente recherchée est donnée par l'équation 2.41.

$$L_{eq} = L_1 * \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^2 \quad (2.41)$$

D'autre part la vitesse d'un écoulement dans un canal cylindrique uniforme, décrite par l'Eq 2.36, est rappelée par l'équation 2.42.

$$V_{uniforme} = \frac{\gamma}{\mu} * \cos(\theta) * \frac{R}{4 * x} \quad (2.42)$$

La différence de vitesse au passage du changement de section est donc donnée par l'équation 2.43.

$$\begin{aligned} \Delta V &= V_{uniforme}(r = R_2, x = L_{eq}) - V_{uniforme}(r = R_1, x = L_1) \\ &= \frac{\gamma}{\mu} * \cos(\theta) * \left(\frac{R_2}{4 * L_{eq}} - \frac{R_1}{4 * L_1} \right) \\ &= \frac{\gamma}{\mu} * \cos(\theta) * \frac{R_1}{4 * L_1 * R_2} (R_1 - R_2) \end{aligned} \quad (2.43)$$

Dans ce cas, un élargissement conduit bien à une diminution de la vitesse d'écoulement et une constriction à son accélération.

Maintenant que les phénomènes associés à des changements de sections ponctuels ont été présentés, nous allons nous intéresser au cas d'un canal constitué d'une succession de changements de sections.

Cas d'un canal ayant une succession de changements de sections. La dynamique des écoulements capillaires spontanés dans des canaux comportant une succession de changement section est présentée dans l'article suivant, publié dans "Sensors and Actuators B : Chemical". Dans cette publication, des équations analytiques sont dérivées pour la dynamique des écoulements capillaires de fluides Newtoniens dans des canaux possédant plusieurs constriction ou élargissements. Il est montré que les résultats obtenus sont en accord avec des simulations présentes dans la littérature. De plus, une étude expérimentale permet de valider les équations établies dans le cas de canaux rectangulaires ouverts.

Références de la publication

Berthier J., Gosselin D., Pham A., Boizot F., Delapierre G., Belgacem N., Chaussy D., 2016. Spontaneous capillary flows in piecewise varying cross section microchannels. *Sensors and Actuators B : Chemical* 223, 868-877.

Lien web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515304895>

2.2.2.5 Cas d'un fluide Newtonien s'écoulant dans un canal tournant

Les précédents paragraphes ont permis d'étudier la dynamique des écoulements capillaires spontanés au sein de canaux uniformes ou non et pour des fluides Newtoniens ou non. L'objet de ce paragraphe est d'étudier l'impact des canaux tournants dans les écoulements microfluidiques capillaires. En effet pour plus de compacité des systèmes il est courant de dessiner des canaux en "zig-zag" ou en "spiral", conduisant ainsi à des canaux possédant une courbure.

L'article qui suit, publié dans "Microfluidics & Nanfluidics", étudie l'impact de la courbure des canaux microfluidiques sur l'écoulement capillaire spontané. Il est alors montré que si pour des canaux suspendu la courbure n'impacte pas de façon prononcée l'écoulement, le cas de canaux rectangulaires ouverts est plus délicat à traiter. Pour ce dernier cas, la présence de filaments de Concus-Finn (angle de contact $< 45^\circ$), peut alors influencer fortement l'écoulement. De plus, le rapport entre le rayon de la paroi intérieure du canal (R_i) et le rayon de la paroi extérieure (R_e) est un rapport intéressant à regarder. En effet plus ce ratio est petit, plus l'écoulement sera perturbé par le tournant.

Références de la publication

Berthier J., Brakke K.A., Gosselin D., Navarro E., Belgacem N., Chaussy D., 2016. Spontaneous capillary flow in curved, open microchannels. *Microfluid Nanofluid* 20, 100.

Lien web : <https://link.springer.com/article/10.1007/s10404-016-1766-6>

2.3 Simulation d'écoulements capillaires spontanés

Bien que les écoulements capillaires spontanés permettent une approche théorique pour des cas assez simples, les équations mises en jeu se complexifient rapidement dès lors que le système mis en jeu utilise des fluides non-Newtoniens ou comporte des élargissements, des constriction, ou autre changement de sections. Ainsi il ne semble pas raisonnable de vouloir modéliser théoriquement un système complet. C'est une des raisons pour laquelle nous avons exploré la possibilité de simuler les écoulements capillaires spontanés avec le logiciel COMSOL Multiphysics. Une autre raison est le caractère multi-physique de COMSOL. En effet, en couplant différentes physiques, il pourrait être envisageable de simuler non seulement les écoulements capillaires mais également les différentes réactions ayant lieu lors de l'utilisation du système ainsi que leurs détections. Cela pouvant, à terme, conduire à une optimisation des systèmes microfluidiques via des simulations numériques.

Le proceeding à la conférence européenne COMSOL 2015 présenté dans ce manuscrit, résume les premières études qui ont été effectuées dans ce sens. On y retrouve de façon probante les différents résultats évoqués ci-dessus mais uniquement de façon qualitative. D'autre part, les temps de calcul associés à ces simulations sont très importants. En effet il n'est pas rare que de telles simulations temporelles prennent plusieurs jours. Compte tenu de ces éléments, il a été décidé de ne pas poursuivre l'étude de ces simulations de façon plus approfondie.

Références de la publication

Gosselin D., Berthier J., Delapierre G., Chaussy D., Belgacem N., 2015. Capillary Flows : Dynamic and Geometry Effects. European COMSOL Conference 2015.

Lien web : <https://www.comsol.fr/paper/capillary-flows-dynamic-and-geometry-effects-23991>

2.4 Conclusion

Ce deuxième chapitre s'est donc focalisé sur l'étude des écoulements capillaires spontanés, et plus particulièrement à leur étude d'un point de vue théorique. Dans un premier temps la condition de présence d'un tel écoulement, connue dans un canal de section uniforme, a été étendue aux canal s'évasant. En particulier il a été montré que la condition de présence d'un SCF dans un tel canal est plus stricte que pour un canal de section uniforme. En effet, l'inclinaison des parois par rapport à la direction de l'écoulement influence la courbure de l'interface et donc, d'après la loi de Laplace, la pression capillaire.

Dans un second temps, la dynamique des écoulements capillaires spontanés a été étudiée. Le cas d'un écoulement Newtonien dans un canal de section uniforme, présent dans la littérature, a été généralisé aux fluides non Newtoniens mais également aux canaux de sections non uniformes. Une équation pour la dynamique des écoulement non-Newtoniens a été établie à partir des équations de Navier-Stokes et de Herschel-Bulkley, et sa validité a été vérifiée expérimentalement avec des écoulement sanguins. Concernant les écoulements capillaires dans des canaux de section non uniforme, les études a été menées dans le cas d'écoulement de fluides Newtoniens. Il a été montré qu'un changement de section peut résulter en un ralentissement local (cas d'un élargissement) ou en un ralentissement global (cas d'une constriction) de l'écoulement. Enfin, le cas canaux possédant une courbure a été étudié. Il a alors était montré que dans ces derniers, à part si des filaments de Concus-Finn sont présents, l'écoulement capillaire est très similaire à l'écoulement dans un canal rectiligne.

Finalement la possibilité d'effectuer des simulations des écoulements capillaires spontanés, grâce au logiciel COMSOL Multiphysics, a été étudiée. Il a été montré que la dynamique des écoulements peut être simulée, mais uniquement de façon qualitative. De plus les temps de calcul associés à ces simulations sont très importants (jusqu'à plusieurs jours parfois). Comme les phénomènes liés aux écoulements capillaires spontanés sont bien décrits de façon analytique, il n'a pas été jugé nécessaire d'approfondir cette voie.

Bibliographie

- [1] J. N. Israelachvili, “17 - Adhesion and Wetting Phenomena,” in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, pp. 415–467, San Diego : Academic Press, 2011.
- [2] P.-G. De Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quere, *Capillarity and Wetting Phenomena - Drops, Bubbles*, | Pierre-Gilles de Gennes | Springer. 2004.
- [3] J. Berthier and K. Brakke, *The Physics of Microdroplets*. Hoboken, New Jersey : Salem, Massachusetts : John Wiley & Sons, May 2012.
- [4] J. Berthier, K. A. Brakke, and E. Berthier, *Open Microfluidics*. Wiley, 2016.
- [5] J. Berthier and P. Silberzan, *Microfluidics for Biotechnology*. Artech House, 2010.
- [6] D. Juncker, *Capillary Microfluidic Systems for Bio/Chemistry*. PhD thesis, 2002.
- [7] L. GERvAIS, *Capillary Microfluidic Chips for Point-of-Care Testing : From Research Tools to Decentralized Medical Diagnostics*. PhD thesis, ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE, 2011.
- [8] J. Berthier, K. Brakke, E. Furlani, I. Karamelas, V. Poher, D. Gosselin, M. Cubizolles, and P. Pouteau, “Whole blood spontaneous capillary flow in narrow V-groove microchannels,” *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 206, pp. 258–267, Jan. 2015.
- [9] L. Gervais, M. Hitzbleck, and E. Delamarche, “Capillary-driven multiparametric microfluidic chips for one-step immunoassays,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 27, pp. 64–70, Sept. 2011.
- [10] L. Gervais and E. Delamarche, “Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates,” vol. 9, pp. 3330–3337, Dec. 2009.
- [11] B. P. Casavant, E. Berthier, A. B. Theberge, J. Berthier, S. I. Montanez-Sauri, L. L. Bischel, K. Brakke, C. J. Hedman, W. Bushman, N. P. Keller, and D. J. Beebe, “Suspended microfluidics,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 10111–10116, June 2013.
- [12] J. Berthier, K. A. Brakke, and E. Berthier, “A general condition for spontaneous capillary flow in uniform cross-section microchannels,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 16, pp. 779–785, Apr. 2014.
- [13] P. Concus and R. Finn, “On the Behavior of a Capillary Surface in a Wedge,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 63, pp. 292–299, Jan. 1969.
- [14] P. Concus, R. Finn, and M. Weislogel, “Measurement of critical contact angle in a microgravity space experiment,” *Experiments in fluids*, vol. 28, no. 3, pp. 197–205, 2000.
- [15] S. Girardo, R. Cingolani, S. Chibbaro, F. Diotallevi, S. Succi, and D. Pisignano, “Corner liquid imbibition during capillary penetration in lithographically made microchannels,” *Applied Physics Letters*, vol. 94, no. 17, p. 171901, 2009.
- [16] E. Ramé and M. M. Weislogel, “Gravity effects on capillary flows in sharp corners,” *Physics of Fluids*, vol. 21, no. 4, p. 042106, 2009.

-
- [17] M. M. Weislogel and S. Lichter, "Capillary flow in an interior corner," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 373, pp. 349–378, Oct. 1998.
- [18] J. Berthier, K. Brakke, D. Gosselin, M. Huet, and E. Berthier, "Metastable capillary filaments in rectangular cross-section open microchannels," vol. 1, no. 1, pp. 31–48, 2014.
- [19] M. Zimmermann, P. Hunziker, and E. Delamarche, "Valves for autonomous capillary systems," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 5, pp. 395–402, Sept. 2008.
- [20] A. Glière and C. Delattre, "Modeling and fabrication of capillary stop valves for planar microfluidic systems," *Sensors and Actuators A : Physical*, vol. 130-131, pp. 601–608, Aug. 2006.
- [21] R. Safavieh and D. Juncker, "Capillaries pre-programmed, self-powered microfluidic circuits built from capillary elements," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 21, p. 4180, 2013.
- [22] A. O. Olanrewaju, A. Robillard, M. Dagher, and D. Juncker, "Autonomous microfluidic capillary circuits replicated from 3D-printed molds," vol. 16, pp. 3804–3814, Sept. 2016.
- [23] R. L. Hoffman, "A study of the advancing interface. I. Interface shape in liquid—gas systems," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 50, pp. 228–241, Feb. 1975.
- [24] M. Bracke, F. D. Voeght, and P. Joos, "The kinetics of wetting : The dynamic contact angle," in *Trends in Colloid and Interface Science III* (P. Bothorel and E. J. Dufourc, eds.), no. 79 in Progress in Colloid & Polymer Science, pp. 142–149, Steinkopff, 1989.
- [25] T. D. Blake, "The physics of moving wetting lines," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 299, pp. 1–13, July 2006.
- [26] J. Berthier, D. Gosselin, and G. Delapierre, "Spontaneous Capillary Flow : Should a Dynamic Contact Angle be Taken into Account?," vol. 191, no. 8, pp. 40–45, 2015.
- [27] J. Berthier, D. Gosselin, and E. Berthier, "A generalization of the Lucas–Washburn–Rideal law to composite microchannels of arbitrary cross section," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 19, no. 7, pp. 497–507, 2015.
- [28] R. Lucas, "Ueber das Zeitgesetz des kapillaren Aufstiegs von Flüssigkeiten," *Kolloid-Zeitschrift*, vol. 23, pp. 15–22, July 1918.
- [29] E. W. Washburn, "The dynamics of capillary flow," *Physical review*, vol. 17, no. 3, p. 273, 1921.
- [30] E. K. Rideal, "On the flow of liquids under capillary pressure," *Philosophical Magazine Series 6*, vol. 44, pp. 1152–1159, Dec. 1922.
- [31] J.-G. Park, S.-H. Lee, J.-S. Ryu, Y.-K. Hong, T.-G. Kim, and A. A. Busnaina, "Interfacial and Electrokinetic Characterization of IPA Solutions Related to Semiconductor Wafer Drying and Cleaning," *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 153, no. 9, p. G811, 2006.

Chapitre 3

Fabrication d'un système microfluidique par embossage de papier et réaction de LAMP

3.1 Fabrication de circuits microfluidiques par embossage papier

Compte tenu du souhait de pouvoir produire des systèmes microfluidiques à bas coût et en volume relativement important, il a été établi dans le chapitre d'introduction que nous nous concentrerons sur les techniques de thermoformage et les systèmes microfluidiques papiers. L'utilisation de l'embossage sur des substrats papiers étant encore très peu développée dans le domaine de la microfluidique, ces deux éléments vont tout d'abord être présentés de façon séparée. L'élaboration de circuits microfluidiques embossés sur papier sera quant à elle évoquée ensuite.

3.1.1 L'embossage : Focus bibliographique

L'embossage, ou plus précisément l'embossage à chaud, est un procédé de fabrication très utilisé pour la production de systèmes microfluidiques en polymères. En effet de part son principe reposant sur la réplique d'un moule, et sa simplicité de mise en oeuvre (en comparaison au moulage par injection), ce dernier offre la possibilité de produire des éléments microfluidiques à coût raisonnable et avec un volume de production assez élevé [1, 2, 3]. D'autre part ce procédé de fabrication peut être optimisé selon de nombreux paramètres tels que la température d'utilisation, la pression appliquée, le temps de contact, le matériau utilisé, etc de façon à obtenir des répliques présentant une très grande fidélité au moule [4]. Notons que de très bonnes résolutions peuvent être obtenues en utilisant ce procédé. En particulier l'élaboration des canaux sub-micrométriques [5] a été reportée. Des structures ayant d'importants rapports d'aspects ont également été reportées dans la littérature [6].

Un des inconvénients de ce procédé de fabrication est le temps de production qui peut être de plusieurs minutes ou dizaines de minutes [4]. Cela est notamment dû au fait que la production d'un réplique de moule nécessite le chauffage du système, l'embossage à proprement parlé puis le refroidissement de l'ensemble. La présence de ce cycle d'actions à répéter à chaque réplique est un facteur limitant quand à la rapidité de production et par conséquent au faible coût de revient de la production. Bien que des procédés d'embossages plus rapides aient été développés pour remédier à cette problématique [7], la solution la plus communément utilisée est l'embossage "Roll-to-Roll" (R2R) [8, 9]. Ce procédé de fabrication permet l'embossage d'un film polymère de façon continue (Figure 3.1), évitant ainsi le besoin d'effectuer un cycle de température sur l'ensemble du système.

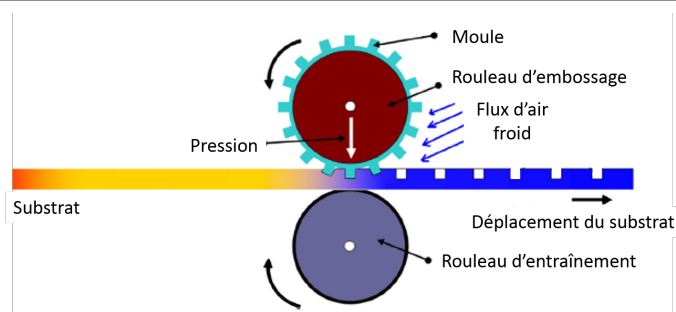


FIGURE 3.1 – Procédé d'embossage en Roll-to-Roll (adaptée de [8])

3.1.2 La fabrication des systèmes microfluidiques papiers : Focus bibliographique

Avec le souhait de développer des systèmes à bas-coûts et autonomes, le papier est apparu comme le matériau de prédilection pour les systèmes de diagnostics Point-of-Care. En effet le faible coût de ce matériau allié à sa capacité à induire un écoulement par capillarité au sein de sa matrice fibreuse hydrophile constituent des arguments qui plaident largement en faveur de ce matériau. D'autre part la possibilité de définir des canaux microfluidiques au sein d'une feuille de papier a permis d'ouvrir la voie à des designs plus complexes que de simples bandelettes [10].

La fabrication de ces canaux se fait d'une façon générale en rendant hydrophobe le reste de la feuille de papier, ou du moins en créant une barrière hydrophobe délimitant les bords des canaux (Figure 3.2). Afin de créer ces zones hydrophobes de nombreux procédés ont été développés au cours des années notamment dans l'optique de permettre la production à coût raisonnable, en moyenne ou grande série de tels dispositifs [11, 12, 13]. Ces procédés diffèrent d'une part par les matériaux utilisés pour définir les régions hydrophobes mais également de par le procédé de dépôt utilisé. Parmi les matériaux les plus utilisés on peut par exemple citer la cire [14, 15], le PDMS [16] ou encore le polystyrène [17, 18]. Concernant les méthodes de fabrication, les plus utilisés sont la sérigraphie [15], la flexographie [18] ou encore l'utilisation d'imprimantes commerciales [19, 14].

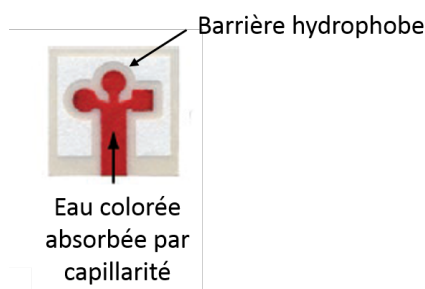


FIGURE 3.2 – Illustration d'un dispositif microfluidique papier (extrait de [10])

Cependant l'écoulement en matrice fibreuse peut être gênant pour l'élaboration de systèmes microfluidiques Point-of-Care. D'une part l'écoulement par imprégnation dépend grandement de l'environnement où le système est utilisé et en particulier de l'humidité. Il a été montré [20] que le temps nécessaire à l'imprégnation d'une bandelette de papier peut varier du simple au double (voire tripler suivant le papier et la largeur de la bandelette) avec l'humidité relative. Le temps d'imprégnation le plus court étant atteint lorsque l'humidité relative est la plus élevée. En d'autres termes lorsque le papier est déjà humide, l'écoulement se fait plus rapidement. La problématique de l'imbibition d'une matrice fibreuse en fonction de son niveau de saturation en eau est également étudiée par l'équipe de Paul Yager [21]. La dynamique de l'impré-

gnation d'une matrice fibreuse est ainsi un problème complexe qui dépend de nombreux paramètres tels que la densité du papier, sa porosité, l'humidité ambiante, etc. Ainsi cela rend ce type d'écoulement bien plus complexe à modéliser que les écoulements capillaires spontanés. Notons également qu'en fonction de l'humidité relative, une dilution variable du liquide imbibant le papier (du fait de la présence de molécules d'eaux adsorbées) peut être imaginée.

D'autre part, la présence de la matrice fibreuse peut également induire un effet de filtration voire de colmatage lorsque l'échantillon est concentré en particules ou cellules. Concernant les diagnostics médicaux, un des fluides corporels le plus utilisé est le sang car il transporte de nombreux bio-marqueurs informant de la santé du patient. Une problématique intrinsèque à son utilisation est le grand nombre de globules rouges qu'il contient. En effet l'hématocrite, représentant le volume du sang occupé par les globules rouges, varie autour de 40% à 50% chez les personnes en bonne santé. Afin de simplifier la visualisation des résultats dans le cadre d'un test colorimétrique, il est commun de chercher à filtrer ces globules rouges afin d'en extraire le plasma. La matrice fibreuse du papier peut alors devenir un élément à part entière du système afin de permettre cette filtration [22, 23]. En revanche il faut également savoir que des phénomènes de colmatages peuvent alors apparaître [23, 24]. D'autre part les volumes de plasma extraits sont généralement assez faibles et restent confinés dans la matrice fibreuse.

Compte tenu des problématiques évoquées ci-dessus, nous avons souhaité développer un procédé de fabrication de systèmes microfluidiques qui n'utilise pas la porosité de la structure fibreuse du papier pour générer un écoulement, mais qui permet un écoulement capillaire spontanée dans des canaux libres (*i.e.* sans fibres), créés à la surface du matériau par embossage. Ce travail est présenté dans la section suivante.

3.1.3 Le procédé de fabrication développé

Le développement de systèmes microfluidiques sur support papier mais présentant des canaux libres a également été étudié dans le laboratoire de G. M. Whitesides [25]. Selon leur procédé de fabrication le papier subi dans un premier temps un traitement hydrophobe dans son volume par silanisation, avant d'être thermoformé. De cela résulte des canaux microfluidiques dépourvus de fibres tel des canaux fabriqués par embossage d'un polymère. Cependant ce procédé implique la perte d'un des grands avantages du papier : l'écoulement par capillarité. En effet les parois des canaux ainsi créés sont hydrophobes et la condition de présence d'écoulement capillaire spontané n'est alors pas respectée (équation 2.22). Dans l'article cité, les auteurs ont donc recours à des pompes pour faire circuler les liquides dans les canaux embossés (Figure 3.3) ce qui diminue la portabilité et l'autonomie du système.

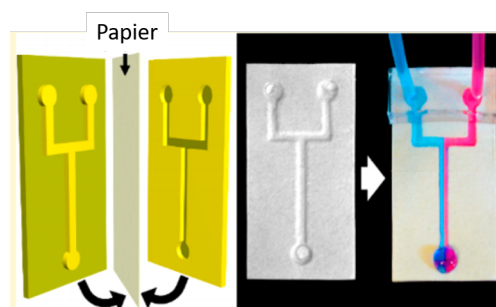


FIGURE 3.3 – Illustration d'un dispositif microfluidique papier (extrait de [25])

Le procédé de fabrication développé au cours de cette thèse est présenté dans l'article suivant, publié dans "Sensors and Actuators B : Chemical". Ce dernier permet également la fabrication de canaux libres par embossage d'un substrat papier mais, en revanche, les canaux résultants possèdent des parois hydrophiles.

Cela permet donc d'aboutir à des systèmes microfluidiques papiers, avec des canaux dépourvus de matrice fibreuse, et permettant un écoulement capillaire spontané. Ce nouveau procédé de fabrication est présenté dans l'article joint ci dessous. Il y est également démontré qu'un test de glycémie peut être obtenu par ce procédé. Ce test propose une réponse colorimétrique en 12 minutes qui peut être interprétée soit semi-quantitativement à l'oeil nu, soit quantitativement grâce à une photographie prise avec un smartphone. Cette publication montre ainsi la capacité du procédé de fabrication développé à la création de systèmes microfluidiques pour le diagnostic ainsi que la compatibilité des tests produits avec la télémédecine. A noter que l'ensemble des embossage présenté dans ce manuscrit ont été réalisés à la "Plateforme Technologique Amont", une infrastructure du réseau Renatech.

Références de la publication

Gosselin D., Belgacem M.N., Joyard-Pitiot B., Baumlin J.M., Navarro F., Chaussy D., Berthier J., 2017. Low-cost embossed-paper micro-channels for spontaneous capillary flow. *Sensors and Actuators B : Chemical* 248, 395-401.

Lien web : <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.144>

3.2 Optimisation du système papier pour la réalisation d'une réaction de LAMP

Cette thèse s'articule autour de la réalisation d'un dispositif de diagnostique basé sur une amplification d'ADN de type LAMP. Ainsi les différents composants (matériaux, chauffage et détection) du système doivent être optimisés pour cette réaction. Dans le cadre de ce chapitre nous allons voir comment le procédé de fabrication décrit auparavant a évolué au cours de notre étude dans l'objectif de pouvoir réaliser une amplification LAMP sur un tel système papier. Les aspects de chauffage et de détection de cette réaction seront quant à eux abordés dans le chapitre suivant.

Concernant l'optimisation du système papier pour la réaction de LAMP, la première étape consiste à tester la bio-compatibilité de la surcouche déposée sur le papier. En effet, il est connu que le matériau utilisé pour la réalisation de la chambre microfluidique servant à l'amplification d'ADN peut inhiber cette dernière. Bien que la réaction de LAMP soit moins sensible aux inhibiteurs que la réaction de PCR, il reste néanmoins nécessaire d'effectuer cette vérification avec les matériaux nouvellement utilisés.

3.2.1 Premiers tests de bio-compatibilité avec la réaction

3.2.1.1 Le protocole de bio-compatibilité

Le protocole décrit dans ce paragraphe sera utilisé afin d'adresser la problématique de la bio-compatibilité de nos systèmes pour la réaction de LAMP. Pour ces tests, le mélange réactionnel utilisé est basé sur le kit "Master Mix Isothermal" acheté chez OptiGene (OptiGene, UK). Il est ainsi composé de la façon suivante :

- Master Mix Isotherme : 15 μ L. Cette solution contient, entre autre, les différents éléments nécessaire à l'amplification isotherme, c'est-à-dire : l'enzyme dans son tampon ainsi que les dNTP.
- Primers : 1.3 μ L. L'ajout des primers *a posteriori* permet l'utilisation du même mélange réactionnel pour différentes amplifications.
- BSA 1% : 2.5 μ L. L'ajout de BSA (Bovine Serum Albumine) permet d'éviter l'adsorption non spécifique de protéines du mélange réactionnel ou de l'ADNs sur les parois, car ces dernières seront passivées par les protéines présentes dans la BSA.
- Eva Green : 0.125 μ L. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN qui fluoresce lorsqu'il est intercalé. Cela permettra de suivre la réaction en temps réel.
- Eau deionisée et RNAfree : 1.075 μ L.

A ce mix, sera ensuite ajouté 5 μ L d'ADN (généralement d'une solution à 10² copies par μ L) pour obtenir une solution correspondant à un test positif.

Le protocole de test est de déposer le mélange réactionnel (avant ou après l'ajout d'ADN) sur la surface à tester, de le laisser au contact pendant 30 secondes, puis de transférer cette solution dans un tube pour effectuer la réaction avec un Stratagene® Mx3005P (Agilent, USA). Lors de cette réaction, un suivi en temps réel est effectué par fluorescence. Cette mesure repose sur la fluorescence de la molécule d'EvaGreen lorsque celle-ci est liée à une structure d'ADN double brins (Figure 3.4). Au cours de l'amplification, de nouvelles molécules d'ADNs sont synthétisées permettant ainsi de de plus en plus de molécule d'émettre de la fluorescence. On observe donc une augmentation du signal fluorescent au cours du temps (Figure 3.5). Comme la LAMP est une amplification exponentielle, cette augmentation est très rapide dans un premier temps : on parle de phase exponentielle. Par la suite l'augmentation est moins forte et on peut atteindre un plateau. Cela est lié à différents phénomènes tels que l'inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction, comme les pyrophosphates, ou encore la diminution en concentration des primers et des dNTPs.

En terme de quantification, l'information importante à extraire de ces courbes est le moment où la cinétique d'amplification suit une loi exponentielle. Cela est généralement obtenu en observant la dérivée

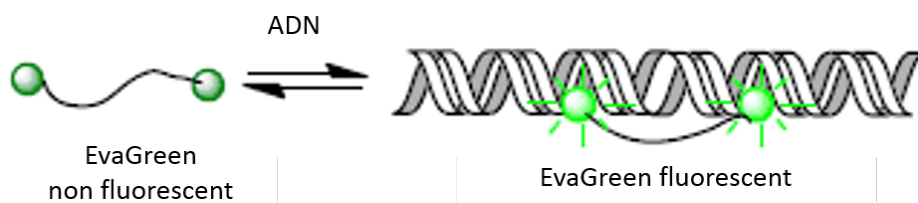


FIGURE 3.4 – L'EvaGreen comme marqueur fluorescent de l'ADN.

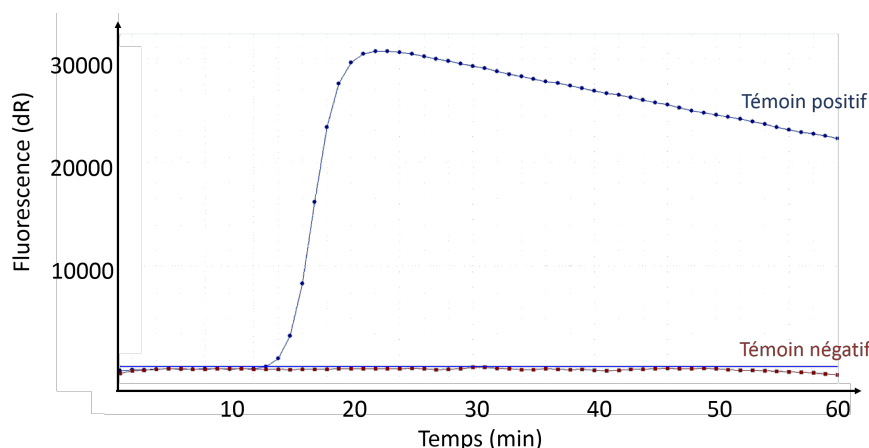


FIGURE 3.5 – Courbes de fluorescence de témoins positif et négatif d'une amplification LAMP.

du signal de fluorescence, et en observant le moment où cette dérivée dépasse un seuil. Ce moment est le C_t de la réaction. Cette dénomination est héritée de l'anglais Cycle threshold et de l'amplification de type PCR. En effet il s'agit alors du cycle à partir duquel la dérivée du signal dépasse le-dit seuil. Dans le cas d'une amplification isotherme telle que la LAMP, un "cycle" correspond à une durée d'une minute.

Le degré de bio-compatibilité de la surface testée peut alors être caractérisée en comparant le C_t du mélange réactionnel ayant été en contact avec la surface avec celui d'un témoin positif (mélange réactionnel n'ayant pas été au contact de la surface à tester). Une surface totalement bio-compatible aura un C_t équivalent au témoin positif alors qu'une surface possédant un inhibiteur aura un C_t plus élevé, c'est-à-dire qu'il y aura un retard de l'amplification. Il est également possible, lorsque l'inhibition est forte, qu'aucune amplification ne soit observée.

Il est toutefois important de noter que même si ce test apporte une information importante par rapport à la bio-compatibilité, il est incomplet. En particulier le support testé n'est pas chauffé lors de ce test.

3.2.1.2 Les tests de bio-compatibilité réalisés

Une série de polymères candidats pour le revêtement du papier dans le procédé de fabrication évoqué dans la section précédente ont été testés (Tableau 3.1). Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, très peu de sur-couches polymères sont, d'après ce test, compatibles avec la réaction de LAMP. De plus compte tenu du souhait d'obtenir des écoulements capillaires spontanés, il est nécessaire que la couche polymère au contact du liquide soit également hydrophile. C'est pourquoi le copolymère styrène acrylique a été choisi comme seconde couche polymère pour le revêtement en vue de la réalisation d'une réaction de LAMP.

Polymère	Compatibilité avec la réaction de LAMP	Angle de contact avec l'eau (en degré)
PVA réticulé	Non	19
PVA Ethylène	Non	25
SBR	Oui	72
"Cire acrylique barrière eau-graisse" (Pas d'informations supplémentaires de la part du fournisseur)	Non	108
Une émulsion non ionique de polyéthylène (Pas d'informations supplémentaires de la part du fournisseur)	Non	<10
SBR chargé avec du carbonate de calcium	Non	65
Copolymère Styrène Accrylique	Oui	58
Copolymère Styrène Accrylique thermoréticulant	Oui	42

Tableau 3.1 – Récapitulatif des différents polymères testés.

3.2.2 Chauffage et confinement du liquide

La seconde problématique rencontrée lorsque l'on souhaite effectuer une réaction d'amplification d'ADN est le confinement du liquide dans le système lorsque ce dernier est chauffé. En effet il est indispensable que le système soit bien fermé, sans quoi le liquide pourrait s'évaporer et des amplicons d'ADN pourraient se retrouver dans l'environnement du laboratoire pouvant provoquer une contamination croisée entre expériences. Cela peut notamment provoquer des faux positifs. C'est à dire qu'une amplification peut être observée alors la préparation initiale du mélange réactionnel ne contenait pas d'ADN.

Nous allons donc tester la capacité des systèmes papiers embossés au confinement du liquide lorsque ceux-ci sont portés à 65°C. Pour ce test, de l'eau colorée sera utilisée comme fluide afin de pouvoir facilement visualiser son comportement lors du chauffage. Afin de confiner le liquide dans le système, ce dernier doit notamment être fermé. Pour cela du film adhésif MicroAmp® (Thermo Fisher Scientific, USA) a été utilisé. Tout d'abord une première fermeture, partielle, du système est effectuée (Figure 3.6 A) avec ce film adhésif. Seules une portion des puits d'entrée et de sortie est laissée ouverte afin de pouvoir pipeter le liquide dans le premier, et de laisser l'air s'évacuer lorsque le liquide remplit le canal pour la second. Lorsque le liquide est pipeté dans le puits d'entrée, ce dernier remplit le système par capillarité (Figure 3.6 B). Une fois le remplissage effectué, un second film adhésif est placé afin de sceller totalement le système (Figure 3.6 C). L'élément rempli est ensuite placé sur un thermo-cycleur MJ Research PTC-200 (GMI, USA) et une consigne de 65°C est ensuite appliquée. La bonne conduction thermique entre le thermo-cycleur et le système est assurée par de la pâte thermique HTSP50T (Electrolube, UK).

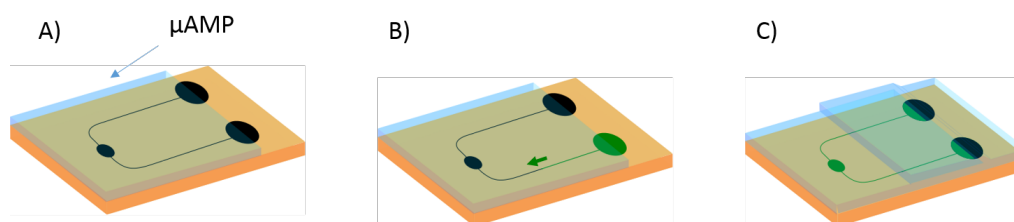


FIGURE 3.6 – Étapes de fermeture d'un circuit embossé sur papier.

La figure 3.7 présente l'évolution du système au cours du temps lorsque le chauffage est activé. On peut voir que malgré le scellement du système avec du MicroAmp® le liquide s'évapore. Il n'est donc pas

envisageable de réaliser une réaction de LAMP dans un tel composant.

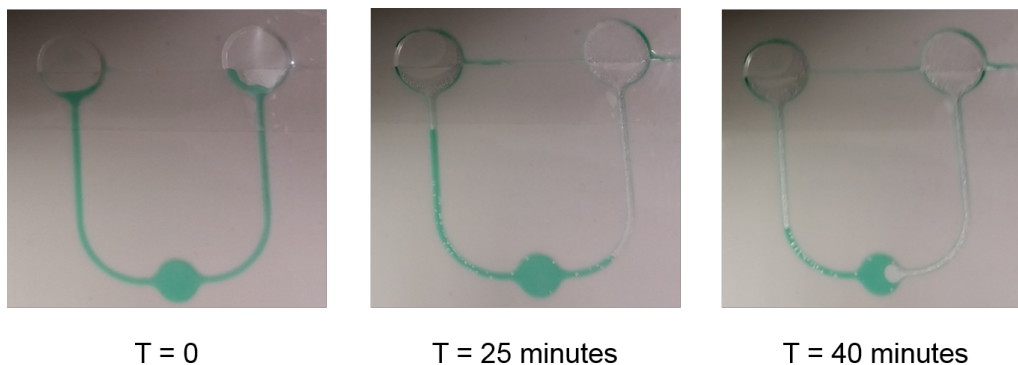


FIGURE 3.7 – Suivi de l'évaporation lorsque le papier SBR-SA est porté à 65°C.

Une hypothèse pour expliquer cette évaporation a été que l'empilement des couches polymères déposées, bien que rendant la surface du papier étanche aux liquides, était perméable aux gaz. Cette hypothèse a pu être vérifiée en effectuant des tests avec un appareil spécifique (appelé varimasse par la suite) qui permet d'effectuer un suivi de la masse d'un échantillon de papier lorsque ce dernier est soumis à différentes conditions d'humidités relatives. Pour nos tests, les consignes en humidité sont les suivantes :

- 50% pendant 1 heure
- 80% pendant 2 heures
- 50% pendant 1 heures
- 20% pendant 2 heures
- 50% pendant 1 heure

Ces expérience vont ainsi permettre de caractériser la reprise en humidité du papier, et donc la perméabilité des surfaces de l'échantillon à la vapeur d'eau.

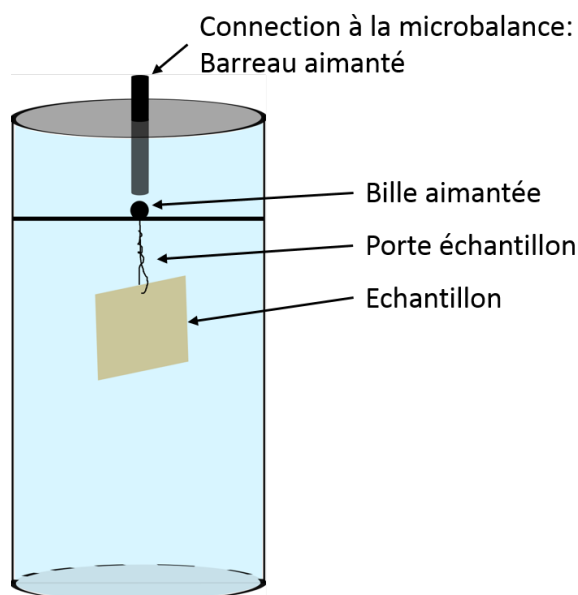


FIGURE 3.8 – Dispositif de mesure du Varimasse.

Durant ces expériences l'échantillon (un carré de $6 \times 6 \text{ cm}^2$ du papier à tester) est suspendu dans un cylindre régulé en humidité et est pesé avec une microbalance toutes les 15 secondes. La liaison à la balance se fait grâce à une bille aimantée située à l'extrémité du porte échantillon (Figure 3.8). Selon ce montage le

papier peut absorber la vapeur d'eau à travers différentes surfaces (Figure 3.9), à savoir :

- La face recto où sont déposées les couches polymères.
- La face verso.
- Les bords.
- Le trou d'attache au porte échantillon.

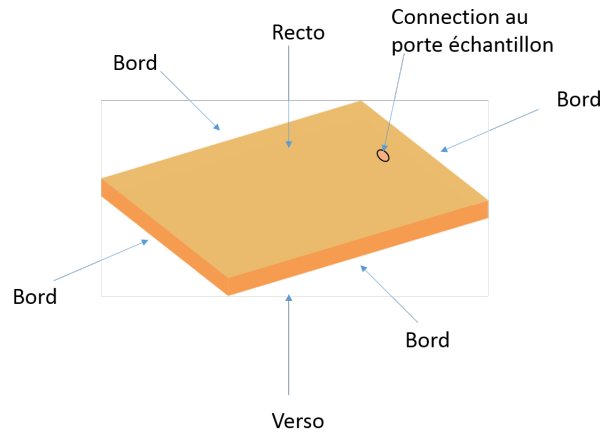


FIGURE 3.9 – Schéma des différentes surfaces d'échange de l'échantillon avec l'environnement.

Afin de s'affranchir des contributions d'absorption à travers les faces recto et verso un film d'adhésif MicroAmp® peut y être collé. Pour ces expériences le témoin négatif considéré est un échantillon de papier avec un film de MicroAmp® collé sur ces deux faces. Ce dernier présente donc encore des surfaces d'échanges avec son environnement, à savoir : les bords et l'attache au porte échantillon. Notons toutefois que du fait de la très faible surface d'échange que cela représente, ces contributions sont minimales comme nous pouvons le voir sur la figure 3.10. En revanche, il est apparent sur cette figure que la variation de la masse de l'échantillon de papier ayant une surcouche SBR-SA n'est pas négligeable.

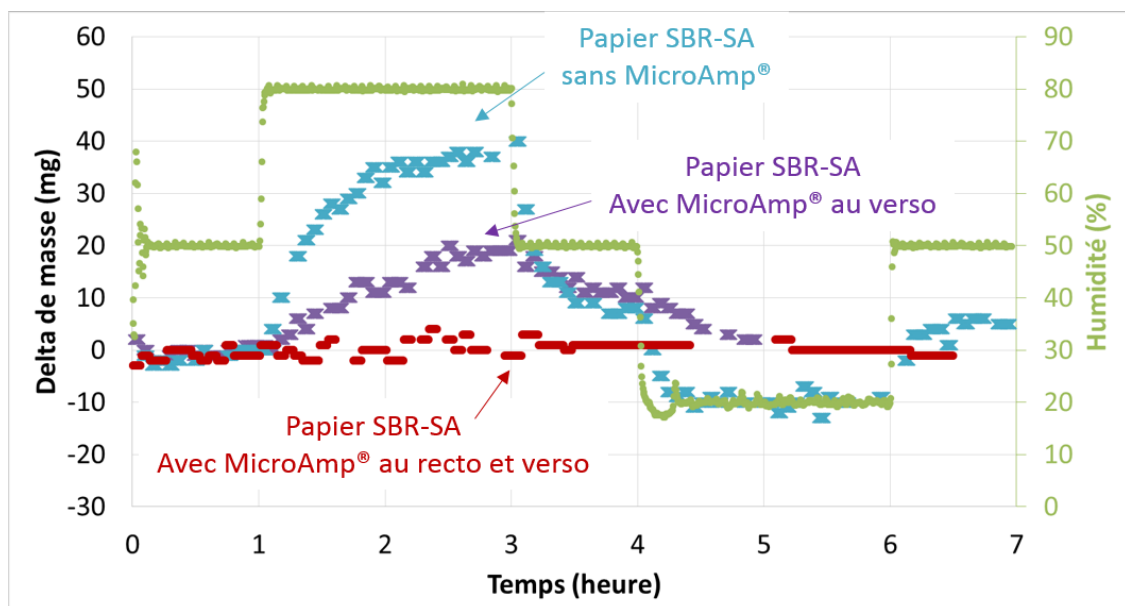


FIGURE 3.10 – Courbes de sorption/desorption obtenues avec le varimasse pour le papier SBR-SA.

Concentrons nous sur la variation de masse liée au passage de 50% d'humidité relative à 80%. Nous pouvons voir, sur la figure 3.10 que cette variation est beaucoup plus rapide pour le papier n'ayant pas été recou-

vert de MicroAmp® par rapport au papier recouvert en son verso. Cela indique donc que la double couche polymère déposée sur le recto du papier ralentit le passage de la vapeur d'eau. En revanche elle n'agit pas comme une bonne barrière puisque la variation de masse reste présente. Considérons les premiers temps de ces variations de masse où cette dernière paraît linéaire dans le temps. Nous observons alors que l'absorption pour l'échantillon non couvert est environ quatre fois plus rapide que pour l'échantillon couvert en son verso (Figure 3.11). Les deux surfaces (recto et verso) présentant la même aire à l'environnement, il peut en être déduit que l'absorption est ralentie par un facteur 2 par la présence des couches déposées.

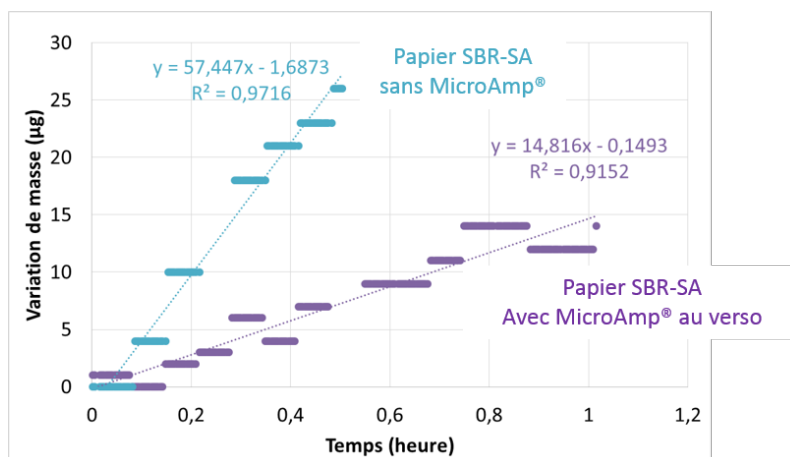


FIGURE 3.11 – Réponse linéaire du changement de masse au changement d'humidité.

D'autre part on constate, sur la figure 3.10, que dans le cas du papier non couvert la variation de masse semble atteindre une valeur d'équilibre au bout des deux heures, ce qui n'est pas le cas du papier couvert en son verso. Cela peut être expliqué par le fait que la durée d'acclimatation à la nouvelle condition d'humidité est plus importante pour l'échantillon couvert en son verso. En effet la reprise d'humidité se fait plus lentement, et ce pour deux raisons. La première étant que la surface exposée à l'environnement est plus faible et la seconde étant l'effet de barrière partielle procurée par le revêtement polymère.

Notons que ces mesures sont faites à température ambiante, et ne reflètent donc pas quantitativement le comportement de notre papier lorsque l'on effectue la réaction de LAMP à 65°C. Cependant ces observations confirment l'hypothèse de la perméabilité aux gaz du coating utilisé, rendant ce type d'échantillon non utilisable pour une amplification d'ADN.

Afin d'éviter cette perméabilité, la solution adoptée a été de remplacer la couche de SBR par un fin feuillet d'aluminium (d'épaisseur 11 µm). Un échantillon de papier recouvert de cette nouvelle double couche a été testé au Varimasse (figure 3.12).

Compte tenu de ce résultat encourageant à température ambiante, un test a été effectué avec un tel papier à 65°C. Pour ce dernier, le protocole utilisé est le même que celui décrit au début de cette sous-section pour le test du papier ayant le revêtement SBR-SA. Le résultat de ce test est présenté figure 3.13.

Lors du chauffage, différents phénomènes sont observables. Tout d'abord le liquide se déplace au sein du système. Cela est lié aux changements de pression de l'air présent dans le système (dans les réservoirs et en tant que bulles) du fait de la montée en température. D'autre part, on observe qu'une partie du liquide se condense sur le film de MicroAmp® au niveau des réservoirs. Cela apparaît comme des gouttelettes d'eau incolore (le colorant ne s'étant pas évaporer avec l'eau). Compte tenu de ces différentes observations, il est raisonnable de penser que la quantité de liquide présent dans les canaux et chambres microfluidiques n'a pas (ou très peu) évolué.

L'empilement proposé ici, et plus particulièrement la présence de la feuille d'aluminium, permet donc

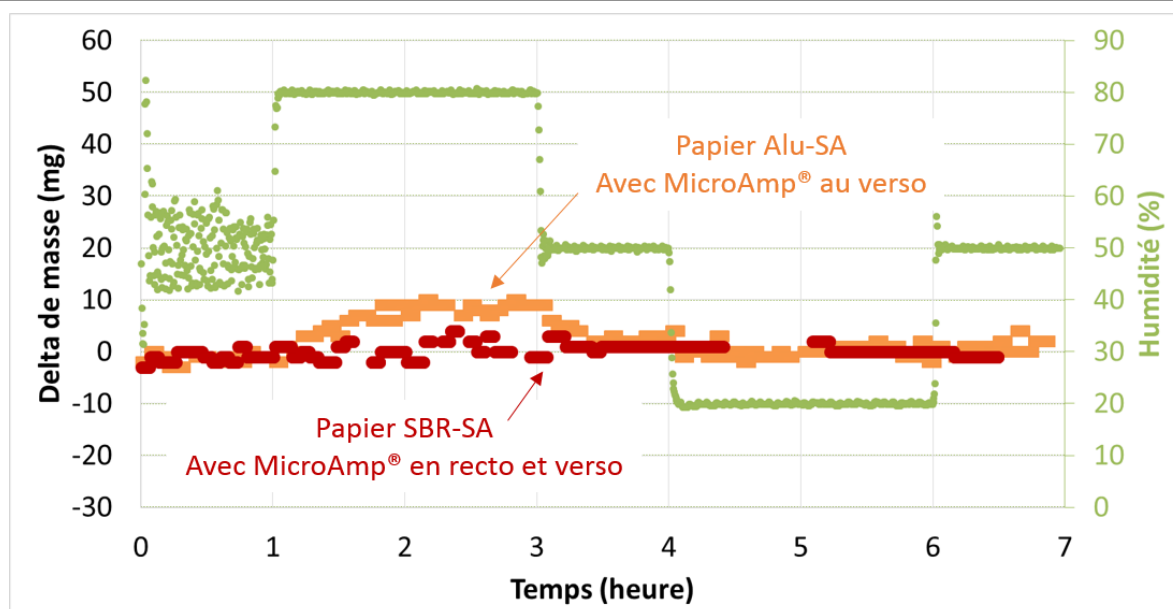


FIGURE 3.12 – Courbes de sorption/desorption obtenues avec le Varimasse pour le papier Alu-SA.

Juste après le remplissage Après 40 min à 65 °C

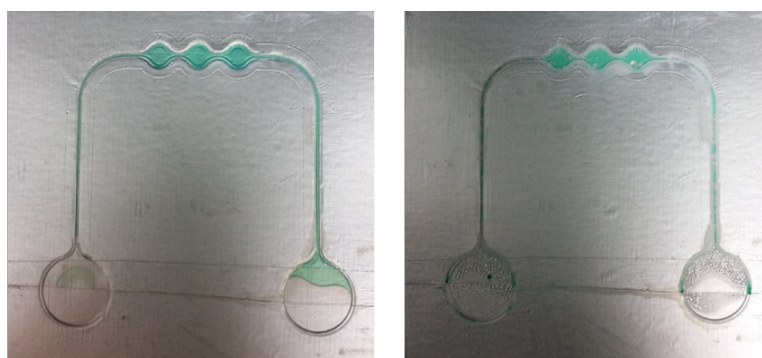


FIGURE 3.13 – Suivi de l'évaporation lorsque le papier Alu-SA est porté à 65°C.

de confiner le liquide dans le système microfluidique lors d'une étape de chauffage. Ajouté à cela la réponse positive au test de bio-compatibilité du copolymère styrène acrylique, couche au contact du liquide, l'empilement Aluminium-copolymère styrene acrylique (dénommé Alu-SA par la suite) semble être un bon candidat pour la réalisation d'une amplification LAMP dans nos systèmes papiers embossés.

3.2.3 Réaction de LAMP sur papier

Afin de tester la réalisation d'une réaction d'amplification d'ADN LAMP dans un système papier embossé, le même mélange réactionnel que celui utilisé pour le test de biocompatibilité a été testé. En revanche, comme il n'est pas possible de suivre l'amplification en temps réel avec le Stratagene®, l'observation de l'amplification se fera en point final avec une analyse à l'aide d'un bioanalyser 2100 (Agilent, USA). Cette dernière repose sur la migration d'ADN sur un gel d'électrophorèse. Cela permet de séparer les brins d'ADN selon leur taille et ainsi de pouvoir déterminer s'il y a présence d'amplicons ou non. De part son fonctionnement (voir chp 1), la LAMP produit des amplicons de différentes tailles et les gels en résultant sont caractérisés par l'apparition de triplets de bandes tels que montré dans la figure 3.14.

Une quantification des différents brins d'ADNs présents dans la solution analysée est possible en calcu-

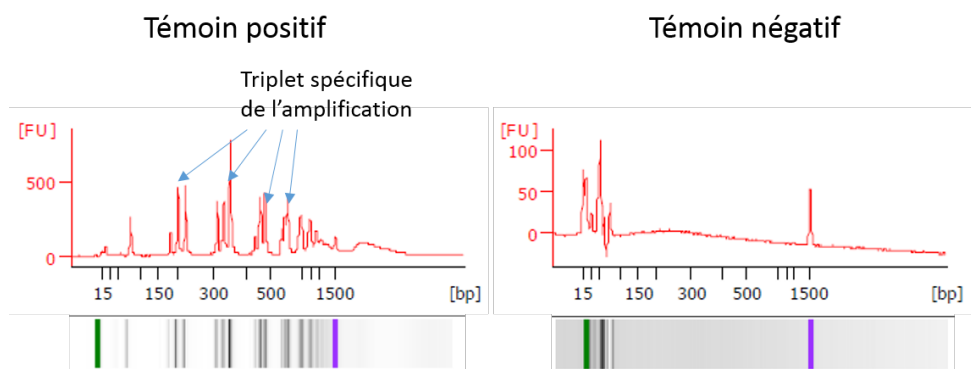


FIGURE 3.14 – Analyse de témoins positif et négatif sur gel d'électrophorèse.

lant l'aire du pic associé qui est retranscrit en concentration d'ADN par le logiciel lié au bio-analyseur. Cette transcription se fait grâce à une calibration effectuée sur chacun des gels avec des marqueurs de concentrations connues fournis avec le kit du bio-analyseur (bandes marquées en vert et violet sur les images des gels).

Cette analyse en point final nécessite donc de pouvoir prélever du liquide dans le système. Afin de permettre cela, le protocole de fermeture du système papier a été modifié. Un adhésif double face, découpé au niveau des réservoirs d'entrée et de sortie, est maintenant utilisé pour fermer le système (Figure 3.15). Afin de pouvoir pipeter facilement le liquide dans le système puis pour l'en extraire des connectiques ont été usinées dans une plaque de PMMA de 1 mm d'épaisseur. Ces derniers consistent simplement en des carrés de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ avec un trou traversant de 1 mm de diamètre permettant d'y insérer des cônes 100 μL de micropipettes. Ces éléments sont ensuite collés à l'aide de l'adhésif double face au niveau des réservoirs. Finalement un adhésif MicroAmp® est apposé sur le reste du scotch double face pour assurer la bonne imperméabilité du système. Une fois le système rempli avec le mélange réactionnel, le système est totalement fermé en apposant du MicroAmp® au niveau des deux connectiques. Ainsi seul le retrait de ces deux derniers bouts de MicroAmp® sera ensuite nécessaire pour pouvoir accéder et extraire le liquide à la fin de l'étape de chauffage.

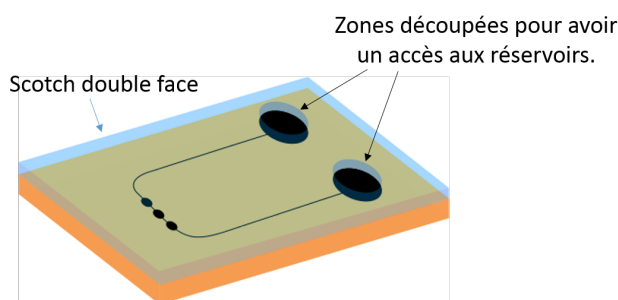


FIGURE 3.15 – Fermeture d'un circuit embossé sur papier avec du scotch double face découpé.

Les résultats de ce test sont présentés figure 3.16. Comme nous pouvons le voir sur cette analyse par électrophorèse, aucune amplification n'a eu lieu. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette inhibition totale. Afin de vérifier que cela n'est pas dû à une adsorption des molécules d'ADNs ou de l'enzyme sur la couche polymère, un essai d'amplification a également été effectué dans un système ayant été préalablement passivé avec de la BSA (et ce, en plus de la présence de BSA dans le mélange réactionnel). Pour ce faire, une solution de BSA 1% a été introduite dans le système, a été laissée en incubation pendant 15 minutes, puis a été retirée avant l'introduction du mix. Comme présenté dans la figure 3.17, aucune

amplification n'a eu lieu dans ce dispositif.

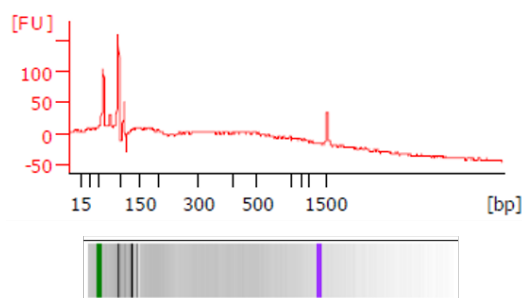


FIGURE 3.16 – Analyse sur gel d'électrophorèse d'une réaction de LAMP dans un dispositif Alu-SA.

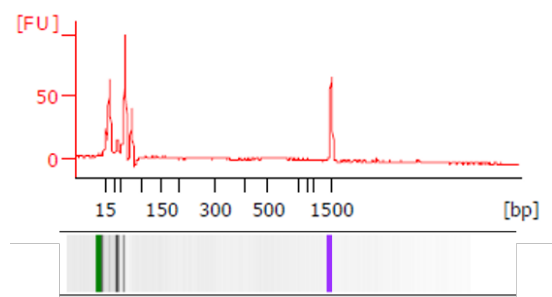


FIGURE 3.17 – Analyse sur gel d'électrophorèse d'une réaction de LAMP dans un dispositif Alu-SA coâté avec de la BSA.

Une autre hypothèse fut la biocompatibilité de l'empilement Alu-SA. En effet lors des premiers tests de biocompatibilité seule la biocompatibilité de la couche de copolymère styrene acrylique, couche en contact direct avec le liquide, a été testée. Le test de biocompatibilité a ainsi été reproduit sur un papier possédant l'empilement Alu-SA. Ce test a de plus été effectué en déposant le mélange réactionnel sur la surface à testé, soit avant, soit après l'ajout de l'ADN. Les résultats de ces tests sont présentés en figure 3.18. La très faible différence de Ct entre ces tests et le témoin positif (< 1) vérifie que la double couche Alu-SA est compatible avec la LAMP selon ce protocole de test. Notons qu'une analyse de ces amplifications au bio-analyseur confirme également que l'amplification a été réalisée avec une amplitude similaire par rapport au témoin positif (figure 3.19).

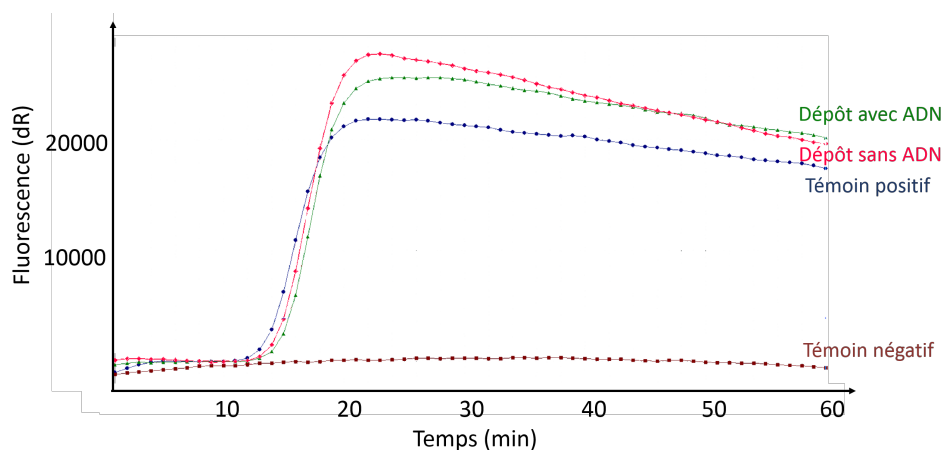


FIGURE 3.18 – Test de bio-compatibilité du revêtement Alu-SA : Courbes en fluorescence.

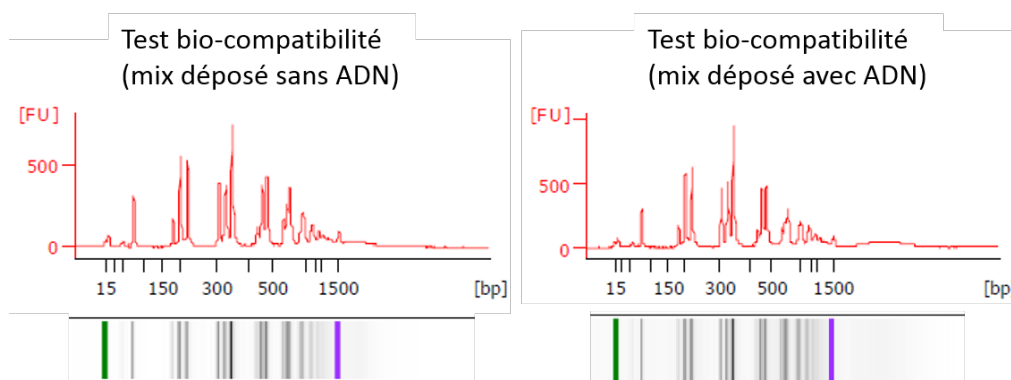


FIGURE 3.19 – Test de bio-compatibilité du revêtement Alu-SA : Gel d'électrophorèse.

Compte tenu de ces différents éléments de réponse, il semble que l'absence d'amplification provienne du relargage d'une substance inhibitrice à la LAMP lorsque le système est porté à 65°C. Des pistes pour remédier à ce problème sont actuellement en cours d'investigation. On peut par exemple citer les idées suivantes :

- Faire un recuit du papier pour essayer de relarguer les substances inhibitrice au préalable.
- Recouvrir par PVD la surface d'une fine couche de silice qui devra être assez compact pour éviter le relargage de la substance inhibitrice au sein du liquide.
- Changer l'adhésif double face.
- Tester avec une autre enzyme d'amplification isotherme. Cela pourrait être avec une autre enzyme de LAMP mais également avec une autre amplification isotherme telle que la RPA.

3.3 Conclusion

En conclusion, lors de ce chapitre, la thématique de la fabrication des systèmes microfluidiques a été évoquée. Nous avons vu comment le procédé de fabrication développé permet d'allier le bas-coût du matériau papier aux avantages des écoulements capillaires spontanés. En particulier, dans les systèmes fabriqués, l'écoulement se fait au sein de canaux microfluidiques et non dans une matrice fibreuse comme c'est classiquement le cas pour les systèmes microfluidiques papiers. Cela simplifie notamment l'étude des écoulements et rend le système plus robuste quant aux conditions environnementales. Cette méthode de fabrication repose sur le thermoformage d'un papier couché. De façon à rendre la surface à la fois étanche (de façon à ce que le liquide ne s'imprègne pas dans la matrice papier) et hydrophile (de façon à ce qu'un écoulement capillaire spontané puisse se produire) un revêtement double couche a été développé. Il consiste en un dépôt d'une première couche de Styène Butadiène Rubber pour profiter de la caractéristique d'étanchéité, puis d'une seconde couche d'alcool Poly-vinyle ou de copolymère de styrène d'acrylique pour rendre la surface hydrophile. Il s'est cependant avéré que cet empilement reste perméable à la vapeur d'eau, et qu'il ne permet donc pas le confinement du liquide lors de l'étape d'amplification d'ADN, se déroulant à 65°C. Pour remédier à ce problème la couche de SBR a été remplacée par un fin feuillet d'aluminium. Ce nouvel empilement permet alors de contenir le liquide dans le système lors du chauffage. Une autre difficulté est ensuite apparue : les dispositifs ainsi fabriqués provoquent une inhibition de la réaction de LAMP. Et ce malgré les tests de bio-compatibilités effectués au préalable. La piste privilégiée pour expliquer cela est le relargage d'une substance inhibitrice à la LAMP par un des éléments lorsque celui-ci est chauffé. Des pistes pour remédier à ce problème ont été évoquées et font, à l'heure actuelle, l'objet de tests.

Bibliographie

- [1] Holger Becker and Claudia Gärtner. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1) :89–111, January 2008.
- [2] Boe-Yu Peng, Chih-Wei Wu, Yung-Kang Shen, and Yi Lin. Microfluidic chip fabrication using hot embossing and thermal bonding of COP. *Polymers for Advanced Technologies*, 21(7) :457–466, July 2010.
- [3] Larry J. Kricka, Paolo Fortina, Nicholas J. Panaro, Peter Wilding, Goretti Alonso-Amigo, and Holger Becker. Fabrication of plastic microchips by hot embossing. 2(1) :1–4, February 2002.
- [4] Neil S. Cameron, Helene Roberge, Teodor Veres, Stephen C. Jakeway, and H. John Crabtree. High fidelity, high yield production of microfluidic devices by hot embossing lithography : Rheology and stiction. 6(7) :936–941, June 2006.
- [5] Y. H. Cho, J. Park, H. Park, X. Cheng, B. J. Kim, and A. Han. Fabrication of high-aspect-ratio polymer nanochannels using a novel Si nanoimprint mold and solvent-assisted sealing. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(2-3) :163–170, November 2009.
- [6] Holger Becker and Ulf Heim. Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures. *Sensors and Actuators A : Physical*, 83(1–3) :130–135, May 2000.
- [7] Thomas E. Kimerling, Weidan Liu, Byung H. Kim, and Donggang Yao. Rapid hot embossing of polymer microfeatures. *Microsystem Technologies*, 12(8) :730–735, February 2006.
- [8] J. Zhang, M. Sahli, J. C. Gelin, and T. Barrière. Roll manufacturing of polymer microfluidic devices using a roll embossing process. *Sensors and Actuators A : Physical*, 230 :156–169, July 2015.
- [9] Lip Pin Yeo, Sum Huan Ng, Zhenfeng Wang, Zhiping Wang, and Nicolaas Frans de Rooij. Micro-fabrication of polymeric devices using hot roller embossing. *Microelectronic Engineering*, 86(4–6) :933–936, April 2009.
- [10] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Manish J. Butte, and George M. Whitesides. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8) :1318–1320, February 2007.
- [11] David M. Cate, Jaclyn A. Adkins, Jaruwan Mettakoonpitak, and Charles S. Henry. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, 87(1) :19–41, January 2015.
- [12] Yuanyuan Yang, Eka Noviana, Michael P. Nguyen, Brian J. Geiss, David S. Dandy, and Charles S. Henry. Paper-Based Microfluidic Devices : Emerging Themes and Applications. *Analytical Chemistry*, 89(1) :71–91, January 2017.
- [13] Ali Kemal Yetisen, Muhammad Safwan Akram, and Christopher R. Lowe. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12) :2210, 2013.
- [14] Emanuel Carrilho, Andres W. Martinez, and George M. Whitesides. Understanding Wax Printing : A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(16) :7091–7095, August 2009.

-
- [15] Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, and Charles S. Henry. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. 136(1) :77–82, December 2010.
- [16] Derek A. Bruzewicz, Meital Reches, and George M. Whitesides. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *Analytical Chemistry*, 80(9) :3387–3392, May 2008.
- [17] Koji Abe, Koji Suzuki, and Daniel Citterio. Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. *Analytical Chemistry*, 80(18) :6928–6934, September 2008.
- [18] Juuso Olkkonen, Kaisa Lehtinen, and Tomi Erho. Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper. *Analytical Chemistry*, 82(24) :10246–10250, December 2010.
- [19] Xu Li, Junfei Tian, Gil Garnier, and Wei Shen. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 76(2) :564–570, April 2010.
- [20] Carlos Castro, Cindy Rosillo, and Hideaki Tsutsui. Characterizing effects of humidity and channel size on imbibition in paper-based microfluidic channels. *Microfluidics and Nanofluidics*, 21(2) :21, February 2017.
- [21] Joshua R. Buser, J. E. Atwood, and Paul Yager. Nothing is saturated : Correcting the assumptions made while predicting flow in paper microfluidics. Dublin, 2016.
- [22] Temsiri Songjaroen, Wijitar Dungchai, Orawon Chailapakul, Charles S. Henry, and Wanida Laiwattanapaisal. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. 12(18) :3392–3398, August 2012.
- [23] Xiaoxi Yang, Omid Forouzan, Theodore P. Brown, and Sergey S. Shevkoplyas. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. 12(2) :274–280, December 2011.
- [24] Samuel B. Berry, Syrena C. Fernandes, Anjali Rajaratnam, Nicholas S. DeChiara, and Charles R. Mace. Measurement of the hematocrit using paper-based microfluidic devices. 16(19) :3689–3694, September 2016.
- [25] Martin M. Thuo, Ramses V. Martinez, Wen-Jie Lan, Xinyu Liu, Jabulani Barber, Manza B. J. Atkinson, Dineth Bandarage, Jean-Francis Bloch, and George M. Whitesides. Fabrication of Low-Cost Paper-Based Microfluidic Devices by Embossing or Cut-and-Stack Methods. *Chemistry of Materials*, 26(14) :4230–4237, July 2014.

Chapitre 4

Développement des fonctions nécessaires au diagnostic : le chauffage et la détection.

L'objet de ce chapitre est de présenter les développements effectués quant aux fonctions nécessaires pour la réalisation et la détection d'une réaction de LAMP. Pour cela, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur des éléments réalisables par sérigraphie (voir Chapitre 1). En effet il s'agit d'un procédé industriel qui permet la réalisation de composants électroniques [1, 2, 3] sur des supports organiques souples et à faible coût. Le panel d'encres conductrices disponibles est ainsi assez large et va permettre la réalisation des fonctions souhaitées pour notre système. Un autre intérêt de cette technologie d'impression est la quantité relativement importante d'encre déposée, comparativement à d'autres techniques de dépôt telle que l'impression jet d'encre. En effet, l'épaisseur de la couche d'encre déposée (de l'ordre de 10 à 15 μm) permet d'envisager une étape d'embossage du support sérigraphié qui minimise le risque de rupture des pistes conductrices imprimées. L'enchaînement de ces étapes pourrait ainsi permettre la création de systèmes microfluidiques intégrés.

Dans ce chapitre les deux fonctions développées (le chauffage et la détection pHmétrique) seront étudiées distinctement. Ce chapitre est ainsi dédié à la caractérisation et l'optimisation de ces fonctions pour une réaction de type LAMP. L'association de ces différentes fonctions ainsi que le couplage entre le procédé de sérigraphie et la technique d'embossage en vue de la création d'un système microfluidique intégré font l'objet du prochain et dernier chapitre de cette thèse.

4.1 Le dispositif de chauffage

4.1.1 Focus bibliographique

De nombreux dispositifs de diagnostic se basent sur un procédé d'amplification d'ADN qui permet d'obtenir une forte sensibilité. Cependant ces instruments nécessitent alors une (ou plusieurs) étape(s) de chauffage pour procéder à l'amplification. Bien que d'après le critère ASSURED proposé par l'OMS il est grandement préférable que le système soit intégré et autonome, de nombreuses publications utilisent des éléments extérieurs tels que des modules peltiers ou de petits boîtiers complémentaires pour effectuer le-dit chauffage [4, 5, 6, 7]. Même si certains de ces articles évoquent la possibilité d'intégrer des éléments chauffants à bas-coût, l'intégration de ces éléments dans le système n'est pas démontrée et peut représenter une étude à part entière. A contrario, de plus en plus de publications revendiquent des outils de diagnostic intégrés, dans lesquels la fonction de chauffage est effectivement intégrée. Pour ce faire, deux méthodes sont utilisées : le chauffage par effet Joule ou le dégagement de chaleur produit par une réaction chimique

exothermique.

4.1.1.1 Le chauffage par effet Joule

Le chauffage par effet Joule est une méthode de chauffage couramment utilisée pour des systèmes réalisant une amplification d'ADN [8, 9, 10, 11]. Cette forte utilisation est dû au fait qu'il s'agit d'une méthode simple à mettre en place et, en particulier qui ne nécessite pas de stockage ou d'ajout de réactifs. Cette méthode repose sur le dégagement de chaleur produit par le passage d'un courant dans un matériau résistif. La puissance dissipée sous forme de chaleur par le-dit élément est donnée par l'Eq 4.1.

$$P_{Joule} = U * i = \frac{U^2}{R} = R * i^2 \quad (4.1)$$

où P_{Joule} est la puissance dissipée (en W), U est la tension appliquée à l'élément (en V), i l'intensité du courant le traversant (en A) et R sa résistance électrique (en Ω).

Afin de garantir une température appropriée sur toute la durée de l'expérience, l'utilisation de tels éléments pour produire un échauffement est souvent couplé à l'utilisation d'un capteur de température et d'une boucle de rétro-action. Cependant cela complexifie le système et, par conséquent, rend celui-ci moins apte à une utilisation portable de type Point-of-Care.

4.1.1.2 Le chauffage par réaction chimique exothermique

La seconde technique parfois utilisée pour effectuer le chauffage dans un système d'amplification d'ADN est basée sur une réaction chimique exothermique. Bien que cette dernière nécessite l'embarquement de réactifs et/ou l'ajout de réactifs à l'utilisation, elle a le grand avantage d'être totalement autonome. En effet il n'y a pas besoin d'apport énergétique pour la réalisation de cette réaction. En revanche un point délicat de cette méthode est le contrôle de la température produite par la réaction. En effet la chaleur produite par une telle réaction ne peut pas être contrôlée comme la tension appliquée à un élément chauffant par effet Joule *via* une boucle de rétroaction. Cependant, la possibilité d'utiliser un matériau à transition de phase pour pallier à cet inconvénient a été démontré dans la littérature [12]. Cette technologie repose sur le principe que la transition de phase du matériau utilisé se fait à température constante. De cette façon, lorsque l'énergie dissipée par la réaction exothermique est assez importante pour induire la transition de phase du matériau, celui-ci possède alors une température constante, pouvant réguler le système. Des dispositifs d'amplification d'ADN basées sur ce principe ont alors été développés [13, 14, 15].

Bien qu'un système de chauffage par réaction exothermique permette de s'affranchir totalement d'un équipement extérieur, nous avons fait le choix dans cette thèse d'utiliser un système de chauffage par effet Joule. Une des motivations de ce choix est le fait que la température obtenue avec un tel système est facilement ajustable pour d'autres applications qui nécessiteraient des températures de fonctionnement différentes. D'autre part, étant donné le souhait d'intégrer une mesure électrochimique à notre système, une petite source d'énergie (batterie, pile ou connexion USB) sera nécessaire. Il ne sera alors pas contraignant d'utiliser également cette source d'énergie pour l'étape de chauffage, du moment que celle-ci ne nécessite qu'une quantité d'énergie raisonnable.

4.1.2 Les éléments chauffants développés

Les éléments chauffants développés au cours de cette thèse se présentent sous la forme d'une nappe rectangulaire d'encre carbone sérigraphiée. La connexion à cette nappe se fait grâce à des pistes d'encre argent également sérigraphiées (Figure 4.1). Une gamme d'éléments chauffants a été définie (Figure 4.2)

afin de pouvoir étudier l'influence de leurs dimensions sur leur capacité à s'échauffer par effet Joule. La caractérisation de ces éléments chauffant permettra ensuite de prédire la température de chauffage de ces éléments en fonction de leur géométrie ainsi que de la tension appliquée à leurs bornes. Il est alors particulièrement intéressant d'inverser le problème. En effet avec une telle prédiction, il sera alors possible de définir la géométrie de l'élément chauffant de façon à atteindre une température donnée avec un voltage donné, ces deux informations étant contraintes par, respectivement, la réaction d'amplification envisagée et les conditions d'utilisations.

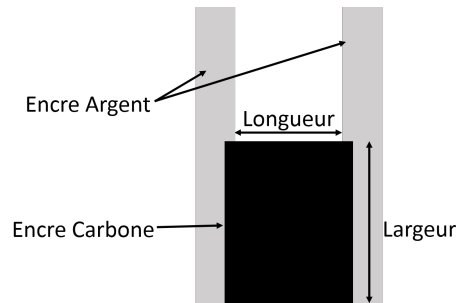


FIGURE 4.1 – Schéma d'un élément chauffant.

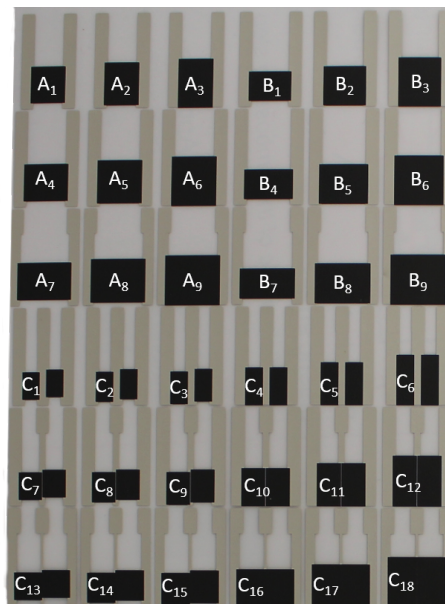


FIGURE 4.2 – Photographie des différents éléments chauffants réalisés.

Longueur (L, en mm)	Largeur (W, en mm)		
	15	17.5	20
12	a_1	a_2	a_3
16	a_4	a_5	a_6
20	a_7	a_8	a_9

Tableau 4.1 – Dimensions des éléments chauffants de la série "a".

Les tableaux 4.1, 4.2 et 4.3 référencent les différents éléments chauffants réalisés avec leurs dimensions et la dénomination adoptée. Le design des masques nécessaires à la réalisation de ces éléments a été réalisée sur SOLIDWORKS (Dassault Systèmes, France). La sérigraphie de ces éléments, sur un support PET (poly(téréphtalate d'éthylène)) de 125 μm d'épaisseur, a quant à elle été sous-traitée à la société Séribase

Industrie (Chateau-Gontier, France). Un visuel des masques réalisés est proposé en Annexe A. On notera qu'un recouvrement de 1 mm a été prévue entre la couche de carbone et celle d'argent afin d'assurer la conduction électrique.

Largeur (W, en mm)	12	16	20
Longueur (L, en mm)			
15	b_1	b_2	b_3
17.5	b_4	b_5	b_6
20	b_7	b_8	b_9

Tableau 4.2 – Dimensions des éléments chauffants de la série "b".

Largeur (W, en mm)	11	12	13	15	17	20
Longueur (L, en mm)						
5	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6
7.5	c_7	c_8	c_9	c_{10}	c_{11}	c_{12}
10	c_{13}	c_{14}	c_{15}	c_{16}	c_{17}	c_{18}

Tableau 4.3 – Dimensions des éléments chauffants de la série "c".

4.1.2.1 Étude basée exclusivement sur la convection naturelle.

Afin d'établir la prédiction souhaitée, une caractérisation de ces éléments chauffants a été effectuée. Lors de cette première étude, qui est présentée dans l'article qui suit, seuls les phénomènes de transferts thermiques convectifs ont été pris en compte. Il y est montré que, du fait du montage où les éléments chauffants sont suspendus horizontalement dans l'air, les contributions de la convection naturelle de la face supérieure et celle de la face inférieure doivent toutes deux être prises en compte. Un nombre de Nusselt total est alors défini afin de décrire cette double convection. Une relation entre ce nombre de Nusselt total, caractérisant le flux thermique, et le nombre de Rayleigh, caractérisant l'intensité de la convection naturelle, est alors établie à partir des données expérimentales. Enfin il est démontré que, grâce à cette relation, une prédiction de la température de chauffage des éléments est possible avec une erreur relative moyenne inférieure à 2%.

A la suite de cet article, la sous section suivante présentera une étude plus complète qui permettra d'affiner ce modèle en prenant en compte les phénomènes de rayonnement et de conduction thermique. Nous y verrons également pourquoi, malgré le fait que ces phénomènes n'aient pas été pris en compte lors de cette première étude, une prédiction correcte de la température a été possible.

Références de la publication

Gosselin D., Chaussy D., Belgacem N., Navarro E., Berthier J., 2016. Heat Transfer Correlations for Free Convection from Suspended Microheaters. *Sensors & Transducers* 203, 16-23.

Lien web : http://www.sensorsportal.com/HTML/DIGEST/P_2847.htm

4.1.2.2 Étude intégrant les phénomènes de conduction et de rayonnement.

Comme il l'a été évoqué auparavant l'étude proposée dans l'article précédent ne prend en compte ni les phénomènes de rayonnement, ni les phénomènes de conduction latérale dans le support en PET (Figure 4.3). Afin d'observer quantitativement l'impact de ces différentes contributions, des simulations ont été effectuées avec COMSOL Multiphysiques.

Le modèle COMSOL Pour cette étude, le modèle 3D de l'élément chauffant et son support a été découpé en trois zones : une représentant la couche de carbone, et deux pour le support en PET (figure 4.4). La zone nommée PET1 est le volume de PET situé directement sous la zone chauffante du système. La zone nommée PET2 est le reste du support de l'élément chauffant. La distinction entre ces deux zones a été faite car, contrairement à l'impact de la zone PET1, l'impact de la zone PET2 *via* la conduction latérale (en rouge sur la figure 4.3) n'a pas été discutée dans l'étude précédente.

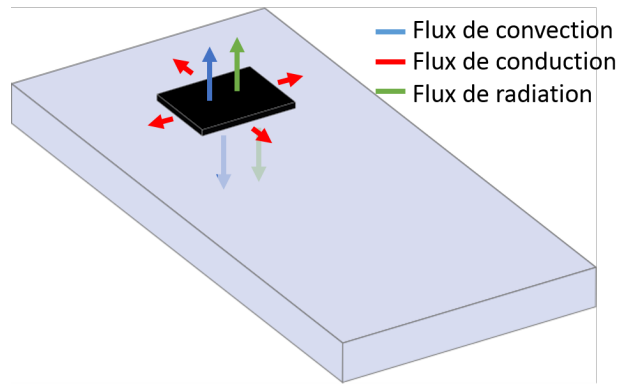


FIGURE 4.3 – Schéma des flux thermiques aux frontières du carbone.

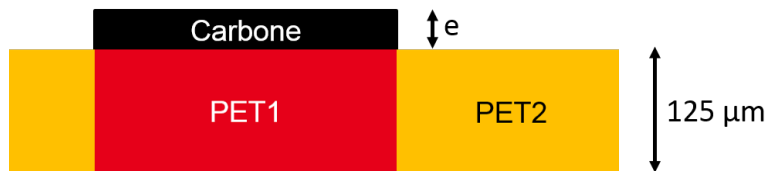


FIGURE 4.4 – Vue en coupe du modèle implémenté dans COMSOL Multiphysics

Une fois la géométrie définie dans COMSOL, les propriétés physiques nécessaires des différents matériaux du système doivent être spécifiées. Concernant le PET, la valeur de sa capacité thermique massique a été prise égale à $C_{pPET} = 1170 \text{ J/kg/K}$ [16] et sa conductivité thermique égale à $k_{PET} = 0,15 \text{ W/m/K}$ [17]. Concernant la pâte carbone sérigraphiée, les valeurs de sa capacité thermique massique et de sa conductivité thermique ont été définies en considérant que cette pâte carbone était composée de graphite et d'un liant polymère. Pour la capacité thermique, propriété linéaire avec les fraction massique des différents composants, l'hypothèse d'un mélange de 80% de graphite et de 20% de polymère (type PMMA, PET ou Polystyrène) a été utilisée. Une valeur finale de $C_{pCarbonpaste} = 820 \text{ J/kg/K}$ a été obtenue [18, 16]. Pour la conductivité thermique, une valeur de $k_{Carbonpaste} = 100 \text{ W/m/K}$ a été définie. Cette dernière a été choisie de façon à rendre compte à la fois de la très bonne conductivité thermique du graphite ($k_{graphite} \sim 170 \text{ W/m/K}$ [19]) et la faible conductivité thermique des polymères (de l'ordre $0,15 - 0,2 \text{ W/m/K}$ [17, 20]). Pour ce qui est de la résistivité électrique (ρ) de la pâte carbone, la valeur a été définie selon la formule établie dans l'étude

précédente, et rappelée par l'Eq 4.2.

$$\rho = \rho_0 * (3,6.10^{-5} * T^2 - 4,5.10^{-4} * T + 0,9867) \quad (4.2)$$

où ρ_0 est la résistivité du matériau à température ambiante (en $\Omega.m$) et T la température (en K). Afin de déterminer ρ_0 , la résistance d'un élément chauffant C_2 a été mesurée à température ambiante et l'on a considéré une épaisseur de $e = 12 \mu m$, épaisseur de référence fournie par Séribase Industrie, pour ce dernier. La valeur de ρ_0 est alors donnée par l'Eq 4.3.

$$\rho_0 = R * \frac{W * e}{L} = 151,3 * \frac{17}{5} \simeq 1,8.10^3 \Omega.m \quad (4.3)$$

Afin de palier à l'inhomogénéité d'épaisseur entre les différents éléments chauffants constatée précédemment, il a été choisi de définir l'épaisseur de la zone de carbone du modèle au cas par cas. Pour cela, l'épaisseur d'un élément chauffant est calculé à partir de sa résistance à température ambiante selon l'équation .

$$e = 1,8.10^3 * \frac{L}{W * R(T_{amb})} \quad (4.4)$$

Notons que pour l'ensemble des éléments considérés dans cette étude, l'épaisseur recalculée est toujours comprise entre 10 et 15 μm , ce qui est tout à fait cohérent avec une épaisseur d'encre sérigraphiée.

Validation du modèle COMSOL Dans un premier temps, le modèle COMSOL a été testé avec seulement la zone carbone et la zone PET1 de façon à le valider vis-à-vis de l'étude précédente. Pour cela seule la convection naturelle sur les faces supérieure et inférieure a donc été implémentée. Afin de définir les coefficients d'échanges convectifs, la formule établie dans l'étude précédente (rappelée par l'Eq 4.5) a été utilisée.

$$h_{tot} = 0,7 * (T - T_{amb})^{(1/8)} * Lc^{(-5/8)} \quad (4.5)$$

Toutefois, il est à noter que pour la simulation une distinction doit être faite entre le coefficient de convection de la face supérieure et celui de la face inférieure, le coefficient obtenu par calcul (h_{tot}) ayant été défini comme la somme des deux. Les deux coefficients d'échange convectif peuvent alors être définis selon l'équation 4.6.

$$\left. \begin{aligned} h_U^{conv} &= x * h_{tot} \\ h_D^{conv} &= (1 - x) * h_{tot} \end{aligned} \right\} \quad \text{avec } x \in [0 \ 1] \quad (4.6)$$

La figure 4.5 montre les températures obtenus par simulations lorsque l'on fait varier la variable x dans les équations 4.6. On peut voir que la température d'équilibre atteinte par l'élément chauffant ne dépend que très légèrement de cette variable. Ainsi pour les simulations présentées par la suite, il est arbitrairement choisi que les deux coefficients d'échanges convectifs soient égaux. Ils sont alors donnés par la relation 4.7.

$$h_U^{conv} = h_D^{conv} = 1/2 h_{tot} \quad (4.7)$$

Maintenant que tous les paramètres ont été définis dans COMSOL, des simulations peuvent être effectuées. La Figure 4.6 montre qu'un très bon accord est obtenu entre les résultats des simulations (étoiles) et les courbes théoriques obtenues par l'étude précédente. Cela permet de valider le modèle implémenté dans COMSOL.

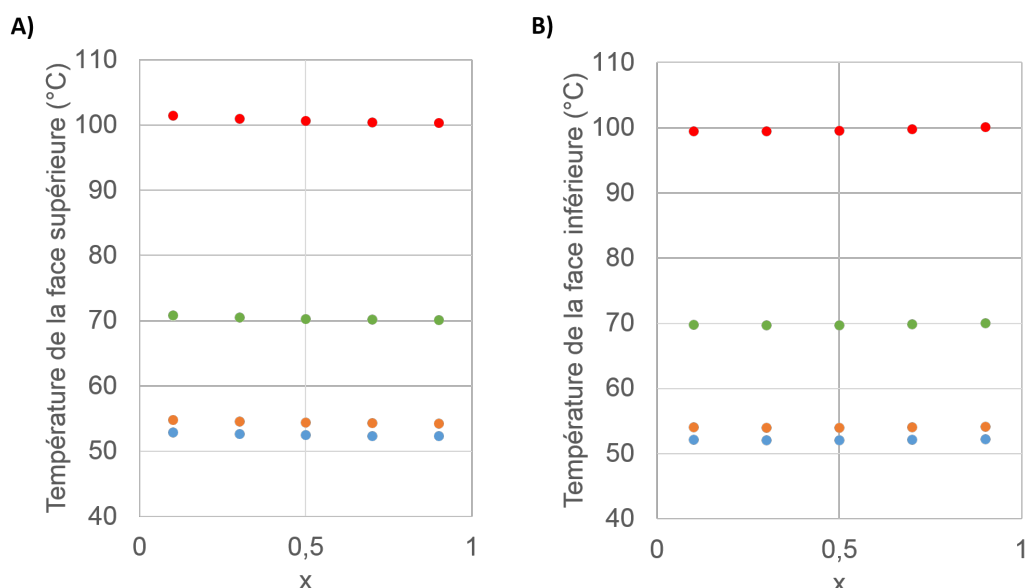


FIGURE 4.5 – Influence de la répartition des flux de convections.

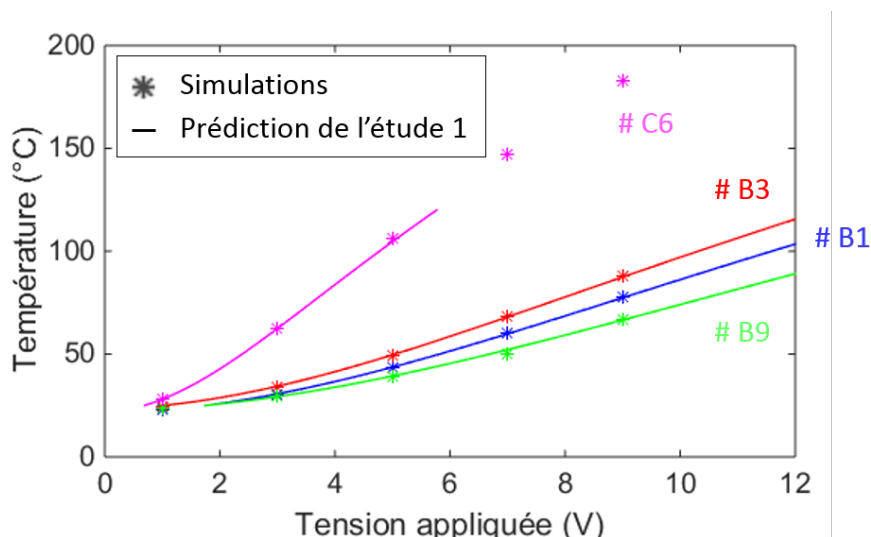


FIGURE 4.6 – Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte uniquement la convection.

La suite de cette étude va maintenant être consacrée à l'implémentation des flux thermiques de rayonnement et de conduction latérale dans le PET afin d'observer leurs impacts respectifs.

Implémentation des flux thermiques manquants dans le modèle COMSOL Dans un premier temps seuls les flux de conduction latérale vont être rajoutés au modèle. Pour cela, la zone PET2 est ajoutée au modèle COMSOL détaillé précédemment. Les coefficients de convection de la face supérieure du carbone et de la face inférieure du PET1 sont, quant à eux, toujours calculés à partir des équations 4.5 et 4.7. L'ajout du PET2 provoque une baisse de la température d'équilibre atteinte par l'élément chauffant de l'ordre de 5% (Figure 4.7). Cette baisse de température d'équilibre s'explique par le fait, qu'en plus des dissipations convectives implémentées auparavant, il y a maintenant également une dissipation latérale par conduction dans le PET2.

La figure 4.8 A montre la distribution simulée de température sur la face supérieure de l'élément chauffant. On voit effectivement qu'une partie du support est chauffée. Notons que cette zone reste relativement

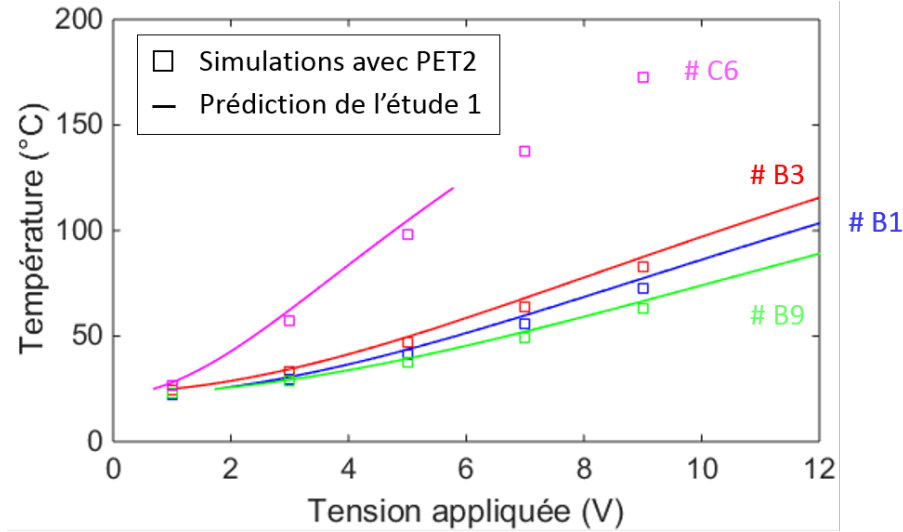


FIGURE 4.7 – Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte la convection et la conduction latérale.

faible du fait de la faible conductivité thermique du PET. Cela peut également se vérifier sur le profil de température présenté en figure 4.8 B.

La présence de cette dissipation dans le PET2 indique que la dissipation convective a été surévaluée lors de la première étude. En effet pour compenser le fait que la dissipation par conduction dans le PET2 n'était pas prise en compte lors de la première étude, le flux de chaleur convectif a été surestimé.

Le flux thermique de rayonnement de la surface de carbone, a ensuite été ajouté à la présence du support PET2. Le coefficient d'émissivité ($\epsilon = 0,73$) déterminé lors de la première étude a été utilisé pour ces simulations. Comme cela avait été le cas lors de l'ajout du PET2, l'ajout du rayonnement provoque une baisse de la température d'équilibre de l'élément chauffant (Figure 4.9). Cela montre ainsi que le rayonnement doit également être pris en compte. En effet, son absence dans la première étude a participé à la surestimation des transferts thermiques convectifs.

La suite de cette sous-section va maintenant s'attacher à introduire ces flux thermiques dans le modèle analytique afin de caractériser plus précisément les échanges convectifs.

Prise en compte de ces flux dans l'étude analytique La prise en compte du flux de rayonnement dans le modèle analytique consiste en l'ajout de l'équation 4.8 dans le bilan des flux. Pour une plus grande représentativité du modèle, nous allons ici ajouter le rayonnement du carbone avec un coefficient d'émissivité $\epsilon_{carbone} = 0,73$ mais également le rayonnement de la face inférieure de la zone PET1. Pour le PET le coefficient d'émissivité est pris égal à $\epsilon_{PET} = 0,81$ [21].

$$\Phi_{ray} = \epsilon \sigma S (T^4 - T_{amb}^4) \quad (4.8)$$

où σ est la constante de Stefan-Boltzmann ($\approx 5,67 \cdot 10^{-8} \text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$), T et T_{amb} sont respectivement la température de l'élément chauffant et la température de l'environnement, et S est la surface d'échange ($S = W * L$, en m^2).

La prise en compte du flux de conduction latérale dans le PET2 est plus délicate. En effet la formule analytique de ce dernier est donnée par l'équation 4.9.

$$\Phi_{cond} = \lambda_{PET} S_{cond} \nabla T \quad (4.9)$$

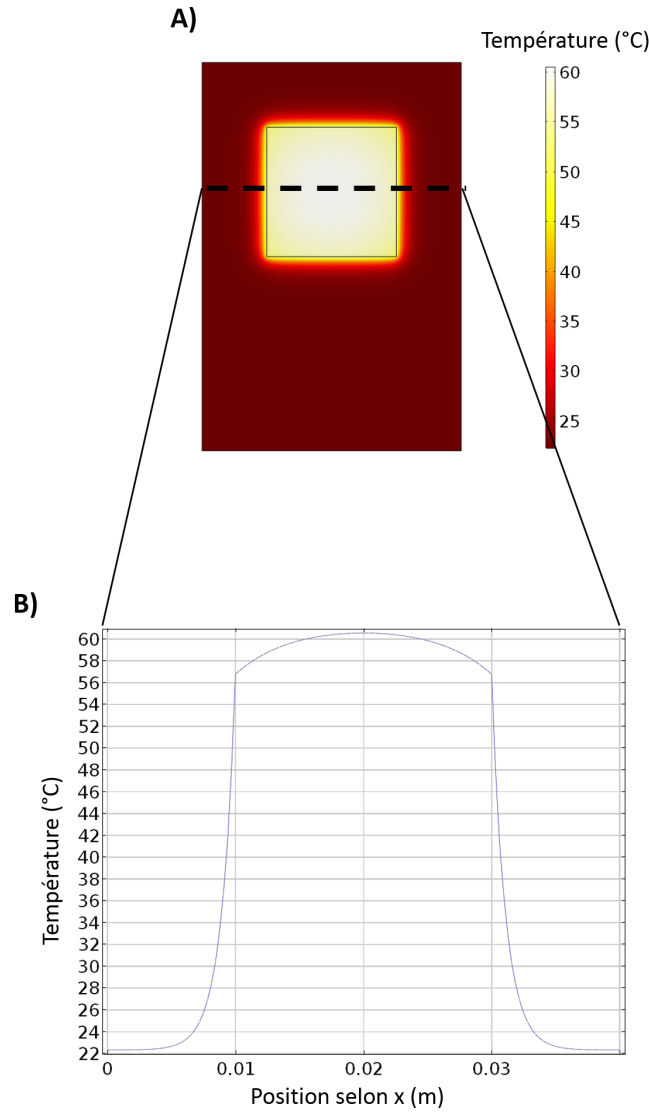


FIGURE 4.8 – Résultats d’une simulation : **A)** Carte couleur de la température de l’élément chauffant. **B)** Profil de température associé à la ligne noire de **A)**.

où λ_{PET} est la conductivité thermique du PET, S_{cond} est la surface à travers laquelle la conduction latérale s’effectue ($S_{\text{cond}} = 2 * (W + L) * e_{\text{PET}}$, avec e_{PET} l’épaisseur du PET, en m^2), et ∇T est le gradient de température.

Or nous ne connaissons pas l’expression du gradient de température ∇T . Afin de pouvoir l’exprimer de façon approchée, des simulations sur un ensemble de vingt éléments chauffants de dimensions diverses ($W = 12, 14, 16, 18$ ou 20 mm et $L = 5, 10, 15$ ou 20 mm) ont été effectuées avec COMSOL. Le flux de conduction latérale total peut ensuite être calculé à partir des résultats des simulations par intégration du flux de conduction surfacique sur l’ensemble de la surface d’échange, opération réalisée par COMSOL. La figure 4.10 présente le résultat de ces calculs.

L’objectif est maintenant de déterminer une relation basée sur ces résultats de simulations afin d’obtenir une équation explicite pour l’équation 4.9. Pour cela, le flux de conduction est normalisé par rapport à sa surface d’échange, comme proposé avec l’Eq 4.10.

$$\frac{\Phi_{\text{cond}}}{S_{\text{cond}}} = \lambda_{\text{PET}} \nabla T \quad (4.10)$$

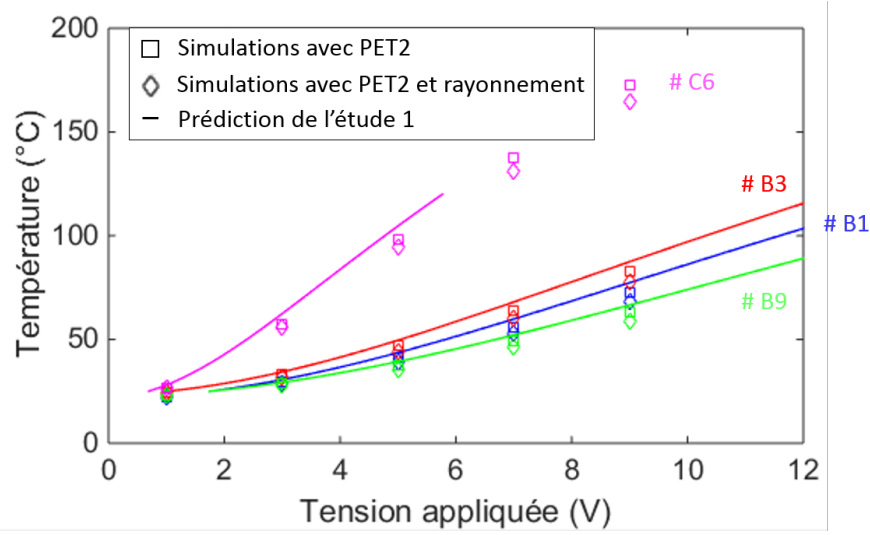


FIGURE 4.9 – Comparaison entre les prédictions de l'étude 1 et les simulations prenant en compte la convection, la conduction latérale et le rayonnement du carbone.

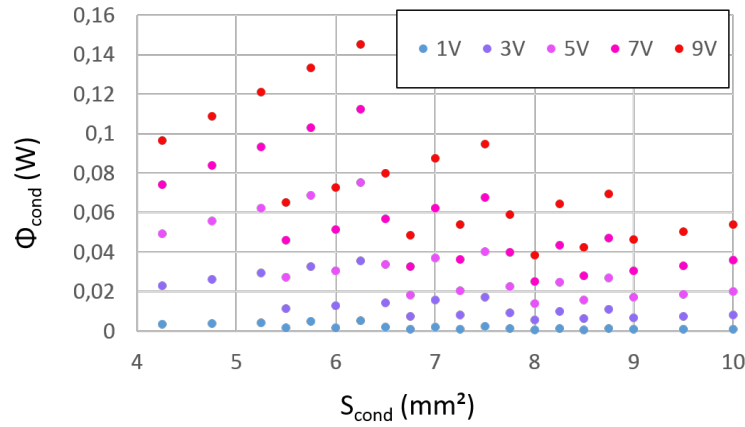


FIGURE 4.10 – Valeurs du flux de conduction latérale simulées avec COMSOL.

L'évolution de ce ratio en fonction de la variation de température $\Delta T = T - T_{amb}$ est présentée figure 4.11. On observe sur ce graphique que l'évolution de ce rapport est linéaire avec la variation de température et que le flux de conduction latérale peut être décrit par l'équation 4.11.

$$\Phi_{cond} = 154,28 * S_{cond} * \Delta T \quad (4.11)$$

Lorsque l'ensemble des flux évoqués ci-dessus sont pris en compte, le bilan des flux thermiques peut s'écrire selon l'équation 4.12.

$$\Phi_g = \Phi_U^{conv} + \Phi_D^{conv} + \Phi_{carbone}^{ray} + \Phi_{PET1}^{ray} + \Phi_{PET2}^{cond} \quad (4.12)$$

$$= h^* * S * \Delta T + (\epsilon_{carbone} + \epsilon_{PET}) * \sigma * S * (T^4 - T_{amb}^4) + 154,28 * S_{cond} * \Delta T \quad (4.13)$$

Ce bilan des flux peut également être écrit tel que dans l'équation 4.14.

$$\Phi_g = \left(h^* + (\epsilon_{carbone} + \epsilon_{PET}) * \sigma * (T^2 + T_{amb}^2) * (T + T_{amb}) + \frac{1}{S} * 154,28 * S_{cond} \right) * S * \Delta T \quad (4.14)$$

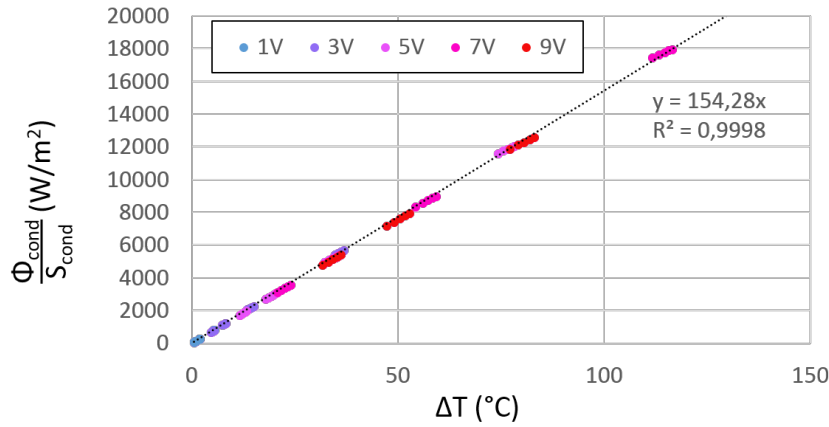


FIGURE 4.11 – Normalisation du flux de conduction latérale par la surface d'échange de convection.

En comparant l'équation 4.14 avec l'expression du bilan des flux thermiques de la première étude, on remarque que le coefficient d'échange convectif calculé précédemment comprenait également les échanges radiatif et de conduction latérale et avait donc bien été surestimé. En prenant en compte l'ensemble des flux, le coefficient d'échange convectif total h^* peut donc s'écrire selon l'équation 4.15.

$$h^* = h_{etude1} - (\epsilon_{carbone} + \epsilon_{PET}) * \sigma * (T^2 + T_{amb}^2) * (T + T_{amb}) - \frac{1}{S} * 154,28 * S_{cond} \quad (4.15)$$

$$= 2.65 * k_{air} * \left(\frac{g * \beta * (T - T_{\infty}) * Pr}{\nu^2} \right)^{1/8} * L_c^{-5/8} - (\epsilon_{carbone} + \epsilon_{PET}) * \sigma * (T^2 + T_{amb}^2) * (T + T_{amb}) - \frac{1}{S} * 154,28 * S_{cond} \quad (4.16)$$

4.1.3 Impact de l'intégration système de ces éléments

Les études présentées dans les paragraphes précédents discutent des échanges thermiques et de l'échauffement d'un élément chauffant lorsque celui-ci est suspendu dans l'air. Cependant la finalité des éléments chauffants développés est de chauffer une chambre microfluidique remplie de liquide afin d'effectuer une réaction d'amplification d'ADN. C'est pourquoi il est intéressant de s'intéresser à l'impact de la présence d'une cuve sur l'élément.

Pour cela un élément chauffant "C12" (largeur : 20 mm et longueur : 7.5 mm) a été utilisé. Dans un premier temps la température d'échauffement de cet élément en fonction de la tension appliquée a été mesurée, dans les mêmes conditions que précédemment, à l'aide de la caméra thermique. Ensuite une chambre microfluidique usinée dans du Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) a été fixée sur l'élément chauffant à l'aide d'un scotch double face (figure 4.12). Un thermocouple est intégré dans la chambre microfluidique qui est ensuite remplie de liquide. La température d'équilibre atteinte par le liquide est alors directement mesurée avec le thermocouple. La figure 4.13 compare ces deux mesures en fonction de la tension appliquée. Sur celle-ci, il apparaît que la présence de la chambre microfluidique remplie de liquide n'a pas d'impact sur la température d'équilibre. En d'autres termes, les prédictions effectuées auparavant semblent pouvoir être utilisées même lorsque un système microfluidique est collé sur l'élément chauffant.

Pour mieux comprendre cette similarité des température d'échauffement, l'analogie thermique/électrique peut être utilisée. Selon cette dernière, une représentation 1D, en schéma électrique équivalent, de l'élément chauffant sans (resp. avec) la chambre microfluidique est montrée en figure 4.14 A (resp. B). Du fait

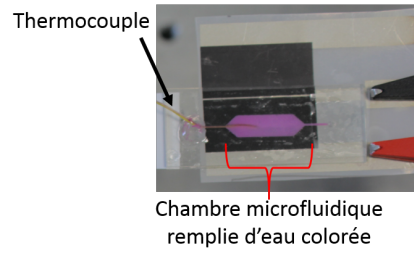


FIGURE 4.12 – Une chambre microfluidique est collée sur l'élément chauffant. Un thermocouple y est intégré.

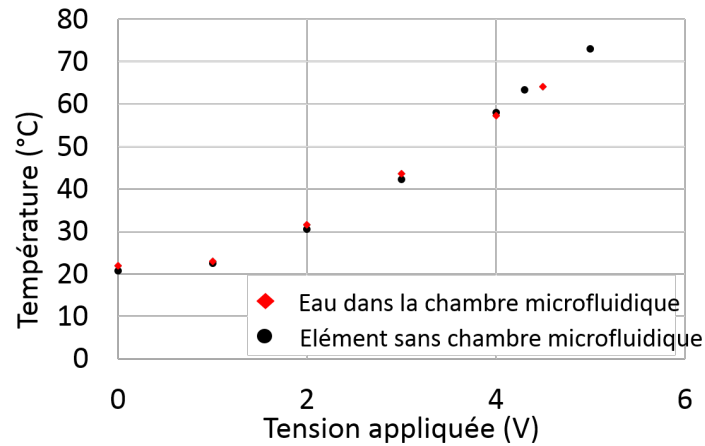


FIGURE 4.13 – Influence de la présence de la chambre microfluidique sur la température de l'élément chauffant.

de la fine épaisseur de la couche d'eau et de PMMA et des valeurs suffisantes des conductivités thermiques de ces deux matériaux ($k_{eau} \approx 0,6 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ et $k_{PMMA} \approx 0,2 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$), les valeurs des résistances associées aux phénomènes de conductions dans ces matériaux sont négligeables devant la résistance associée au phénomène de convection de la face supérieure. La présence de ces deux résistances a donc un faible impact sur le système. Même si cette première analyse par schéma électrique équivalent n'est effectuée qu'en 1D et sans tenir compte des phénomènes radiatifs, elle permet tout de même de confirmer les observations précédentes : à savoir que la température d'échauffement de l'élément chauffant reste inchangée en présence d'une chambre microfluidique remplie de liquide.

Si d'un point de vue statique la présence de la chambre microfluidique n'affecte pas le système, la dynamique du chauffage en est tout de même largement modifiée. En effet la présence de ces deux couches supplémentaires de matériaux a un impact sur le temps nécessaire pour atteindre la température d'équilibre du système (figure 4.15). En effet, la présence de ces matériaux, et plus précisément leur capacité calorifique, implique la nécessité d'un apport énergétique plus important pour faire varier la température du système. Ainsi en présence d'une chambre microfluidique remplie, il faudra environ 200 s pour atteindre l'équilibre (contre 30 s en absence de chambre). Si la plus grande inertie thermique du système avec une chambre microfluidique ne permet pas un chauffage aussi rapide que sans chambre, elle permet en revanche de rendre le système moins sensibles aux fluctuations de températures dues aux mouvements d'air environnants (Figure 4.15).

La première partie de ce chapitre s'est donc concentrée sur l'étude d'éléments chauffants réalisés par procédé d'impression sérigraphique. Il a été montré que ce procédé de fabrication permet l'élaboration d'éléments chauffants pouvant atteindre une température de 65°C, température requise pour la LAMP, avec

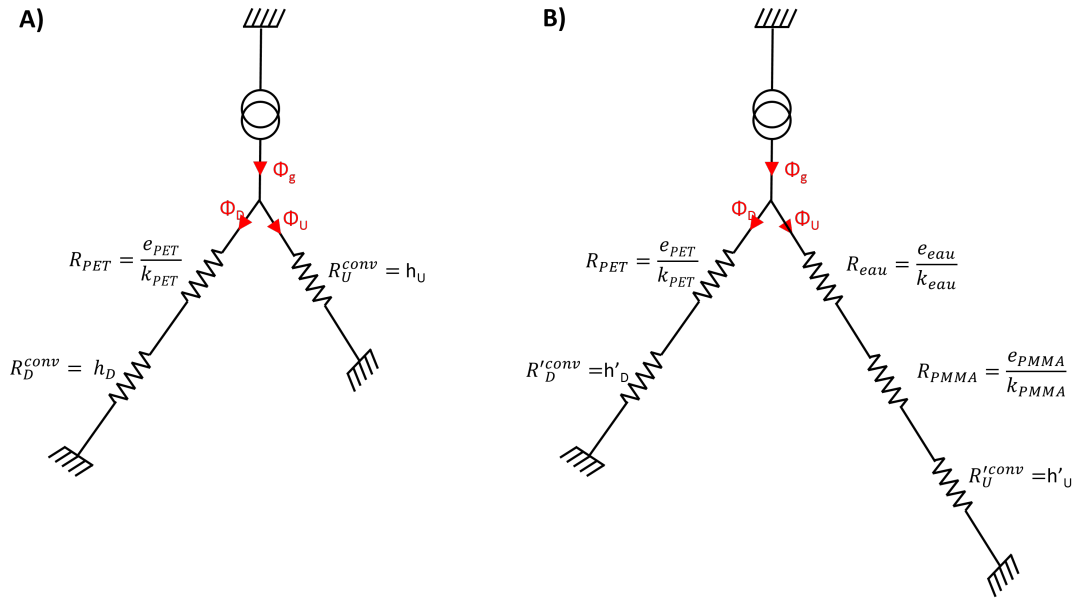


FIGURE 4.14 – Représentation 1D, en schéma équivalent électrique, d'un élément chauffant sans (A) ou avec (B) la chambre microfluidique.

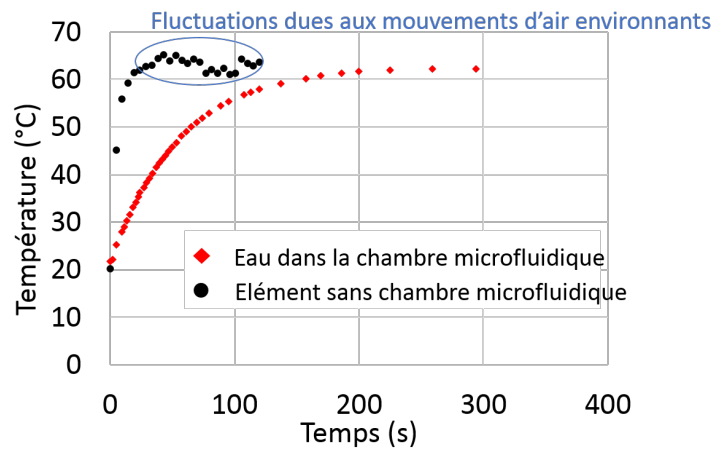


FIGURE 4.15 – Influence de la présence de la chambre microfluidique sur la dynamique de l'élément chauffant.

des tensions inférieures à 5V. Cela permet donc d'envisager leur utilisation dans des systèmes de diagnostics portables qui seraient alimentés par des batteries ou par une connexion USB. Dans le cadre de cette thèse, une seconde brique élémentaire a été développée par procédé sérigraphique : des électrodes de mesure de pH. Ce dernier développement est l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

4.2 La détection

La seconde partie de ce chapitre se concentre donc sur la réalisation et la caractérisation d'une méthode de détection de la réaction de LAMP qui soit compatible avec les souhaits d'intégration et d'autonomie qui caractérisent la démarche de cette thèse. Dans un premier temps, un état de l'art des principales techniques de détection utilisé pour les réactions d'amplification d'ADN est effectué. Dans un second temps, la possibilité d'utiliser le procédé sérigraphique afin d'élaborer des électrodes permettant de suivre en temps réel la réaction d'amplification (*via* un suivi pHmétrique) sera développé. Ainsi le développement de ces cap-

teurs se fait dans la continuité, en terme de procédé de fabrication, de celui des éléments chauffant. De plus, comme il le sera démontré dans le chapitre suivant, cela permettra de faciliter l'intégration de cette fonction dans un système plus complet.

4.2.1 Focus bibliographique

4.2.1.1 Détection d'une amplification d'ADN

L'état de l'art proposé sur les techniques de détection de réactions d'amplification d'ADN est organisé selon le type de mesure effectué (fluorescence, électrochimique, ...) de façon à souligner les avantages et les inconvénients de chacune d'elles. Cependant avant cela, il est important d'expliquer la distinction entre les méthodes de détection en point final et les méthodes de détection en temps réel. Pour les premières, une unique mesure est effectuée une fois que la période allouée à l'amplification est terminée. Cela permet ainsi de déterminer si l'amplification a eu lieu ou non, et par conséquent si l'ADN recherché était présent ou non dans l'échantillon. Cette méthode donne donc principalement une réponse qualitative de type Oui/Non. En revanche lorsque la détection s'appuie sur une mesure en temps réel, une quantification de l'ADN initialement présent dans l'échantillon est possible. En effet suivant la quantité d'ADN initialement présente, le signal mesuré sera détectable plus ou moins tôt. En d'autres termes, une plus grande quantité d'ADN initialement présente permettra une amplification plus rapide, et le signal sera mesurable plus rapidement (Figure 4.16).

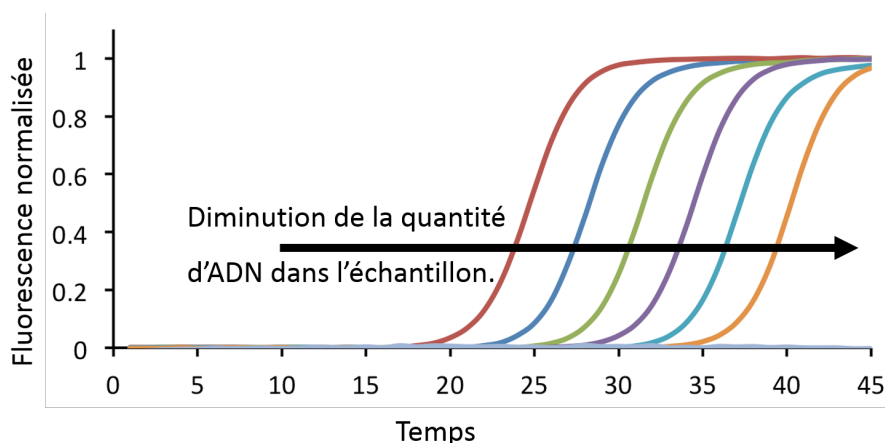


FIGURE 4.16 – Quantification de l'ADN présent dans l'échantillon par une détection en temps réel.

Dans le cadre des diagnostics Point-of-Care, si la réponse Oui/Non est la plus importante, une réponse quantitative peut être souhaitable afin de connaître le degrés d'infection du patient. D'autre part une telle quantification peut également permettre de suivre la réponse au traitement administré. C'est pourquoi nous considérerons par la suite qu'une mesure en temps réel de l'amplification est préférable à une mesure en point final.

Les méthodes de fluorescence Les méthodes les plus classiques de détection d'une réaction d'amplification d'ADN utilisent la fluorescence. En effet cette dernière est très sensible et permet une quantification précise de la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon grâce à une observation en temps réel. Ces méthodes reposent sur l'utilisation de marqueurs fluorescents tel qu'un intercalant de l'ADN ou une sonde TaqMan, par exemple. Le principe d'une mesure avec un intercalant fluorescent a été expliqué au cours du chapitre précédent, (utilisation de l'intercalant EvaGreen pour les tests de bio-compatibilité).

On notera que ce type de détection n'est pas spécifique. En effet l'intercalant se lie à tous les doubles brins d'ADN, quels qu'ils soient. Ainsi la spécificité du diagnostic provient uniquement de la réaction d'amplification d'ADN, via la spécificité d'hybridation des primers.

Afin d'augmenter la spécificité du diagnostic, des méthodes de détection par fluorescence spécifiques ont également été développées. La plus courante est l'utilisation d'une sonde TaqMan [22, 23]. Le principe de ce moyen de détection est illustré dans la figure 4.17. Il repose sur la présence d'un fluorophore et d'un quencher sur un court brin d'ADN dont la séquence est complémentaire à une partie de la séquence de l'ADN que l'on souhaite détecter. L'enzyme utilisée pour la répllication de l'ADN possède, en plus de l'activité de polymérisation, une activité d'exonucléase. Cette dernière permet de dégrader le brin d'ADN reliant le fluorophore au quencher lors de la répllication du brin d'ADN. Ainsi, à chaque brin d'ADN répliqué, un fluorophore est dissocié de son quencher et peut émettre une fluorescence. Le suivi de la fluorescence de l'échantillon permet donc de suivre l'évolution du nombre de brins d'ADN ayant la séquence cible de façon spécifique. En particulier, et contrairement à l'utilisation d'intercalant fluorescents, si une amplification non spécifique se produit au sein du système, elle ne sera pas détectée. En effet, les sondes TaqMan ne s'étant pas liées aux brins d'ADNs amplifiés non spécifiquement, elles ne sont pas dégradées et la fluorescence des fluorophores est empêchée par la présence des quenchers.

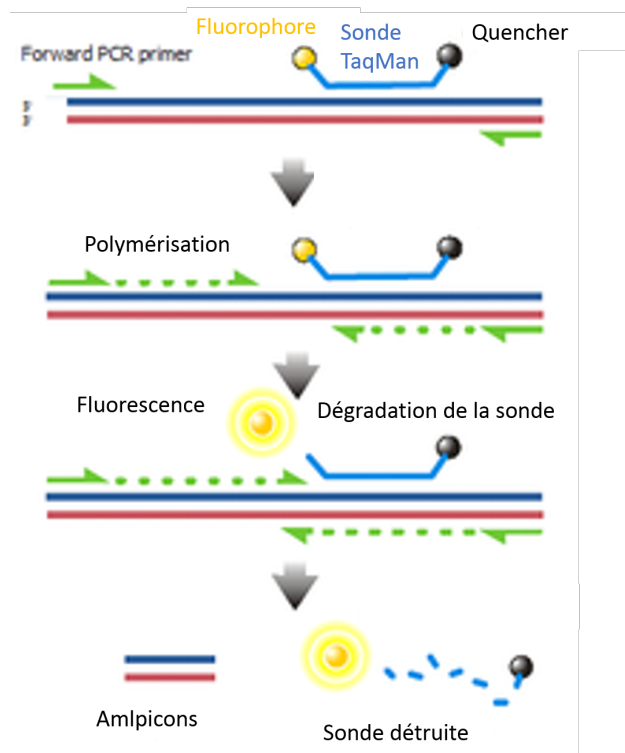


FIGURE 4.17 – Fonctionnement de la détection par fluorescence en utilisant une sonde TaqMan.

Notons que cette méthode de détection est également intéressante dans le sens où elle permet de faire une détection multiplexe. En effet, comme la sonde est spécifique à une séquence ADN, différents fluorophores (chacun associé à une sonde différente) peuvent être utilisés pour détecter différents ADNs au cours d'une même et unique réaction d'amplification.

Les différentes méthodes de détection par fluorescence permettent ainsi une détection fiable, sensible et quantitative d'une réaction d'amplification d'ADN. C'est pourquoi il s'agit des méthodes qui sont habituellement utilisées par les instruments présents dans les laboratoires d'analyses. Cependant lorsque l'on souhaite réduire la taille des systèmes et aboutir à plus de compacité et d'autonomie, ces méthodes de

détection ont l'inconvénient d'utiliser du matériel difficilement intégrable. En particulier elles impliquent l'utilisation d'une source lumineuse pour exciter les fluorophores et d'un capteur pour capter la fluorescence émise par ces derniers. Afin d'éviter le recours à de tels systèmes optiques, d'autres voies ont été explorées.

Les méthodes électrochimiques Les méthodes électrochimiques présentes dans la littérature sont généralement basées sur une mesure par voltampérométrie cyclique. Pour ce type de mesure, trois électrodes sont nécessaires : la première est appelée la contre électrode, la seconde est dite de travail et la dernière de référence. Lors de ces mesures, les propriétés RedOx des espèces en solution sont analysées. Pour ce faire, le courant entre l'électrode de travail et la contre électrode est enregistré, alors qu'un balayage en potentiel est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (Figure 4.18). La Figure 4.19 représente un exemple de courbe obtenue lors d'une telle mesure. Les activités d'oxydation et de réduction localisées à la surface de l'électrode de travail sont ainsi mesurées.

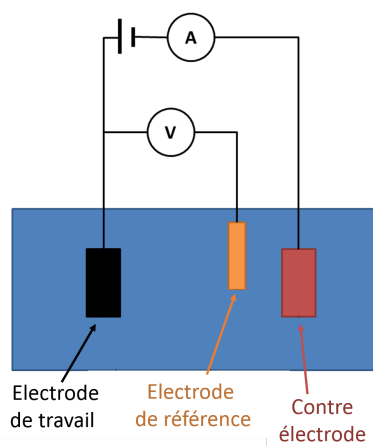


FIGURE 4.18 – Schéma d'un montage de mesure en voltampérométrie cyclique.

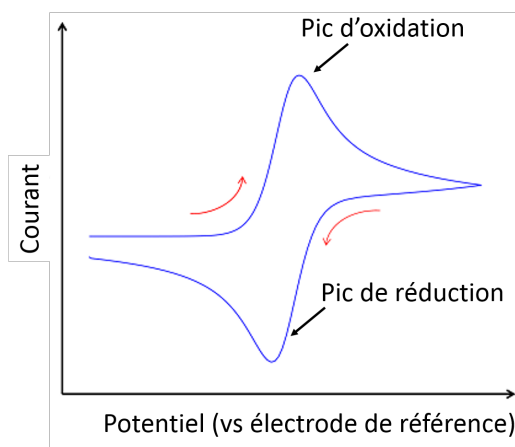


FIGURE 4.19 – Exemple de courbe obtenue en voltampérométrie cyclique.

Une première façon de détecter la présence d'ADN à la surface d'une électrode est d'utiliser le caractère oxydo-réducteur des bases de l'ADN [24]. En particulier la présence de guanine peut être détectée en mesurant l'activité RedOx du Ruthenium Tris(2,2'-bipyridine)(III), noté $Ru(bpy)_3^{3+}$ [25, 26]. Gore et al. [27] ont également montré la possibilité d'utiliser de l'Osmium Tris(2,2'-bipyridine)(III), noté $Os(bpy)_3^{3+}$ comme médiateur RedOx lorsque les bases nucléiques sont modifiées avec de la 8-oxoguanine (8G) et de

la 5-aminouridine (5U). Ces derniers ont utilisés cette méthode pour la détection d'une réaction d'amplification d'ADN en phase solide [27]. Cette dernière est basée sur l'élongation de primers liés à l'électrode de travail. Cette élongation entraîne l'intégration de nouvelles bases nucléiques (Figure 4.20), ce qui modifie la réponse RedOx. Ainsi un suivi en temps réel de l'amplification peut être effectué.

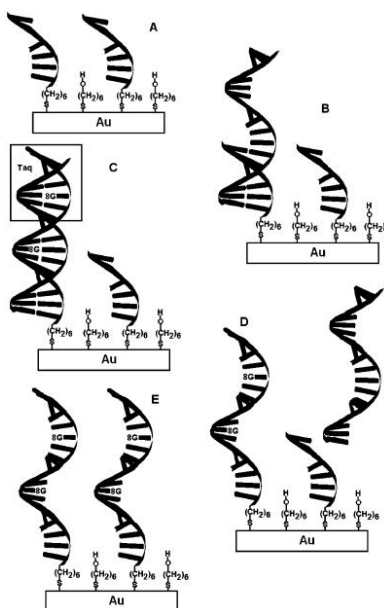


FIGURE 4.20 – Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique en phase solide proposée dans la référence [27]

D'autres méthodes de détection consistent en ce que le marqueur RedOx soit lié à une base d'acide nucléique [28, 29] ou qu'il soit piégé par interaction électrostatique [30]. De la même façon que précédemment, un suivi en temps réel d'une amplification d'ADN en phase solide peut alors être effectué [28, 29].

Un des inconvénients majeurs de ces méthodes est qu'elles sont basées sur une amplification en phase solide. En effet, d'une part cela réduit considérablement le volume dans lequel l'amplification peut avoir lieu (car elle est localisée uniquement à la surface de l'électrode), et d'autre part les amplicons créés ne sont pas disponibles pour les réplifications suivantes. Cela diminue ainsi énormément l'efficacité de la réaction et augmente le temps de détection. Afin d'éviter une amplification en phase solide, d'autres méthodes de détection par voltamétrie cyclique se sont également développées.

Une autre approche, basée sur le marquage RedOx d'une sonde ADN, est intéressante à noter [31, 32]. Dans cette dernière, le marqueur est lié à l'extrémité d'une grande séquence d'ADN immobilisée en surface de l'électrode de travail. Cette séquence ADN est conçue pour, d'une part, être spécifique à l'ADN que l'on souhaite détecter, et d'autre part, pour avoir des séquences complémentaires à ses extrémités (Figure 4.21). Ainsi lorsqu'aucune molécule d'ADN ne s'hybride sur la sonde, celle-ci se replie sur elle-même et le marqueur RedOx est assez proche de l'électrode pour que son activité puisse être mesurée. A l'opposé, lorsqu'un brin d'ADN est hybridé sur la sonde, celle-ci est dépliée et le marqueur RedOx n'est plus à proximité de l'électrode qui ne mesure donc plus son activité. Cette méthode permet ainsi de détecter la présence de molécules d'ADN par une diminution de l'activité RedOx mesurée. Cependant, cette méthode n'a été utilisée que dans le cadre mesure en point final.

Récemment l'intérêt d'utiliser des marqueurs RedOx qui ont également la caractéristique d'être des intercalants de l'ADN a été démontré [33]. En effet cela permet d'utiliser la voltampérométrie cyclique pour effectuer une détection en temps réel sans les contraintes d'une détection en phase solide. Cette méthode repose sur le fait que lorsque la quantité d'ADN augmente (du fait de l'amplification), de plus en plus de

marqueurs sont intercalés. En d'autres termes, au fur et à mesure de l'amplification, de moins en moins de marqueurs RedOx sont disponibles en solution et la réponse RedOx en est diminuée.

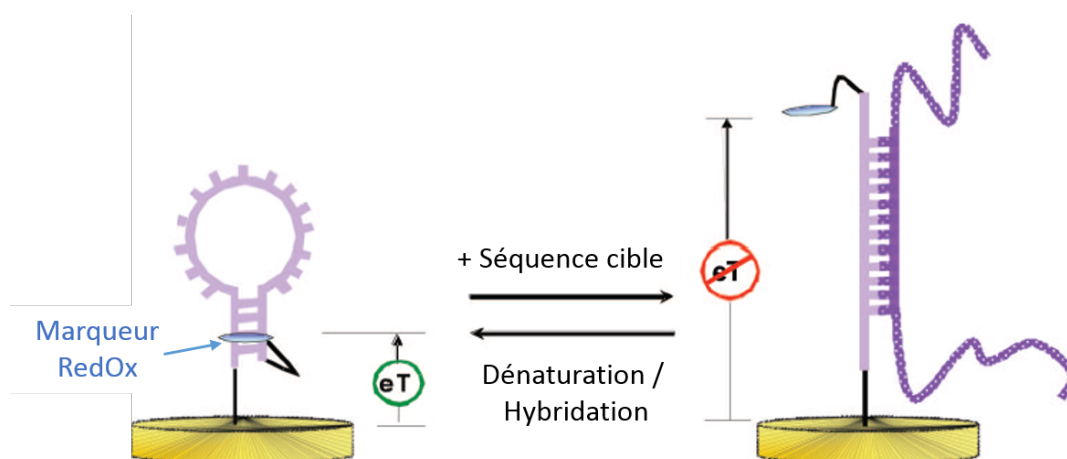


FIGURE 4.21 – Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique, *via* une sonde immobilisée marquée RedOx, proposée dans la référence [31]

D'autres études utilisent un marqueur enzymatique afin de catalyser une réaction RedOx [34, 35]. Dans ce cas le système comporte un hydrogel RedOx dans lequel une sonde ADN spécifique est immobilisée, permettant la capture de l'ADN ciblé. Une fois l'ADN capturé, une seconde sonde, comportant le marquage enzymatique, peut s'hybrider de façon spécifique à l'ADN immobilisé. Une fois ces hybridations effectuées l'électrode montre une réponse RedOx (*via* la réaction catalysée par l'enzyme) permettant de conclure à la présence de l'ADN ciblé dans l'échantillon (Figure 4.22). Cependant, ici encore, il s'agit d'une méthode de détection en point final.

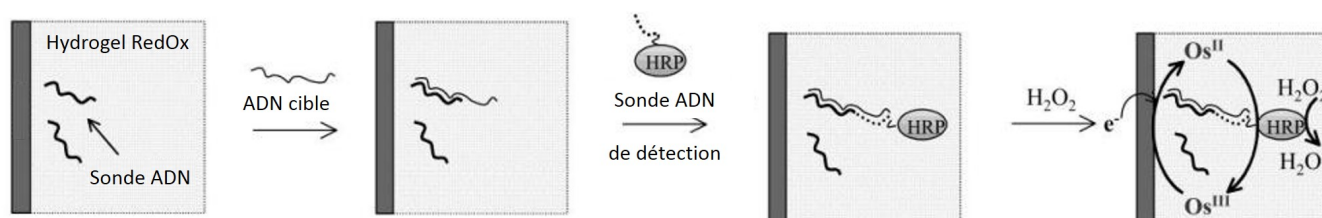


FIGURE 4.22 – Schéma de fonctionnement de la détection électrochimique, *via* une sonde marquée avec une enzyme. Extrait et traduit de la référence [35]

L'ensemble des méthodes de détections électrochimiques évoquées ci-dessus ont l'avantage, par rapport aux méthodes de fluorescence, d'être plus facilement miniaturisables et intégrables dans des systèmes portables. Cependant elles nécessitent l'ajout de médiateurs RedOx en solution et, pour la plupart d'entre elles, une fonctionnalisation de la surface des électrodes avec une immobilisation des sondes ADN. D'autre part la voltammetrie cyclique est une méthode de mesure active, dans le sens où un apport en énergie est nécessaire pour effectuer la mesure (en l'occurrence pour le balayage en potentiel). Afin de se conformer de façon plus prononcée avec les exigences de portabilité et d'autonomie des systèmes destinés au diagnostic Point-of-Care, il a été montré qu'une détection d'amplification d'ADN peut être réalisée par test bandelette, à l'image du bien connu test de grossesse.

Le couplage entre amplification d'ADN et test bandelette La réalisation de la détection d'un diagnostic par test bandelette permet de rendre le résultat directement observable par l'utilisateur, sans qu'il n'ait

besoin de recourir à un quelconque équipement. Cela apporte donc un grand avantage en terme d'auto-nomie et de simplicité d'utilisation du diagnostic. C'est pourquoi la possibilité d'utiliser un test bandelette pour détecter les amplicons produits par une amplification d'ADN a été démontrée dans différentes publi-cations [6, 10, 36, 37, 38]. Cependant, il faut noter qu'il s'agit d'une détection en point final qui ne permet donc pas une quantification telle que lorsque l'amplification est suivie en temps réel. D'autre part, du fait de la limite en sensibilité des test bandelette, il est nécessaire que l'amplification produise un nombre suffisant d'amplicons ($>10^5 \text{ copies}$) pour permettre la détection. Cela implique donc que la détection ne peut se faire qu'après un temps d'amplification assez élevée (de l'ordre d'une heure), mais également que l'amplification n'ait pas subi d'inhibition partielle. Il faut également noter que l'intégration de ce type de détection dans un système implique une fonctionnalisation de surface localisée afin d'immobiliser les élé-ments de capture (formant les zones de résultats), mais également la nécessité de séquencer les actions d'amplification et de détection. Le séquençage de ces opérations peut se faire manuellement [6, 38] ou peut être intégré dans un système complet [10]. Néanmoins, dans un cas comme dans l'autre, ces solutions ne paraissent à l'heure actuelle pas viables pour l'élaboration de systèmes de diagnostic point-of-care. En ef-fet la simplicité de la détection pour l'utilisateur est alors balancée par un surcroît d'opérations manuelles, ou par un système complexe dont la production en série ne semble pas réalisable à bas-coût. Afin d'évi-ter la complexité d'un séquençage d'actions, il semble donc intéressant de pouvoir mesurer l'amplification directement dans la chambre de réaction. Alors que les deux premiers paragraphes de cette sous-section s'attachaient à mesurer l'évolution de la quantité d'amplicons d'ADN à l'intérieur de la chambre de réac-tion, les méthodes de détections évoquées dans le paragraphe suivant adoptent une autre approche : celle de détecter des produits secondaires de la réaction d'amplification.

La détection de la réaction d'amplification *via* celle des produits secondaires Il est connu que lors de la polymérisation d'un brin d'ADN, un ion hydronium ainsi qu'un ion pyrophosphate sont produits à chaque ajout de base nucléique sur ce nouveau brin [39] (Figure 4.23). Effectuer un suivi de la concentration de ces espèces permet donc de suivre l'activité de l'ADN polymérase, et par conséquent la réaction d'amplifi-cation. Cette approche a ainsi l'intérêt de pouvoir effectuer un suivi de l'amplification dans le temps mais également de simplifier la détection. En effet, comme nous allons le voir, la concentration de ces espèces peut être mesurée avec des méthodes relativement simple, ce qui rend le système final propice à une utili-sation de type Point-of-Care.

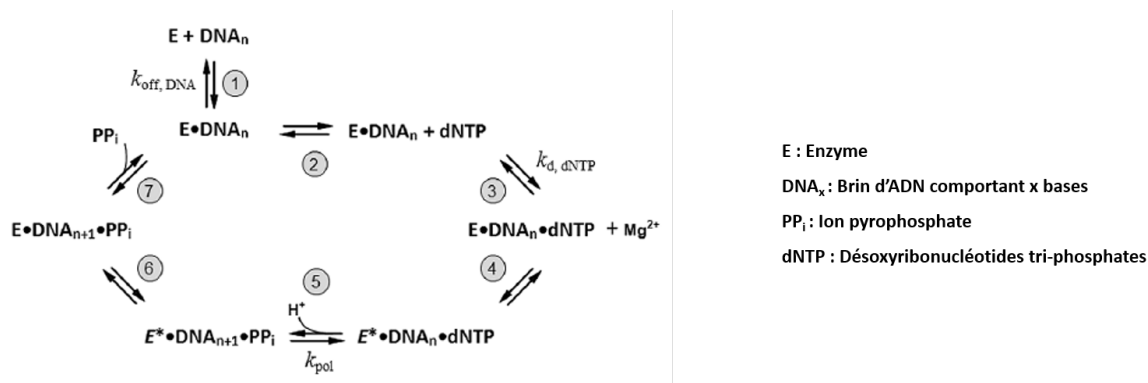


FIGURE 4.23 – Schéma du cycle de réactions conduisant à l'incorporation d'une base nucléique lors de l'élongation d'un brin d'ADN. Extrait de [39].

La détection des pyrophosphates La détection des ions pyrophosphates se fait de manière indirecte par l'observation d'un précipité de pyrophosphate de magnésium selon l'équation 4.17. En effet la présence de ce précipité blanc entraîne une augmentation de la turbidité de la solution [40]. La turbidité de la solution peut alors être mesurée en temps réel afin d'obtenir une méthode de détection quantitative [41].



Notons que cette technique de détection démontrée sur une réaction de LAMP, n'est pas compatible avec la technique d'amplification de PCR. Cela peut être expliqué par le fait que ces derniers sont hydrolysés lors de l'étape de dénaturation à 95°C [42].

Cette méthode de détection est intéressante car elle permet une appréciation visuelle, à l'oeil nu, du résultat d'une amplification LAMP. Cependant une telle observation ne permet qu'une réponse Oui/Non en point final et l'intégration d'un système de mesure en continu de la turbimétrie reste complexe et peu envisageable pour un système portable et autonome.

La détection des ions hydroniums Du fait de la production d'ions hydroniums lors de l'activité de l'ADN polymérase, la réaction d'amplification d'ADN peut être suivie par une mesure pHmétrique. Deux méthodes ont pour le moment été exploitées à cette fin dans la littérature : la détection en point final avec un indicateur coloré [43], ou le suivi en temps réel grâce à des capteurs ISFET (Ion-Sensitive Field Effect Transistor) [44, 45]. Dans le premier cas, la variation de pH induite par l'amplification d'ADN est utilisée pour passer le virage colorimétrique d'un indicateur pH coloré présent dans le mélange réactionnel (Figure 4.24). Suivant l'indicateur coloré utilisé, le pH initial de la solution doit être ajusté de façon à se trouver légèrement supérieur à la gamme de valeur correspondant au virage colorimétrique. Cet ajustement du pH initial permet en effet que le virage colorimétrique soit effectué le plus rapidement possible, rendant le test plus rapide et plus sensible. Cette méthode de détection permet donc d'obtenir une grande simplicité d'utilisation, et ce, sans complexifier la fabrication du système comme c'est le cas pour les test bandelette. Cette méthode semble donc très bien adaptée au diagnostic de type Point-of-Care, du moment où une réponse Oui/Non est suffisante. Si l'on souhaite obtenir une quantification, d'autres méthodes doivent être envisagées pour mesurer le pH en temps réel.

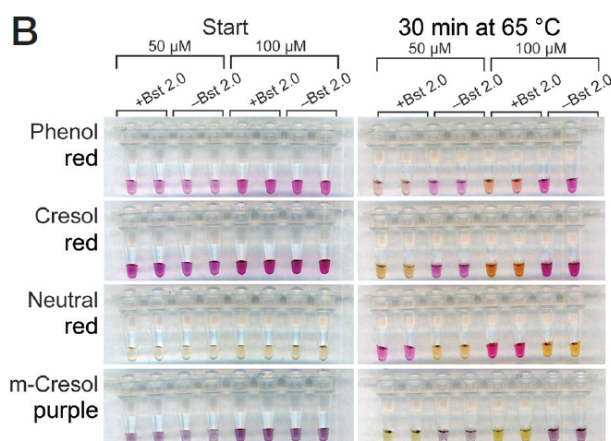


FIGURE 4.24 – Détection colorimétrique d'une réaction de LAMP grâce à des indicateurs pH colorés. Extrait de [43]

La seconde méthode de détection pHmétrique présente dans la littérature utilise des capteurs ISFET permettant de suivre en temps réel l'évolution du pH de la solution [44, 45]. Ces capteurs utilisent des tran-

sistors dont la grille a été modifiée pour être sensible au pH. Ainsi une modification du pH modifiera la conductance du canal semi-conducteur entre la source et le drain du transistor. Une mesure du courant circulant entre la source et le drain permet donc de quantifier le pH de la solution en contact avec la grille. Cependant ce type de détection nécessite l'utilisation de technologies semi-conducteur pour la fabrication des capteurs, rendant ces derniers moins pertinent pour une utilisation de type Point-of-Care. En effet, il semblerait plus cohérent de réaliser des capteurs pHmétriques avec les matériaux à bas-coûts, tels que le plastique ou le papier, qui sont utilisés pour la fabrication des systèmes microfluidiques à bas-coût.

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes ainsi intéressés à l'élaboration d'un capteur pH sérigraphiable. En effet, un tel capteur pourrait alors être imprimé sur différents supports comme du plastique ou du papier. Pour la réalisation d'un tel capteur, notre choix s'est porté sur la PolyAniline (polymère conducteur sérigraphiable) car elle permet, comme il l'est montré dans la sous section suivante, la réalisation d'un capteur pH potentiométrique.

4.2.1.2 La détection pH et la PolyAniline

La PolyAniline (abréviée PANi dans la suite de ce manuscrit) est un polymère conducteur possédant des propriétés RedOx mais également des propriétés de protonations/déprotonations [46, 47]. La présence de ces multiples états rend le comportement de la PANi difficile à décrire de façon exhaustive et explicite. Néanmoins, il est établi qu'elle possède trois niveaux d'oxydation (Figure 4.25). Une première oxydation permet le passage de l'état de leucoéméraldine (LE) à celui d'éméraldine protonée (ES), et la seconde le passage à la forme de pernigraniline (PE) [48, 49] (Figure 4.26). On notera qu'une quatrième forme est généralement décrite : l'éméraldine base (EB). Cette dernière forme correspond à la forme déprotonée de ES.

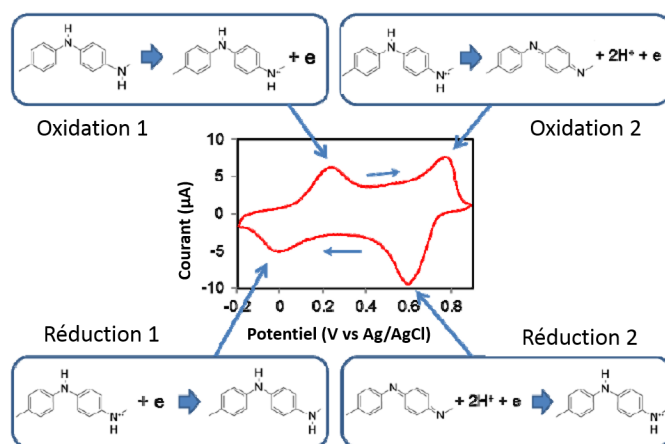


FIGURE 4.25 – Courbe de voltampérométrie cyclique de la PolyAniline. Extrait de [46]

La présence d'un ion hydronium dans l'équation de la seconde réaction d'oxydo-réduction rend cette réaction dépendante au pH. En effet le potentiel de cette réaction est donné, selon la loi de Nernst, par l'équation 4.18.

$$E_2 = E_2^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a(PE) * [H_3O^+]^4}{a(ES)} \right) = E_2^0 - 2 * \frac{RT}{F} * \ln(10) * pH + \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a(PE)}{a(ES)} \right) \quad (4.18)$$

Ainsi le potentiel d'équilibre d'une électrode de PANi va dépendre du pH. Cette dépendance peut être utilisée afin de créer un capteur pH potentiométrique à base de PANi. Ce type de mesure consiste à mesurer

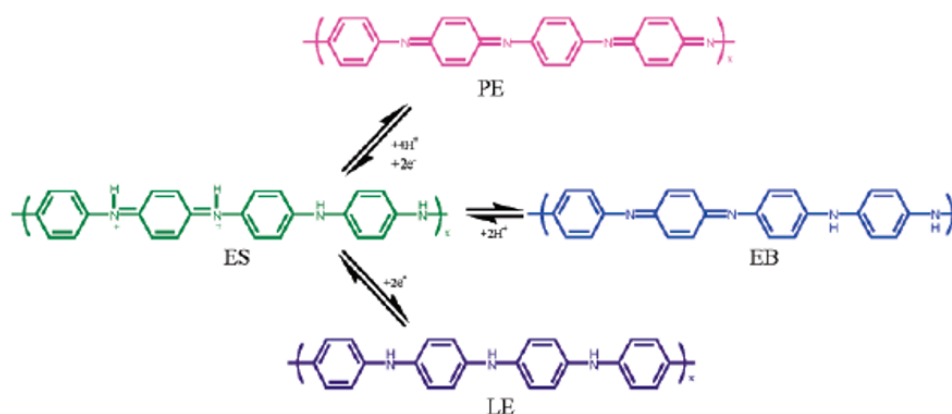


FIGURE 4.26 – Schéma des différents états de la PolyAniline. Extrait de [48]

le potentiel entre deux électrodes, la première dite de référence, et la seconde dite de travail. Alors que le potentiel de l'électrode de travail (ici fonctionnalisée avec la PAni) dépend de la concentration en ion hydronium, celui de l'électrode de référence (Ag/AgCl) n'en dépend pas. La mesure de la différence de potentiel entre ces deux électrodes permet ainsi de quantifier le pH de la solution en contact avec ces électrodes [50, 51, 52, 53].

Dans la prochaine section nous allons voir comment cette méthode de détection a été utilisée et optimisée au cours de cette thèse afin de pouvoir suivre en temps réel une réaction d'amplification d'ADN, mais également afin de permettre facilement son intégration dans un dispositif destiné au diagnostic Point-of-Care.

4.2.2 La détection par potentiométrie

Tout comme nous avons souhaité développer des éléments chauffants par impression sérigraphique, les électrodes utilisées pour effectuer la détection de la réaction d'amplification d'ADN seront réalisées par ce même procédé. Afin de nous concentrer sur le développement de la couche active des électrodes, c'est-à-dire la PolyAniline, l'ensemble des autres étapes de sérigraphie a été sous-traité à la société Séribase Industrie (Chateau-Gontier, France). Ces étapes consistent en l'impression des pistes avec une encre argent, l'impression de l'électrode de référence avec l'encre Ag/AgCl Dupont 5878 (Dupont, USA), l'impression d'une encre carbone pour renforcer les connectiques et les électrodes de travail, ainsi que l'impression de la (ou des) couche(s) de passivation nécessaire(s).

La figure A1.2, en annexe, montre une vue globale de la planche de sérigraphie. Deux zones ont été séparées : une zone d'éléments chauffants et une zone d'électrodes. La définition de ces deux zones sur le même masque de sérigraphie a permis d'effectuer l'impression des électrodes et des éléments chauffant en même temps, réduisant par la même occasion le nombre de masques utilisés ainsi que les coûts de fabrication. Notons que ces masques ont également été conçus afin que les éléments chauffants et les électrodes se superposent lorsque l'on effectue une rotation de 180° du masque (ou lorsqu'on le retourne). Ces symétries permettent ainsi de créer des dispositifs où les impressions des électrodes et des éléments chauffants sont superposés. Ce point sera discuté de façon plus approfondie dans le chapitre suivant traitant de l'intégration des différents composants dans le système final.

Lors de l'élaboration des masques de sérigraphies, quatre designs d'électrodes ont été imaginés (Figure 4.27). Ces différentes configurations sont ensuite répétées 20 fois par planche. Une zone de reprise de connexion est prévue aux dimensions du connecteur "0.5 mm, FPC Connector, SMT, Bottom Contact" de

TE Connectivity (Suisse).

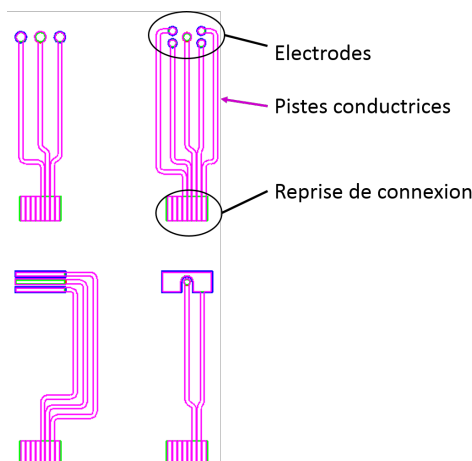


FIGURE 4.27 – Les quatre designs d’électrodes proposées au cours de cette thèse.

L’acquisition des données se fera grâce à une carte d’acquisition développée au sein du CEA. Pour nos mesures nous avons travaillé avec une carte connectée en USB sur un ordinateur et alimentée par une alimentation externe. Dans l’optique de la réalisation d’un système point-of-care, il est intéressant de signaler qu’une version ultra-portable (avec une batterie intégrée et une connexion bluetooth) de ce système d’acquisition a également été développée (Figure 4.28).

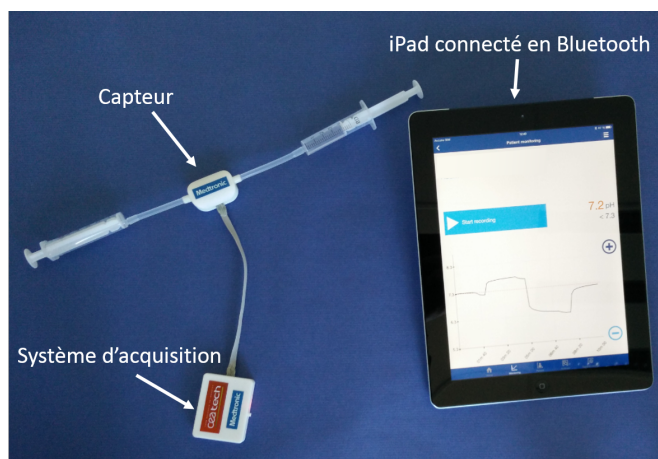


FIGURE 4.28 – Photographie d’un système d’acquisition potentiométrique ultra-portable.

Comme évoqué auparavant le dépôt de la couche active des électrodes, c’est-à-dire la PANi, n’a pas été sous-traité afin de pouvoir la développer et l’optimiser au cours de cette thèse. La prochaine sous-section va ainsi être consacrée à la caractérisation de cette couche. Une fois ces caractérisations effectuées, les sous-sections suivantes traiteront de l’utilisation de ces électrodes pour effectuer un suivi en temps réel d’une réaction d’amplification d’ADN.

4.2.2.1 Caractérisation des électrodes

Pour les expériences de caractérisation, les électrodes seront élaborées de la façon suivante :

- Un volume prédéfini d’encre PANIPLAST (Rescoll, France), à base de PANi, est déposé à l’aide d’une micro-pipette sur l’électrode.
- Le tout est ensuite placé dans un four à 80°C pendant une heure.

- Une fois le séchage effectué, une chambre microfluidique de 500 μm d'épaisseur est collée sur le dispositif (Figure 4.29). Ce collage est effectué à l'aide d'un adhésif double face pré-découpé aux dimensions de la chambre microfluidique (afin que les électrodes soient au contact du liquide).

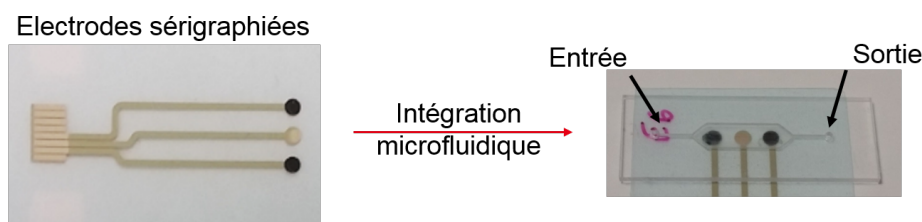


FIGURE 4.29 – Photographie d'un système d'électrodes sérigraphiées et de son intégration microfluidique.

Grâce à ce montage, la chambre microfluidique contenant les électrodes peut être remplie avec des solutions à différents pH et un écoulement peut y être appliqué en reliant l'entrée de la chambre à un pousse-seringue. Pour les caractérisations des électrodes de PANi, nous utiliserons des solutions de PBS (Phosphate Buffer Salin Solution) à différents pH. Ces solutions sont préparées à partir d'une solution de PBS 1x, en y ajoutant différents volume de HCl 1 M pour l'acidifier. Le pH des solutions utilisées est mesuré à l'aide d'un pHmètre inoLab® pH 7310 (WTW, Allemagne) avant les différentes expériences. Lorsque la solution de PBS présente dans les chambres microfluidiques (d'un volume d'environ 40 μL) est renouvelée, un volume de 100 μL de la nouvelle solution PBS est injecté de façon à changer totalement le liquide contenu dans la chambre.

Il est important de noter que l'ajout de HCl aux solution de PBS va modifier la concentration en ion chlorure de ces dernières. En effet le potentiel de l'électrode Ag/AgCl dépend de cette concentration selon l'équation 4.19.

$$E_{\text{Ag/AgCl}} = E_{\text{Ag/AgCl}}^0 - 0.06 * \log ([\text{Cl}^-]) \quad (4.19)$$

Cependant en se basant sur les réactions acido/basiques de l'acide phosphorique (équations 4.20, 4.21 et 4.22) qui déterminent le pH des solution de PBS, la concentration en ions chlorure des différentes solutions de PBS peut être calculée.



En particulier pour la solution de PBS ayant un pH de 7,2 (la plus basique des solutions utilisées) la concentration en ion chlorure serait $\approx 0,142$ M et pour la solution de PBS ayant un pH de 4,6 (la plus acide des solutions utilisées), la concentration en ion chlorure serait $\approx 0,148$ M. D'après l'équation 4.19, cette variation de concentration change le potentiel de l'électrode de référence de moins de 1,2 mV. Cette variation étant extrêmement faible, elle est négligeable devant les variations de potentiel de l'électrode de PANi (qui sont de l'ordre de 200 mV sur cette gamme de pH comme il le sera montré plus tard dans ce chapitre). Pour la suite de cette étude, nous considérerons donc que le potentiel de l'électrode d'Ag/AgCl est constant pour l'ensemble des solutions de PBS utilisées.

Effet du confinement microfluidique Dans un premier temps, il est important de souligner l'impact du confinement du liquide dans la chambre microfluidique. En effet, comme le volume de liquide présent est relativement faible, on peut observer que la présence des électrodes a une influence sur le pH de la solution. Cela est observable si l'on remplit la chambre microfluidique de façon successive avec la même solution de PBS (Figure 4.30). La réponse du capteur présente alors un nouveau saut de potentiel à chaque introduction de la solution de PBS (jusqu'à une stabilisation). La présence de ces sauts signifie que le pH d'équilibre au niveau de l'électrode est différent de celui de la solution de PBS introduite. Cette différence peut être due aux réactions de protonation/déprotonation de la PANi ou à un mauvais rinçage de la matrice de PANi lors du renouvellement du liquide. On note tout de même qu'à force d'introduction successive de la solution de PBS, un potentiel d'équilibre stable peut tout de même être atteint, signifiant que l'électrode est en équilibre avec le pH de la solution de PBS.

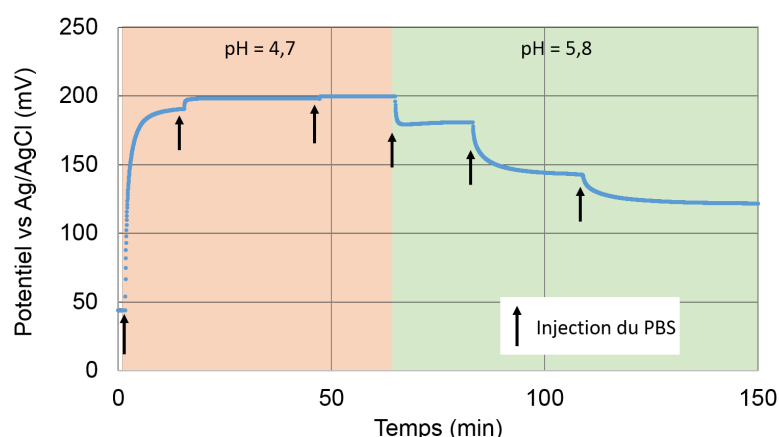


FIGURE 4.30 – Courbes de réponses potentiométriques lors de l'injection ponctuelle de PBS.

Ainsi pour s'affranchir de ce phénomène lors de la caractérisation des électrodes, les solutions de PBS seront soumises à un écoulement avec un débit fixe de $1 \mu\text{L}/\text{s}$. Cet écoulement permet d'effectuer un rinçage en continu de la chambre microfluidique et ainsi de maintenir le pH dans cette chambre constant et égal au pH de la solution de PBS.

La réponse temporelle : impact de la quantité de PANi déposée. Pour étudier le temps de réponse des électrodes, des solutions de PANi à des concentrations différentes (Tableau 4.4), ont été préparées à partir de la solution PANIPLAST. D'autre part, suivant les électrodes, un volume différent de PANi a été déposé. La Figure 4.31, synthétise la réponse de différentes électrodes lors d'une première hydratation, dans une solution de PBS à $\text{pH} = 7.2$. D'après cette dernière figure, il est clair que la quantité de PANi déposée influence le temps de réponse. En effet, diminuer la quantité de PANi déposée permet de diminuer le temps de réponse du système.

Dilution	1 : 2	1 : 5	1 : 10
Volume de PANi (mL)	3	1	1
Volume d'eau (mL)	6	5	10

Tableau 4.4 – Les différentes dilutions de PANi utilisées.

On notera que toutes les courbes présentes sur la figure 4.31 commencent avec un palier, plus ou moins long, à 250 mV . En réalité il ne s'agit pas d'un palier mais de la limite maximale de potentiel mesurable par la carte d'acquisition. Cette saturation de la mesure est due au fait que la PANi est livrée en solution très acide

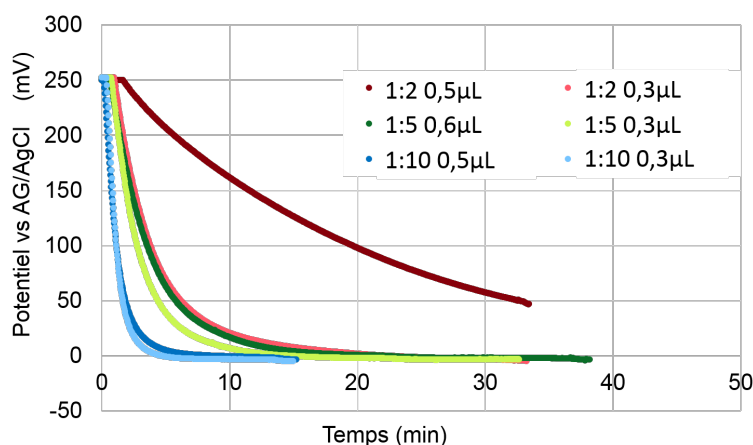


FIGURE 4.31 – Courbes de réponses potentiométriques à la première hydratation, pour différentes quantités de PANi déposées.

($pH = 1 - 2$). En effet, comme nous le verrons dans le prochain paragraphe, une telle acidité correspond à des potentiels supérieurs à 250 mV.

D'autre part, la réponse de ces mêmes électrodes a également été enregistrée lors d'un saut de pH de 3 unités (pH passant de 7.2 à 4.2). La figure 4.32 présente les mesures obtenues lors de ces tests. La courbe correspondant à la réponse de l'électrode 1 : 2 0,5µL n'est pas présente dans cette dernière figure car la stabilité à pH 7.2 n'a pas été atteinte avant le changement de solution. La réponse obtenue ne correspond donc pas au saut de pH escompté. D'après la figure 4.32 on note, tout comme précédemment, une bien meilleure réponse des électrodes diluées 1 : 10. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une telle solution pour la suite des expériences.

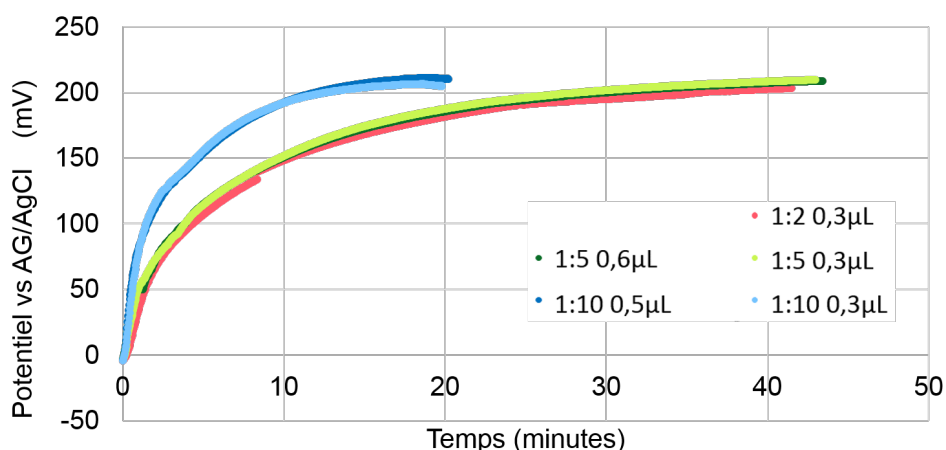


FIGURE 4.32 – Courbes de réponses potentiométriques à un saut de trois unités pH, pour différentes quantités de PANi déposées.

La sensibilité des électrodes Nous avons vu dans la sous-section précédente que les électrodes de PANi permettaient d'obtenir une réponse en terme de variation potentiel lorsqu'elles sont soumises à un changement de pH. Dans cette partie nous allons voir comment cette réponse peut être reliée au pH de la solution. Pour cela des solutions à différents pH sont mises en écoulement successivement dans la chambre micro-fluidique. La Figure 4.33, montre la réponse en potentiel au cours du temps. Lorsque l'on change le pH de la solution de PBS s'écoulant dans le système, on observe un saut de potentiel suivi d'une stabilisation à

un potentiel d'équilibre. Les deux courbes présentes sur cette figure représentent la réponse de deux électrodes présentes sur le même dispositif. La bonne superposition de ces deux courbes démontre ainsi une certaine robustesse de notre système de mesure. On peut toutefois noter que les sauts de potentiel de la courbe orange se passent légèrement plus tard que ceux de la courbe bleue. Cela est dû au faible débit du liquide dans la chambre. En effet, avec un tel débit ($1\mu\text{L/s}$), la seconde électrode est en fait en contact avec la nouvelle solution de PBS environ 16s après la première électrode.

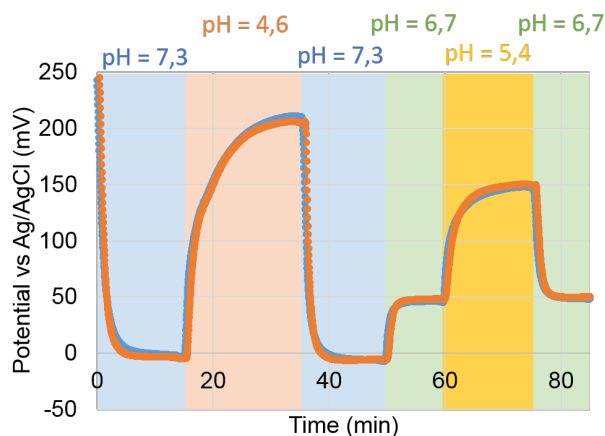


FIGURE 4.33 – Courbes de réponses potentiométriques à une succession de saut de pH.

Un autre aspect qui peut être remarqué sur les courbes de la figure 4.33 est que le temps de réponse diffère en fonction du saut de pH. Si dans le cas d'une diminution du pH, le temps de réponse du système augmente avec l'amplitude de la variation de pH, dans le cas d'une augmentation de pH le temps de réponse des électrodes ne semble pas dépendre de cette amplitude. Cette asymétrie du comportement de la PANi est un signe du caractère thermodynamiquement quasi-réversible (également parfois qualifié de renversible) de celle-ci, et plus généralement des polymères conducteurs. En effet les phénomènes de protonation et déprotonation de ces polymères, bien que renversables, n'induisent pas les mêmes dissipations au sein du système. En particulier l'intégration d'un ion hydronium dans un polymère protoné est plus complexe que son relargage par l'espèce protonée. En effet lorsque le polymère est protoné, le gonflement de ce dernier du fait de la présence des charges supplémentaires, facilite la circulation des espèces ioniques.

Hormis les phénomènes évoqués précédemment, il est intéressant de voir que pour chacune des solution de PBS, le signal potentiométrique atteint une valeur d'équilibre. Lorsque l'on reporte les potentiels d'équilibres en fonction du pH de la solution de PBS, on obtient la figure 4.34. L'ensemble des points présentés dans cette figure a été obtenu au cours de cinq différentes expériences, toutes similaires à celle présentée ci-dessus. La réponse du système peut ainsi être représentée par une relation linéaire entre le pH et le potentiel mesuré, ce qui est cohérent avec l'équation 4.18.

Bien que selon l'équation 4.18, une sensibilité de -120 mV/pH pourrait être attendue, il n'est pas incohérent d'obtenir une sensibilité moins importante : -83 mV/pH dans notre cas. En effet la présence de multiples réactions d'oxydoréduction et de protonation/déprotonation peut abaisser cette dépendance au pH. Dans la littérature, on trouve ainsi des droites de calibrations pour la PANi ayant des sensibilités de -55 mV/pH [48], de -70 mV/pH [53], ou encore de -90 mV/pH [54, 50]. La variabilité des sensibilités observées dans ces différentes études semble pouvoir être expliquée par la diversité des procédés de fabrication et, en particulier, par le dopage utilisé [48, 54]. Cependant, malgré cette variabilité, la valeur de -83 mV/pH obtenue au cours de notre étude est cohérente avec la majorité des calibrations reportées auparavant.

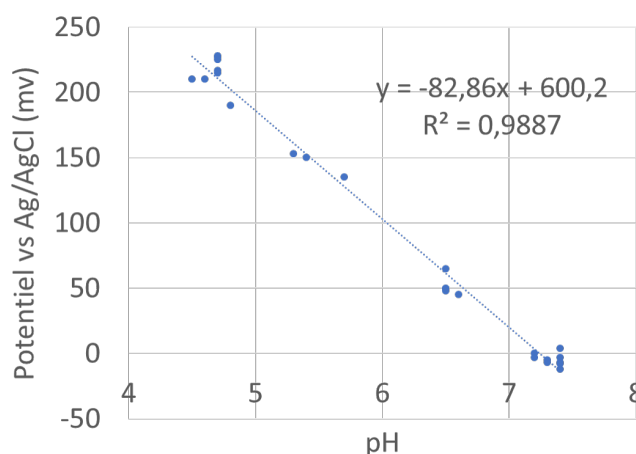


FIGURE 4.34 – Droite de calibration des électrodes développées.

Compte tenu de la réponse au pH obtenue, il semble que ces électrodes soient à même de permettre le suivi de l'évolution du pH au cours d'une réaction d'amplification d'ADN. Notons toutefois que la calibration présentée ci-dessus a été effectuée à température ambiante, soit environ 22°C, alors que la réaction de LAMP s'effectue à 65°C. La sous section suivante va donc s'attacher à discuter l'influence de la température sur la réponse de ces électrodes.

Impact de la température Tout d'abord il est évident, d'après la loi de Nernst (Eq 4.18), que la température a un impact sur la réponse potentiométrique des électrodes. Cependant l'influence de la température ne s'arrête pas là. En effet cette dernière peut également modifier les constantes d'équilibres des réactions chimiques. Par exemple, la dépendance à la température de la constante d'hydrolyse de l'eau (notée K_e a été reportée dans la littérature [55]. Ainsi le simple fait de changer la température de l'eau modifie son pH. En particulier, il peut être calculé que le chauffage à 65°C d'une solution aqueuse ayant un pH 9 à 25°C modifie son pH à 7,8 (voir Annexe). Notons que bien que le raisonnement présenté en Annexe ne prenne en compte que la modification du K_e de l'eau, il permet de prouver que la température n'est pas un paramètre négligeable. L'influence de la température sur la mesure effectuée par notre système est donc un paramètre pertinent à étudier.

Pour cela, une série d'expériences a été réalisée selon le protocole suivant : Injection d'une solution de PBS dans le système, fermeture du système grâce à du microAMP, puis réalisation de paliers de température à l'aide du thermocycleur PTC200. Les consignes en température sont les suivantes : 25°C, 40°C, 65°C, 40°C, 65°C, 80°C, 65°C, 40°C, 65°C, et 25°C. Le temps des paliers de température peut varier suivant les expériences mais il est généralement de 1h30. Une courbe typique de la réponse des électrodes à ce cyclage est présentée en figure 4.35.

Sur cette figure 4.35 deux réponses, ayant des constantes de temps très différentes, sont observables lors des changements de température. La première réponse est très rapide, sous la forme d'un saut de potentiel. La seconde, beaucoup plus lente, apparaît plus comme une dérive du signal mesuré. De plus, alors que la première réponse semble identique entre les deux électrodes du dispositif (courbes bleue et orange), la seconde paraît moins reproductible. On note tout de même une tendance pour cette seconde réponse : la dérive est d'autant plus forte que la température est élevée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le scotch double face utilisé pour ces montages relargue des ions hydronium lorsqu'il est chauffé. La dérive observée pourrait ainsi être liée à ce relargage d'ion H_3O^+ .

Concernant le saut de potentiel apparaissant immédiatement lors du changement de température, une

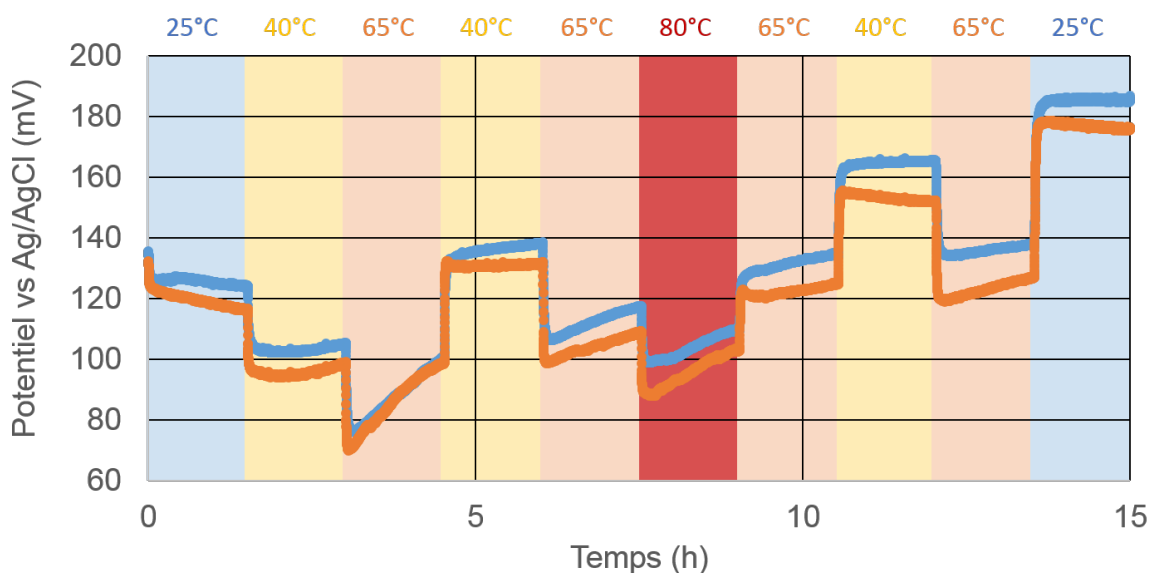


FIGURE 4.35 – Courbes de réponses potentiométriques à une succession de saut de température.

bonne reproductibilité est présente entre les électrodes, mais également entre différentes expériences. Sur la Figure 4.36, les sauts de potentiel mesurés par 5 électrodes, sur deux systèmes différents, sont représentés en fonction du saut de température appliqué. On observe alors une réponse linéaire des électrodes en fonction de la température, ce qui est, encore une fois, cohérent avec la loi de Nernst 4.18.

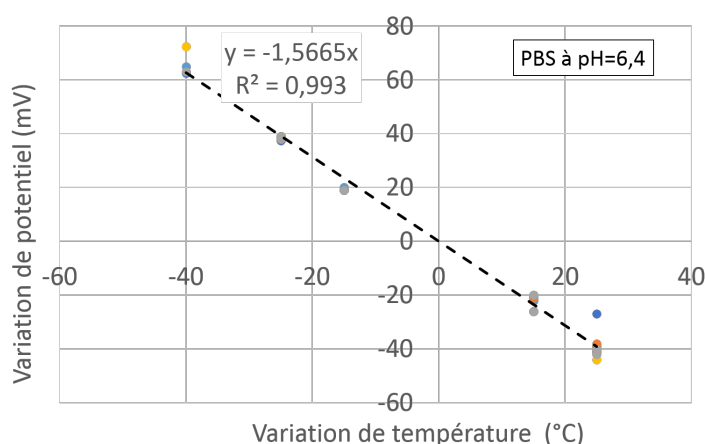


FIGURE 4.36 – Réponses des électrodes développées aux changements de températures avec une solution de PBS à $pH = 6,4$.

En répétant ce type d'expérience pour des solutions de PBS à différents pH, on obtient la figure 4.37. Cette dernière figure montre que la réponse en température dépend du pH de la solution mais d'une façon non triviale. En effet, si la variation du potentiel en fonction de la température est presque nulle pour un pH de 7,3, elle augmente fortement à pH 6,4 puis redescend légèrement lorsque le pH est de 5,7. La complexité de cette dépendance température/pH est probablement due aux multiples équilibres réactionnels mis en jeu par la PAni (Figure 4.26). Afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, une étude plus poussée est alors nécessaire. Toutefois, il est à rappeler que la réaction de LAMP est une amplification isotherme, c'est-à-dire qu'il n'y aura pas de changement de température au cours de la réaction. C'est pourquoi il a été choisi de se concentrer en premier lieu sur l'optimisation et l'utilisation de ces électrodes pour le suivi d'une réaction de LAMP, plutôt que de poursuivre l'étude de la réponse de ces capteurs aux changements de

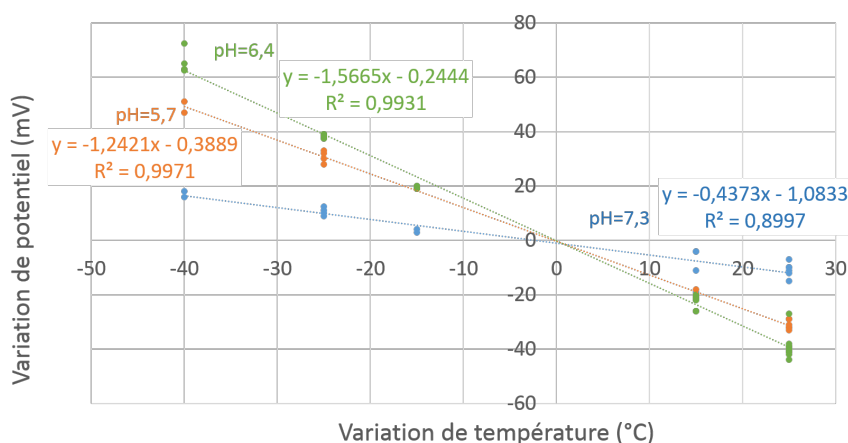


FIGURE 4.37 – Réponses des électrodes développées aux changements de températures avec des solutions de PBS à différents pH.

températures. Ainsi, après avoir présenté les optimisations effectuées sur le mélange réactionnel de LAMP, la fin de ce chapitre se consacrera à la détection en temps réel d'une réaction de LAMP grâce à des électrodes de PANi.

4.2.2.2 Le protocole de "LAMP pHmétrique"

Un des objectifs du travail effectué au cours de cette thèse est d'effectuer la détection de la LAMP par pHmtrie, et notamment par voie électrochimique via des électrodes à base de PANi. Un des pré-requis pour pouvoir effectuer une telle détection est donc la possibilité de faire varier le pH de la solution pendant la réaction. En particulier il ne faut pas que le mélange réactionnel contienne un agent qui joue le rôle d'un tampon pH. Or c'est généralement le cas des mélanges réactionnels commerciaux car ils sont optimisés pour le fonctionnement de l'enzyme et donc sont tamponnés à un pH optimal. C'est pourquoi le mélange réactionnel utilisé pour les expériences présentées dans la suite de ce chapitre a été adapté de façon à ne pas tamponner le pH de la solution. Dans la composition de ce mélange réactionnel (d'un volume final de 20 µL) se trouvent notamment :

- L'enzyme : L'enzyme utilisée ici est la Bst 2 achetée chez NEB (New England Biolabs, USA).
- Les dNTP.
- Les primers : Les primers utilisés proviennent d'Eurofins Genomics (Eurofins Scientific Group, Allemagne).
- De la BSA 1% : L'ajout de BSA (Bovine Serum Albumine) permet d'éviter l'adsorption non spécifique de protéines du mélange réactionnel ou de l'ADNs sur les parois, car ces dernières seront passivées par les protéines présentes dans la BSA.
- Du Cresol Red : Il s'agit de l'indicateur coloré utilisé pour la détection colorimétrique. Son utilisation permettra de confirmer les amplifications observées en électrochimie.
- Du KOH : Le volume et la concentration en KOH étant à ajuster de façon à optimiser (en terme de pH) la réaction et sa détection.

A cela est ensuite ajouté 5 µL d'ADN pour effectuer un test positif, ou 5 µL d'eau pour effectuer un test négatif.

La coloration du rouge de crésol en fonction du pH est représentée figure 4.38. On peut voir que cet indicateur a une couleur violette au-delà d'un pH de 8.5 – 9 et une couleur jaune pour des pHs inférieurs à 6,5. Entre ces valeurs de pH, le rouge de crésol subit un virage colorimétrique passant par des couleurs rouge

puis orange. Cet indicateur coloré est particulièrement intéressant pour une réaction de LAMP colorimétrique car le début de son virage colorimétrique se trouve à un pH très proche du pH optimal de l'enzyme utilisée, qui est de 8.8. Ainsi se placer à une telle valeur de pH au début de la réaction va permettre de se trouver dans des conditions optimales à la fois, pour l'enzyme mais également pour la détection visuelle car le virage colorimétrique se fera au plus tôt.

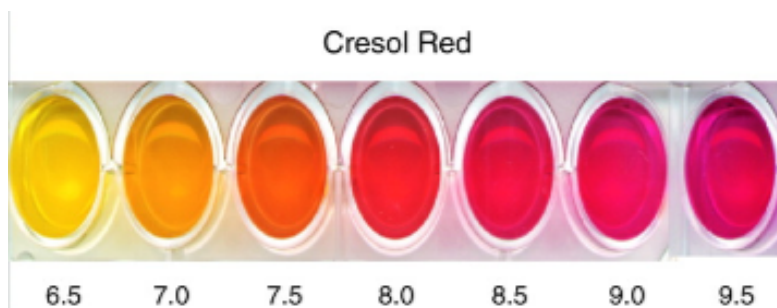


FIGURE 4.38 – Echelle colorimétrique du rouge de Crésol. Extrait de [56].

Afin de déterminer la quantité de KOH optimale, des tests d'amplifications ont été effectués en tube. La figure 4.39 présente des photographies des tubes à l'état initial, juste après activation de chauffage, puis lorsque les tubes sont refroidis après avoir passé 1 heure à 65°C. La quantité de KOH dans ces différents tubes est présentée dans le tableau 4.5.

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume de KOH 100 mM (μL)	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.25

Tableau 4.5 – Gamme de volume de KOH utilisée pour l'optimisation du mélange réactionnel LAMP colorimétrique.

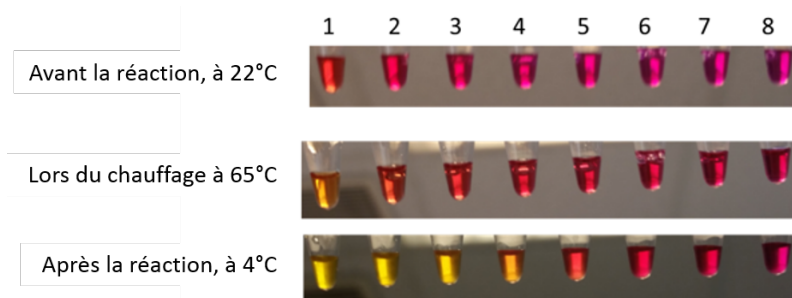


FIGURE 4.39 – Photographies de la gamme de mélange réactionnel LAMP colorimétrique à différents moments de la réaction d'amplification.

Dans un premier temps, l'influence de la température sur le pH est confirmée : lorsque l'on chauffe, le pH de la solution diminue et le virage colorimétrique peut alors être plus ou moins entamé. Ce changement de pH avec la température implique qu'il ne faut pas partir d'un pH trop bas si l'on souhaite pouvoir distinguer le virage colorimétrique lors de la réaction, c'est-à-dire à 65°C. De plus, ce changement de couleur semble également indiquer que le pH de la solution initiale à 65°C est d'ores et déjà inférieur au pH optimal de fonctionnement de l'enzyme. Ainsi la plus faible quantité de KOH (tube 1) ne semble pas adéquate.

D'autre part, comme nous pouvons le voir dans la figure 4.39, une trop grande quantité de KOH dans le mélange réactionnel induit un virage colorimétrique incomplet lors de l'amplification (tubes 5-8).

Compte tenu de ces observations les meilleurs résultats en LAMP colorimétrique sont obtenus pour les tubes 2-4 avec une préférence pour le tube 3. En effet ce dernier semble être le meilleur compromis entre

une teinte rouge à 65°C et une teinte jaune en fin d'amplification (à froid).

Finalement, pour les expériences présentées dans ce manuscrit, le mélange réactionnel utilisé sera donc ajusté initialement en pH grâce à 1 μ L de KOH 100 mM.

Nous noterons l'arrivée sur le catalogue commercial de NEB, lors de la dernière année de cette thèse, de mélanges réactionnels dédiés à la détection pH colorimétrique. Ces solutions pourraient grandement simplifier la préparation des mélanges réactionnels de réactions par la suite.

4.2.2.3 Détection d'une réaction de LAMP

Optimisation des électrodes pour une réaction de LAMP Comme évoqué précédemment la mesure potentiométrique, à base d'électrode de PANi, semble être une méthode prometteuse pour le suivi en temps réel d'une réaction d'amplification d'ADN. Alors que la sous-section précédente a présenté l'optimisation effectuée au niveau du mélange réactionnel de LAMP pour permettre une détection pHmétrique, nous allons voir dans le paragraphe suivant comment les électrodes de PANi peuvent être optimisées dans le cadre de cette application.

L'étude présentée dans ce paragraphe est une optimisation en terme de conditionnement pH de la PANi. En effet comme nous l'avons vu avec la figure 4.31, lorsque la PANi est déposée sur les électrodes, celle-ci est à pH très faible, de l'ordre de 1 ou 2. En revanche le mélange réactionnel de LAMP a, à l'état initial, un pH au environ de 9. Ainsi, injecter le mélange réactionnel directement dans une chambre avec des électrodes de PANi séchées ayant un pH aussi faible, va modifier le pH de la solution et l'optimisation du mélange réactionnel effectuée précédemment n'aura plus de sens. Il est donc nécessaire de conditionner en pH les électrodes de PANi avant la mesure de la réaction de LAMP. Pour cela deux pistes ont été envisagées. La première est d'effectuer un rinçage des électrodes avec une solution de PBS ayant un pH aux alentours de 9. Cependant cela complique le procédé de fabrication des électrodes puisque qu'un conditionnement en phase liquide suivi d'un séchage doivent être effectués. C'est pourquoi la seconde méthode de conditionnement a été privilégiée. Il s'agit d'augmenter le pH de la solution de PANi avant le dépôt. Pour cela de nouvelles solutions de PANi sont préparées à partir de la solution de PANi 1 : 2 en y ajoutant des solutions de KOH selon le tableau 4.6. Dans le cas de l'ajout de 3 mL de KOH, on note un changement de couleur de la solution de PANi. Cette dernière passe d'une couleur verte à une couleur bleue, indiquant le passage de la forme ES à celle de EB (voir figure 4.26). Notons que cette transition colorimétrique est connue dans la littérature et peut être utilisée pour la réalisation d'une détection colorimétrique [57].

Électrode	A	B	c
Quantité de KOH ajoutée à 3mL de PANi 1 : 2	1 mL de KOH, pH 12.7	0,5 mL de KOH, pH 13.8	3 mL de KOH, pH 13.8
Couleur	Verte	Verte	Bleue

Tableau 4.6 – Tableau résumant les différentes quantités de KOH ajoutées à la solution de PANi pour son optimisation.

Si l'on regarde la réponse de ces électrodes lorsqu'elles sont mises en contact avec une solution de PBS de pH 7.4, on voit que l'électrode C commence à un potentiel beaucoup plus bas que les deux autres (Figure 4.40). Cela confirme ainsi la possibilité d'optimiser le pH initial des électrodes par le conditionnement de la solution de PANi avant le dépôt.

D'autre part, pour les expériences de LAMP, de la BSA est également ajoutée (pour une concentration finale de 0.1%) dans la solution de PANi afin de passiver au mieux l'électrode dans son volume pour éviter l'adsorption des molécules d'ADN. Toutefois, étant donné le recuit des électrodes ainsi que la présence de

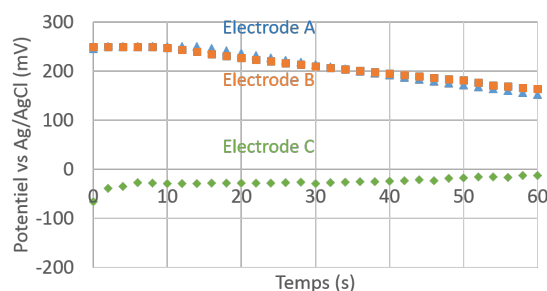


FIGURE 4.40 – Premiers instants de la réponse potentiométrique des différentes solutions de PANi.

BSA dans le mélange réactionnel de LAMP, cet ajout ne semble finalement pas utile. Cet ajout n'affectant cependant pas la réponse des électrodes, la solution de PANi utilisée pour les expériences de LAMP est composée de :

- 1 mL de PANi
- 3 mL de KOH à pH 13.8
- Eau deionisée, sans RNase, DNase, ni protease : 6,9 mL. Cette eau spécialement vendue pour la biologie moléculaire est achetée chez ACROS Organics (Thermo Fischer Scientific, USA).
- 0,1 mL de BSA 10%

Le suivi d'une réaction de LAMP par potentiométrie Une fois l'ensemble des optimisations évoquées précédemment effectuées, les électrodes développées au cours de cette thèse ont pu être utilisées pour effectuer un suivi en temps réel d'une amplification de type LAMP *via* le suivi du pH de la solution. Ce résultat est présenté dans l'article qui suit, publié sous forme d'une letter dans la revue Analytical Chemistry. Dans ce dernier, après une description du système électrochimique utilisé pour effectuer la mesure, la possibilité d'utiliser des électrodes à base de PANi pour effectuer un suivi potentiométrique d'une amplification ADN est démontrée. De plus, il est démontré que le système présenté présente une bonne reproductibilité sur un triplicat de réactions mais également qu'il permet une détection quantitative avec une sensibilité jusqu'à 10 copies d'ADNs. Finalement, la mesure potentiométrique est comparée à une mesure en fluorescence et il est montré que les réponses sont extrêmement proches. En effet, la réponse potentiométrique ne montre qu'environ 2 minutes de retard par rapport à la mesure par fluorescence. Cette similarité avec la méthode de détection classiquement utilisée sur les instruments commerciaux indique que la méthode de détection développée au cours de cette thèse est prometteuse. De plus, de part sa possibilité à être fabriquée à bas-coût et en série, cette dernière est particulièrement intéressante pour les diagnostics Point-of-Care.

Références de la publication

Gosselin D., Gougis M., Baque M., Navarro F.P., Belgacem M.N., Chaussy D., Bourdat A.-G., Mailley P., Berthier J., 2017. Screen-Printed Polyaniline-Based Electrodes for the Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reactions. *Anal. Chem.* 89, 10124-10128.

Lien web : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02394>

Un système permettant une "double" détection. Nous venons de voir, dans l'article précédent, qu'une mesure potentiométrique entre une électrode de PANi et une électrode d'Ag/AgCl permettait de suivre en temps réel une amplification d'ADN de type LAMP. Cette amplification d'ADN étant effectuée à température constante, ce paramètre n'apparaît pas dans cet article. Or nous avons vu auparavant que la réponse potentiométrique dépendait de la température. Cette propriété va être utilisée ici pour effectuer une seconde mesure, cette fois-ci en point final sur notre échantillon.

Dans la plupart de nos expériences, lorsque le chauffage est coupé au bout des 60 minutes, la chambre microfluidique est ensuite portée à 4°C afin de stopper entièrement l'amplification. Ce saut de température induit donc un saut du potentiel mesuré. Or, comme nous l'avons vu précédemment (Figure 4.37), le saut en potentiel dépend alors du pH de la solution. De ce fait, lorsque l'amplification a eu lieu, le pH de la solution a diminué et la réponse au changement de température est différente de celle d'une solution où il n'y a pas eu d'amplification (Figure 4.41).

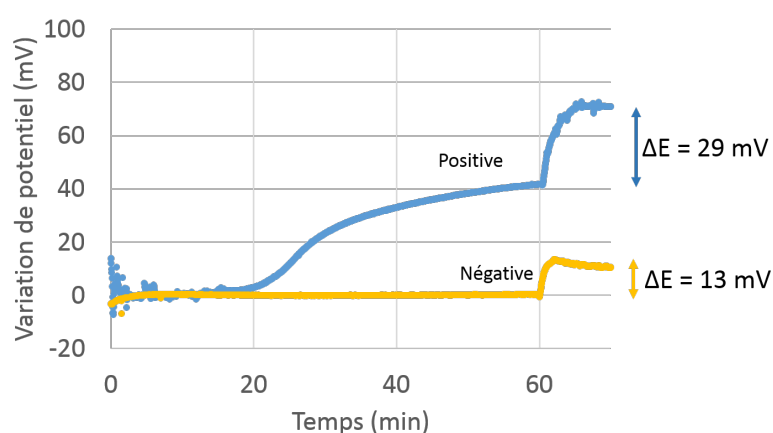


FIGURE 4.41 – Courbes de réponses potentiométriques lors de réactions de LAMP positive (en bleu) et négative (en jaune).

Du fait que notre système de mesure soit sensible à deux paramètres (le pH et la température) qui varient de façon indépendante lors d'une réaction d'amplification d'ADN isotherme, il est possible d'effectuer deux mesures lors d'une même réaction. La première étant le suivi en temps réel de l'évolution de l'amplification, via le suivi du PH à température constante, et la seconde étant une mesure end-point lorsque le système refroidit, via le saut de potentiel induit (Figure 4.42). Notons que, même si le système n'est pas refroidi à la fin de la réaction, le refroidissement de la chambre microfluidique jusqu'à la température ambiante se fait de façon autonome lorsque le chauffage est coupé. Une seconde mesure de l'amplification, pouvant servir de contrôle, est ainsi facilement réalisable en poursuivant la mesure quelques minutes à la fin de l'étape de chauffage.

4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, la réalisation et l'optimisation de deux fonctions nécessaires à un test par amplification d'ADN ont été étudiées. Le choix de la réalisation de ces deux fonctions par sérigraphie a été fait afin de permettre leur production à bas-coût mais également pour faciliter l'intégration de ces éléments dans des systèmes plus complet. Même si ce dernier point sera abordé plus en détail dans le prochain chapitre, nous avons déjà pu démontrer ici que l'intégration d'une chambre microfluidique sur des électrodes sérigraphiées pouvait s'effectuer de manière très simple. D'autre part, le fait de pouvoir réaliser à la fois les

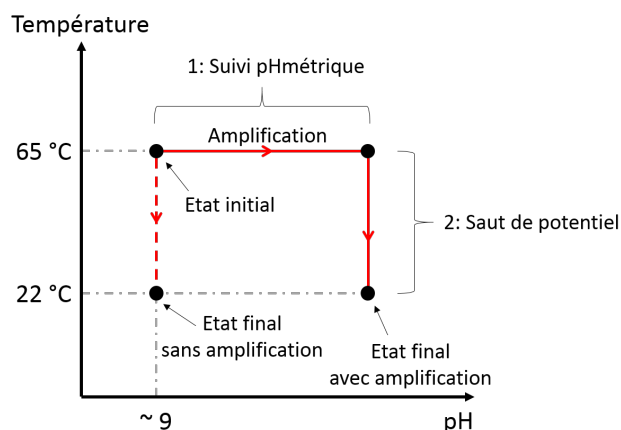


FIGURE 4.42 – Schéma de principe de la double mesure possible avec les électrodes de PANi.

éléments chauffants et le système de détection par un même procédé de fabrication participe à simplifier la production d'un tel système.

Dans un premier temps les transferts thermiques ont été étudiés pour les éléments chauffants suspendus dans l'air. Il a été montré que la prédiction des températures de chauffage était possible avec une bonne précision (Erreur relative moyenne $< 2\%$), permettant le dimensionnement des éléments chauffants afin d'atteindre une température donnée avec une tension donnée. Si une première étude ne prenant qu'uniquement en compte les phénomènes convectifs a démontré de bons résultats, un affinement de cette dernière a ensuite été proposé afin d'intégrer les phénomènes radiatifs et de conduction. Finalement il a été montré que la présence d'une chambre microfluidique apposée à un tel élément chauffant n'a d'impact que sur la dynamique de l'échauffement (le système met alors environ 200 s pour atteindre son équilibre). La température d'équilibre du système reste en effet inchangée en présence de la-dite chambre.

La seconde partie de ce chapitre a été dédiée à la détection de réactions de LAMP par potentiométrie. Pour cela des électrodes de PolyAniline ont été développées. Après une première optimisation de la solution de PANi, par dilution et par ajustement du pH, et une optimisation du mélange réactionnel LAMP, il a été démontré que ce type de détection permettait une détection en temps réel d'une réaction de LAMP. Il a de plus été montré que cette détection potentiométrique produit une réponse très semblable à celle en fluorescence. Cette similitude conforte ainsi le potentiel de cette méthode de détection. En effet avec une optimisation plus poussée de ces électrodes de PolyAniline, la réponse pourrait être encore plus rapide et on pourrait ainsi aboutir à un système de détection ayant une plus grande sensibilité que les méthodes de fluorescence.

Alors que ces deux fonctions ont ici été étudiées séparément, l'objectif du prochain chapitre est d'intégrer ces deux fonctions dans un même dispositif. De plus, nous allons voir que le choix de la réalisation de ces éléments par procédé d'impression sérigraphique permet d'effectuer une étape d'embossage du support imprimé tout en conservant la fonctionnalité de ces éléments. De cette façon, il sera démontré que l'ensemble des opérations unitaires de fabrications utilisées au cours de cette thèse forment un tout cohérent pour la fabrication simple et à bas-coût de systèmes de diagnostics par amplification d'ADN.

Bibliographie

- [1] M. A. Baldo, S. Lamansky, P. E. Burrows, M. E. Thompson, and S. R. Forrest, "Very high-efficiency green organic light-emitting devices based on electrophosphorescence," *Applied Physics Letters*, vol. 75, pp. 4–6, June 1999.
- [2] T. Someya, T. Sekitani, S. Iba, Y. Kato, H. Kawaguchi, and T. Sakurai, "A large-area, flexible pressure sensor matrix with organic field-effect transistors for artificial skin applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, pp. 9966–9970, June 2004.
- [3] A. Aliane, V. Fischer, M. Galliani, L. Tournon, R. Gwoziecki, C. Serbutoviez, I. Chartier, and R. Coppard, "Enhanced printed temperature sensors on flexible substrate," *Microelectronics Journal*, vol. 45, pp. 1621–1626, Dec. 2014.
- [4] J. Kim, D. Byun, M. G. Mauk, and H. H. Bau, "A disposable, self-contained PCR chip," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 606–612, Feb. 2009.
- [5] A. Priye, S. W. Bird, Y. K. Light, C. S. Ball, O. A. Negrete, and R. J. Meagher, "A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 44778, Mar. 2017.
- [6] J. R. Choi, J. Hu, R. Tang, Y. Gong, S. Feng, H. Ren, T. Wen, X. Li, W. A. B. W. Abas, B. Pingguan-Murphy, and F. Xu, "An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care," *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 611–621, Jan. 2016.
- [7] J. T. Connelly, J. P. Rolland, and G. M. Whitesides, "'Paper Machine' for Molecular Diagnostics," *Analytical Chemistry*, vol. 87, pp. 7595–7601, Aug. 2015.
- [8] D. Moschou, N. Vourdas, G. Kokkoris, G. Papadakis, J. Parthenios, S. Chatzandroulis, and A. Tserepi, "All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 199, pp. 470–478, Aug. 2014.
- [9] G. D. Kaprou, G. Papadakis, D. P. Papageorgiou, G. Kokkoris, V. Papadopoulos, I. Kefala, E. Gizeli, and A. Tserepi, "Miniaturized devices for isothermal DNA amplification addressing DNA diagnostics," *Microsystem Technologies*, vol. 22, pp. 1529–1534, Dec. 2015.
- [10] L. K. Lafleur, J. D. Bishop, E. K. Heiniger, R. P. Gallagher, M. D. Wheeler, P. Kauffman, X. Zhang, E. C. Kline, J. R. Buser, S. Kumar, S. A. Byrnes, N. M. J. Vermeulen, N. K. Scarr, Y. Belousov, W. Mahoney, B. J. Toley, P. D. Ladd, B. R. Lutz, and P. Yager, "A rapid, instrument-free, sample-to-result nucleic acid amplification test," *Lab on a Chip*, Aug. 2016.
- [11] J.-H. Wang, L.-J. Chien, T.-M. Hsieh, C.-H. Luo, W.-P. Chou, P.-H. Chen, P.-J. Chen, D.-S. Lee, and G.-B. Lee, "A miniaturized quantitative polymerase chain reaction system for DNA amplification and detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 141, pp. 329–337, Aug. 2009.
- [12] J. Singleton, C. Zentner, J. Buser, P. Yager, P. LaBarre, and B. H. Weigl, "Instrument-free exothermic heating with phase change temperature control for paper microfluidic devices," p. 86150R, Mar. 2013.

-
- [13] K. A. Curtis, D. L. Rudolph, I. Nejad, J. Singleton, A. Beddoe, B. Weigl, P. LaBarre, and S. M. Owen, "Isothermal Amplification Using a Chemical Heating Device for Point-of-Care Detection of HIV-1," *PLoS ONE*, vol. 7, p. e31432, Feb. 2012.
- [14] P. LaBarre, K. R. Hawkins, J. Gerlach, J. Wilmoth, A. Beddoe, J. Singleton, D. Boyle, and B. Weigl, "A Simple, Inexpensive Device for Nucleic Acid Amplification without Electricity—Toward Instrument-Free Molecular Diagnostics in Low-Resource Settings," *PLoS ONE*, vol. 6, p. e19738, May 2011.
- [15] S.-C. Liao, J. Peng, M. G. Mauk, S. Awasthi, J. Song, H. Friedman, H. H. Bau, and C. Liu, "Smart cup : A minimally-instrumented, smartphone-based point-of-care molecular diagnostic device," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 229, pp. 232–238, June 2016.
- [16] *Polymer Handbook, 2 Volumes Set, 4th Edition*, vol. 2. J. Brandrup, Edmund H. Immergut, E. A. Grulke, wiley ed., 2003.
- [17] J. G. Speight and N. A. Lange, *Lange's Handbook of Chemistry*. Maidenhead : McGraw-Hill Professional, 2005. OCLC : 489645366.
- [18] "Specific Heat of Solids." http://www.engineeringtoolbox.com/specific-heat-solids-d_154.html.
- [19] "Thermal Conductivity of common Materials and Gases." http://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-d_429.html.
- [20] "PMMA." <http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pmma.htm>.
- [21] T. Okada, R. Ishige, and S. Ando, "Analysis of Thermal Radiation Properties of Polyimide and Polymeric Materials Based on ATR-IR spectroscopy," *Journal of Photopolymer Science and Technology*, vol. 29, no. 2, pp. 251–254, 2016.
- [22] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand, "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, pp. 7276–7280, Aug. 1991.
- [23] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, "Real time quantitative PCR.," *Genome Research*, vol. 6, pp. 986–994, Jan. 1996.
- [24] E. Paleček, "Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid," *Nature*, vol. 188, pp. 656–657, Nov. 1960.
- [25] P. M. Armistead and H. H. Thorp, "Modification of Indium Tin Oxide Electrodes with Nucleic Acids : Detection of Attomole Quantities of Immobilized DNA by Electrocatalysis," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 3764–3770, Aug. 2000.
- [26] M. E. Napier, C. R. Loomis, M. F. Sistare, J. Kim, A. E. Eckhardt, and H. H. Thorp, "Probing Biomolecule Recognition with Electron Transfer : Electrochemical Sensors for DNA Hybridization," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, pp. 906–913, Nov. 1997.
- [27] M. R. Gore, V. A. Szalai, P. A. Ropp, I. V. Yang, J. S. Silverman, and H. H. Thorp, "Detection of Attomole Quantities of DNA Targets on Gold Microelectrodes by Electrocatalytic Nucleobase Oxidation," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 6586–6592, Dec. 2003.
- [28] S. S. W. Yeung, T. M. H. Lee, and I.-M. Hsing, "Electrochemical Real-Time Polymerase Chain Reaction," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 13374–13375, Oct. 2006.
- [29] S. S. W. Yeung, T. M. H. Lee, and I.-M. Hsing, "Electrochemistry-Based Real-Time PCR on a Microchip," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 363–368, Jan. 2008.
-

-
- [30] A. B. Steel, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, "Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4670–4677, Nov. 1998.
- [31] R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, H. T. Soh, K. W. Plaxco, and A. J. Heeger, "Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 4017–4021, Mar. 2006.
- [32] K. Hsieh, B. S. Ferguson, M. Eisenstein, K. W. Plaxco, and H. T. Soh, "Integrated Electrochemical Microsystems for Genetic Detection of Pathogens at the Point of Care," *Accounts of Chemical Research*, vol. 48, pp. 911–920, Apr. 2015.
- [33] A. Martin, L. Bouffier, K. B. Grant, B. Limoges, and D. Marchal, "Real-time electrochemical LAMP : A rational comparative study of different DNA intercalating and non-intercalating redox probes," vol. 141, pp. 4196–4203, June 2016.
- [34] Y. Zhang, A. Pothukuchy, W. Shin, Y. Kim, and A. Heller, "Detection of ~103 Copies of DNA by an Electrochemical Enzyme-Amplified Sandwich Assay with Ambient O₂ as the Substrate," *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 4093–4097, July 2004.
- [35] M. Dequaire and A. Heller, "Screen Printing of Nucleic Acid Detecting Carbon Electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 4370–4377, Sept. 2002.
- [36] T. Nimitphak, W. Meemetta, N. Arunrut, S. Senapin, and W. Kiatpathomchai, "Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 24, pp. 1–5, Feb. 2010.
- [37] W. Jaroenram, W. Kiatpathomchai, and T. W. Flegel, "Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 23, pp. 65–70, Apr. 2009.
- [38] N. M. Rodriguez, W. S. Wong, L. Liu, R. Dewar, and C. M. Klapperich, "A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples," *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 753–763, Feb. 2016.
- [39] C.-Y. Chen, "DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies : Both past and present," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, June 2014.
- [40] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi, "Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 289, pp. 150–154, Nov. 2001.
- [41] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, and T. Notomi, "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 59, pp. 145–157, May 2004.
- [42] N. J. Gibson, C. R. Newton, and S. Little, "A Colorimetric Assay for Phosphate to Measure Amplicon Accumulation in Polymerase Chain Reaction," vol. 254, no. 1, pp. 18–22, 1997.
- [43] N. A. Tanner, Y. Zhang, and T. C. Evans, "Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes," *BioTechniques*, vol. 58, Feb. 2015.
- [44] E. Salm, Y. Zhong, B. Reddy, C. Duarte-Guevara, V. Swaminathan, Y.-S. Liu, and R. Bashir, "Electrical Detection of Nucleic Acid Amplification Using an On-Chip Quasi-Reference Electrode and a PVC REFET," *Analytical Chemistry*, vol. 86, pp. 6968–6975, July 2014.
-

-
- [45] C. Toumazou, L. M. Shepherd, S. C. Reed, G. I. Chen, A. Patel, D. M. Garner, C.-J. A. Wang, C.-P. Ou, K. Amin-Desai, P. Athanasiou, H. Bai, I. M. Q. Brizido, B. Caldwell, D. Coomber-Alford, P. Georgiou, K. S. Jordan, J. C. Joyce, M. La Mura, D. Morley, S. Sathyavruathan, S. Temelso, R. E. Thomas, and L. Zhang, "Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system," *Nature Methods*, vol. 10, pp. 641–646, July 2013.
- [46] E. Song and J.-W. Choi, "Conducting Polyaniline Nanowire and Its Applications in Chemiresistive Sensing," *Nanomaterials*, vol. 3, pp. 498–523, Aug. 2013.
- [47] Z. Ping, B. G. E. Nauer, H. Neugebauer, J. Theiner, and A. Neckel, "Protonation and electrochemical redox doping processes of polyaniline in aqueous solutions : Investigations using insitu FTIR-ATR spectroscopy and a new doping system," vol. 93, pp. 121–129, Jan. 1997.
- [48] C. Ge, N. R. Armstrong, and S. S. Saavedra, "pH-Sensing Properties of Poly(aniline) Ultrathin Films Self-Assembled on Indium-Tin Oxide," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 1401–1410, Feb. 2007.
- [49] S. Picart, F. Miomandre, and V. Launay, "A la découverte de l'univers fabuleux de la polyaniline," vol. 95, pp. 581–592, 2001.
- [50] W. W. Focke, G. E. Wnek, and Y. Wei, "Influence of oxidation state, pH, and counterion on the conductivity of polyaniline," vol. 91, no. 22, pp. 5813–5818, 1987.
- [51] W.-S. Huang, A. G. MacDiarmid, and A. J. Epstein, "Polyaniline : Non-oxidative doping of the emeraldine base form to the metallic regime," pp. 1784–1786, Jan. 1987.
- [52] A. Ray, A. F. Richter, and A. G. MacDiarmid, "Polyaniline : Protonation/deprotonation of amine and imine sites," vol. 29, no. 1, pp. 151–156, 1989.
- [53] A. A. Karyakin, O. A. Bobrova, L. V. Lukachova, and E. E. Karyakina, "Potentiometric biosensors based on polyaniline semiconductor films," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 33, pp. 34–38, July 1996.
- [54] A. A. Karyakin, M. Vuki, L. V. Lukachova, E. E. Karyakina, A. V. Orlov, G. P. Karpachova, and J. Wang, "Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors.," *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 2534–2540, July 1999.
- [55] W. L. Marshall and E. U. Franck, "Ion product of water substance, 0–1000 °C, 1–10,000 bars New International Formulation and its background," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 10, pp. 295–304, Apr. 1981.
- [56] M. d. P. Corena, L. VanEkeris, M. I. Salazar, D. Bowers, M. M. Fiedler, D. Silverman, C. Tu, and P. J. Linser, "Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut," *Journal of Experimental Biology*, vol. 208, pp. 3263–3273, Sept. 2005.
- [57] B. Thakur, C. A. Amarnath, S. Mangoli, and S. N. Sawant, "Polyaniline nanoparticle based colorimetric sensor for monitoring bacterial growth," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 207, pp. 262–268, Feb. 2015.

Chapitre 5

Vers un système intégré : Premiers pas et perspectives.

Comme évoqué lors du premier chapitre de ce manuscrit, l'intégration des différentes fonctions nécessaires au diagnostic PoC est un point essentiel lors du développement d'un tel outil. En effet, l'intégration des différentes étapes du diagnostic permet de simplifier son utilisation mais également de le rendre plus robuste car cela évite les opérations manuelles, et donc évite les variations inter-opérateur. Après avoir passé en revue différents systèmes d'amplification d'ADN prenant en compte (ou du moins partiellement) cette problématique d'intégration, la seconde partie de ce chapitre présentera l'approche d'intégration qui a été développée au cours de cette thèse.

5.1 Focus bibliographique

L'intégration des fonctions unitaires nécessaires à la réalisation d'un diagnostic par amplification d'ADN est un aspect non trivial pour ces systèmes. En effet si l'on souhaite répondre convenablement à la liste de critères ASSURED évoquée en introduction, il faut en particulier que le système résultant soit utilisable en toutes conditions (en particulier en absence d'accès à l'électricité), qu'il soit facile d'utilisation et qu'il soit peu onéreux (afin d'être accessible à tous).

De façon à répondre à ces conditions, trois fonctions doivent être intégrées dans le système : la préparation de l'échantillon, le chauffage permettant la réaction et la détection de cette réaction. Il est à noter que l'intégration dans le système final des réactifs nécessaires à ces différentes étapes est également primordiale.

Une grande partie des systèmes présents dans la littérature ne propose cependant pas une intégration de ces différentes fonctions de façon très avancée. En effet la majorité des systèmes microfluidiques utilise un boîtier indépendant, dans lequel sont placés les éléments nécessaires à la réaction et à sa détection par fluorescence [1, 2, 3, 4, 5] (Figure 5.1). Afin d'augmenter la portabilité des systèmes finaux, ces derniers utilisent généralement la caméra d'un téléphone portable en guise de détecteur et utilisent un système de chauffage qui ne nécessite pas plus de 5V de façon à pouvoir être alimenté par des piles ou une connexion USB.

Dans le cas des travaux de Liao et al [5], un effort supplémentaire quant à l'autonomie énergétique est effectué en utilisant l'énergie dégagée par une réaction chimique exothermique pour fournir le chauffage nécessaire. D'une façon générale, l'utilisation de tels boîtiers pour effectuer et détecter la réaction d'amplification d'ADN oriente ces instruments vers un système d'appareil réutilisable d'un test à l'autre (le boîtier)

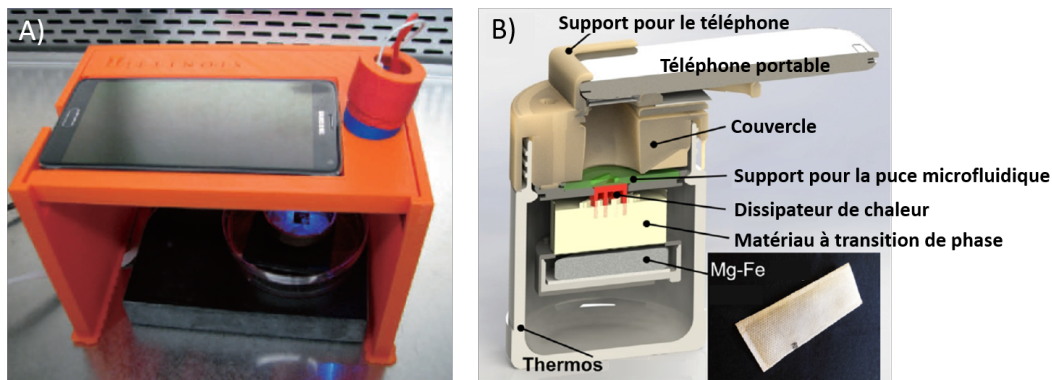


FIGURE 5.1 – Exemple de systèmes microfluidiques utilisant un boîtier indépendant pour effectuer et détecter la réaction d'amplification d'ADN. Extraits de [4] (A) et [5] (B).

associé à des cartouches de tests jetables après chaque diagnostic. Dans le cas des diagnostics Point-of-Care, cette voie est intéressante lorsque les cartouches jetables possèdent un très bas-coût comme c'est le cas des tests sur supports papiers [3].

De façon à pousser un peu plus loin l'intégration de ces derniers systèmes, des dispositifs papiers jetables comprenant l'étape de préparation de l'échantillon ont été développés [7, 8, 6]. De plus, dans le cas des références [8] et [6], la détection se fait par Lateral Flow et permet donc une visualisation directe, à l'oeil nu, du résultat du diagnostic. Cependant l'obligation de séquencer les différentes étapes pour ces tests entraîne l'apparition d'un certains nombres d'étapes manuelles (Figure 5.2), ce qui n'est pas souhaitable si les systèmes doivent être faciles d'utilisation.

Le principe de boîtier réutilisable et de cartouches jetables est actuellement utilisé dans les quelques appareils de diagnostic moléculaire (*i.e.* par amplification d'ADN) commercialisés [9, 10]. Ces derniers intègrent l'ensemble des étapes du diagnostic mais restent cependant de taille assez importante. Par exemple, dans le cas du PanNAT System de Micronics [9] l'appareil a les dimensions suivantes $30,5 \times 38 \times 30,5 \text{ cm}^3$ et pèse 11 kg. Il s'agit alors d'un appareil peu portable, bien que transportable, dans le sens où il n'est pas pensé pour être déplacé régulièrement. Son utilisation se rapproche donc plus d'un instrument de laboratoire mais qui pourrait être placé à proximité des zones où les diagnostics sont effectués. Il est à noter que Cepheid (Cepheid Inc., USA) a développé un appareil bien plus léger ($< 1 \text{ kg}$) permettant d'effectuer un diagnostic par amplification d'ADN [11]. La commercialisation de ce boîtier, nommé le GeneXpert Omni, est prévue d'ici la fin de l'année 2017. Grâce à la présence d'une batterie, cet appareil offre la possibilité d'effectuer jusqu'à 4h de diagnostics sans accès à l'électricité. Cet appareil est donc bien adapté au diagnostic de terrain, et peut permettre de réaliser des diagnostics dans les régions les plus reculées. Cependant, ce système ne répond pas de façon très satisfaisante au critère de bas-coût. En effet avec un prix du système de l'ordre de \$ 3000 et un coût des consommables de l'ordre de \$ 70, l'utilisation de ce systèmes peut paraître onéreuse.

Afin de diminuer le coût de ces systèmes intégrés, certaines publications reportent l'utilisation de support papier pour l'aspect microfluidique de leur système [12, 13]. Pour ces deux dernières références, le dispositif microfluidique en papier est alors intégré dans un boîtier dédié où le chauffage de la zone d'amplification est effectué grâce à un élément chauffant par effet Joule et où la détection est basée sur un Lateral Flow (Figure 5.3).

Si pour la référence [12] le séquencage des opérations se fait encore manuellement, dans le cas de la référence [13] l'ensemble des opérations est automatisé grâce à la présence d'un microcontrôleur. Pour ces deux systèmes, l'alimentation électrique est effectuée par deux piles AA (1.5 V), ce qui leur confère une totale autonomie énergétique. Bien que ces derniers systèmes se présentent comme des preuves de concepts

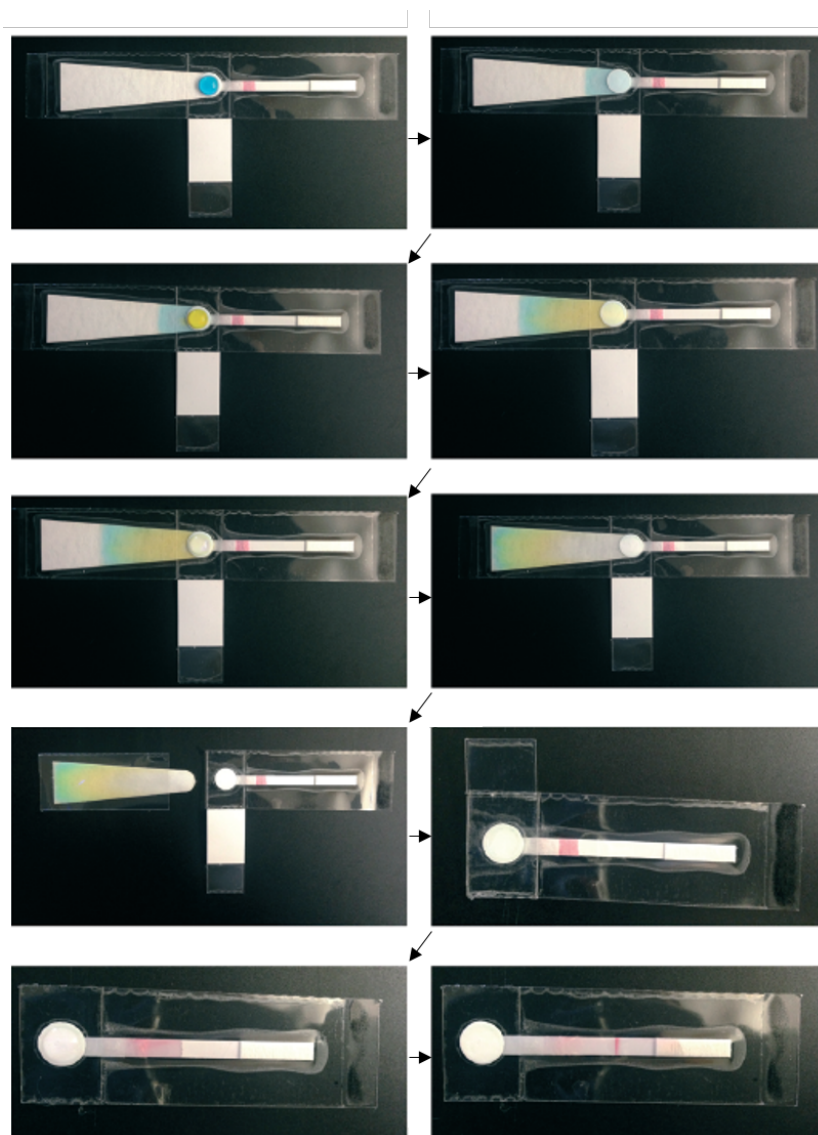


FIGURE 5.2 – Séquences des étapes manuelles pour la réalisation d'une réaction d'amplification d'ADN avec le système présenté en référence [6].

abouties de l'intégration d'un outil de diagnostic par amplification d'ADN, ils ne semblent pas, à l'état actuel, adaptés à une production en série à faible coût.

Ainsi, afin de répondre à ces deux derniers points, le choix a été fait, dans le cadre de cette thèse, de développer les éléments actifs du diagnostic (en l'occurrence le chauffage et la détection électrochimique) de façon à pouvoir les intégrer directement sur le dispositif jetable et non dans un boîtier dédié. La possibilité d'utiliser les technologies d'embossage et d'impression sérigraphique, discutées dans les chapitres précédents, pour une telle intégration est démontrée dans la section suivante.

5.2 L'intégration des briques élémentaires

Au cours du chapitre précédent, le développement de deux briques élémentaires par procédé sérigraphique a été étudié. De plus, lors du chapitre trois de ce manuscrit, un procédé de fabrication de systèmes microfluidiques capillaires par embossage d'un support papier a été développé. L'objet de cette section est de montrer que les choix de ces procédés de fabrication ont été faits dans l'objectif de faciliter l'élaboration d'un système intégré, qui pourrait alors être produit en série à bas-coût.

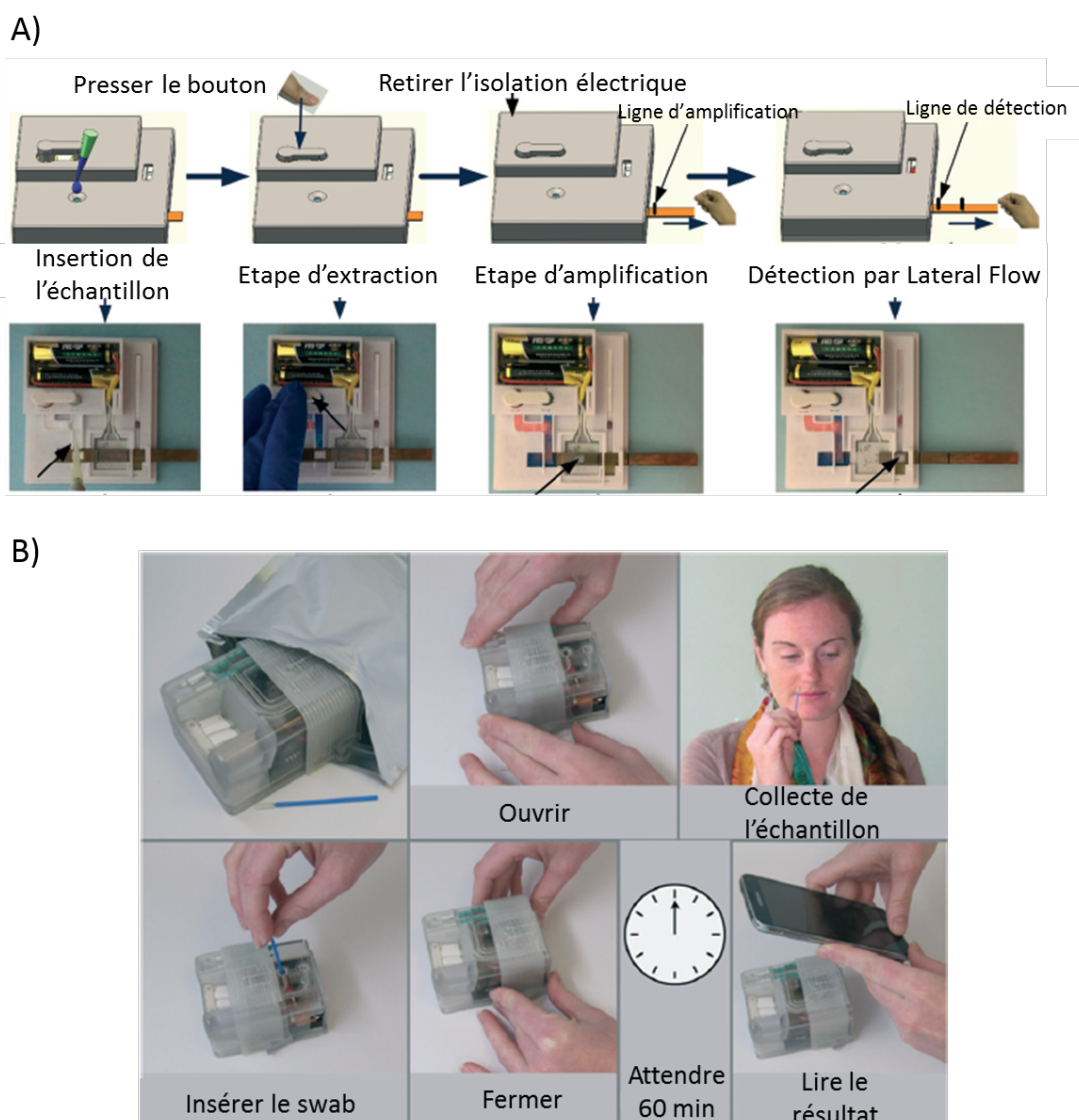


FIGURE 5.3 – Exemples de systèmes où toutes les étapes nécessaires au diagnostic par amplification d'ADN sont intégrées. Extraits de [12] (A) et [13] (B).

Tout d'abord, les premiers pas de la transposition sur papier des fonctions développées dans le chapitre précédent seront discutés. En effet l'objectif étant d'aboutir à des systèmes à très bas-coût, l'utilisation du support papier présente un avantage certain. De plus, la réalisation de ces systèmes à partir d'un support papier présenterait également l'avantage de pouvoir se débarrasser facilement de ces dispositifs en les brûlant, dans le but d'éviter de possibles contaminations.

Cependant, comme nous le verrons ultérieurement, des difficultés ont été rencontrées lors de l'impression des éléments chauffants sur papier. C'est pourquoi la seconde section de ce chapitre utilisera le support plastique pour démontrer les différentes possibilités d'intégrations offertes par les procédés de fabrications choisis. D'une part, il va être montré que le développement des fonctions de chauffage et de détection électrochimique par procédé d'impression permet leur superposition. En d'autres termes, les électrodes peuvent être imprimées sur les éléments chauffants, cet empilement peut alors servir comme un "capot" doublement fonctionnalisé pour des systèmes microfluidiques quelconques. D'autre part, le fait d'utiliser le procédé sérigraphique pour l'impression de ces fonctions, rend ces systèmes imprimés compatibles avec le procédé d'embossage. En effet, la possibilité d'utiliser des encres conductrices présentées comme "étirables" (telle que l'encre DUPONT PE873), alliée à l'épaisseur relativement importante de la couche d'encre

déposée lors d'une impression sérigraphique (de l'ordre de 10 à 15 μm), permet d'éviter une perte de la conduction des pistes imprimées lors de l'étape d'embossage.

5.2.1 Les premiers pas vers un système sur support papier

Compte tenu des résultats prometteurs obtenus lors des premiers tests des éléments chauffants (cf partie 4.1), l'impression d'une petite quantité de ces derniers a été réalisée par Séribase Industries sur support papier. Cependant les résultats de ces impressions n'ont pas permis de poursuivre cette étude. En effet les zones de carbone sérigraphiées présentes de nombreuses fissures (Figure 5.4) qui rendent ces derniers très résistifs, de l'ordre de 40 fois plus résistif que les éléments sur PET. Cette forte résistance des éléments chauffants ne permet pas leur bon fonctionnement car le courant les traversant est extrêmement faible, et ne permet donc pas leur échauffement par effet Joule.



FIGURE 5.4 – Observation de fissures sur les éléments chauffants sérigraphiés sur support papier.

Afin de remédier à l'apparition de ces fissures il semble donc indispensable d'étudier de façon plus approfondie la sérigraphie sur les supports papiers en question et, en particulier, l'étape de recuit des encres. En effet, les différentes couches déposées sur le papier peuvent présenter des coefficients de dilations thermiques différents (entre elles mais également avec le support papier), ce qui peut alors conduire à un effet de tuilage du papier lors du recuit. Ce dernier peut ainsi être à l'origine des micro-fissures et de la perte de conductivité observée.

Une autre approche permettant de se rapprocher d'un système sur support papier aurait été de réaliser un système multi-matériaux : papier-PC. Pour ce dernier, une superposition des éléments sérigraphiés sur PC serait utilisée comme un capot pour un système microfluidique embossé sur papier. Les éléments sérigraphiés étant sur PC, il n'y aurait pas eu besoin d'études supplémentaires quant à leur impression. Cependant la non compatibilité des systèmes papiers développés jusqu'à présent avec la réaction de LAMP n'a pas non plus permis de mettre en oeuvre cette approche.

5.2.2 Démonstration de l'approche sur un support plastique

Afin de valider expérimentalement les différentes intégrations envisagées (*i.e.* superposition et combinaison sérigraphie/embossage), la sérigraphie sur support plastique (PC) a été utilisée. Pour cela les masques de sérigraphie réalisés ont été dessinés avec certaines symétries (figure A1.2). En effet, ces masques présentent des symétries permettant aux électrodes et aux éléments chauffants de se superposer parfaitement lorsque le support subit une rotation de 180° ou lorsque celui-ci est retourné selon son petit côté. La présence de ces symétries permet de réaliser des impressions où les deux éléments fonctionnels sont superposés du même côté du support mais également où les deux éléments fonctionnels se trouvent sur chacune des faces du support. De plus un moule a été dessiné afin de permettre une étape d'embossage des supports imprimés. Nous disposons donc finalement de 6 configurations possibles :

- Impression simple, non embossée.
- Impression superposée des deux éléments, non embossée.
- Impression recto-verso des deux éléments, non embossée.
- Impression simple, embossée.
- Impression superposée et embossée des deux éléments.
- Impression recto-verso et embossée des deux éléments.

La validité de l'approche d'intégration par superposition et embossage des éléments sérigraphiés est exposée dans l'article qui suit. Ce dernier est tiré des proceedings à la conférence TechConnect World Congress 2017. Après une présentation de la technologie de détection électrochimique développée au cours de cette thèse, il est démontré que les électrodes peuvent être sérigraphiées sur un élément chauffant et ce, sans altérer la fonctionnalité de chacune de ces deux briques élémentaires. Il est également montré que l'embossage des électrodes est possible tout en conservant leur fonctionnalité. Cela permet ainsi de créer le système microfluidique directement sur le support de sérigraphie.

Références de la publication

Gosselin D., Gougis M., Baque M., Maffini-Alvaro V., Mailley P., Bourdat A.-G., Revol-Cavalier F., Vignoud S., Navarro E., Belgacem M.N., Chaussy D., Berthier J., 2017. Low-cost screen printed and embossed LAMP micro-reactors. Nanotech 2017 Conference.

Lien web : <https://www.techconnect.org/proceedings/paper.html?volume=TCB2017v3&chapter=6&paper=388>

5.2.3 Vers un système totalement intégré et sur papier

Si le développement d'un système intégrant l'étape de chauffage et l'étape de détection électrochimique n'a pas été validé sur support papier, les avancées effectuées au cours de cette thèse sont encourageantes quant à une telle possibilité. Afin de poursuivre l'exploration de cette thématique, un projet européen sera réalisé et une demande d'ANR devrait être déposée.

Notons également que l'intégration démontrée ici n'est pas totale car l'aspect de préparation d'échantillon n'a pas été traité au cours de cette thèse. Cet aspect doit également faire l'objet de travaux à la suite de cette thèse, notamment dans le cadre du projet européen.

5.3 Conclusion

En conclusion, il a été montré dans ce chapitre que l'intégration des différentes fonctions nécessaires à une réaction d'amplification d'ADN n'est pas triviale lorsque l'on souhaite répondre à la liste des critères ASSURED. En particulier, l'élaboration d'un système autonome, facile d'utilisation et qui puisse être produit à bas-coût reste encore aujourd'hui un défi. Au cours de ce chapitre il a été démontré que l'association des procédés d'impression sérigraphique et d'embossage permet d'intégrer un élément chauffant ainsi que les électrodes nécessaires à une détection électrochimique directement dans le composant microfluidique. Grâce à cette approche, il n'est plus nécessaire de développer, en plus du système microfluidique, un boîtier apportant ces fonctions. La fabrication du système final s'en trouve donc simplifiée et possible à bas-coût. Dans le cadre de cette thèse différentes preuves de concept de cette approche ont été effectuées sur support plastiques. En revanche, le transfert sur support papier ainsi que l'intégration de la préparation d'échantillon doivent faire l'objet d'études ultérieures à cette thèse.

Bibliographie

- [1] A. Priye, S. W. Bird, Y. K. Light, C. S. Ball, O. A. Negrete, and R. J. Meagher, "A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 44778, Mar. 2017.
- [2] X. Qiu, S. Ge, P. Gao, K. Li, S. Yang, S. Zhang, X. Ye, N. Xia, and S. Qian, "A smartphone-based point-of-care diagnosis of H1N1 with microfluidic convection PCR," *Microsystem Technologies*, pp. 1–6, May 2016.
- [3] L. Magro, B. Jacquelin, C. Escadafal, P. Garneret, A. Kwasiborski, J.-C. Manuguerra, F. Monti, A. Sakuntabhai, J. Vanhomwegen, P. Lafaye, and P. Tabeling, "Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 1347, May 2017.
- [4] G. L. Damhorst, C. Duarte-Guevara, W. Chen, T. Ghonge, B. T. Cunningham, and R. Bashir, "Smartphone-Imaged HIV-1 Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) on a Chip from Whole Blood," *Engineering*, vol. 1, pp. 324–335, Sept. 2015.
- [5] S.-C. Liao, J. Peng, M. G. Mauk, S. Awasthi, J. Song, H. Friedman, H. H. Bau, and C. Liu, "Smart cup : A minimally-instrumented, smartphone-based point-of-care molecular diagnostic device," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 229, pp. 232–238, June 2016.
- [6] N. M. Rodriguez, W. S. Wong, L. Liu, R. Dewar, and C. M. Klapperich, "A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples," *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 753–763, Feb. 2016.
- [7] J. T. Connelly, J. P. Rolland, and G. M. Whitesides, "'Paper Machine' for Molecular Diagnostics," *Analytical Chemistry*, vol. 87, pp. 7595–7601, Aug. 2015.
- [8] J. R. Choi, J. Hu, R. Tang, Y. Gong, S. Feng, H. Ren, T. Wen, X. Li, W. A. B. W. Abas, B. Pingguan-Murphy, and F. Xu, "An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care," *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 611–621, Jan. 2016.
- [9] "Micronics Microfluidics | Lab Automation and Nanotechnology." <https://www.micronics.net/products/diagnostic-products/PanNAT>.
- [10] "FilmArray ME Panel (Meningite Encephalite) - Diagnostic Clinique | bioMerieux France." <http://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/filmarray-me-panel-meningiteencephalite>.
- [11] "Cepheid | GeneXpert Omni." <http://www.cepheid.com/us/genexpert-omni>.
- [12] R. Tang, H. Yang, Y. Gong, M. You, Z. Liu, J. R. Choi, T. Wen, Z. Qu, Q. Mei, and F. Xu, "A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection," vol. 17, pp. 1270–1279, Mar. 2017.
- [13] L. K. Lafleur, J. D. Bishop, E. K. Heiniger, R. P. Gallagher, M. D. Wheeler, P. Kauffman, X. Zhang, E. C. Kline, J. R. Buser, S. Kumar, S. A. Byrnes, N. M. J. Vermeulen, N. K. Scarr, Y. Belousov, W. Mahoney,

B. J. Toley, P. D. Ladd, B. R. Lutz, and P. Yager, "A rapid, instrument-free, sample-to-result nucleic acid amplification test," *Lab on a Chip*, Aug. 2016.

Conclusion

Au début du manuscrit, la problématique d'intégration des systèmes microfluidiques destinés au diagnostic médical de type Point-of-Care ou Home-Care a été établie. En effet pour que de tels systèmes soient utilisables en toutes conditions, ils doivent notamment être portables et autonomes. L'organisation mondiale de la santé a défini une liste de pré-requis plus exhaustive avec le critère *ASSURED* : Affordable, Specific, Sensitive, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered. Afin qu'un système puisse répondre pleinement à l'ensemble de ces critères, il est alors indispensables que les différents acteurs du développement de ces systèmes travaillent de façon coordonnée. En particulier l'ensemble des contraintes liées au produit final doit être pris en compte pour le développement de chacune des briques technologiques du système.

Pour atteindre cet objectif, différents types de diagnostics ont, dans un premier temps, été étudiés et le choix de focaliser ce travail sur un diagnostic basé sur une réaction d'amplification isotherme de type LAMP a été fait. En effet, il s'agit d'une méthode ayant une forte sensibilité, qui est rapide et qui est plus simple à mettre en place que la technique d'amplification standard de PCR. Dans ce premier chapitre les choix du matériau et du procédé de fabrication ont également été analysés. Le papier et les polymères, matériaux à bas coût, ont été sélectionnés. En ce qui concerne le procédé de fabrication, la technique de thermoformage, et plus précisément d'embossage, a été retenue. En effet ce dernier permet d'élaborer une structuration sur des feuilles de papier ou de polymère avec des coûts raisonnables pour des moyennes séries. D'autre part, la réalisation d'un système de diagnostic basé sur une réaction de LAMP implique la présence d'un élément de chauffage ainsi que d'un élément de détection. Pour l'élaboration de ces deux briques fonctionnelles, l'utilisation du procédé de sérigraphie a été choisi. Ce choix repose sur le fait que ce procédé d'impression permet le dépôt d'éléments conducteurs de façon simple et compatible avec la production en moyenne série. De plus, la réalisation de ces éléments sera faite dans l'optique que le système puisse être alimenté à faible tension (5V), notamment grâce à un smartphone ou le port USB d'un ordinateur. Finalement le principe d'écoulements capillaires spontanés a été sélectionné afin d'apporter un maximum d'autonomie au système final.

Le second chapitre de ce manuscrit s'est focalisé sur l'étude théorique des écoulements capillaires spontanés (SCF). Tout d'abord une étude sur les conditions de présence d'un écoulement capillaire spontanée a été menée. Si une condition, liant l'angle de contact et la géométrie du canal, était déjà connue pour la présence d'un écoulement capillaire spontané dans un canal de section uniforme, le cas des canaux divergents a été étudié. En particulier il a été montré que la condition de présence d'un SCF dans un canal présentant des parois divergentes est plus stricte que pour un canal de section uniforme. En effet l'inclinaison des parois par rapport à la direction de l'écoulement impacte la courbure de l'interface et donc la pression capillaire, moteur de l'écoulement. Ensuite la dynamique des écoulements capillaires spontanés a également été étudiée. Le cas d'un écoulement Newtonien dans un canal uniforme, connu dans la littérature, a été généralisé d'une part aux fluides non Newtonien et d'autre part aux canaux de sections non uniformes.

L'étude de la dynamique des écoulements non Newtonien a été illustrée par une approche expérimentale de l'écoulement du sang. Il a été montré que l'équation établie à partir des équations de Navier-Stokes et de Herschel-Bulkley permettait de décrire un tel écoulement. L'écoulement capillaire dans des canaux de section non uniforme a, quand à lui, été analysé dans le cas d'écoulement de fluides Newtoniens. Les études en résultant ont notamment montré que la présence d'une constriction permettait d'effectuer un ralentissement global de l'écoulement alors que la présence d'un élargissement constituait un ralentissement local de l'écoulement. Le cas des écoulements dans des canaux possédant une courbure a ensuite été étudié. Pour ce dernier cas, il ressort que, à part si des filaments de Concus-Finn sont présents, l'impact des virages dans les canaux microfluidiques est faible sur l'écoulement.

Le troisième chapitre de ce manuscrit présente un nouveau procédé de fabrication de systèmes microfluidiques par embossage de papier. Ce dernier permet, grâce à un support fibreux cellulosique revêtu d'une couche étanche et hydrophile, de créer, par embossage, des canaux microfluidiques à la surface de ce dernier permettant un écoulement capillaire spontané. Il a notamment été démontré qu'à la fois des écoulement en canaux ouverts et fermés pouvaient être obtenus mais également qu'un tel système pouvait permettre la réalisation d'un test de glycémie colorimétrique. Ce procédé de fabrication est actuellement en cours d'optimisation afin de permettre la réalisation d'une réaction de LAMP dans un système papier embossé. En effet, si la problématique d'évaporation du liquide à travers les couches polymères déposées a été solutionnée par l'insertion d'un feuillet d'aluminium, la réaction de LAMP subie actuellement toujours une inhibition dans ces systèmes.

Le quatrième chapitre de cette thèse a porté sur le développement et l'étude de deux briques fonctionnelles nécessaires pour notre application : le chauffage et la détection. Dans ce chapitre les deux briques ont été développées de façon séparée. Dans un premier temps il a été établi que le procédé de sérigraphie permettait, grâce aux dépôts successifs de couches fonctionnelles, l'élaboration d'éléments chauffants par effet Joule. Ce système est capable d'atteindre la température de 65°C, nécessaire à la LAMP, sous faible tension (5 V). Pour ces éléments, il a été montré qu'il était possible de prédire leur température de chauffage en fonction de leur géométrie et de la tension appliquée. Cela permet donc de spécifier les dimensions de l'élément chauffant afin d'obtenir la température requise avec le voltage souhaité. Il a également été montré que l'intégration d'une chambre microfluidique superposée à ces derniers, bien qu'ayant une influence sur la dynamique du chauffage, n'a qu'un très faible impact sur la température d'équilibre.

La seconde partie de ce quatrième chapitre a, quant à elle, traitée la problématique de la détection d'une réaction de LAMP. Une méthode de mesure potentiométrique du pH grâce à des électrodes à base de PolyAniline (PAni) a alors été développée. En effet, il se trouve que les ions hydroniums sont des produits secondaires de la réplication des brins d'ADNs. Plus précisément, à chaque ajout d'une base nucléique sur un brin d'ADN par l'ADN polymérase, un ion hydronium est produit. Le suivi de la concentration de ces ions, *i.e.* du pH, permet ainsi de suivre l'activité enzymatique et donc la réaction d'amplification d'ADN. Il a été choisi d'effectuer la mesure du pH par potentiométrie grâce à des électrodes de PAni car la réalisation de ces dernières est compatible avec le procédé de sérigraphie et que l'électronique associée à une telle mesure peut être intégrée dans un système portable communiquant les données *via* Bluetooth et fonctionnant avec 5V. Dans un premier temps l'étude a confirmé que ces électrodes imprimées permettaient bien une mesure du pH. Une sensibilité de -83 mV/pH , cohérente avec les données de la littérature, a été déterminée à 22°C. De même, le suivi de la réaction de LAMP en temps réel par cette mesure potentiométrique a été vérifiée. De plus, une comparaison avec une mesure par fluorescence (méthode de référence) montre que la détection potentiométrique présente une sensibilité comparable à cette dernière. L'effet de la température sur cette mesure potentiométrique a été observé mais s'est révélé complexe et n'a pas pu être traité durant

le temps imparti à cette thèse. Néanmoins, il a été montré que le changement de température associé au refroidissement en fin de la réaction de LAMP permettait également de discriminer les échantillons positifs des échantillons négatifs.

Finalement le cinquième chapitre de ce manuscrit s'est attaché à démontrer que l'ensemble du travail effectué au cours de cette thèse a été réalisé dans une logique cohérente d'intégration système. D'une part, le fait d'utiliser un procédé d'impression permet à la fois d'élaborer et de superposer les éléments chauffants et les électrodes de pH. Un tel élément imprimé peut alors ensuite être apposé en tant que capot sur une chambre microfluidique en apportant deux fonctions essentielles pour la réaction d'amplification d'ADN : le chauffage et la détection. D'autre part, le couplage du procédé d'embossage à l'étape de sérigraphie permet la réalisation de micro-réacteur LAMP embossé dans lesquels les fonctions sérigraphiées sont intégrées. Si le dépôt par sérigraphie de ces briques fonctionnelles n'a pas pu être réalisée sur support papier au cours de cette thèse, l'utilisation de supports plastiques (supports bien connus de l'industrie sérigraphique) a permis de valider ces concepts d'intégrations. Dans l'objectif de poursuivre les travaux réalisés au cours de cette thèse, un projet européen sera réalisé et une demande d'ANR devrait être déposée. Ces derniers ont notamment pour but d'effectuer la transposition de ces concepts sur support papier mais également d'intégrer les étapes de préparation d'échantillon nécessaires pour l'autonomie du diagnostic.

Annexes

A1 Vue supérieure des masques de sérigraphies

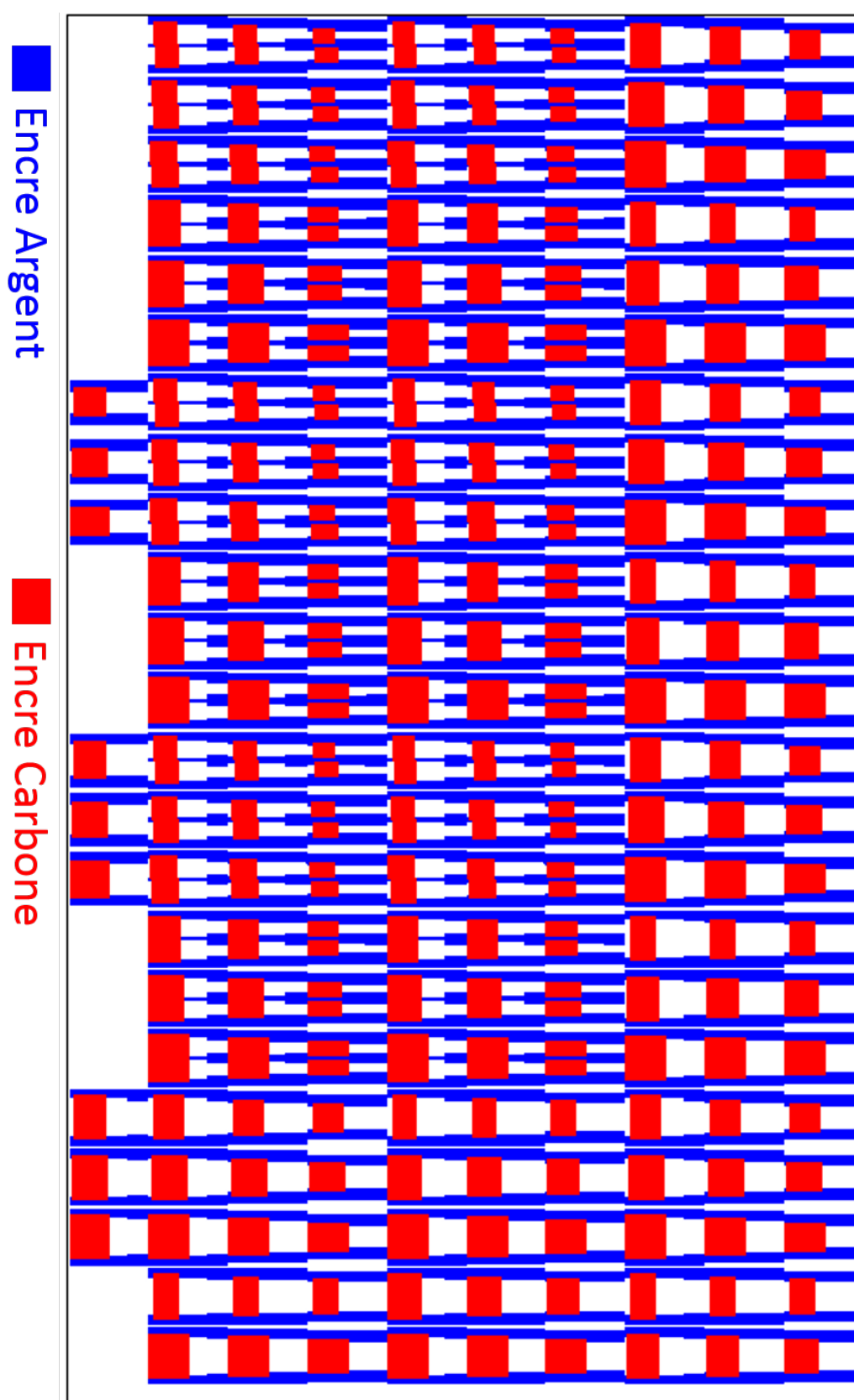


FIGURE A1.1 – Schéma de l'ensemble de la planche des éléments hauffants sérigraphiés.

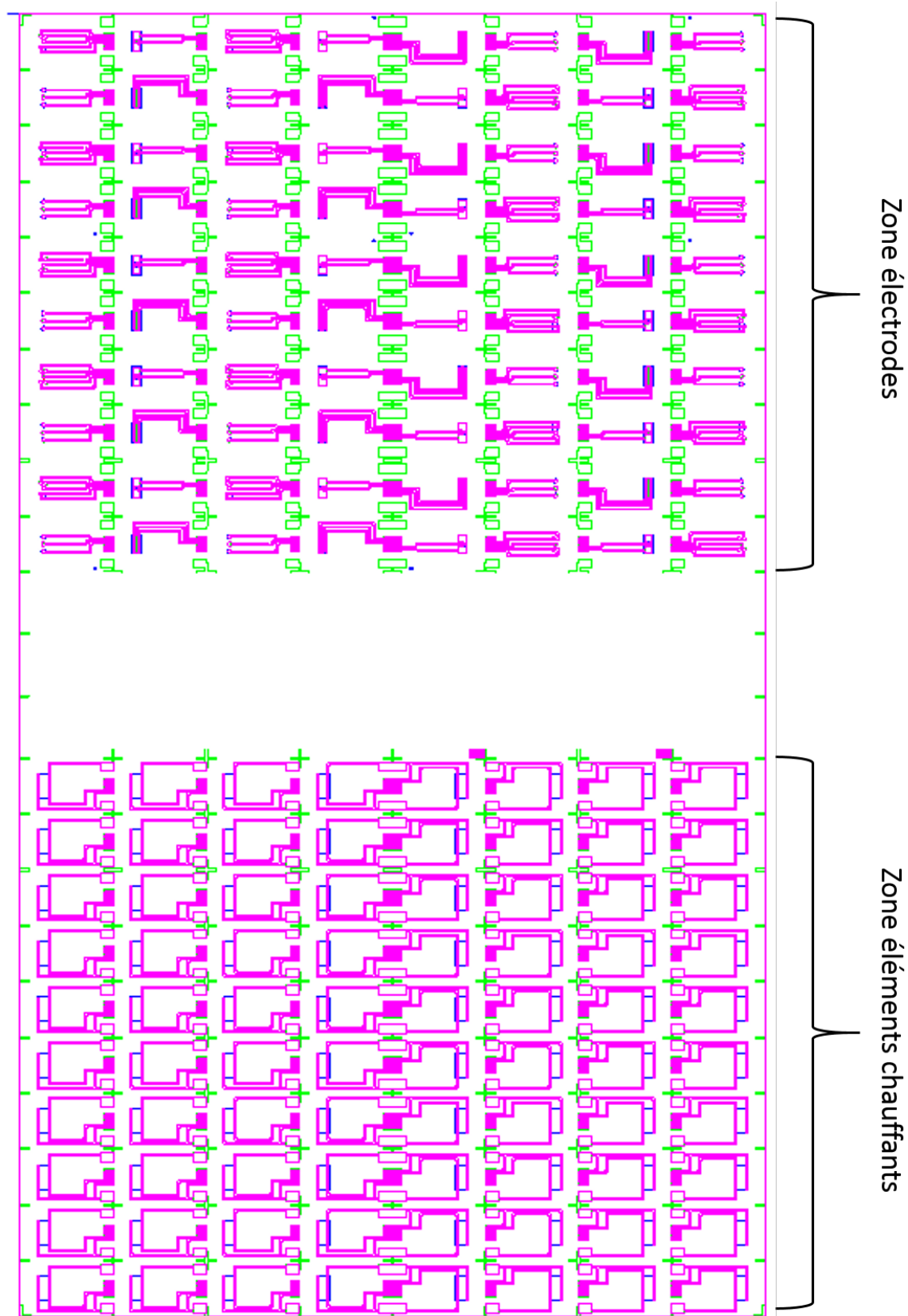


FIGURE A1.2 – Schéma de l'ensemble de la planche de sérigraphie comprenant électrodes et éléments chauffants.

A2 Annexe : Calcul des concentrations des différentes espèces dans les solutions de PBS

La détermination de la concentration des différentes espèces ioniques dans notre gamme de solutions de PBS, se fait par la résolution d'un système de 10 équations à 10 inconnues. Afin d'établir ces équations, commençons par lister les différentes espèces ioniques et les différentes réactions pouvant avoir lieu dans une telle solution.

Mise en place du système d'équations

Le tableau A2.1, résume les différentes espèces utilisées pour la préparation d'une solution de PBS classique [1], ainsi que leur quantité et leur solubilité. Compte tenu des faibles quantités (par rapport à leur solubilité) des espèces utilisées, la solubilisation est totale pour chacune d'elles.

Espèce	Quantité (en mmol)	Solubilité (en mol/L) dans de l'eau à 20°C	Solubilité (en g/L) dans de l'eau à 20°C
$NaCl$	137	6,13 mol/L	358,5 g/L
KCl	2,7	4,56 mol/L	340 g/L
Na_2HPO_4	10	0,54 mol/L	77 g/L
KH_2PO_4	1,8	1,66 mol/L	226 g/L

Tableau A2.1 – Tableau résumant la composition des espèces utilisées pour la préparation d'une solution de PBS.

Les réactions considérées pour les calculs effectués par la suite, ainsi que leur constante de réaction, sont résumées dans le tableau A2.2.

Réaction	Constante de réaction
$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$	$K_e = [H^+][OH^-] = 10^{-14}$
$H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+$	$K_{a1} = \frac{[H_2PO_4^-][H^+]}{[H_3PO_4]} = 10^{-2,15}$
$H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+$	$K_{a2} = \frac{[HPO_4^{2-}][H^+]}{[H_2PO_4^-]} = 10^{-7,2}$
$HPO_4^{2-} \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H^+$	$K_{a3} = \frac{[PO_4^{3-}][H^+]}{[HPO_4^{2-}]} = 10^{-12,32}$

Tableau A2.2 – Tableau résumant les réactions se produisant dans la solution ainsi que leur constante de réaction.

Les équations des constantes de réactions décrites dans le tableau A2.2, sont quatre équations définissant l'état d'équilibre du système chimique. Lors de l'ajout de HCl pour acidifier les solutions de PBS, un déplacement de cette position d'équilibre aura lieu selon les équations suivantes.

- $n(OH^-)_f = n(OH^-)_i + \epsilon_e$
- $n(PO_4^{3-})_f = n(PO_4^{3-})_i + \epsilon_1$
- $n(HPO_4^{2-})_f = n(HPO_4^{2-})_i + \epsilon_2 - \epsilon_1$
- $n(H_2PO_4^-)_f = n(H_2PO_4^-)_i + \epsilon_3 - \epsilon_2$
- $n(H_3PO_4)_f = n(H_3PO_4)_i - \epsilon_3$
- $n(H^+)_f = n(H^+)_i + \epsilon_1 + \epsilon_2 + \epsilon_3 + \epsilon_e + n(H^+)_a$

où les indices $n(X)_i$ et $n(X)_f$ signifient, respectivement, la quantité d'espèce X à l'état initiale et finale. ϵ_e correspond à l'état d'avancement de la réaction d'autoprotolyse. Les variables ϵ_1 , ϵ_2 et ϵ_3 correspondent

quant à elles à l'état d'avancement de la première, seconde et troisième réaction d'oxydation de l'acide phosphorique, respectivement.

La combinaison de ces différentes équations résulte finalement en un système de dix équations à dix inconnues ($n(\text{H}^+)_f$, $n(\text{OH}^-)_f$, $n(\text{PO}_4^{3-})_f$, $n(\text{HPO}_4^{2-})_f$, $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-)_f$, $n(\text{H}_3\text{PO}_4)_f$, ϵ_e , ϵ_1 , ϵ_2 et ϵ_3).

Calcul des concentrations des différentes espèces

Selon le protocole décrit en référence [1], l'ensemble des réactifs sont dissout dans 800 mL puis le pH de cette solution est ajuster à 7,4 à l'aide de HCl. En résolvant le système d'équations précédent, on trouve que la solution après mélange est à $\text{pH} = 7,93$ et que l'ajout de 2,65 mL de HCl 1M permet d'effectuer l'ajustement en pH. L'ensemble des ions Cl^- étant dissocié, la solution de PBS contient ainsi une concentration de 142,35 mM.

La résolution de ce système d'équations permet également de déterminer la quantité de HCl à ajouter pour ajuster une solution de PBS à un certain pH et ainsi déterminer la concentration en ion Cl^- de la solution finale.

A3 Annexe : Evolution du pH de l'eau avec la température

Le but de cette annexe est de montrer l'influence que peut avoir la température sur le pH d'une solution aqueuse, à travers son impact sur la constante d'autoprotolyse de l'eau. L'équation de cette dernière réaction est décrite par l'équation A3.1. La constante de réaction associée, Ke , est donnée par l'équation A3.2.



$$Ke = [H^+] [OH^-] \quad (A3.2)$$

Le pKe de cette réaction peut alors être défini selon l'équation A3.3.

$$pKe = -\log(Ke) \quad (A3.3)$$

$$= -\log([H^+]) - \log([OH^-]) \quad (A3.4)$$

$$= pH + pOH \quad (A3.5)$$

Si on part d'une solution ayant initialement un pH noté pH_i , les concentrations en ions hydroniums et hydroxydes peuvent s'écrire selon les équations A3.6 et A3.7.

$$[H^+]_i = 10^{-pH_i} \quad (A3.6)$$

$$[OH^-]_i = 10^{pH_i - pKe_i} \quad (A3.7)$$

où les indices i stipulent qu'il s'agit de l'état initial.

En changeant la température, on change le Ke de la réaction d'autoprotolyse de l'eau selon l'équation A3.8[2].

$$\log(Ke) = 4.098 - 3245.2/T + (2.2362 * 10^5)/T^2 - (3.984 * 10^7)/T^3 \quad (A3.8)$$

Ainsi lorsque l'on change la température, les concentrations en ions hydroniums et hydroxydes s'adaptent de façon à satisfaire l'équation A3.9.

$$Ke_f = [H^+]_f * [OH^-]_f \quad (A3.9)$$

où les indices f stipulent qu'il s'agit de l'état final.

Or, du fait de la stoechiométrie 1/1 de la réaction d'autoprotolyse de l'eau, il y a autant d'ions H^+ que d'ions OH^- qui sont formés (ou détruits). Les concentrations en ions hydroniums et hydroxydes peuvent donc s'écrire selon les équations A3.10 et A3.11.

$$n(H^+)_f = n(H^+)_i + n(H^+)_r = n(H^+)_i + n_r \quad (A3.10)$$

$$n(OH^-)_f = n(OH^-)_i + n(OH^-)_r = n(OH^-)_i + n_r \quad (A3.11)$$

où la lettre r indice les changement de quantité de matière dus à la réaction.

En injectant les équations A3.10 et A3.11 dans l'équation A3.9, on obtient finalement une équation du second degré (équation A3.12).

$$Ke_f = Ke_i + C_r * (10^{-pH_i} + 10^{pH_i - pKe_i}) + C_r^2 \quad (A3.12)$$

avec $C_r = n_r/V$, où V est le volume.

En résolvant cette dernière équation, et en utilisant l'équation A3.10, on obtient l'expression du pH pour la solution portée à la nouvelle température (équation A3.13).

$$pH_f = -\log \left(10^{-pH_i} + \frac{\left(- (10^{-pH_i} + 10^{pH_i - pKe_i}) + \left((10^{-pH_i} + 10^{pH_i - pKe_i})^2 - 4 * (Ke_i - Ke_f) \right) \right)}{2} \right) \quad (A3.13)$$

En effectuant une application numérique, on trouve que si on chauffe à 65°C, une solution ayant un pH de 9 à 25°C, on obtient un pH de 7,8. L'impact du changement de la température sur le pH d'une solution aqueuse n'est donc effectivement pas négligeable.

Bibliographie

- [1] “Phosphate-buffered saline (PBS).” <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>.
- [2] W. L. Marshall and E. U. Franck, “Ion product of water substance, 0–1000 °C, 1–10,000 bars New International Formulation and its background,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 10, pp. 295–304, Apr. 1981.

Résumé en français

Grâce aux technologies de la microfluidique (i.e. la manipulation d'un fluide dans un système ayant une dimension caractéristique sub-millimétrique), il est possible d'imaginer l'intégration de l'ensemble des fonctions ordinairement réalisées en laboratoire dans un système miniaturisé, réalisant ainsi un laboratoire sur puce. Cela peut ainsi permettre d'allier efficacité et bas-coût requis pour la réalisation de dispositif de diagnostics médicaux utilisable en dehors d'infrastructure médicalisée, souvent appelés systèmes Point-of-Care. Pour la réalisation d'un tel dispositif, il semble important de concevoir l'intégration des différents composants du système d'une façon cohérente, et en prenant en compte l'ensemble des contraintes imposées par l'application finale ciblée. Le travail effectué au cours de cette thèse a ainsi été réalisé dans l'optique de proposer une réponse à cette problématique d'intégration dans le cadre du développement d'un système microfluidique de diagnostic Point-of-Care basé sur une réaction d'amplification d'ADN isotherme LAMP. Afin de pouvoir proposer un système bon marché et dont l'industrialisation est aisée, nous avons fait appel à l'utilisation du papier comme support et au thermoformage comme moyen de production. En effet à la fois l'industrie papetière et le procédé de thermoformage sont d'ores et déjà existant et proposent des fabrications en série. De plus, le faible coût du matériau et du procédé en question permettent d'envisager un dispositif final à bas-coût. Afin de pouvoir effectuer et détecter la réaction de LAMP la présence de fonctions actives telles qu'un chauffage et un outil de détection est nécessaire. Pour ces dernières, l'intégration a été réalisée par procédé sérigraphique. Le chauffage est effectué par effet Joule grâce au dépôt d'une couche d'encre conductrice à base de carbone. La détection est quant à elle faite par méthode potentiométrique, à l'aide d'électrode couverte de polyaniline. Il sera également montré que l'utilisation de ces méthodes de fabrication est pertinente en termes d'intégration car elles permettent une superposition des différentes fonctions actives, mais également leur intégration directement dans le système microfluidique.

English summary

Developments of microfluidics - the study of flows at the sub-millimetric dimensions - have made possible the integration of most of the macroscopic functions of laboratory fluidic systems in a miniaturized system, thus realizing a lab on a chip. This allows the conception of low cost, sensitive and efficient medical diagnostic device usable outside of a medical infrastructure. Such devices are called Point-of-Care (PoC) systems. The design and fabrication of such devices requires an elaborated and coherent integration that takes into account all the constraints imposed by the targeted final application. The work reported here, and performed during the PhD internship, is focused on the study of the concept and development of the integration of a PoC device based on the isothermal LAMP (Loop mediated AMPlification) reaction for the molecular analysis of DNA. In order to offer a cheap and easily industrialized system, we investigate the use of paper as the chip material and thermoforming as the mean to build the channels. These two techniques are currently used in the industry and their adaptation to the fabrication of such devices is easy and low-cost. In order to perform a LAMP reaction, specific functions such as a heating and a detection system are required. The integration of these functions was carried out using screen printing technology. Heating is done by Joule effect using a layer of carbon-based conductive ink. Detection is performed by a potentiometric method, using polyaniline-covered electrodes. It is shown that this approach is compatible with integration when the screen-printing layers are superposed. Besides they can be printed before thermoforming, resulting in a highly integrated system.