



HAL
open science

Développement d'une plateforme autonome et portable et pour des applications santé

Charlotte Parent

► **To cite this version:**

Charlotte Parent. Développement d'une plateforme autonome et portable et pour des applications santé. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAY037 . tel-01996023

HAL Id: tel-01996023

<https://theses.hal.science/tel-01996023>

Submitted on 28 Jan 2019

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 : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Charlotte PARENT

Thèse dirigée par **Yves FOUILLET**, ingénieur de recherche, CEA et
coencadrée par **Nicolas VERPLANCK**, ingénieur de recherche, CEA
et **Jean Luc ACHARD**, Directeur de recherche CNRS, LEGI.

préparée au sein du **Laboratoire systèmes microfluidiques et
bioingénierie – CEA-Leti/DTBS**
dans l'École Doctorale de Physique

Développement d'une plateforme autonome et portable pour des applications santé

Thèse soutenue publiquement le « 8 octobre 2018 », devant le jury
composé de :

M, Michel, PONS

Directeur de recherche CNRS, SIMAP, Président

M, Bruno, LE PIOUFLE

Professeur, Ecole normale supérieure Paris-Saclay, Rapporteur

M, Vincent, THOMY

Maitre de conférence, Université de Lille 1, Rapporteur

Mme, Anais, ALI CHERIF

Ingénieur, Horiba Montpellier, Examinatrice

Mme, Rose-Marie, SAUVAGE

Ingénieur, DGA Paris, Membre invitée



Table des matières

Table des matières	3
Introduction générale	9
Chapitre I: Dispositifs portables pour des analyses biologiques	11
I.1. Les différentes techniques d'analyses	13
I.1.1. L'amplification d'ADN.....	13
I.1.2. Les tests immunologiques	14
I.1.3. Complémentarité entre le test ELISA et l'amplification d'ADN.	19
I.2. Intérêt d'un diagnostic de terrain dans les différents domaines	20
I.2.1. Domaine médical	21
I.2.2. Domaine de l'environnement	23
I.2.3. Domaine de l'agro-alimentaire.....	23
I.2.4. Domaine vétérinaire.....	24
I.3. Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome	24
I.3.1. Choix du protocole.....	24
I.3.2. Critères définis par l'OMS	26
I.3.3. Définition de l'ensemble des critères à respecter.....	27
I.3.4. Exemples de tests ELISA de terrain pour chacun de ces critères	30
I.4. Etat de l'art des gammes de dilution dans des systèmes microfluidiques	40
I.4.1. Microfluidique continue	40
I.4.2. Microfluidique digitale et gamme de dilution en cascade.....	40
I.4.3. Microfluidique digitale et gamme de dilution linéaire.....	43
I.5. Etat de l'art des méthodes de stockage des réactifs	45
I.6. Conclusion	49
Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif	53
II.1. Contexte initial : la plateforme FlowPad	55
II.2. Architecture fluidique	57
II.2.1. Approche continue.....	57
II.2.2. Approche discrète.....	61
II.2.3. Choix de l'approche et de l'architecture.....	63
II.3. Techniques de contrôle des fluides dans une carte	64
II.3.1. Types de vannes.....	65
II.3.2. Chambres fixes	67

II.3.3. Chambres à volume variable	74
II.4. Bilan : choix de la technique de contrôle de fluides	77
II.5. Pilotage pneumatique	78
II.5.1. Banc expérimental.....	79
II.5.2. Adressage pneumatique et multiplexage.....	81
II.5.3. Programmation des étapes du protocole.....	82
II.5.4. Bilan du pilotage pneumatique.....	87
II.6. Réalisation de la cartouche microfluidique.....	87
II.6.1. Conception de la cartouche microfluidique.....	87
II.6.2. Carte microfluidique.....	88
II.6.3. Membrane élastique.....	91
II.6.4. Assemblage des cartes microfluidiques et du film étirable.....	93
II.7. Conclusion	97
Chapitre III: Intégration d'une gamme de dilution dans un protocole avec calibration	99
III.1. Gamme de dilution : principes à la base de son intégration.....	102
III.2. Gamme de dilution : mise au point du mode de fonctionnement et observations préliminaires	105
III.2.1. Architecture de la carte.....	106
III.2.2. Programmation	107
III.2.3. Observations préliminaires qualitatives.....	109
III.2.4. Observations préliminaires quantitatives	112
III.2.5. Bilan des expériences préliminaires	113
III.3. La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.....	114
III.3.1. Optimisation des chambres	114
III.3.2. Règles de conception	116
III.3.3. Dimensionnement des vannes.....	117
III.3.4. Compensation des volumes morts des canaux fluidiques.....	120
III.3.5. Bilan des règles de conception définies.....	123
III.4. Etudes préliminaires sur la dynamique de mélange	123
III.4.1. Visualisation du mélange.....	124
III.4.2. Transferts fluidiques.....	125
III.5. Protocole de test enzymatique : validation d'une gamme de dilution.....	132
III.5.1. Le test enzymatique	132
III.5.2. Dimensionnement de la gamme de dilution pour le test enzymatique	134

III.5.3. Programmation	135
III.5.4. Validation de la gamme de dilution	135
III.6. Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet.....	138
III.6.1. Adaptation du protocole du test de glycémie.....	138
III.6.2. Démarche utilisée pour valider le test enzymatique dans une carte microfluidique	140
III.6.3. Première validation intermédiaire.....	140
III.6.4. Deuxième validation intermédiaire.....	142
III.6.5. Validation complète	149
III.7. Conclusions et perspectives	157
Chapitre IV: Validation de tests ELISA	161
IV.1. Gamme de dilution pour le test ELISA	163
IV.1.1. Dimensionnement.....	163
IV.1.2. Validation fluidique.....	165
IV.1.3. Validation quantitative	165
IV.2. Test ELISA en phase homogène	167
IV.2.1. Protocole.....	167
IV.2.2. Adaptation du protocole de test ELISA en phase homogène.....	169
IV.2.3. Dimensionnement.....	170
IV.2.4. Adressage pneumatique.....	172
IV.2.5. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.....	173
IV.2.6. Validation du protocole de test ELISA en phase homogène dans une carte microfluidique	176
IV.3. Bilan de la validation du test ELISA en phase homogène	180
IV.4. Test ELISA en phase hétérogène.....	181
IV.4.1. Choix du protocole.....	182
IV.4.2. Démarche de développement d'une carte microfluidique pour les protocoles ELISA hétérogène.....	184
IV.4.3. Test du kit et adaptation du protocole.....	184
IV.4.4. Dimensionnement.....	188
IV.4.5. Adressage pneumatique.....	190
IV.4.6. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.....	193
IV.4.7. Validation fluidique.....	197
IV.4.8. Fonctionnalisation.....	198
IV.4.9. Expériences préliminaires	199

IV.4.10. Optimisation de la phase de lavage dans la carte microfluidique.....	204
IV.4.11. Validation quantitative du test ELISA en phase hétérogène	208
IV.5. Conclusions et perspectives	212
Chapitre V: Développement d'un démonstrateur portable et autonome.....	215
V.1. Développement de l'instrument	217
V.1.1. Cahier des charges.....	217
V.1.2. Choix du microcontrôleur.....	219
V.1.3. Génération de la pression	221
V.1.4. Régulation de la pression.....	224
V.1.5. Réseau pneumatique associé aux sources de pressions.....	225
V.1.6. Pilotage des électrovannes.....	228
V.1.7. Pilotage de l'instrument via un écran tactile et premiers tests	230
V.1.8. Conception du circuit électronique.....	232
V.1.9. Système final à intégrer.....	236
V.1.10. Conception du boîtier	237
V.1.11. Assemblage de l'instrument.....	238
V.1.12. Première application : utilisation de cet instrument pour la fête de la science 2017	242
V.1.13. Bilan et validation à la fête de la science	248
V.2. Intégration des réactifs	249
V.2.1. Description de la technique développée.....	249
V.2.2. Validation : couplage de cette technique avec une gamme de dilution et utilisation de l'instrument pour piloter cette carte.....	253
V.3. Conclusions et perspectives.....	256
Conclusion Générale	259
Annexes	263
Bibliographie	271

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire « systèmes microfluidiques et bioingénierie » (LSMB) au sein du commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA). Je remercie tout d'abord le CEA et la direction générale de l'armement (DGA) d'avoir accepté de financer cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir examiné mon travail et en particulier, Bruno Le Pioufle et Vincent Thomy, rapporteurs, d'avoir effectué une lecture approfondie du manuscrit. Les discussions lors de la soutenance ont été très enrichissantes aux côtés de Michel Pons, d'Anaïs Ali Cherif et de Rose Marie Sauvage.

Je remercie très sincèrement mes trois encadrants de thèse : Yves Fouillet, Nicolas Verplanck et Jean Luc Achard pour le soutien et la confiance qu'ils m'ont apporté tout au long de la thèse. Merci à Yves pour son soutien au laboratoire, pour les manip effectuées ensemble et pour toutes ces discussions sur la microfluidique qui ont permis de résoudre des problèmes techniques et de faire évoluer la thèse. Merci à Nicolas pour son appui sur la partie manufacturing et les conversations dans le couloir qui ont permis d'avancer sur la thèse. Merci à Jean Luc pour les discussions sur l'aspect théorique de la thèse et son expertise pour la rédaction.

Merci à Guillaume Delapierre de m'avoir accueillie au LBAM en février 2015 pour mon stage de fin d'études et qui m'a ensuite permis de poursuivre en thèse.

Je tiens également à remercier Claude Vauchier, chef du service SMAVI et Fabrice Navarro, chef du laboratoire LBAM puis LSMB de m'avoir fourni les moyens financiers et matériels pour réaliser cette thèse dans les bonnes conditions. Merci de m'avoir offert l'opportunité de présenter mes travaux à plusieurs reprises dans des congrès internationaux.

Je remercie également l'ensemble des personnes avec qui j'ai travaillé au sein du département biologie et santé. J'ai eu la chance de travailler dans un environnement pluridisciplinaire riche en compétences diverses en biologie, microfluidique, électronique, optique, mécanique... Un grand merci à François Boizot et Manuel Alessio pour la fabrication et l'assemblage des nombreuses cartes microfluidiques qui m'ont permis d'avancer rapidement et de tester un grand nombre de designs. Merci à Raymond Charles pour ses précieux conseils et son aide en mécanique. Merci à Thomas Bordy pour la partie électronique. Merci à Guillaume Nonglaton pour la partie fonctionnalisation de surface. Merci à Mathilde Menneteau pour son aide précieuse en fin de thèse dans la réalisation d'expériences biologiques pour les tests ELISA. Merci à Myriam Cubizolles pour son expertise sur les tests ELISA. Merci à Patricia Laurent pour son aide dans le laboratoire. Merci à Nathalie Dussert-Rosset et Barbara Coynel, les assistantes de SMAVI pour leur aide précieuse et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes que j'ai rencontré au CEA et qui m'ont fait passer trois années exceptionnelles. A Eloïse, qui a été à la fois mon binôme de travail (Tic et Tac) et une amie précieuse. A Mélissa Baque, Thomas Bordy et Pierre Alexandre Setier, mes partenaires de courses à pied les plus fidèles qui m'ont fait aimer le dénivelé et surtout la superbe bastille de Grenoble. Merci à tous les « jeunes » du DTBS pour leur bonne humeur, pour les débats au H3 et toutes les soirées « Afterwork » et autres. En particulier, Eloïse, Roxane, Aurélie,

Mélissa, Perrine, Sophie, Charlotte, Mathilde, Morgane, Prisca, Clémentine, Claire, Emilie, Céline, Giacomo, Maxime(s), David(s), Raphael, Thibault, Vivian, Hadrien, Emeric, Guillaume et Thomas(s). Un grand merci également à mes autres amis pour leur soutien tout au long de ces trois dernières années : les anciens BIOMED (Stéphanie, Christophe, Cécile, Mathieu, Blandine...), les autres ancien Phelma (Sophie, Kévin, Alexis...) et mes deux anciens supers colocos Aurore et Pierre.

Enfin, merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu et m'ont permis de faire les études que j'ai choisies.

Introduction générale

Les analyses biologiques interviennent dans de nombreux domaines tels que le diagnostic médical, l'environnement, l'agroalimentaire ou encore le vétérinaire. Dans le domaine de la santé, les analyses biologiques visent notamment à établir un diagnostic médical en utilisant un échantillon du patient (sang, urine, tissus...). Dans le domaine de l'environnement, il est important de contrôler par exemple la qualité de l'eau, de l'air ou des sols. De nombreux tests sont également effectués en agroalimentaire pour vérifier la qualité des productions ou pour identifier des allergènes. Dans le domaine vétérinaire, les animaux d'élevage sont aussi contrôlés pour éviter la propagation de maladies et garantir la qualité.

Dans ces différents domaines, les microtechnologies sont en plein essor car elles se prêtent bien à des enjeux qui sont multiples. L'objectif majeur est de développer des mini ou microsystèmes dans le but d'intégrer, d'automatiser et de miniaturiser les protocoles d'analyses. Tout d'abord, il en résulte une réduction de la quantité de réactifs utilisée lors d'un test et donc du coût de ce test. Un autre intérêt est d'automatiser l'ensemble ou une partie d'une chaîne d'analyse entre la collecte, la préparation d'échantillon et la détection. Ceci permet de garantir une meilleure reproductibilité et également de rendre accessibles les protocoles d'analyses à des utilisateurs non formés. Enfin, la miniaturisation et donc la portabilité des systèmes permet d'effectuer les analyses directement sur les sites de prélèvements ce qui présente l'avantage de réduire les temps de transport et de stockage, de limiter le risque de dégradation de l'échantillon et d'avoir une réponse immédiate.

Un premier exemple typique est le cas des analyses dans les pays en voie de développement où les diagnostics sur les populations doivent être rapides. Par exemple, dans le cas d'une crise de contagion par le virus Ebola, il faut identifier les patients malades pour confiner la contagion tout en les soignant efficacement. Un autre exemple est le cas d'urgence où il est essentiel de détecter très rapidement si un patient est en insuffisance cardiaque. Les protocoles d'analyses à considérer sont généralement constitués d'une succession d'opérations portant sur de petits volumes de liquide. Il faut mélanger un échantillon avec un ou plusieurs réactifs, concentrer, purifier des analytes avant de pouvoir mesurer leur concentration par exemple. Il apparaît alors nécessaire de développer une ingénierie spécifique à la manipulation de petits volumes de fluide, cette thématique de recherche est le domaine de la microfluidique. En 2001, la Technology Review du MIT a classé la microfluidique parmi les dix techniques émergentes qui vont changer le monde. Cette thématique regroupe en fait différents types de procédés tels que la microfluidique capillaire, en gouttes ou en flux... Le type de procédé choisi va dépendre de l'application visée et sera le cœur du système.

Le chapitre I de cette thèse va être consacré à une réflexion sur les principaux critères souhaitables que doivent vérifier les microsystèmes à développer. Par exemple, pour répondre aux problématiques des tests de terrain, il semble important d'aboutir à un système portable et simple d'utilisation. De plus, pour élargir le nombre de tests disponibles, il faut être en mesure de pouvoir intégrer des protocoles complexes c'est-à-dire nécessitant l'ajout étape par étape de plusieurs réactifs et d'effectuer des réactions en parallèle.

Cependant, les dispositifs présentés dans l'état de l'art qui suit cette réflexion, ne répondent que partiellement aux critères souhaitables identifiés et à ce jour, la révolution espérée de la microfluidique prend du retard. Quelques succès peuvent être évoqués comme les tests sur bandelettes que l'on retrouve par exemple dans les tests de grossesse ou les tests de glycémie mais ces technologies ne sont pas adaptées à toutes les analyses. En effet, la plupart des tests sur bandelettes ne sont pas quantitatifs et ne sont donc pas adaptés pour le diagnostic de maladies où le résultat doit être comparé à une valeur seuil. Par exemple, dans le cas des maladies cardiovasculaires, il faut un test sensible pour détecter le plus tôt possible un infarctus. Les tests de glycémie sont quantitatifs mais utilisent une réaction enzymatique. Ce type de réaction ne permet pas de détecter directement des cibles telles que des protéines ou des anticorps ce qui limite les applications possibles. L'analyse de l'état de l'art dans le chapitre I détaillera les limitations des systèmes présentés.

Pour aborder l'ensemble de ces applications et combler une partie des lacunes entrevues, l'objectif de ce travail de thèse sera de proposer un nouveau système portable, simple d'utilisation et fournissant des résultats quantitatifs précis pour l'intégration de protocoles complexes. A titre d'exemple, nous nous intéresserons aux tests ELISA. Il existe une multitude de kits ELISA disponibles qui sont déjà validés et utilisés dans les laboratoires par des opérateurs ou dans des automates. Dans le cadre de cette thèse, les kits biologiques ne seront pas redéveloppés, ils seront simplement adaptés avec un minimum de modifications. En revanche, les protocoles impliquent une succession d'étapes et il conviendra de les automatiser et de les intégrer dans un système microfluidique. Ce travail sera pluridisciplinaire et débordera la microfluidique proprement dite avec la technologie de fabrication, l'instrumentation et la biologie où les choix pourront résulter de compromis avec une approche d'ingénierie.

Les objectifs fixés dans le chapitre I vont se traduire par la contrainte de développer une carte microfluidique permettant de manipuler une large gamme de volumes (de 1 à 500 μL) et un grand nombre d'opérations sans complexifier le système de pilotage. Différentes techniques d'actionnement de fluides et différentes architectures seront alors analysées dans le chapitre II avant de se focaliser sur une technique originale utilisant un matériau hyperélastique dont la fabrication sera détaillée. Les cartes développées seront testées à l'aide d'un banc expérimental dédié qui sera aussi présenté.

Ces choix techniques seront ensuite validés à travers des protocoles biologiques par ordre de complexité croissante dans les chapitres III et IV. Ainsi, les fonctions élémentaires pourront être intégrées progressivement. Grâce à des visualisations fluidiques, les architectures pourront être optimisées et la programmation des cartes adaptée. L'enchaînement des étapes élémentaires qui vont constituer un protocole complet sera alors défini avant d'effectuer la validation biologique.

Enfin, le chapitre V sera consacré à la présentation de la plateforme autonome et portable capable de piloter les cartes microfluidiques développées. Cette plateforme a été conçue pour être générique : elle peut s'adapter à tout type de test biologique. Une solution d'embarquement des réactifs sera également présentée pour l'automatisation du protocole. Le développement de ce démonstrateur constituera un aboutissement pour la démarche suivie au cours de la thèse car il permettra de valider les choix effectués pour la carte microfluidique et de démontrer la capacité du système complet à répondre aux objectifs définis dans le chapitre I.

Chapitre I:

Dispositifs portables pour des analyses biologiques

Sommaire

I.1. Les différentes techniques d'analyses.....	13
I.1.1. L'amplification d'ADN.....	13
I.1.2. Les tests immunologiques	14
I.1.3. Complémentarité entre le test ELISA et l'amplification d'ADN.	19
I.2. Intérêt d'un diagnostic de terrain dans les différents domaines.....	20
I.2.1. Domaine médical	21
I.2.2. Domaine de l'environnement	23
I.2.3. Domaine de l'agro-alimentaire.....	23
I.2.4. Domaine vétérinaire.....	24
I.3. Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome	24
I.3.1. Choix du protocole.....	24
I.3.2. Critères définis par l'OMS	26
I.3.3. Définition de l'ensemble des critères à respecter.....	27
I.3.4. Exemples de tests ELISA de terrain pour chacun de ces critères	30
I.4. Etat de l'art des gammes de dilution dans des systèmes microfluidiques	40
I.4.1. Microfluidique continue	40
I.4.2. Microfluidique digitale et gamme de dilution en cascade.....	40
I.4.3. Microfluidique digitale et gamme de dilution linéaire.....	43
I.5. Etat de l'art des méthodes de stockage des réactifs.....	45
I.6. Conclusion.....	49

Ce chapitre va préciser les caractéristiques exigeantes du dispositif microfluidique portable que nous nous proposons de développer. Un état de l'art des dispositifs portables existants, dont certains sont déjà présents sur le marché, permettra de comprendre pourquoi peu de microsystèmes comportant l'ensemble de ces caractéristiques sont actuellement disponibles. Mais auparavant, il est d'une part indispensable de rappeler les différentes techniques d'analyses biologiques pour intégrer un test qui soit pertinent et significatif pour ce dispositif ; il n'est d'autre part pas inutile de rappeler l'intérêt d'un diagnostic de terrain dans différents domaines d'application.

I.1. Les différentes techniques d'analyses

Le but d'une analyse est généralement d'identifier voire de quantifier des agents pathogènes, des biomarqueurs, ou de mesurer une réponse immunitaire. Différentes techniques ont été développées suivant la cible visée. Deux des principales techniques utilisées seront ici abordées : l'amplification d'ADN et le test immunologique qui sont respectivement des tests de biologie moléculaire et de biochimie.

I.1.1. L'amplification d'ADN

L'amplification d'ADN est une technique qui permet d'analyser une partie du patrimoine génétique d'un individu ou d'agents pathogènes. Elle permet de mettre en évidence la présence de virus, bactéries ou champignons. Le principe de cette technique est de multiplier les brins d'ADN.



Figure I-1: Principe de l'amplification d'ADN [1].

Cette technique comprend d'abord différentes étapes de chauffage pour séparer les brins d'ADN, hybrider des amorces et synthétiser l'ADN à partir des amorces (Figure I-1). Il existe ensuite différents protocoles qui permettent d'amplifier l'ADN.

(i) La méthode PCR

La PCR est l'abréviation anglaise de Polymerase Chain Reaction qui se traduit par « réaction en chaîne polymérase » (Figure I-2).

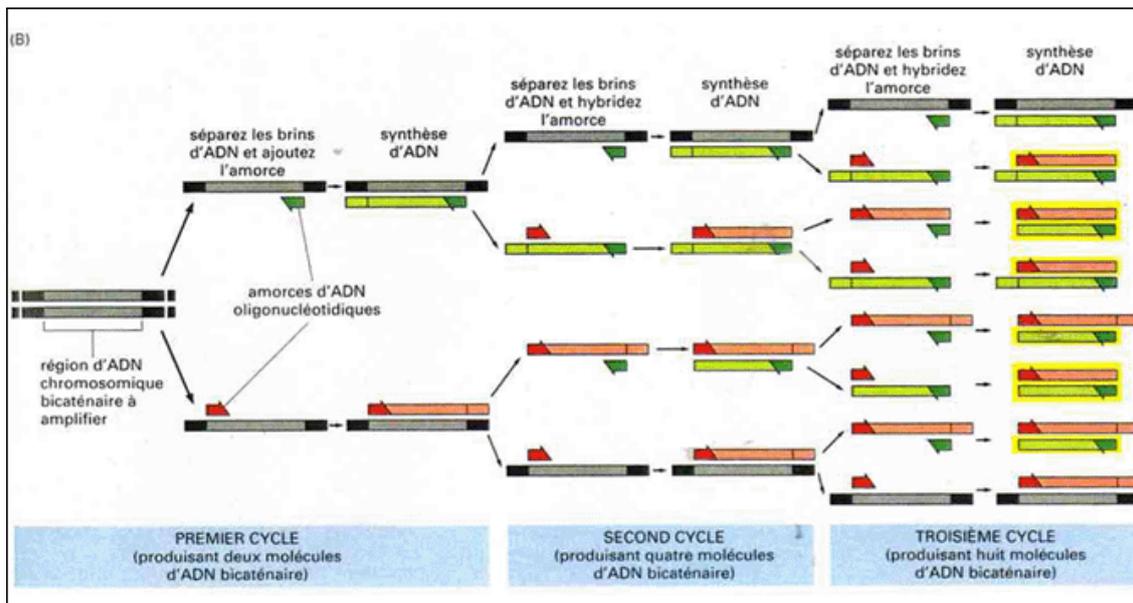


Figure I-2: Schéma de réalisation de la PCR [1].

Chaque cycle de PCR comprend trois étapes. La première étape est la dénaturation qui se produit à 95°C. C'est l'étape au cours de laquelle les deux brins d'ADN se séparent. Ensuite, la deuxième étape est l'hybridation des amorces qui se produit entre 40°C et 65°C selon la longueur des amorces. Enfin, il y a l'étape d'élongation qui se déroule à 72°C. A chaque cycle, le nombre de brins d'ADN est multiplié par deux. Ainsi, il est possible d'identifier la présence de quelques brins d'ADN dans un échantillon grâce à cette technique d'amplification exponentielle. La PCR est réalisée dans un thermocycleur avec une détection par fluorescence et dure entre 2 et 3 heures.

(ii) Les méthodes isothermes

Concernant la détection de l'ADN ou de l'ARN, il existe plusieurs techniques d'amplification. Par exemple, pour simplifier le protocole d'amplification d'ADN, d'autres méthodes ont été mises au point comme la RPA (« Recombinase polymérase amplification ») et la LAMP (« Loop Mediated Isothermal Amplification ») [2]. Ces méthodes ont l'avantage de fonctionner à température constante. La LAMP se déroule à une température comprise entre 63°C et 65°C et la RPA se déroule à plus basse température (37°C - 42°C). Ces deux techniques ne nécessitent pas d'équipements coûteux et sont plus rapides que la PCR (entre 15 et 60 min). De plus, la méthode de détection peut être colorimétrique, ce qui est plus simple à mettre en œuvre.

I.1.2. Les tests immunologiques

Un test immunologique est un test biochimique qui mesure la présence ou la concentration d'une molécule dans une solution, grâce à l'utilisation d'un anticorps ; lorsque la concentration est mesurée, on parle aussi de dosage immunologique. La molécule détectée par le dosage immunologique est désignée sous le nom d'analyte ou d'antigène, il s'agit souvent d'une protéine. Le principe de ce test est fondé sur la reconnaissance spécifique entre l'anticorps et la protéine. Un test immunologique peut inversement utiliser un antigène pour détecter la présence d'anticorps. Ces tests sont par exemple utilisés pour le diagnostic d'une maladie ou le suivi thérapeutique d'un traitement [3]. Ils sont couramment utilisés pour détecter la présence d'un

virus en recherchant la présence d'anticorps. Pour tout type d'infection, il existe deux types d'anticorps [4] :

- les IgM (Immunoglobulines M) : marqueurs d'une infection aiguë.
- les IgG (Immunoglobulines G) : marqueurs d'une infection passée.

Une infection récente repose surtout sur la recherche d'IgM. Ces anticorps apparaissent en général quelques jours après l'infection.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour détecter la présence de l'antigène ou de l'anticorps, comme par exemple la technique d'immuno-agglutination. Un exemple consiste à mélanger un échantillon contenant l'antigène (ou l'anticorps) à détecter avec un anticorps (ou un antigène) qui est fonctionnalisé sur la surface de billes en latex. Les agglutinats peuvent alors être détectés par une mesure optique [5].

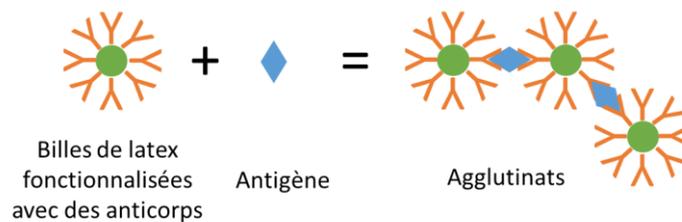


Figure I-3: Agglutination entre des billes de latex fonctionnalisées avec des anticorps et des antigènes.

Un exemple de test qualitatif d'agglutination est le typage sanguin. Les globules rouges du patient sont mélangés avec l'anticorps spécifique correspondant au groupe sanguin. Si des agglutinats se forment entre les anticorps et les globules rouges alors il s'agit du bon groupe sanguin (Figure I-4). Les agglutinats sont visibles à l'œil nu.

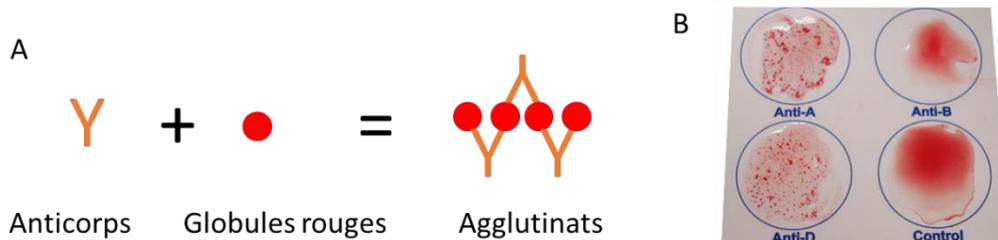


Figure I-4: Schéma (A) et photo (B) d'une agglutination entre des anticorps et des globules rouges lors d'un test de typage sanguin [6].

Les tests immunologiques peuvent également utiliser des marqueurs chimiquement liés ou conjugués à l'antigène ou à l'anticorps ciblé. Ces marqueurs sont détectables par divers moyens : émission de rayonnements lumineux ou radioactifs, de fluorescence sous la lumière, changement de couleur dans la solution. Une autre technique de détection utilise la PCR [7] pour amplifier le signal (Figure I-5). Dans cette technique, l'anticorps secondaire est couplé à un oligonucléotide.

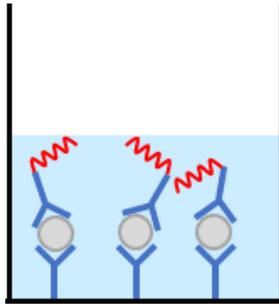


Figure I-5: Test immuno-PCR [7].

Les tests immunologiques les plus couramment utilisés sont les tests ELISA [8], [9], [10] (de l'Anglais « *Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay* » soit « *dosage d'immunoabsorption par enzyme liée* ») qui utilisent des enzymes pour la détection. Ces enzymes émettent un signal colorimétrique ou fluorescent en présence d'un substrat. De nombreuses molécules chimiques telles que le glucose ou l'éthanol peuvent être quantifiées directement grâce à une réaction enzymatique. Dans le cas des tests ELISA, les enzymes sont couplées à des anticorps.

Les tests ELISA existent dans différents formats [11]. Ils peuvent être menés par étapes en ajoutant des réactifs qui sont ensuite éliminés ou séparés à certains moments du test. L'une des étapes consiste à greffer les anticorps ou les antigènes sur une surface solide. C'est pourquoi, ces tests sont souvent appelés dosages immunologiques *hétérogènes*. Mais ils peuvent aussi être menés en mélangeant simplement les réactifs et l'échantillon puis en réalisant une mesure physique. Ces tests sont alors appelés dosages immunologiques *homogènes*. Un bref aperçu d'un test ELISA de chaque type va être présenté.

(i) Test ELISA en phase hétérogène

Il existe plusieurs variantes de test ELISA de ce type (tests direct, indirect ou en sandwich) [12], [13].

Le test direct est le plus rapide car il nécessite peu d'étapes (Figure I-6). La première étape est de laisser incuber une solution contenant l'antigène afin qu'il s'adsorbe sur la surface (1). Ensuite, un anticorps spécifique de cet antigène et conjugué avec une enzyme est ajouté. Après cette étape, un lavage est nécessaire pour éliminer les anticorps qui ne se sont pas liés. Enfin, pour émettre un signal, le substrat qui va réagir avec l'enzyme doit être introduit. Ce protocole présente néanmoins des inconvénients. L'adsorption de l'antigène est non spécifique. Un bruit de fond important peut donc être mesuré.

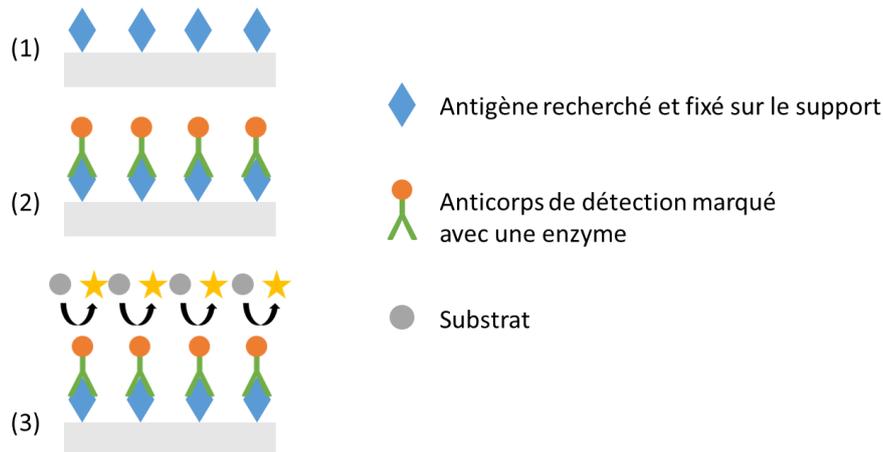


Figure I-6: Test ELISA direct.

Les tests ELISA indirects sont appelés ainsi car l'anticorps de détection ne se lie pas directement à l'antigène recherché (Figure I-7). La première étape de ce protocole consiste à fonctionnaliser les puits avec l'antigène (1). Ensuite, après avoir lavé les puits, la solution d'anticorps primaire qui reconnaît l'antigène est ajoutée (2). L'étape suivante consiste à ajouter un anticorps secondaire marqué par une enzyme (3). Enfin, le principe de détection est similaire au test ELISA direct. Des étapes de lavage sont effectuées puis le substrat est introduit et se colore en présence d'enzyme et donc de l'antigène. Le test ELISA indirect est plus sensible qu'un test ELISA direct car plusieurs anticorps de détection peuvent se lier à un anticorps primaire ce qui augmente le signal. L'inconvénient de ce test est que l'anticorps secondaire peut se lier à l'antigène ce qui augmente aussi le bruit de fond. La durée du test est également plus longue puisqu'il y a une étape supplémentaire d'incubation.

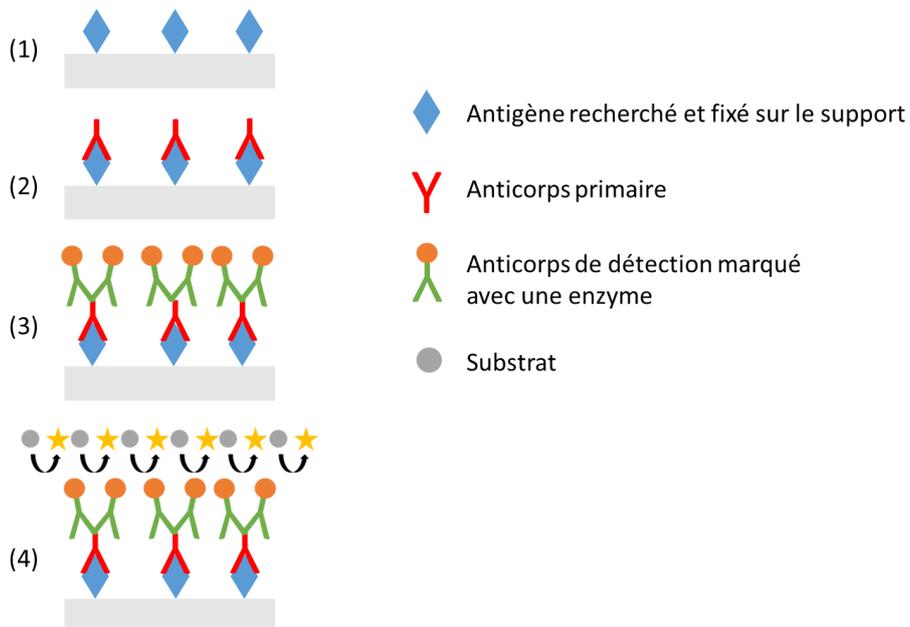


Figure I-7: Test ELISA indirect.

Le test ELISA en sandwich permet également de détecter un antigène (Figure I-8). Pour réaliser ce test, il faut fonctionnaliser une surface avec les anticorps dirigés contre l'antigène recherché. Ces anticorps sont appelés anticorps de capture. Puis, il faut un deuxième anticorps en solution

et conjugué à une enzyme pour réaliser la détection. L'étape de détection est similaire aux tests ELISA présentés précédemment : il faut laver pour éliminer les anticorps libres et ajouter le substrat pour la détection.

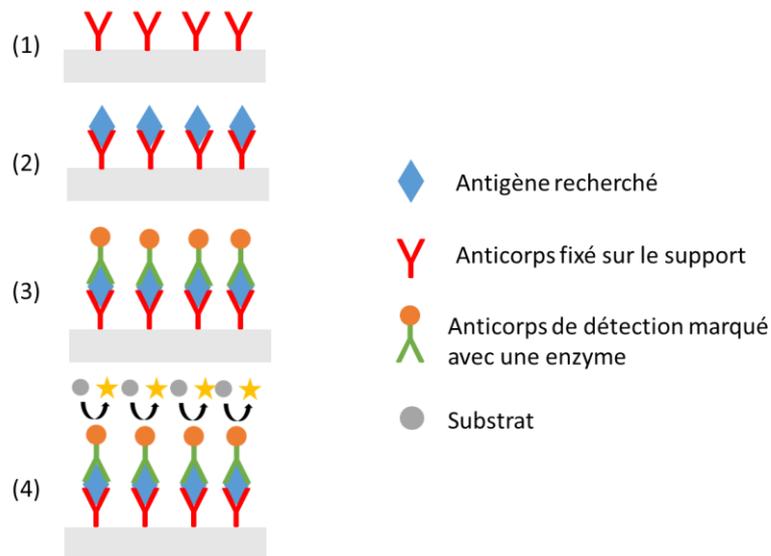


Figure I-8: Test ELISA en sandwich.

Les tests ELISA en phase hétérogène sont très sensibles grâce aux étapes de lavage qui éliminent le bruit de fond et grâce à l'amplification du signal dû à la réaction enzymatique. Cependant, ils nécessitent de nombreuses étapes et une grande précision. Ainsi, les étapes de lavage sont très importantes pour éviter des faux positifs.

De plus, la durée de ce test est de l'ordre de quelques heures selon le kit utilisé. Des étapes de lavage peuvent être effectuées entre chaque étape ou seulement après l'étape 3. Les temps d'incubation varient également beaucoup selon les kits (entre 15 min et 2h d'incubation).

(ii) Test ELISA en phase homogène

Le test ELISA en phase homogène est appelé ainsi car il n'y a pas d'interaction avec une surface. Ces tests présentent plusieurs avantages. Il ne faut pas fonctionnaliser de surface et il n'y a pas d'étapes de lavage. Ils sont donc plus simples à réaliser et demandent moins d'opérations. Cependant, il n'y a pas d'effet d'amplification et la méthode optique de mesure est plus complexe. Ces tests utilisent généralement des anticorps liés à des billes pour détecter un antigène. Lors de la capture de la cible, ces billes sont suffisamment proches pour interagir et émettre un signal qui dépend de la réaction en jeu.

Il existe différents types de tests ELISA en phase homogène. Certains tests comme le test Alphasisa (Perkinelmer) utilise un échange d'oxygène singulet entre les deux billes (Figure I-9) [14]. Cet échange est provoqué par une excitation à 680 nm et cela provoque une émission à 615 nm.

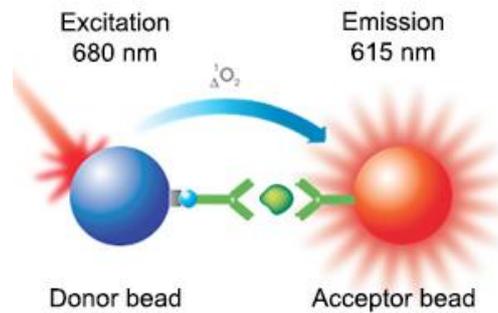


Figure I-9: Test ELISA en phase homogène basé sur un échange d' O_2 singulet entre deux billes : exemple du test Alphasisa (Perkinelmer) [14].

D'autres tests (Cisbio (n°62SGLPEF)) utilisent le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) fondé sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores, un donneur et un accepteur quand ils sont suffisamment proches. Quand ces deux entités sont assez proches, l'excitation du donneur par une source d'énergie engendre un transfert d'énergie vers l'accepteur qui émet alors de la fluorescence à une longueur d'onde donnée (Figure I-10).

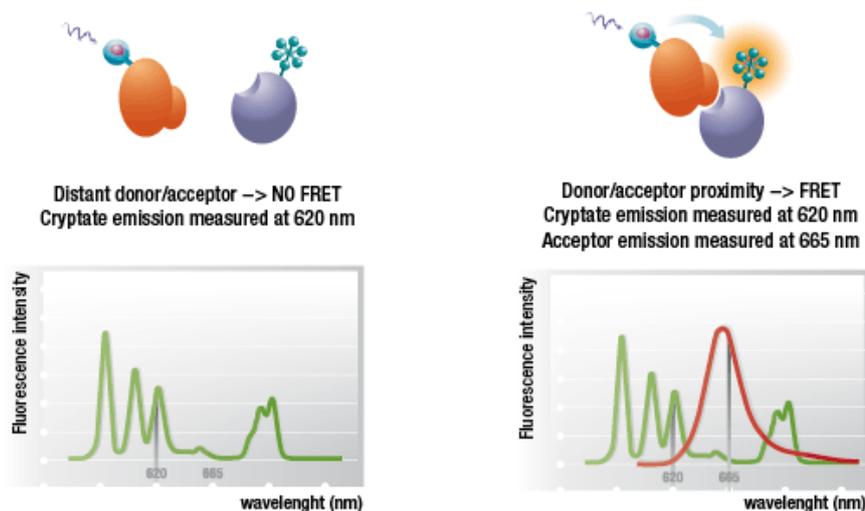


Figure I-10: Test ELISA en phase homogène basé sur le principe du FRET [15].

I.1.3. Complémentarité entre le test ELISA et l'amplification d'ADN.

Les tests immunologiques et l'amplification d'ADN sont deux méthodes d'analyses complémentaires. En effet, dans le cas d'une infection par un virus, la Figure I-11, reportée dans [16] et illustrant le cas de la Dengue, montre que la méthode PCR est plus efficace pour détecter le virus dès le début de l'infection (avant 4 jours). Le test ELISA sera quant à lui plus efficace environ une semaine après l'infection pour détecter la réponse immunitaire immédiate (IgM) et sur le long terme (IgG).

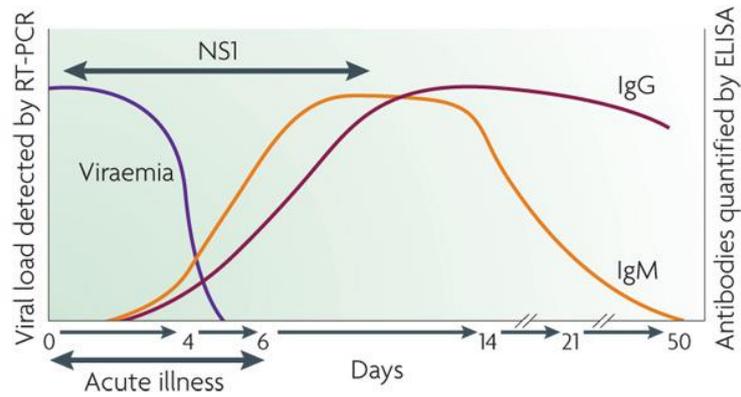


Figure I-11: Réponse de l'antigène et des anticorps dans le cas d'une infection par le virus de la Dengue [16].

Un exemple concerne la sûreté des produits sanguins. Lors des transfusions sanguines, le sang est qualifié et il est nécessaire de rechercher à la fois les virus et les anticorps pour détecter par exemple l'hépatite B ou le VIH.

L'amplification d'ADN présente l'avantage d'être plus sensible que le test immunologique. En effet, une seule molécule peut être détectée puisqu'elle est amplifiée. Cependant, les protéines ne peuvent pas toujours être détectées de manière spécifique par cette méthode. Un même ADN peut en effet conduire à différentes protéines. Par ailleurs, les protéines peuvent présenter des modifications post traductionnelles (phosphorylation, glycosylation par exemple). Pour détecter des protéines ou des biomarqueurs dans le corps humain dont la quantité ou les modifications peuvent indiquer la présence d'une maladie, le test ELISA est donc plus couramment utilisé.

I.2. Intérêt d'un diagnostic de terrain dans les différents domaines

Les outils de diagnostic actuels des laboratoires d'analyse, que ce soient les tests immunologiques ou les tests d'amplification d'ADN, demandent des volumes de réactifs et d'échantillons importants (entre 10 et 250 μL) et de l'instrumentation coûteuse et encombrante [17](Figure I-12).



Figure I-12: Automate (5 m \times 1,3 m) pour des tests immunologiques (Roche Cobas 6000).

Dans les laboratoires de recherche, ces tests sont effectués par du personnel qualifié et demandent de longues manipulations. Le format utilisé est généralement la plaque 96 puits (Figure I-13B)

et les solutions sont prélevées manuellement à l'aide de pipettes (Figure I-13,A) ou automatiquement à l'aide de robots pipeteurs (Figure I-13,C).



Figure I-13: Outils utilisés pour réaliser un test ELISA en laboratoire A: Opération de pipetage, B: Plaque 96 puits, C : robot pipeteur [18].

Pour parer à ces inconvénients, la microfluidique, qui est un domaine de recherche apparu depuis une vingtaine d'années, a permis de révolutionner ces tests de diagnostic. Ces développements sont justifiés par une demande croissante qu'il s'agit ici de bien identifier suivant les grands domaines d'applications : médical, environnement, agroalimentaire ou vétérinaire.

I.2.1. Domaine médical

Pour comprendre l'intérêt d'un test de diagnostic de terrain dans le domaine de la santé, il est important d'étudier tout d'abord le processus d'analyse tel qu'il existe aujourd'hui (Figure I-14). Le personnel médical prélève l'échantillon du patient et l'envoie au laboratoire d'analyses. Le laboratoire analyse l'échantillon et détecte les substances qu'il contient. Les quantités de ces substances sont mesurées et sont comparées à des gammes de référence qui correspondent aux valeurs pour un patient sain. Entre le prélèvement de l'échantillon et les résultats d'une prise de sang, le délai est compris entre 2H pour les cas urgents traités à l'hôpital et environ 8H dans un laboratoire de ville.

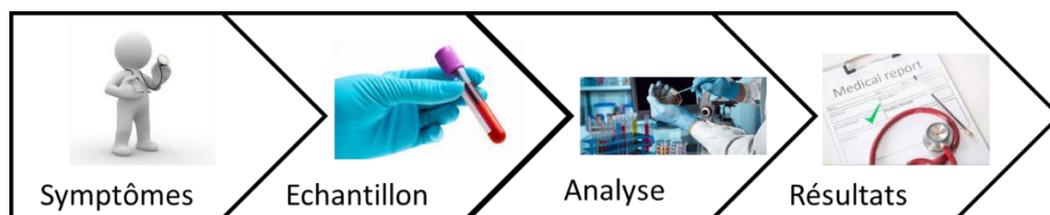


Figure I-14: Déroulement d'un test en laboratoire.

Actuellement, les tests de diagnostic permettent de détecter une maladie suite à des symptômes pour prescrire le traitement ou même de détecter une maladie avant l'arrivée des premiers symptômes, afin de pouvoir soigner cette maladie le plus tôt possible. Ensuite, l'efficacité d'un traitement peut être évaluée et l'évolution de la maladie, suivie.

Le diagnostic de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et les diabètes est un défi important pour la santé [19]. Ces maladies sont très répandues dans les pays développés et également dans les pays en voie de développement qui connaissent des changements rapides dans leur mode de vie.

Les outils de diagnostic portables permettraient d'effectuer davantage d'analyses pour améliorer la prise en charge des patients. S. Nayak et col [20] proposent de classer les outils de diagnostic suivant 4 principaux cas d'usage définis par deux critères : le budget (restreint ou modéré) et l'infrastructure (clinique ou terrain) (Figure I-15).

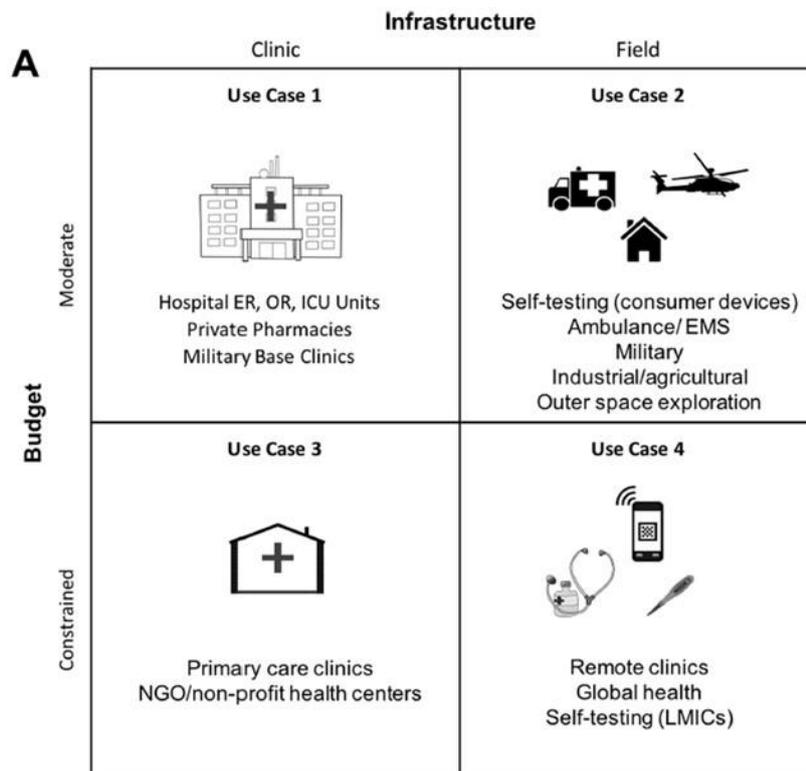


Figure I-15: Les différents cas d'usage [20].

Dans le premier cas d'usage, l'instrument est utilisé par du personnel qualifié dans un environnement clinique tel qu'un hôpital. L'objectif est d'accéder plus rapidement aux résultats des analyses.

Dans le second cas d'usage, il s'agit plutôt de délocaliser les analyses dans l'ambulance ou chez le patient. Le budget n'est pas nécessairement restreint mais l'instrument doit être portable et utilisable par du personnel non qualifié. L'outil de diagnostic portable permet alors d'obtenir les résultats d'une analyse dès la prise en charge du patient dans l'ambulance ce qui est très important pour les maladies cardio-vasculaires par exemple. Cela peut également concerner des militaires qui ont besoin de détecter des maladies dans des zones qui ne comportent ni laboratoire ni hôpital. Une autre application concerne le suivi de patient. Certaines maladies telles que le diabète ou le cancer nécessitent des contrôles réguliers pour adapter le traitement. Il y a donc une forte demande sur des systèmes appelés « tests de diagnostic compagnons ». Le patient peut posséder un instrument pour effectuer des auto analyses ou le médecin peut se déplacer également avec l'instrument.

Le cas d'usage 3 concerne par exemple les hôpitaux dans les pays en voie de développement qui ont un budget limité. Comme les équipements dans ces hôpitaux sont restreints, les tests ne doivent pas utiliser des instruments coûteux tels que les automates de laboratoires qui sont généralement utilisés pour les tests ELISA.

Enfin, le dernier cas d'usage est le plus restrictif. Il s'agit de l'appareil de terrain à bas coût. Cette contrainte est imposée pour les dispositifs appelés en anglais « point of care » et traduits par « au chevet du patient ». Ces dispositifs sont souvent jetables et à usage unique ; c'est pourquoi la contrainte de coût est très importante. Une autre application concerne les pays en voie de développement où le manque d'infrastructures prive la population d'analyses médicales.

Ces différents cas d'usage montrent qu'il y a un réel besoin d'outils de diagnostic de terrain quels que soient les contraintes de coûts ou d'infrastructures. Les critères à respecter pour le dispositif portable dépendront du cas d'usage et seront détaillés dans la partie suivante.

I.2.2. Domaine de l'environnement

Dans le domaine de l'environnement, l'utilisation d'outils d'analyses portables permet de tester des échantillons directement sur le terrain ([21], [22]) lorsqu'il s'agit par exemple de contrôler la qualité des eaux et des sols. Il est ainsi intéressant de pouvoir détecter des toxines dans les eaux de baignade ou d'abreuvement pour les élevages. Il est également souhaitable de contrôler facilement la qualité bactériologique des eaux et mesurer la quantité de certains polluants chimiques dans l'eau (ex : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)). Par rapport aux méthodes classiques, l'analyse serait alors plus rapide et limiterait également les risques de contamination ou de dégradation de l'échantillon durant le transfert et le stockage. Il est également nécessaire de mesurer la quantité d'azote, de phosphate et de potassium dans les terres agricoles pour vérifier que les apports en fertilisants sont raisonnés. Un autre exemple concerne la mesure de la qualité de l'air. Il est nécessaire de pouvoir détecter en temps réel des menaces chimiques pour contrôler les lieux publics vis-à-vis des attaques terroristes [23]. Il faut également être capable de contrôler la concentration en amiante ou en poussière dans l'air pour assurer la sécurité des travailleurs.

Dans tous ces exemples, l'objectif d'un dispositif de terrain est d'avoir une réponse plus rapide par rapport aux méthodes actuelles qui nécessitent de prélever un échantillon puis de l'envoyer dans un laboratoire. Le prix n'est donc pas le critère principal pour ces applications car les analyses de terrain permettent de répondre à un besoin non couvert par les méthodes actuelles. Enfin, les dispositifs de terrain peuvent être présents sous deux formes : une utilisation ponctuelle ou bien une mesure dans le temps. Dans ce dernier cas, le système de mesure est une balise qui reste à demeure sur le terrain [24].

I.2.3. Domaine de l'agro-alimentaire

Le domaine agro-alimentaire est également un secteur très important pour les analyses biologiques. En effet, les aliments sont souvent contrôlés pour s'assurer de leur qualité. Par exemple, il faut s'assurer que les aliments ne sont pas contaminés par des bactéries ou qu'ils ne contiennent pas d'éléments allergènes, comme par exemple dans le cas des éléments garantis « sans gluten ».

Comme les industries ne sont pas toujours équipées de laboratoire, elles vont donc prélever leurs échantillons et les envoyer à des laboratoires d'analyses. Les résultats d'une analyse ne sont alors connus qu'après quelques jours. Souvent, lorsque les résultats arrivent, le produit a déjà été envoyé dans les magasins. En cas d'incident, les fabricants doivent alors effectuer des retours

produits sur des très grands volumes ce qui engendre des risques économiques importants pour l'entreprise avec une traçabilité complexe à établir ainsi qu'un impact sur son image. Notons qu'une forte évolution se manifeste actuellement sur les exigences réglementaires pour ces applications.

En septembre 2017, une contamination de lait infantile par des salmonelles a été révélée en France. Les conséquences pour les consommateurs mais aussi pour l'entreprise concernée sont critiques. Cet exemple montre bien l'intérêt de développer des outils de diagnostic rapide et de les installer sur les sites de production ou de stockage pour s'assurer de la qualité des produits.

I.2.4. Domaine vétérinaire

Les animaux nécessitent également un suivi médical régulier. Par exemple, la mesure de lactate est devenue une pratique courante pour évaluer l'hypo perfusion chez les chiens [25].

Dans les industries d'élevage, pour éviter des épidémies, des antibiotiques sont beaucoup utilisés sur les animaux. Cependant, le recours systématique de ces antibiotiques rend les bactéries de plus en plus résistantes et donc les antibiotiques moins efficaces. Un plan national « Ecobio » [26] a été mis en place en 2012 par le ministère de l'agriculture pour lutter contre l'antibiorésistance et pour réduire l'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire.

Dans d'autres situations, en cas de présence d'un virus, l'ensemble d'un troupeau peut être abattu pour éviter les contaminations. C'était le cas par exemple en janvier 2017 dans le sud-ouest de la France où une centaine de milliers de canards ont été abattus de manière préventive pour éviter la propagation du virus de la grippe aviaire [27].

Un outil de diagnostic portable permettrait donc de tester les animaux pour ainsi éviter par exemple l'utilisation abusive des antibiotiques ou les abattages massifs.

Après avoir identifié les grands domaines d'applications des tests de terrain, il est maintenant possible de préciser les caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome.

I.3. Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

Dans cette section, le choix et l'étude du protocole à intégrer vont guider les critères à respecter pour le dispositif portable et autonome à développer. Chacun de ces critères sera analysé à l'aide d'exemples de l'état de l'art. Des choix techniques pourront être effectués suite à cette analyse.

I.3.1. Choix du protocole

Dans la section I.1, les techniques d'analyses retenues ont été détaillées. L'amplification d'ADN et le test immunologique sont deux techniques complémentaires et intéressantes à intégrer dans un dispositif portable.

Au sein de notre laboratoire, les techniques d'amplification d'ADN ont été étudiées et intégrées dans des systèmes microfluidiques depuis de nombreuses années. Il a donc semblé cohérent de

commencer une étude sur le test complémentaire qui est le test immunologique et plus particulièrement l'ELISA à travers ce travail de thèse. Le développement de ce dispositif permettra de détecter un large ensemble de cibles pour pouvoir répondre à un grand nombre d'applications.

Examinons ici schématiquement le déroulement d'un protocole ELISA homogène et hétérogène, en suivant la succession des étapes que l'utilisateur doit effectuer selon les recommandations des kits commerciaux.

Le protocole fluide d'un test ELISA homogène ne comporte que deux mélanges. Dans l'exemple du test présenté en Figure I-16 qui permet de mesurer la concentration de glucagon pour les patients souffrant du diabète, un échantillon de 10 μL contenant potentiellement la cible recherchée est mélangé avec 5 μL d'anti Glucagon-d2 et 5 μL d'anti-glucagon-tb³⁺ cryptate qui sont deux anticorps liés à des fluorophores. Ensuite, une détection de fluorescence permet d'accéder à la concentration de glucagon. Les fabricants de ces kits mettent en avant la grande simplicité de ces tests par rapport aux tests ELISA hétérogènes.

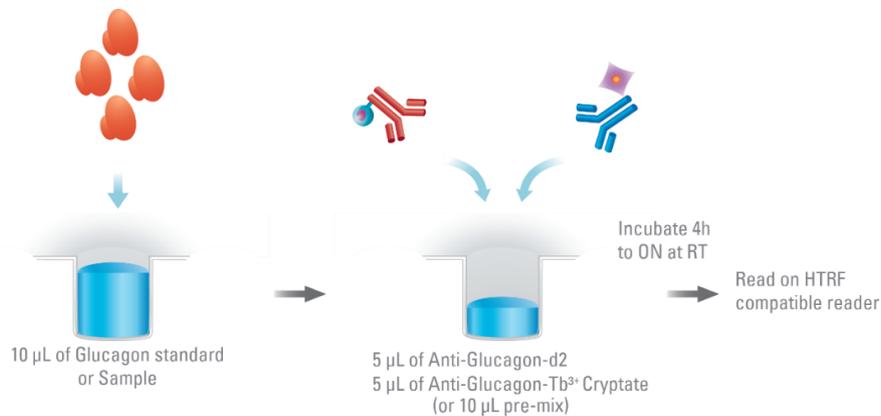


Figure I-16: Exemple de protocole d'un test ELISA homogène dans un puits [28].

Le protocole d'un test ELISA en phase hétérogène est plus complexe car il implique un nombre plus important d'étapes (Figure I-17). La première étape consiste à fonctionnaliser une surface avec des anticorps primaires ou des antigènes. Puis, une première solution contenant la cible recherchée (anticorps/antigène) est ajoutée. Ensuite, des étapes de lavage sont nécessaires avant d'ajouter un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Après cette étape, une deuxième étape de lavage est nécessaire avant d'ajouter le substrat. Les résultats de ce test sont ensuite fournis par une détection colorimétrique. Au total, ce protocole comprend une fonctionnalisation de surface, trois mélanges ainsi que trois étapes de lavage.

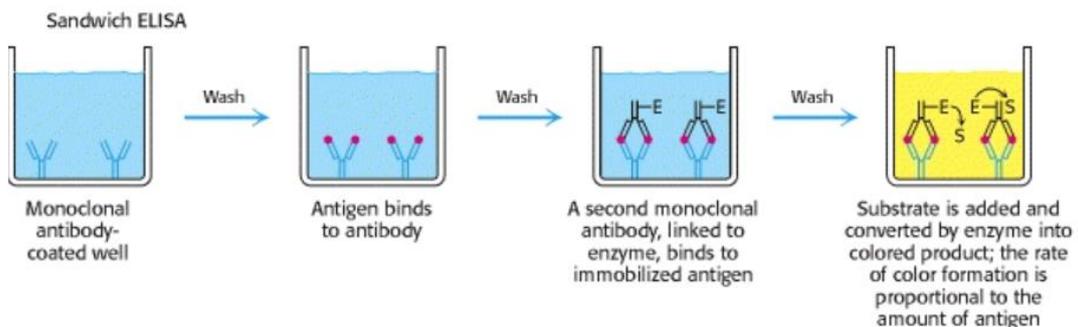


Figure I-17: Exemple de protocole d'un test ELISA hétérogène dans un puits [29].

Le choix du type de test et du protocole associé va donc se répercuter sur les études et les développements qui vont être réalisés.

I.3.2. Critères définis par l’OMS

Le dispositif portable « idéal » doit être capable d’accomplir une analyse complète à partir d’un échantillon biologique en parcourant toutes les étapes du protocole : préparation d’échantillon, contrôle de fluides, détection... Dans un dispositif portable, la partie en contact avec l’échantillon et les réactifs est appelée « consommable ». Cette partie est généralement jetée à la fin du test pour éviter les contaminations. En plus du consommable, le dispositif peut également comporter un instrument pour par exemple gérer les réactifs, faire la détection ou indiquer le résultat. Dans certains cas, ces éléments sont directement intégrés au consommable qui est jeté à la fin du test (exemple : test de grossesse). Dans d’autres cas, l’instrument est généralement réutilisable (exemple : lecteur de glycémie).

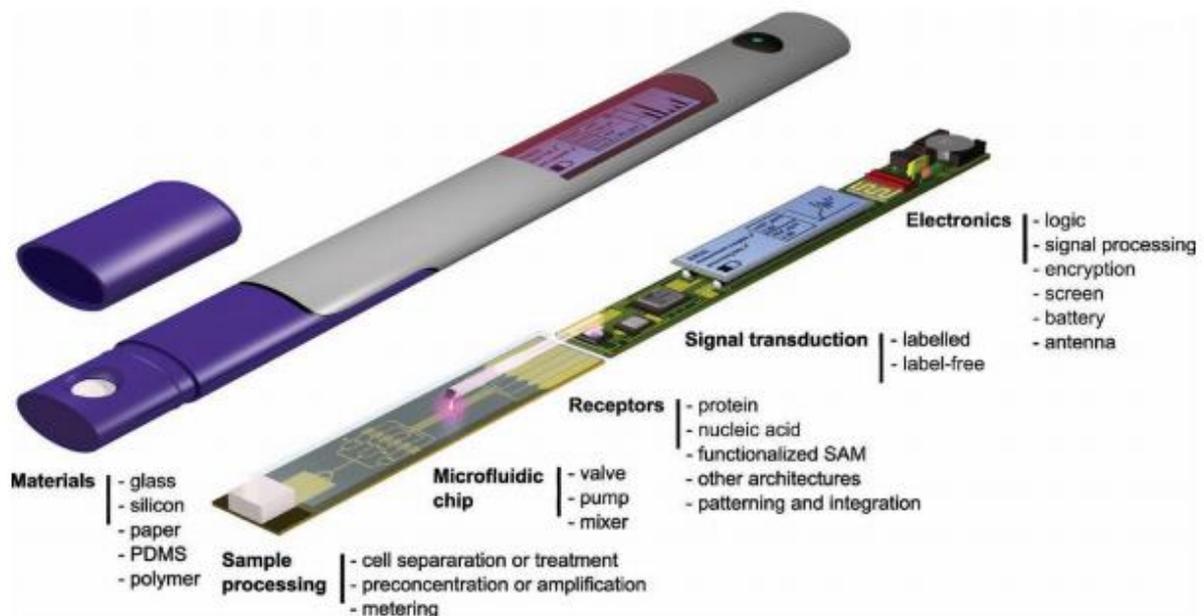


Figure I-18: Le dispositif portable idéal [30].

Idéalement, ce dispositif doit remplir 7 critères définis par l’OMS à l’aide de l’acronyme ASSURED (Figure I-18) [30]. Il doit être :

- **Abordable** : le test doit être à bas-coût
- **Sensible** : la détection doit empêcher les faux négatifs
- **Spécifique** : la détection doit être précise et spécifique
- **User-friendly** : l’utilisation doit être simple
- **Rapide** : l’accès aux résultats doit être rapide
- **Equipment-free** : le test ne doit pas nécessiter d’équipements extérieurs
- **Delivered** : le dispositif doit être fourni prêt à l’emploi

Selon les cas d’usage présentés dans la section I.2 (Figure I-15), l’importance de ces critères peut varier. Par exemple, pour des tests de terrain réalisés dans un pays en voie de développement, le critère du coût est important. Concernant l’utilisation du test, si un dispositif est utilisé par du

personnel médical, des opérations manuelles peuvent être demandées. En revanche, si le dispositif est utilisé par du personnel non formé, par exemple dans le cas où un agriculteur veut tester son élevage ou sa récolte, il faudra automatiser un maximum d'opérations. Des équipements extérieurs peuvent également être tolérés. Par exemple, dans le cas du test de glycémie, il est nécessaire d'avoir un glucomètre qui est un appareil de mesure réutilisable (Figure I-19).



Figure I-19: Glucomètre [31].

I.3.3. Définition de l'ensemble des critères à respecter

Un premier objectif de la thèse est donc d'intégrer un test ELISA dans un dispositif portable et autonome en respectant les critères définis par l'OMS. Ces critères vont être décrits par ordre d'importance croissante :

- Coût limité (critère A)
- Portabilité (critère E)
- Dispositif simple d'utilisation (critères U et D)

Le critère E qui signifie « absence d'équipements extérieurs » sera traduit par la portabilité du système car un instrument sera toléré. Les deux critères S ainsi que le critère R ne seront pas analysés car ils dépendent du protocole. Un critère supplémentaire qui n'est pas présenté dans l'acronyme ASSURED est celui de la quantification. Il se trouve que cette thèse va lui accorder une place majeure. Certains tests peuvent se satisfaire d'une réponse qualitative du type oui/non lorsque seule la présence d'une molécule est recherchée. En revanche, dans de nombreuses applications, il est important d'accéder à la concentration de la cible recherchée. Cette condition est exigée notamment dans le cas où il faut comparer la mesure à une valeur seuil. Par conséquent, pour répondre à tous les besoins décrits dans la section I.2, le critère de la quantification doit être considéré. Ce critère sera donc ajouté à la suite des critères précédents. Pour être valable, il doit être également couplé aux critères S (sensible et spécifique).

(i) Coût limité

Le critère du coût limité impose des contraintes importantes sur le consommable ainsi que son instrument. Il faut par exemple réduire au maximum le coût du consommable et donc sa complexité. De même, l'instrument doit comporter un minimum de fonctions.

Dans le cadre de la thèse, ce critère ne sera pas prioritaire mais il faudra tout de même veiller à minimiser les coûts.

(ii) Portabilité

Pour respecter le critère de portabilité, la carte microfluidique doit fonctionner avec une instrumentation simple, c'est-à-dire en limitant les sources d'énergie externe telles que les alimentations électriques ou pneumatiques. Trois problématiques sont à résoudre pour atteindre cet objectif.

Tout d'abord, il est important d'éviter les connexions fluidiques entre le consommable, c'est-à-dire la carte microfluidique, et son instrument. En effet, la présence d'une multitude de tubulures complexifie le système et en gêne la portabilité.

Ensuite, il s'agira d'identifier un système simple de gestion des fluides. Pour minimiser la taille de l'instrument, il est important de choisir un principe d'actionnement qui ne nécessite pas l'utilisation par exemple de pompes volumineuses. Actuellement, certains instruments fonctionnent avec un compresseur pour générer plusieurs bars ce qui limite la portabilité du système.

Enfin un dernier aspect pouvant limiter la portabilité est la méthode de détection choisie. Pour respecter ce critère, il faut donc être vigilant sur le choix du protocole qui va imposer le type de détection.

(iii) Dispositif quantitatif

Deux approches s'opposent afin de respecter les critères « sensibilité, spécificité et quantification ». La première approche suppose que le système et la technique utilisés soient suffisamment fiables. La deuxième tolère que les résultats ne soient pas reproductibles mais exige d'étalonner le système à chaque utilisation.

La première approche implique donc des contraintes sur les coûts de fabrication des composants pour la reproductibilité et des contraintes sur la stabilité des réactifs ce qui est difficile avec les anticorps. De même, la méthode de détection devra être très stable d'une mesure à l'autre, d'un appareil à l'autre et pour différentes conditions d'utilisation.

Une autre voie, plus originale dans les systèmes portables, consiste à auto calibrer le système pour s'assurer de la validité de chaque mesure effectuée à un instant t . Cela permet donc de relâcher les contraintes de reproductibilité mais la mise en œuvre d'un protocole fluidique est alors plus complexe. Plus concrètement, la calibration implique la mise en œuvre d'une gamme de dilution à partir d'une solution de référence. Le test complet doit être réalisé sur l'ensemble de la gamme en parallèle de l'échantillon.

Dans le cas où les tests sont effectués manuellement, les gammes de dilution impliquent de nombreuses étapes de pipetage. La précision des volumes dépend de la précision de l'utilisateur et de la pipette. L'ordre de grandeur des volumes utilisés est de l'ordre du μL au mL .

La première étape d'un test ELISA consiste à réaliser la gamme de dilution pour calibrer le test. Les réactifs du test étant sensibles à la température et aux conditions de stockage, les notices d'utilisation des kits biologiques indiquent qu'un test avec des solutions de référence est systématiquement nécessaire.

La méthode la plus couramment utilisée pour réaliser une gamme de dilution est la méthode de dilution en cascade (Figure I-20). Cela consiste à diluer une solution de référence également

I.3 : Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

appelée solution standard puis diluer à nouveau la solution diluée pour augmenter le facteur de dilution.

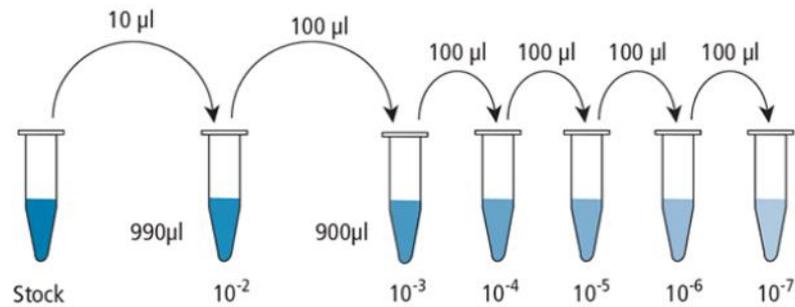


Figure I-20: Dilution en cascade.

Dans l'exemple de la Figure I-20, la première solution est diluée 100 fois. Ensuite, pour réaliser la deuxième dilution, 100 µL sont pipetés dans la solution diluée et ajoutés avec 900 µL de diluant ce qui permet de diluer par 10. Ensuite, pour les autres étapes, il y a également une dilution par 10. Cette méthode permet de prélever des gros volumes ce qui est plus précis. En revanche, si une erreur de pipetage se produit, cette erreur se propage dans toutes les solutions.

La deuxième méthode est appelée la méthode de dilution linéaire (Figure I-21). Pour réaliser une dilution, il faut prélever un certain volume de la solution de départ et de diluant quel que soit le facteur de dilution. Chaque dilution est donc indépendante.

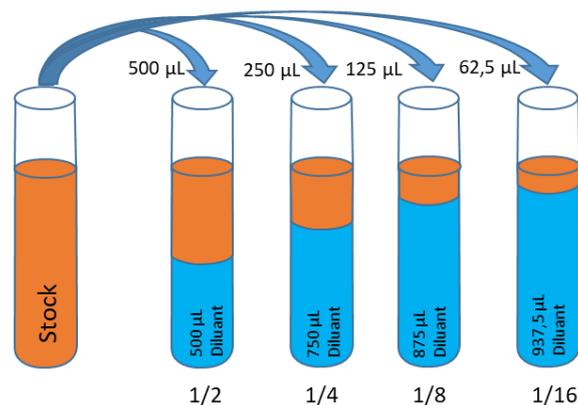


Figure I-21: Dilution linéaire.

Cette technique est peu utilisée car pour obtenir des coefficients de dilution importants (par exemple de ratios de 64 pour des gammes en puissance de 2), il faut soit prélever de très faibles volumes de la solution de référence ou alors ajouter un volume important de diluant. Cependant, la méthode semble plus directe car elle comporte moins de manipulations et n'est pas itérative.

Après avoir accompli la gamme de dilution à partir d'une solution en concentration d'analyte connue, le test est effectué sur les différentes solutions de référence en même temps que l'échantillon à tester. Lors de l'étape de détection, la valeur obtenue pour l'échantillon est alors comparée à celle de la courbe de calibration (Figure I-22) et la concentration de l'analyte recherché dans l'échantillon peut ainsi être calculée.

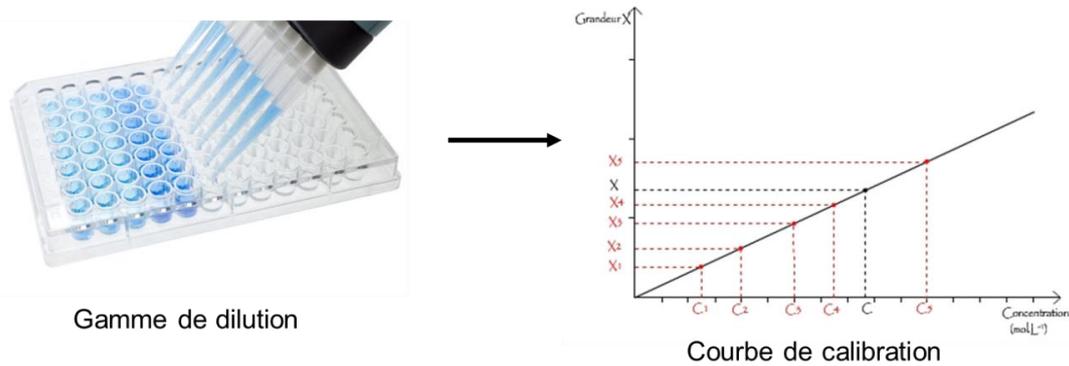


Figure I-22: Utilisation d'une gamme de dilution pour tracer une courbe de calibration.

L'élaboration conjointe d'une gamme de dilution et de la courbe de calibration demande donc de nombreuses étapes qu'il faut implémenter dans un système microfluidique.

(iv) Dispositif simple d'utilisation

Il est important que le dispositif soit utilisable par du personnel non qualifié pour des applications de terrain. Pour cela, il faut limiter un maximum le nombre d'opérations manuelles. Il faut donc éviter les opérations de pipetages, de connexions de tubes par exemple. Dans notre étude, nous avons choisi de privilégier ce critère en plus de l'aspect quantitatif pour viser un large nombre d'applications et d'utilisateurs.

I.3.4. Exemples de tests ELISA de terrain pour chacun de ces critères

Pour chacun des critères énoncés, un ou plusieurs exemples de système ayant choisi de favoriser ce critère en particulier seront présentés. En fait, bien souvent, plusieurs critères sont favorisés simultanément. Inversement, ce tour d'horizon montrera que la difficulté majeure est de respecter l'ensemble des critères choisis et en particulier les critères « quantitatif » et « simple d'utilisation ». Surmonter cette difficulté sera le défi principal de cette thèse. Ces analyses permettront ensuite d'effectuer des choix pour le dispositif visé par la thèse.

(i) Coût limité

Actuellement, la plupart des dispositifs portables existants sur le marché et ayant le plus de succès sont des tests sur bandelettes ; ils mettent en jeu un écoulement latéral (« lateral flow ») [32] induit uniquement par des forces capillaires. Tous les réactifs nécessaires au test sont stockés et séchés sur le dispositif. La lecture du résultat est optique et peut s'effectuer à l'œil nu. L'exemple le plus connu fondé sur ce principe est le test de grossesse [33]. La Figure I-23 explique le fonctionnement d'un test immunologique sur bandelette. L'échantillon est entraîné dans le dispositif par les forces capillaires. Les réactifs sont alors réhydratés par le passage de l'échantillon. Ensuite, au niveau de la ligne de test, des anticorps sont greffés et capturent l'antigène couplé à un anticorps marqué, s'il est présent dans l'échantillon. Dans le cas d'un test positif, une ligne de couleur apparaît. Il y a également une ligne de contrôle comprenant des anticorps secondaires qui se couplent aux anticorps marqués non liés. Quel que soit le résultat

I.3 : Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

du test, la deuxième ligne doit être colorée pour valider le bon fonctionnement du test. Les résultats sont visibles après une durée allant de 2 à 15 minutes.

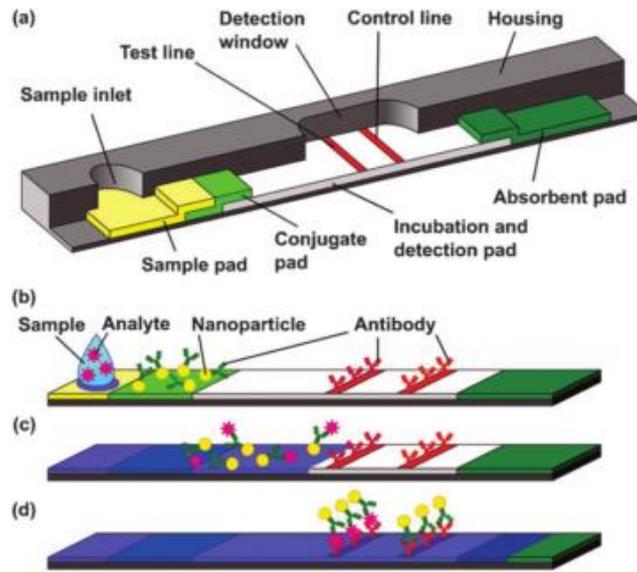


Figure I-23: Test immunologique sur bandelette [34].

Les tests sur bandelettes présentent de nombreux avantages. Ce sont des dispositifs à bas coût, entièrement automatisés, et donc simples d'utilisation. De plus, ils fonctionnent sans source externe. Ces présents aspects font que les tests sur bandelettes sont très utilisés sur de nombreuses applications avec des performances de plus en plus intéressantes. Ceci explique l'intérêt de certains laboratoires de faire évoluer la technologie vers les systèmes appelés laboratoires sur papier (Figure I-24, [35]).

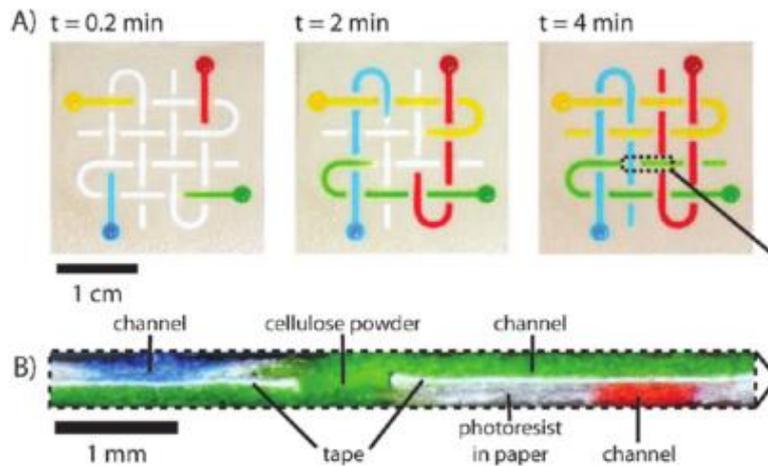


Figure I-24: Exemple de système microfluidique sur papier [35].

Cependant, ce type de test est réservé à des protocoles simples avec un faible nombre d'étapes. Ainsi, ce test ne comporte pas d'étape d'amplification ce qui rend difficile la détection de cibles présentes en faible quantité. Il ne comporte pas non plus d'étapes de lavage ce qui augmente le bruit de fond et sa sensibilité tend à être réduite. De plus, comme il est difficile de contrôler précisément des volumes de fluides, il n'est que qualitatif ou semi quantitatif. Il est également difficile de s'assurer de la stabilité des réactifs car ces derniers étant sensibles à la température

ou l'humidité par exemple, l'exactitude du résultat ne peut être garantie. Enfin, pour effectuer certains tests, une étape de préparation d'échantillon est nécessaire (extraction de plasma, dilution du sang...). Or cette étape, qui est difficilement intégrable sur ce type de dispositif, doit être conduite de façon externe.

Cet exemple montre qu'il est difficile de respecter à la fois les critères « sensibilité et quantification » et le critère du coût limité. En effet, pour atteindre un test sensible et quantitatif, un instrument sera nécessaire pour la détection et l'affichage du résultat.

Un compromis pour respecter ces trois critères est de dissocier l'instrument du consommable afin de le rendre réutilisable. De plus, pour limiter le coût de l'instrument, il est intéressant d'aboutir à une plateforme générique pour une pluralité de protocoles ELISA. Un changement de protocole ne doit pas remettre en cause l'instrument. La plateforme doit donc être programmable et versatile. Enfin, pour ne pas redévelopper de protocoles ou de réactifs dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi d'utiliser des kits commerciaux.

(ii) Portabilité

Jouer sur les forces capillaires est avantageux car il est alors possible d'injecter des fluides sans apport d'énergie et donc sans instrument. Une autre approche utilisant ce principe est de structurer des matériaux (papiers, polymères) par micro fabrication [36]. Ce choix a été adopté pour réaliser des tests immunologiques sur des cartes microfluidiques [37], [38]. Pour réaliser un protocole en plusieurs étapes, des fonctions fluidiques peuvent être ajoutées telles que des vannes qui stoppent, déclenchent ou retardent l'écoulement [39]. Dans l'exemple de la Figure I-25, le dispositif permet de détecter la présence de troponine dans un échantillon. Ce protocole se réalise en deux étapes. Un échantillon de 15 μL est d'abord injecté par le port 1 et va ensuite migrer grâce aux forces capillaires jusqu'à une vanne « stop » ; puis une solution de 15 μL d'anticorps marqués avec FITC est injectée par le port 2, en déclenchant l'écoulement de l'échantillon. Ces deux liquides vont ensuite migrer à travers deux serpentins qui vont réduire la vitesse de l'écoulement : le premier permet aux deux liquides de se mélanger et le deuxième permet d'augmenter le temps d'incubation. Le mélange atteint ensuite la zone de détection. Dans les systèmes microfluidiques, la forme des chambres est également importante pour minimiser la formation de bulles. Limiter les bulles permet de contrôler plus précisément le volume d'une chambre et de ne pas gêner la détection. Dans cet exemple, la forme de la chambre est un losange. Enfin, une solution de tampon (PBS) de 40 μL est injectée par les ports 1 et 2 du système. Cela permet d'amener les complexes anticorps – antigènes restant vers la zone de détection et cela agit également en tant que tampon de lavage pour éliminer les anticorps qui ne sont pas liés.

I.3 : Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

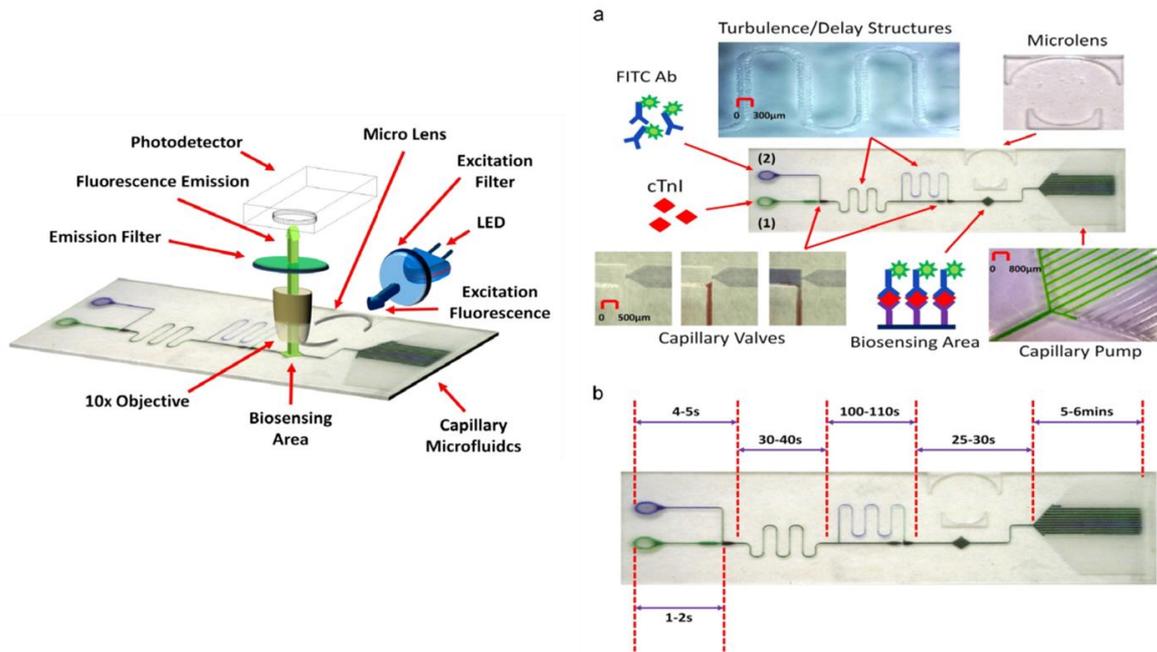


Figure I-25: Configuration du dispositif [38].

Dans ce type de système, chaque mélange est généralement réalisé avec un serpentin. Si le protocole comporte un grand nombre d'étapes et que plusieurs échantillons sont testés en parallèle, la taille du dispositif sera trop importante. De plus, pour augmenter le nombre d'étapes, il faut également ajouter des fonctions fluidiques supplémentaires. Par exemple, des serpentins peuvent être rajoutés pour retarder certains écoulements comme le montre la partie D de la Figure I-26 ce qui peut rendre l'architecture très complexe.

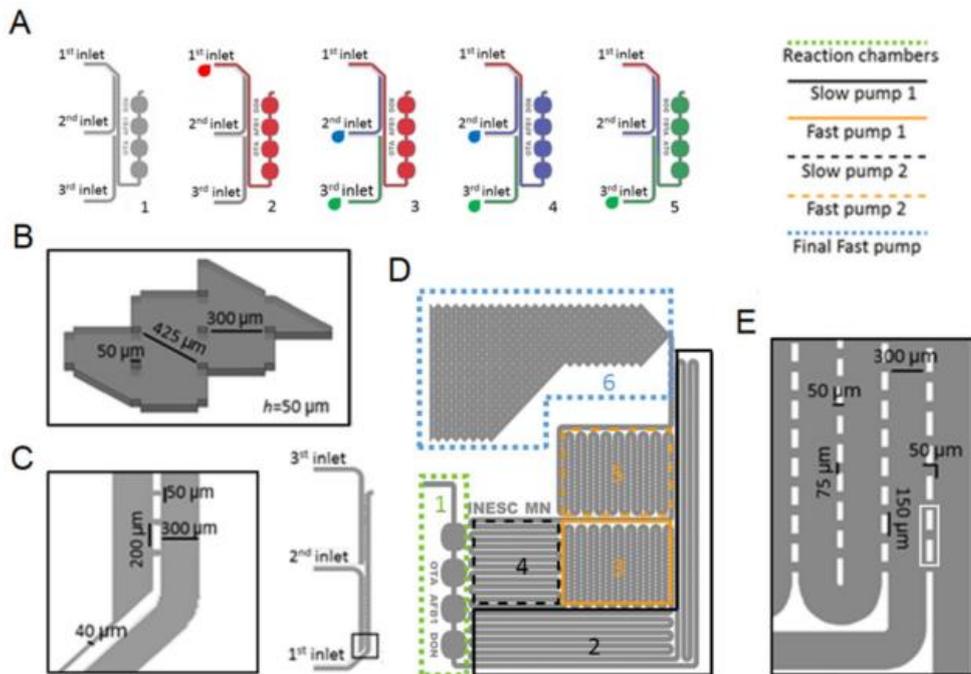


Figure I-26: Architecture pour intégrer un test ELISA multi étapes [40].

Les systèmes fondés sur les forces capillaires permettent de se passer d'équipements externes tels que des pompes mais ne permettent pas par exemple d'automatiser les injections de réactifs. Ils

ne sont pas programmables, il faut par exemple que l'opérateur injecte les réactifs les uns après les autres dans le système, qu'il ouvre ou ferme des événements pour diriger les réactifs ce qui peut constituer dans certains cas une contrainte importante.

Finalement, le choix effectué est d'intégrer des composants actifs telles que des vannes dans le consommable afin d'automatiser l'enchaînement des opérations d'un protocole complexe et pour éviter à l'opérateur de réaliser des opérations manuelles. Cependant, il faudra simplifier au maximum l'architecture pour qu'elle soit pilotable par un nombre limité d'actionneurs.

(iii) Dispositif quantitatif

Comme expliqué précédemment, la première approche pour atteindre un dispositif quantitatif en microfluidique est d'utiliser un système reproductible et de comparer la mesure obtenue pour l'échantillon avec une courbe de calibration effectuée précédemment. Un dispositif portable (Minicare, Philips) a été développé pour détecter de la troponine [41] et comprend un consommable et un instrument (Figure I-27 A et B). Il permet de tester un échantillon sanguin qui va remplir le consommable par capillarité. Pour réaliser la détection, un capteur optomagnétique est utilisé [42] (Figure I-27 C et D). La lumière est réfléchiée sur la surface avec une intensité qui dépend de la concentration de nanoparticules à la surface du capteur. Si la troponine est présente dans l'échantillon, les nanoparticules vont s'accrocher à la surface du capteur et seront détectées.

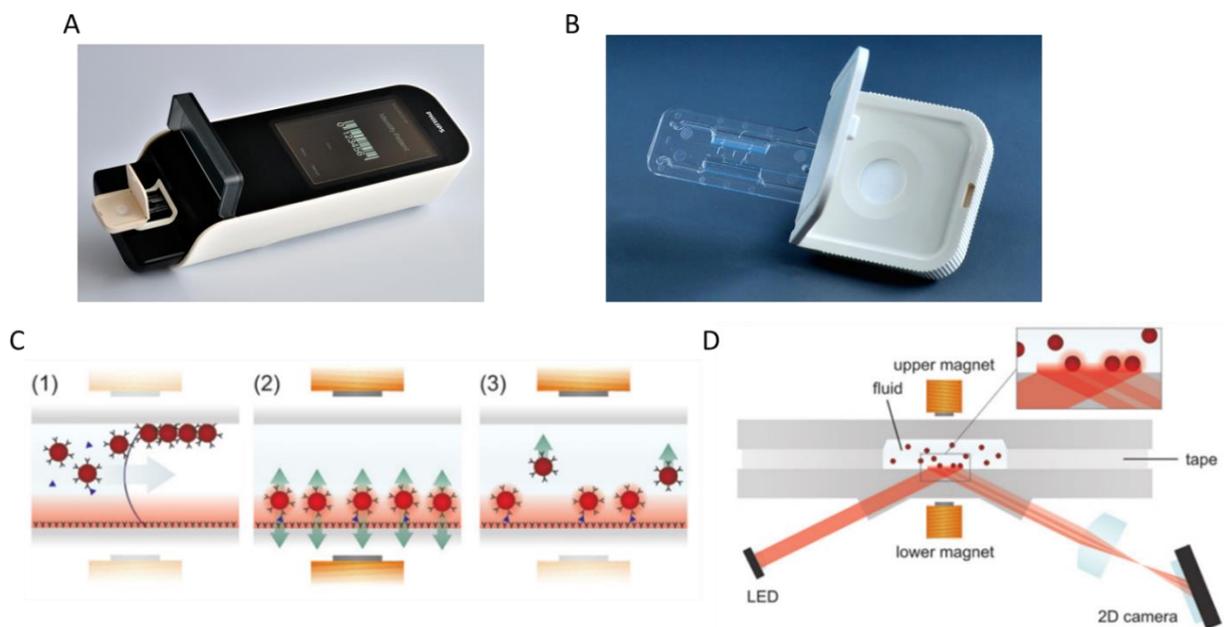


Figure I-27: Instrument (A) et consommable (B) Minicare, Philips. Principe du capteur optomagnétique : représentation des étapes successives de la chambre de réaction (C) et schéma du capteur (D).

Concernant le protocole, les réactifs sont séchés dans le dispositif et la seule étape consiste à ajouter l'échantillon. Le protocole est simple mais pour que les résultats soient valables, il faut être certain que les réactifs se conservent dans le consommable et il faut que la détection soit reproductible.

La deuxième approche consiste à intégrer une calibration. Cette méthode est celle qui est recommandée systématiquement dans les kits ELISA commerciaux. Dans l'exemple de la Figure

I-28, un test ELISA homogène du type Alphasisa décrit précédemment a été intégré dans une carte microfluidique [43].

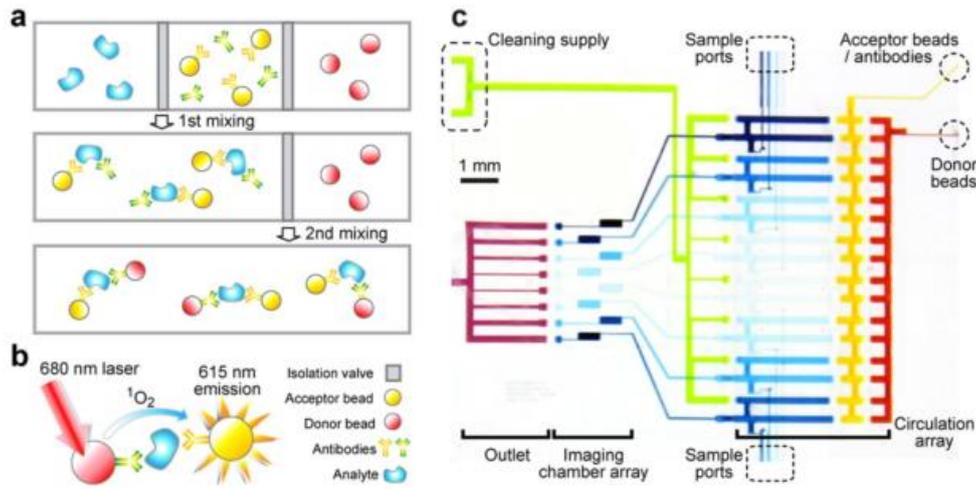


Figure I-28: Intégration d'un test Alphasisa dans une carte microfluidique [43].

Ce test est réalisé en phase homogène et sans étapes de lavage qui est à première vue plus facilement intégrable qu'un test ELISA en phase hétérogène du point de vue de la microfluidique. Des solutions de référence doivent être injectées pour calibrer le système. De plus, la méthode de détection nécessite un microscope fluorescent équipé d'un laser de 500 mW ce qui peut compromettre l'autonomie et la portabilité du système.

L'exemple suivant intègre en plus dans la carte la préparation de la gamme de dilution et l'utilise pour réaliser un test ELISA en phase hétérogène (Figure I-29 [44]).

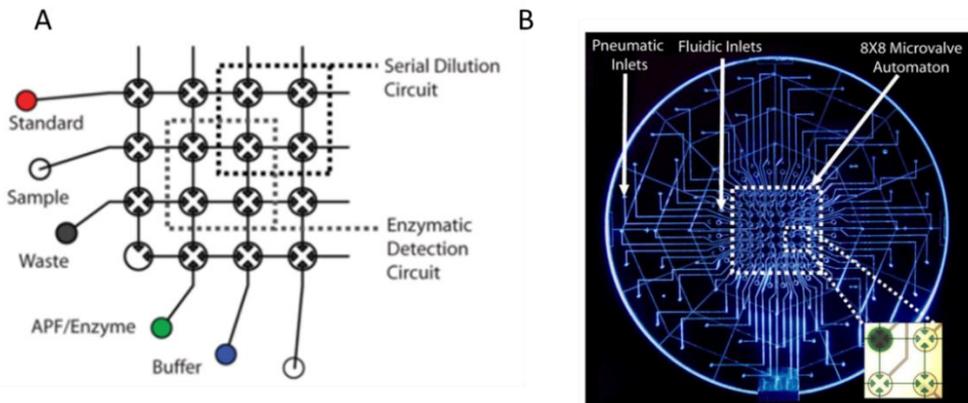


Figure I-29 : A : Architecture d'une carte microfluidique pour réaliser une dilution en série et un test ELISA, B : image de la carte microfluidique [44].

Cette architecture est intéressante mais la photo de la carte (Figure I-29, B) montre que de nombreuses connexions fluidiques et pneumatiques sont nécessaires pour son contrôle. Cette solution semble difficilement portable avec des réactifs qui ne sont pas intégrés et il n'y a d'ailleurs pas d'images du dispositif dans son ensemble dans la publication.

Un exemple de dispositif connecté à l'aide de tubes est représenté en Figure I-30. Cette image montre bien la complexité d'une carte dont les réactifs ne sont pas embarqués.

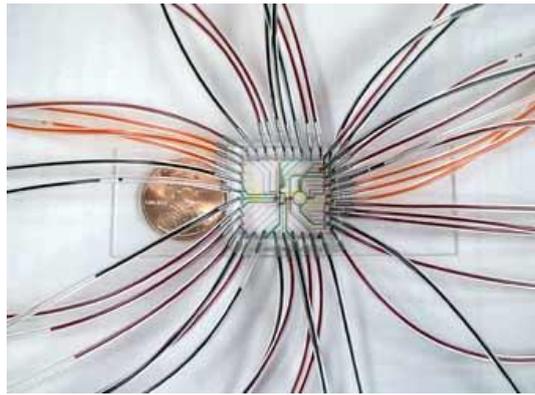


Figure I-30: Vue d'une carte microfluidique et des connexions fluidiques [45].

Pour éviter à l'utilisateur de devoir manipuler des tubes et des réactifs, il est nécessaire de confiner les réactifs et l'échantillon dans la partie consommable. Le système devient plus simple d'utilisation et de plus, cela permet d'éviter les contaminations et les sources d'erreurs (sur l'adressage des connexions par exemple). L'instrument pourra alors rester sec.

Pour s'affranchir des contraintes sur la reproductibilité du protocole ou de la détection, nous avons fait le choix d'intégrer la préparation d'une gamme de dilution et de calibrer le système à l'aide de cette gamme comme dans l'exemple de la Figure I-29. Ce choix est cohérent avec notre souhait de ne pas modifier ou dégrader les protocoles définis par les kits ELISA existants qui préconisent systématiquement l'auto-calibration. Cependant, la difficulté sera de combiner ce choix avec les critères « U » et « D », c'est-à-dire la simplicité d'utilisation.

(iv) Dispositif simple d'utilisation

La contrainte de simplicité englobe notamment la contrainte de portabilité. De ce fait, elle se retrouve en opposition avec la troisième contrainte énoncée : il s'agit de concevoir un dispositif microfluidique à la fois simple et quantitatif sachant que pour respecter cette dernière une calibration sera intégrée dans le système. Il existe ainsi plusieurs solutions pour intégrer un test ELISA dans un dispositif portable et simple d'utilisation mais les architectures de carte ne permettent pas d'intégrer une calibration dans le système.

Un test ELISA peut ainsi être réalisé avec une plateforme qui utilise la force centrifuge pour injecter des liquides [46],[47]. Ces plateformes sont appelées « Lab on a disc » (Laboratoire sur disque). Le système se présente sous la forme d'un disque sur lequel sont placés des réactifs. Selon leur emplacement sur le disque, les réactifs vont être injectés à une vitesse de rotation donnée [48], [49]. Ce principe simple d'actionnement rend la plateforme miniaturisable et plus facilement transportable ; un autre intérêt est de pouvoir intégrer facilement la préparation d'échantillon. Par exemple, le plasma peut être récupéré à partir du sang total en utilisant la force centrifuge [47]. Dans la Figure I-31, le test ELISA est réalisé avec une plateforme qui utilise des pistons pour actionner des vannes et pour injecter les réactifs à différents instants.

I.3 : Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

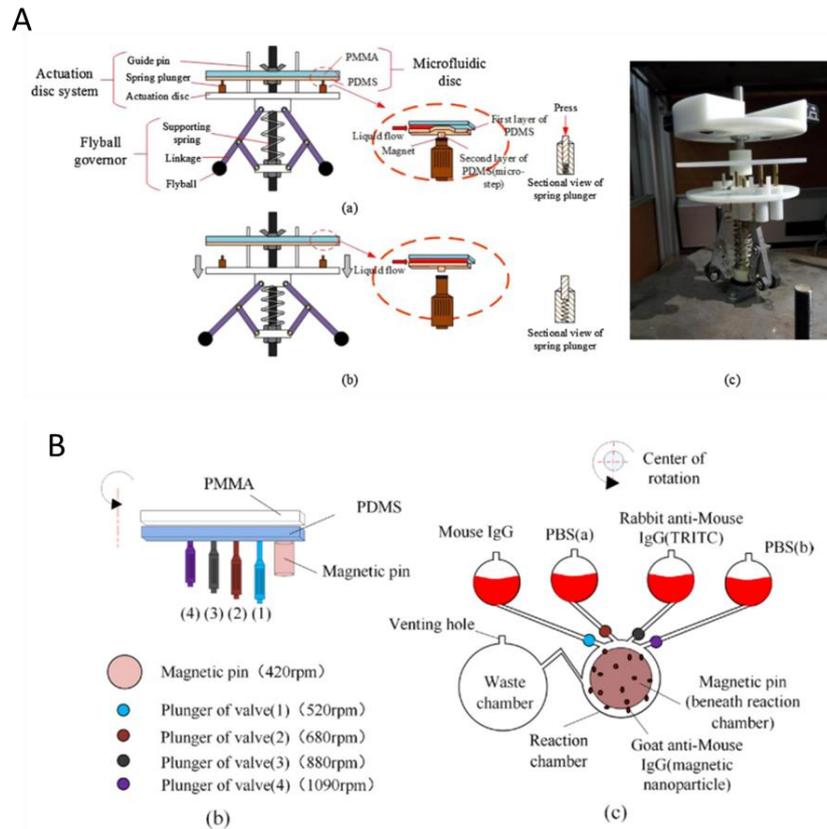


Figure I-31: Plateforme centrifuge comprenant des pistons (A) et principe d'actionnement des réactifs (B) [46].

Cette plateforme intègre un test ELISA complet avec des étapes de lavage mais seul l'échantillon est testé. Il n'y a donc pas de calibration du système. La méthode centrifuge est donc intéressante pour ce qui est de la portabilité mais il semble difficile d'effectuer différentes analyses en parallèle et donc d'y ajouter une calibration. De plus, cette méthode est peu programmable car le seul paramètre modifiable est la vitesse de rotation. Si les volumes de réactifs changent, il faut changer le design de la carte et recalculer les vitesses de rotation.

Les smartphones sont souvent associés aux dispositifs portables de diagnostic ; leur fonction peut varier. Ils peuvent servir à réaliser des détections colorimétriques [50], d'alimentation électrique ou encore d'outil pour accompagner l'utilisateur et lui indiquer les différentes étapes. Ils peuvent également permettre d'afficher les résultats du test. Dans l'exemple de la Figure I-32, le smartphone a pour fonction d'indiquer à l'utilisateur les différentes étapes et de lui demander de faire des manipulations comme par exemple d'appuyer sur un bouton pour activer une chambre de pression négative et ainsi pomper les réactifs dans la carte [51], [52]. L'avantage de ce système est qu'il n'implique pas de mécanisme électromécanique externe, l'instrument est donc simple et portable.



Figure I-32: Exemple d'un dispositif portable utilisant un smartphone pour mesurer la concentration d'hémoglobine et détecter des anticorps contre le VIH [50].

Dans ce système, il y a quatre zones de détection : une zone est dédiée à la mesure d'hémoglobine, trois zones sont dédiées à la mesure du VIH (un contrôle positif, un contrôle négatif et la zone de test). Pour assurer une calibration de la détection optique du système, un réactif de lavage est injecté dans le dispositif et une mesure optique est effectuée pendant son passage. La même opération est réalisée lors du passage de l'échantillon. En revanche, dans ce système il n'y a pas de calibration avec des solutions de référence.

L'exemple de la Figure I-33 montre un dispositif permettant de réaliser un test ELISA grâce à des pompes électrochimiques intégrées [50]. Le smartphone permet de faire la détection colorimétrique.

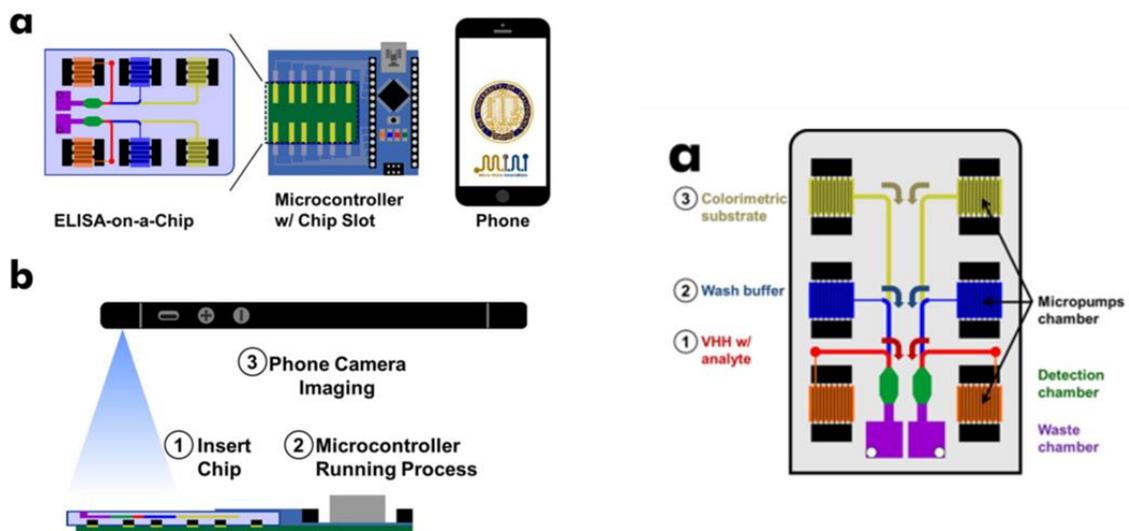


Figure I-33: Système intégré comportant un smartphone pour réaliser un test ELISA [50].

I.3 : Caractéristiques visées pour un nouveau dispositif portable et autonome

Ce dispositif contient deux chambres de réaction qui permettent de conduire deux analyses en parallèle ce qui semble insuffisant pour calibrer le système. De plus, les réactifs utilisés ne proviennent pas de la même chambre et il est donc difficile de comparer.

Le dispositif présenté dans la Figure I-34, intègre des vannes mécaniques qui permettent d'injecter des liquides à différents instants. Ces vannes peuvent être actionnées à l'aide d'un instrument mais peu de vannes de ce type peuvent être intégrées dans le dispositif, ce qui ne permet pas d'intégrer un nombre important d'étapes. En effet, le nombre de réactifs différents à gérer sera équivalent aux nombres de vannes c'est-à-dire six dans cet exemple. Cette plateforme permet donc d'intégrer un protocole en plusieurs étapes avec des étapes de lavage mais le test n'est effectué que sur l'échantillon. Il semble difficile d'intégrer une gamme de dilution et de gérer plusieurs tests en parallèle pour réaliser une calibration.

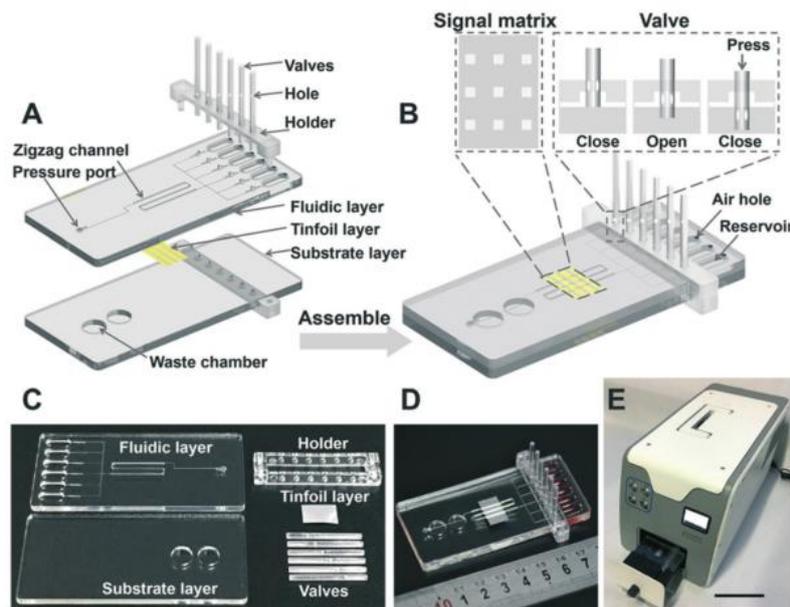


Figure I-34: Fabrication et architecture d'une carte pour un test immunologique de chimiluminescence [53].

Ces solutions sont adaptées pour l'intégration d'un test ELISA dans un dispositif portable et simple d'utilisation. Cependant, les architectures de carte et les dispositifs choisis ne permettent pas d'intégrer une calibration dans le système. Actuellement, aucun système ne semble donc combiner une calibration et un dispositif portable et simple d'utilisation.

Nous allons alors analyser dans la section I.4, les différentes techniques microfluidiques pour réaliser une gamme de dilution, qui est la première étape pour calibrer un système, afin de choisir une architecture cohérente avec nos critères.

La section I.5 sera ensuite consacrée aux méthodes de stockage de réactifs pour réfléchir à un dispositif entièrement automatisé, compatible avec l'intégration d'un protocole complexe.

I.4. Etat de l'art des gammes de dilution dans des systèmes microfluidiques

La mise en œuvre d'une gamme de dilution implique la gestion précise des volumes et leur mélange. Certaines techniques microfluidiques sont connues pour être d'une très grande précision. Un état de l'art de ces techniques va être rapidement dressé ici.

I.4.1. Microfluidique continue

Des dilutions peuvent être réalisées et intégrées dans une carte microfluidique en utilisant un réseau de microcanaux dans une structure en branches [54], [55], [56]. Un exemple développé par l'équipe de G. Whitesides [57] est reporté dans la Figure I-35. Ces systèmes sont fondés sur une approche en flux continu. Le principe est de contrôler le flux des différents liquides (diluant et solution de référence) pour atteindre différentes concentrations. Cette technique est adaptée pour contrôler des liquides sur une longue période avec une très bonne maîtrise en terme de débit.

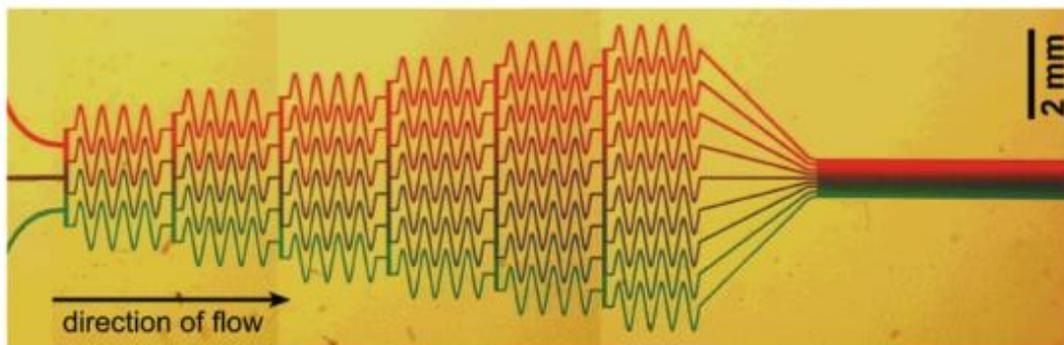


Figure I-35: Technique de dilution en flux continu [57].

I.4.2. Microfluidique digitale et gamme de dilution en cascade

Une autre approche est la microfluidique digitale qui contrôle des volumes discrets. Les opérations fluidiques telles que mélanger, séparer ou aliquoter peuvent être combinées pour faire des dilutions. Deux approches digitales peuvent être employées pour réaliser des dilutions. La première approche est itérative et utilise le principe de dilutions en cascade, défini dans la section I.3.3(iii).

Cette approche fondée sur le contrôle d'un volume unitaire peut être réalisée par électromouillage [58],[59] dont un exemple est donné en Figure I-36.

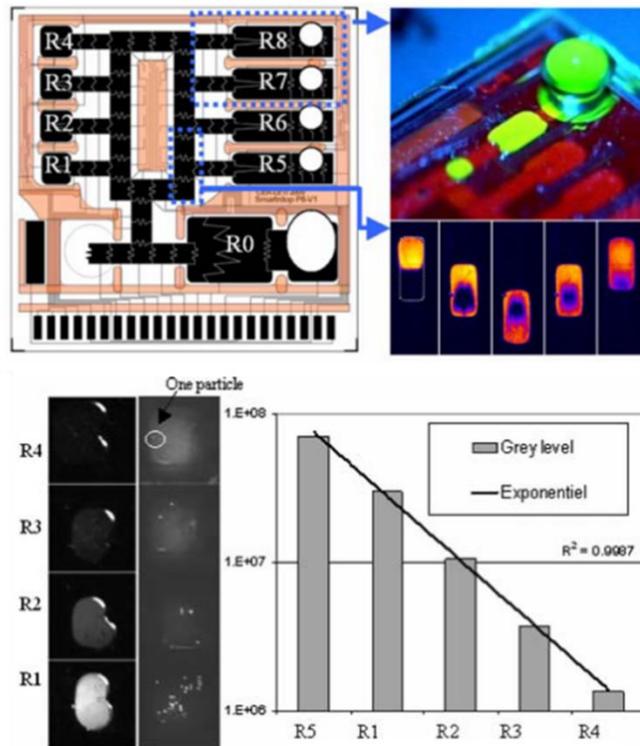


Figure I-36: Dispositif utilisant l'électromouillage pour l'élaboration d'une gamme de dilution [58].

Elle peut aussi être effectuée grâce à un actionnement pneumatique sur une puce en PDMS. Cette technique utilise la déformation d'une membrane de PDMS pour transférer un volume de fluide d'une chambre à une autre [60], [61]. Ce principe a été utilisé par Stephen Quake pour réaliser des vannes [62]. Ces vannes sont composées de deux couches de PDMS. L'une comporte des canaux fluidiques pour la circulation des fluides et l'autre comporte des canaux pneumatiques. Les vannes se forment au croisement de deux canaux. En pressurant le canal pneumatique, le matériau élastique se déforme dans le canal fluide pour le fermer et bloquer le passage du liquide (Figure I-37).

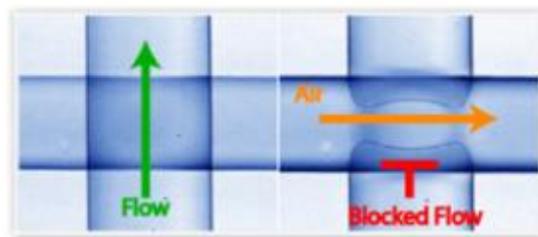


Figure I-37: Vanne de Stephen Quake (Fluidigm) [63].

Une autre technologie de vannes appelées « Doormate » c'est-à-dire « vanne à franchissement » en français, dont le fonctionnement est schématisé sur la Figure I-38 peut être utilisée pour réaliser une gamme de dilution en cascade.

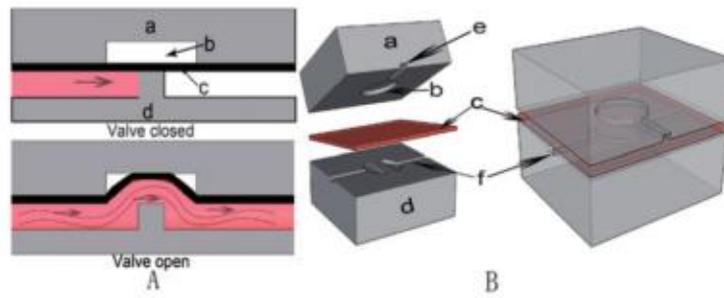


Figure I-38: Vanne « doormate » [64].

Ces vannes peuvent être normalement fermées puis ouvertes avec une pression négative. Différentes architectures sont fondées sur ce principe comme les structures en boucle [65], les structures en échelle (Figure I-39) [66] et les matrices de chambres [67],[68] (Figure I-40).

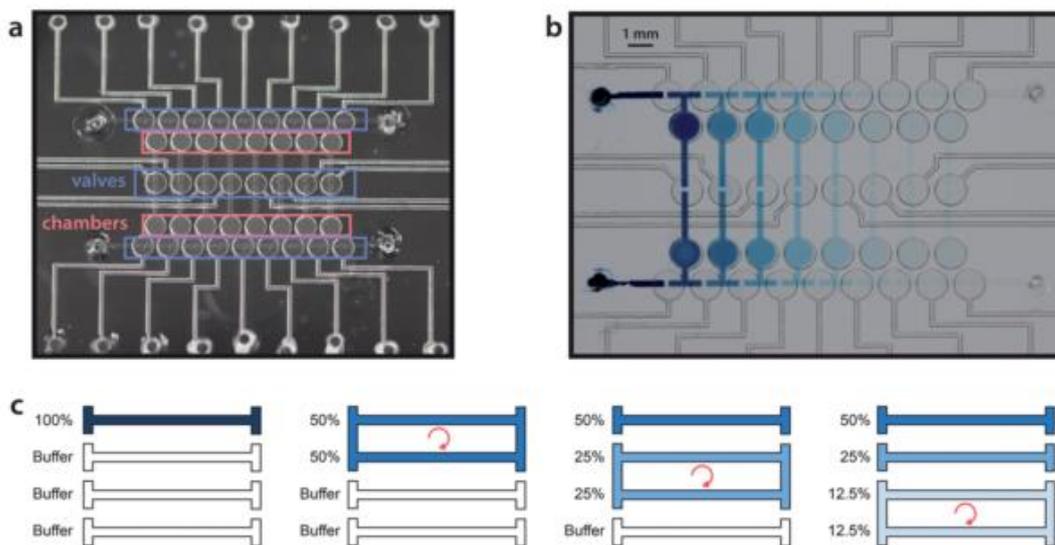


Figure I-39: Gamme de dilution utilisant une méthode de dilution en cascade dans une structure en échelle [66].

La structure en échelle est intéressante pour créer rapidement une gamme de dilution. Les solutions sont mélangées en effectuant des cycles. Cependant, les solutions préparées semblent difficilement exploitables. Il faut une technique qui permette de créer une gamme de dilution mais également qui propose un moyen de stocker ces solutions et de les utiliser ensuite pour effectuer un test.

La structure en matrice de chambres (Figure I-40) semble plus pertinente pour élaborer la gamme de dilution et utiliser simplement les solutions pour calibrer le système. La première dilution est atteinte en combinant l'échantillon et le diluant dans deux vannes. Puis, une des vannes est transférée vers la sortie 1 et la deuxième est de nouveau diluée. Quatre niveaux de dilutions sont ainsi obtenus.

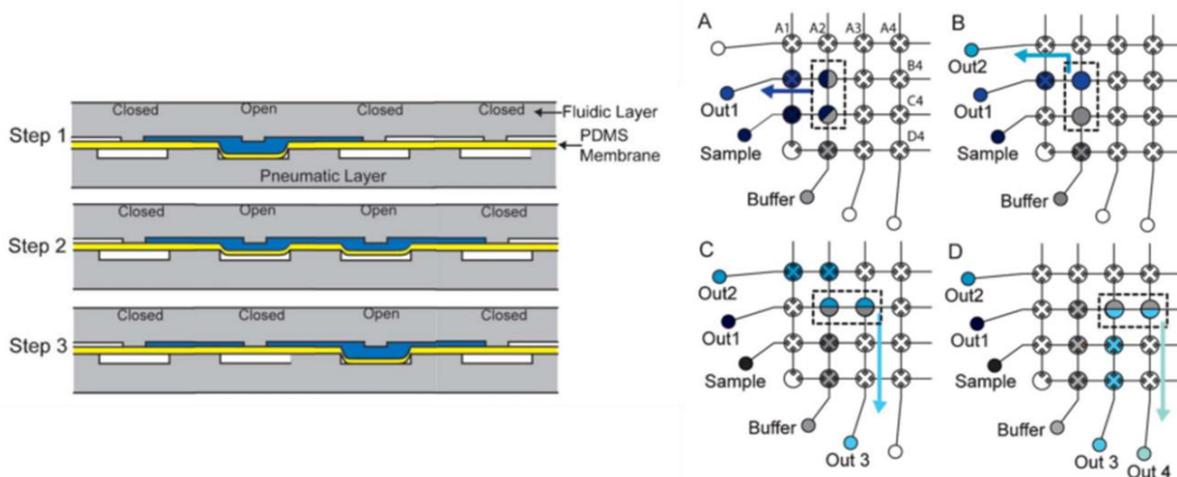


Figure I-40: Gamme de dilution utilisant une méthode de dilution en cascade dans une structure en matrice [68].

Cette technique présente un autre intérêt, les réactifs sont mélangés efficacement en combinant des opérations sur les chambres. En revanche, chaque chambre doit être pilotée par un actionneur pneumatique individuel, ce qui complexifie l'instrumentation et limite la possibilité de miniaturisation (voir section I.3.4(iii)). D'autre part, à chaque dilution, il y a une imprécision au niveau des volumes mélangés due aux volumes morts présents dans les canaux. Par conséquent, la concentration finale, en particulier pour un grand nombre d'itérations, peut entraîner une erreur qui s'accumule à chaque étape de dilution et il est nécessaire d'appliquer un coefficient de correction pour obtenir le facteur de dilution réel. Enfin, cette technologie a été développée pour gérer des faibles volumes (centaines de nL) alors que les volumes utilisés dans les kits commerciaux sont plutôt de l'ordre de quelques μL à quelques centaines de μL [67].

I.4.3. Microfluidique digitale et gamme de dilution linéaire

La deuxième approche relevant de la microfluidique digitale est la méthode de dilution linéaire. Ici chaque dilution résulte d'un seul mélange de deux volumes qu'il faudra calibrer, c'est-à-dire la solution de référence et de diluant, avec un ratio correspondant à la concentration attendue.

Dans la Figure I-41, le dispositif développé par l'équipe de T. Veres, effectue des dilutions linéaires en injectant différents volumes de réactifs dans une chambre de mélange. Ici, le principe de l'actionnement des fluides résulte d'un couplage entre des vannes pneumatiques et une plateforme de centrifugation permettant l'injection des fluides dans les chambres. Chaque volume à mélanger est défini par la pression qui est appliquée. Puis, pour améliorer le mélange, des impulsions d'air sont appliquées au niveau du réservoir de mélange. Ensuite, la plateforme est mise en rotation à forte vitesse pour que le liquide traverse une constriction par effet centrifuge. Une partie du mélange est alors stockée sous la forme d'un aliquot. Cette opération est répétée plusieurs fois pour obtenir les aliquots de concentrations différentes et atteindre une gamme de dilution complète. Cette méthode permet donc d'obtenir une gamme de dilution et de stocker les différentes solutions mais les auteurs ne précisent pas comment la gamme ainsi formée peut-être exploitée pour poursuivre un protocole complet. De plus, le contrôle en pression dépend de nombreux paramètres tels que les pertes de charge qui peuvent varier suivant l'architecture de la carte et les propriétés du liquide.

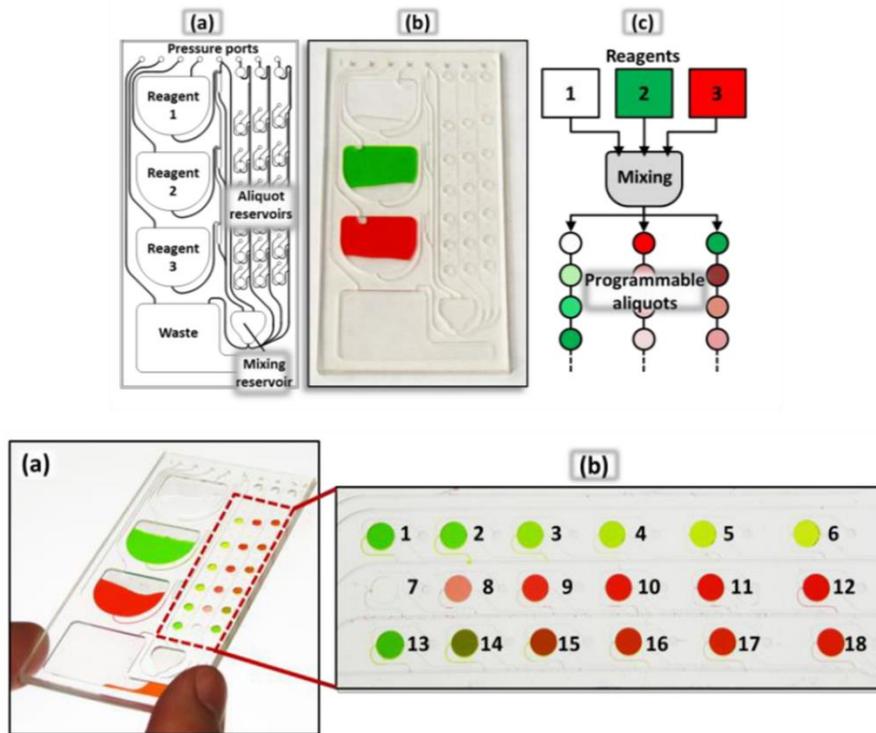


Figure I-41: Plateforme d'aliqots programmables, dispositif permettant de réaliser des dilutions linéaires [69].

La publication [70] présente une architecture en X-Y c'est-à-dire une architecture formée de lignes et de colonnes permettant de paralléliser les opérations (Figure I-42). Le diluant et la solution standard sont injectés suivant une première ligne dans la direction X sur deux voies en parallèles formées par des successions de chambres. Le volume des chambres de la solution de référence augmente dans la direction X alors que le volume des chambres de diluant diminue de manière complémentaire. Il reste à mettre en contact chaque colonne de chambres deux à deux suivant la direction Y. Les fluides sont alors transférés vers une troisième ligne de chambres.

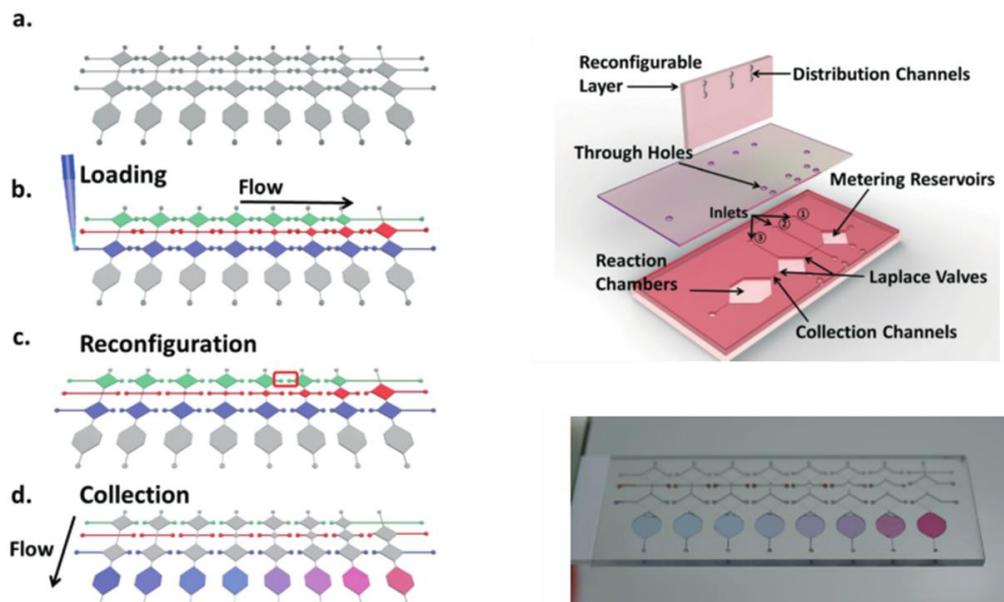


Figure I-42 : Gamme de dilution réalisée par la méthode de dilution linéaire avec une architecture en X-Y [71].

Ici, le facteur de chaque dilution est donc uniquement déterminé par les volumes des chambres. Ceci présente l'intérêt d'avoir un principe robuste avec un résultat qui n'est pas dépendant des propriétés des fluides (viscosité, capillarité). Ce protocole est simple et nécessite seulement quelques étapes. L'avantage de ce système est que la carte est totalement passive et évite l'utilisation de pompes externes. Cependant, l'architecture ligne-colonne comporte des intersections formant des aiguillages qu'il faut maîtriser. Pour sélectionner la direction d'écoulement (sur X dans un premier temps, sur Y dans un deuxième temps), les auteurs utilisent des effets capillaires ainsi qu'une reconfiguration du réseau fluide obtenue par un repositionnement d'un capot.

Cette architecture est pertinente d'un point de vue de la simplification des opérations qui peuvent s'effectuer en parallèle. Comparé aux méthodes de dilution en cascade, le nombre d'opérations est indépendant du nombre de points de la gamme de dilution. En revanche, avec cette mise en œuvre, ce système demande beaucoup d'opérations manuelles. Les liquides sont injectés manuellement à l'aide d'une pipette puis, pour effectuer chaque mélange, les liquides sont pipetés à la sortie colonne par colonne. De plus, il faut changer la configuration du capot pour modifier la direction d'injection. Enfin pour homogénéiser les mélanges de chaque dilution, les auteurs précisent qu'une méthode acoustique s'avère être nécessaire.

I.5. Etat de l'art des méthodes de stockage des réactifs

Pour qu'un dispositif soit utilisable sur le terrain, il est important de prendre en compte la question du stockage des réactifs [72]. En particulier, l'utilisateur ne doit pas manipuler les liquides pour des raisons de sécurité et de facilité. Ces aspects ne sont pas toujours considérés dans les publications scientifiques car les dispositifs restent au stade de développement au sein d'un laboratoire. Dans notre démarche, il est donc essentiel d'anticiper les contraintes de stockage de réactifs pour orienter les études, en dressant également sur ce point un état de l'art.

Pour réduire les manipulations de liquides, la plupart des systèmes vont embarquer les réactifs séchés ou lyophilisés dans le consommable. C'est le cas par exemple des tests sur bandelettes ou du consommable Minicare (Philips). Cependant, dans certains protocoles, des réactifs ne peuvent pas être séchés et de plus, il sera toujours nécessaire d'ajouter un liquide pour resuspendre les réactifs.

Le stockage de réactifs liquides dans un consommable microfluidique présente trois principales difficultés techniques. Il est premièrement nécessaire de conditionner et conserver les liquides dans un emballage adapté afin de ne pas dégrader les réactifs. Deuxièmement, il faudra ouvrir ou percer l'emballage au moment de la réalisation du test. Troisièmement, il s'agira de vider l'emballage et d'injecter les fluides avec des flux plus ou moins contrôlés. Or ces deux derniers points ne devront pas rajouter de manipulations complexes pour l'opérateur.

Un exemple d'emballage de réactifs liquides est présenté dans la Figure I-43 (Microfluidic Chipshop, Allemagne). Le stockage des liquides est assuré par des réservoirs amovibles fermés par des films d'aluminium. L'intérêt de ce type de réservoirs est qu'ils peuvent comporter des capuchons pour pressuriser les réservoirs. Cependant, l'utilisateur doit retirer manuellement les films d'aluminium, fermer les capuchons et ajouter des connectiques. Il faut donc beaucoup

d'opérations manuelles pour utiliser ce type de réservoirs et l'utilisateur risque d'être en contact avec les réactifs. Un autre inconvénient est la phase de vidange. Il est nécessaire d'arrêter l'injection avant la vidange complète du réservoir pour ne pas injecter d'air dans le composant fluide ce qui implique un contrôle supplémentaire.

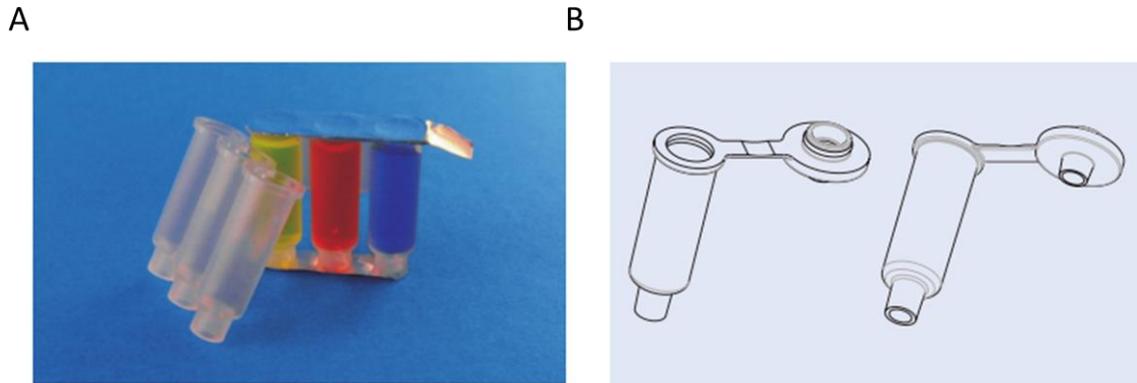


Figure I-43: A : Exemple de réservoirs amovibles fermés par des films d'aluminium, B : exemple de réservoirs pouvant être fermés et pressurisés [73].

Une autre technique consiste à embarquer les réactifs liquides sous forme de poche. Sa mise en œuvre peut être inspirée des méthodes de conditionnement déjà utilisées pour l'industrie pharmaceutique afin de stocker des réactifs liquides. C'est par exemple le conditionnement en capsule ou « blister » dans la littérature (Figure I-44) [74], [75]. En revanche, l'actionnement du blister peut s'avérer complexe. Il faut ouvrir un passage fluide sur une zone du blister puis transférer le fluide hors du blister avec un flux plus ou moins contrôlé.

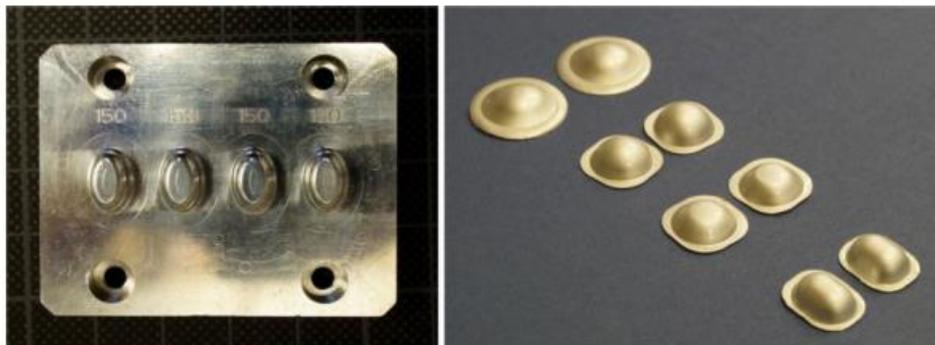


Figure I-44: Exemple de blisters (ChipShop) [74].

Des solutions de réactifs liquides embarqués directement sur le composant sont proposées (Microfluidic ChipShop). Les blisters peuvent être actionnés manuellement ou mécaniquement pour les vider avec une force contrôlée (Figure I-45). Cependant, le contrôle de l'injection par actionnement mécanique ne permet pas d'obtenir une précision suffisante notamment pour de faibles volumes (environ $< 100 \mu\text{L}$). Ensuite, un actionneur mécanique pour chaque blister est nécessaire. Or, dans un protocole ELISA, plusieurs réactifs liquides embarqués doivent être gérés. Cette technique d'actionnement risque donc de complexifier l'instrument. De plus, pour

développer un instrument compatible avec de nombreux consommables, un actionnement mécanique nécessite de standardiser la position des réactifs, ce qui semble contraignant.

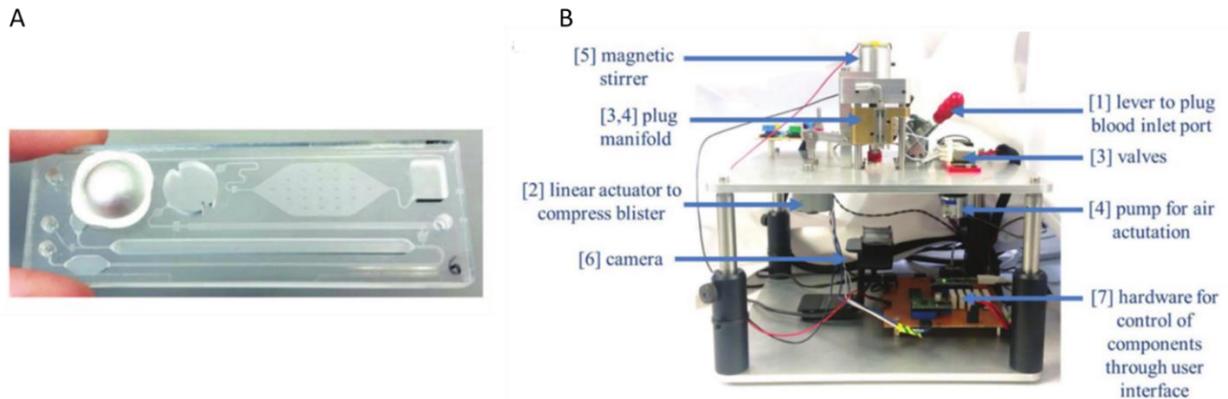


Figure I-45: A : Exemple de consommable intégrant un blister (Microfluidic ChipShop), B : système mécanique d'actionnement associé.

La société Daktari Diagnostics (USA) a également développé un consommable comportant des blisters intégrés, fabriqués par Thinxxs (Allemagne) ainsi qu'un instrument associé (Figure I-46). Cette solution est similaire à celle proposée par la société Microfluidics ChipShop et comprend les mêmes inconvénients concernant la précision du contrôle des liquides et l'instrument. Dans cet exemple, trois réactifs doivent être actionnés à l'aide de pistons mécaniques.

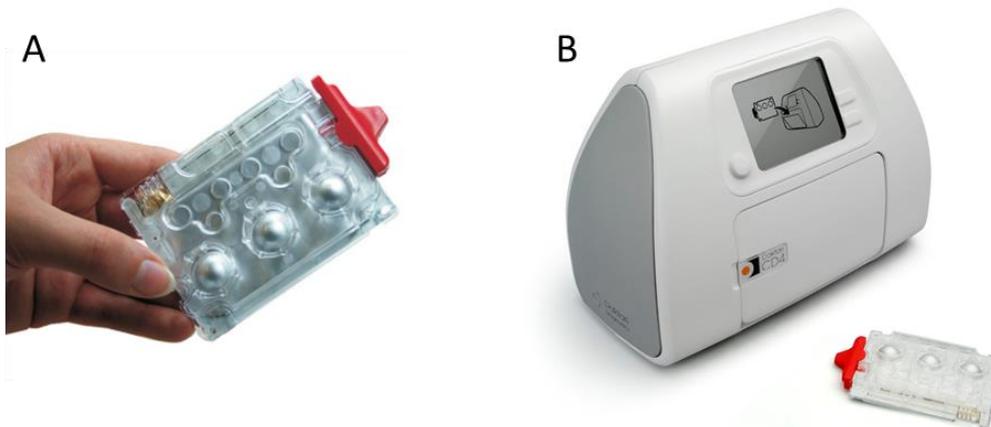


Figure I-46: A : Exemple de consommable (A) et d'instrument associé (B) par la société Thinxxs [76].

L'exemple de la Figure I-47 [48] montre qu'il est aussi possible de stocker des réactifs sous forme de poches individuelles. Ces poches sont formées par un film aluminium et permettent de conserver les réactifs sur une longue durée [77]. Les poches peuvent être ouvertes en imposant une pression sur le fluide, cette opération s'effectue ici en utilisant la force centrifuge. L'ouverture s'effectue sur demande en appliquant la vitesse de rotation correspondante à la pression d'ouverture

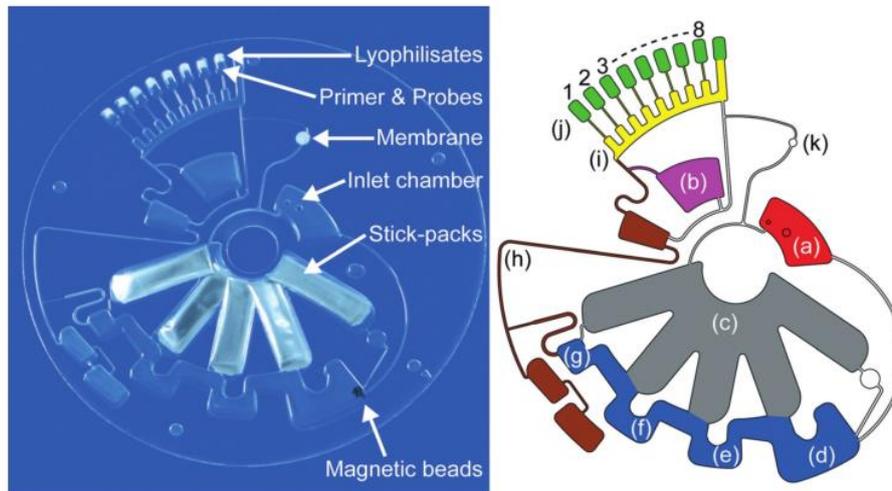


Figure I-47: Exemple de laboratoire sur disque avec un stockage de réactifs [48].

Des blisters plus évolués sont proposés sur la Figure I-48 [78]. L'originalité consiste à utiliser une pression positive pour déformer une membrane flexible. Cette déformation a pour effet de percer le blister ce qui évite à l'utilisateur d'être en contact avec le réactif. Selon les auteurs, cette méthode permet également de contrôler en pression l'injection des réactifs et donc d'avoir une bonne maîtrise des débits d'injection dans les composants microfluidiques.

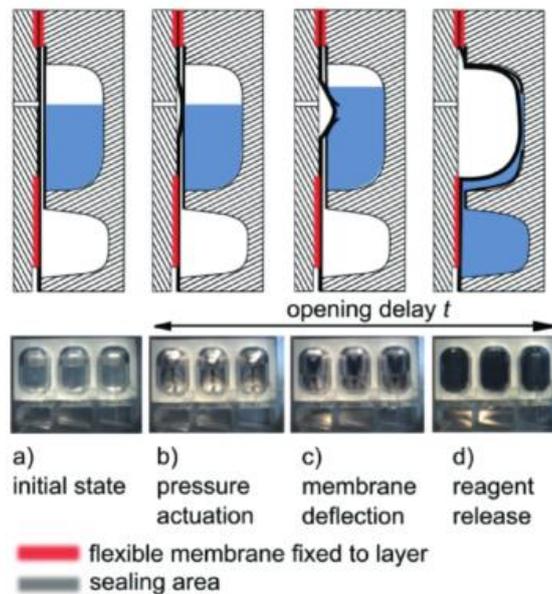


Figure I-48: Réservoirs intégrés contenant un blister. Principe d'actionnement : déformation de la membrane pour vider les réservoirs [78].

Ces deux dernières méthodes sont intéressantes pour stocker des réactifs directement sur le consommable et contrôler précisément l'ouverture et l'actionnement des réservoirs. Ils pourront être source d'inspiration et devront être adaptés à notre système.

I.6. Conclusion

Les caractéristiques visées pour le développement d'un système portable appliqué aux tests ELISA ont été définies à l'aide d'un inventaire des critères envisageables. Dans notre étude, nous avons fait le choix de considérer les critères suivants : A (« abordable »), U (« user friendly »), E (« equipment free »), D (« delivered ») et enfin quantitatif. Ces critères ont été analysés grâce à des exemples de dispositifs tirés de la littérature (Tableau I-1).

	A	U	E	D	Quantitatif
Tests sur bandelettes	+	+	+	++	-
Microfluidique capillaire	+	--	+/-	--	+ /-
Microfluidique centrifuge	+	+	-	+	+/-
Dispositifs combinés à un smartphone	+	+	+/-	+	+/-
Plateforme microfluidique avec vannes mécaniques	-	+	-	-	+/-

Tableau I-1 : Analyse des différents types de dispositifs portables selon les critères A (Abordable), U (User-friendly), E (Equipment free), D (Delivered) et quantitatif.

Pour répondre au premier critère A (« abordable »), le principe de capillarité est souvent utilisé car il simplifie ou supprime l'instrumentation et permet donc de respecter également le critère E (« Equipment free ») et donc de la portabilité. Cependant, il semble compliqué d'utiliser ce principe pour effectuer des protocoles complexes sans demander à l'utilisateur de réaliser des opérations manuelles. Le critère U (« user Friendly ») n'est alors plus respecté.

Pour répondre au critère U, nous avons donc fait le choix d'automatiser les opérations à l'aide de composants actifs tels que des vannes et des pompes. Pour respecter la portabilité, il faudra veiller à limiter au maximum le nombre d'actionneurs nécessaires au pilotage de la carte.

Afin de minimiser les coûts, nous allons développer un instrument générique et compatible avec un ensemble de cartes microfluidiques. Par ailleurs, pour ne pas redévelopper de réactifs biologiques, nous avons fait le choix d'utiliser des kits commerciaux.

Le critère « D » est souvent respecté en embarquant les réactifs sous forme séchée dans le consommable. Cependant, pour l'intégration d'un test ELISA avec des étapes de lavage, il est nécessaire d'intégrer également des réactifs liquides dans le consommable. Parmi les techniques étudiées, il semble plus intéressant d'assembler les réactifs sur le consommable au moment de son utilisation. Le système présente alors l'intérêt d'être modulable. Ainsi, une carte microfluidique peut être fabriquée puis utilisée pour différents types d'applications suivant les réactifs ajoutés. Notons que les réactifs d'un kit biologique ne présentent pas tous les mêmes caractéristiques par rapport à la température de stockage et à la durée de conservation. Dans les cas où les réactifs seraient stockés sur un même consommable, le réactif dont la date limite est la plus courte imposerait la durée de validité du consommable. Il paraît alors nécessaire de combiner plusieurs techniques afin obtenir un système modulable pour conserver de manière durable les réactifs, simple à utiliser et permettant de gérer de manière contrôlée une large gamme de volumes.

Enfin, la plupart des dispositifs décrits semblent donner des résultats quantitatifs. Seuls les tests sur bandelettes sont plutôt destinés à des analyses qualitatives ou semi quantitatives. Cependant, il est rarement indiqué dans les publications le niveau de variabilité pour différentes conditions

expérimentales et différents réactifs. Sans courbe de calibration, il semble difficile de garantir un résultat. Il y a donc un paradoxe entre les kits biologiques pour des formats plaque à puits qui préconisent de calibrer le système au moment de la mesure et les tests de terrain qui n'effectuent que la mesure de l'échantillon.

Pour suivre les recommandations des kits qui soulignent l'importance de comparer la mesure de l'échantillon à une courbe de calibration obtenue pendant le test et dans les mêmes conditions, nous avons choisi d'incorporer la préparation d'une gamme de dilution puis d'effectuer le test sur les solutions de référence obtenues.

Le protocole visé ainsi que l'intégration d'une gamme de dilution vont déterminer l'architecture de la carte microfluidique et le principe fluidique permettant un aiguillage automatisé des fluides pour une large gamme de volumes avec une grande précision.

Pour nous aider dans le choix de cette architecture et du principe fluidique, des techniques permettant de réaliser des gammes de dilution dans des systèmes microfluidiques ont été évaluées de manière subjective selon les critères suivants : la capacité à travailler avec une large gamme de volumes, la capacité à utiliser les solutions pour réaliser un test ELISA, l'automatisation des opérations, l'impact sur la taille de l'instrument (Tableau I-2).

	Gamme de volumes	Couplage avec un test ELISA	Automatisation des operations	Impact sur l'instrument
Méthode en flux continu	Non applicable (débit)	-	+	+
Dilution en cascade par une architecture en échelle	1 nL - 1 µL	+	++	-
Dilution en cascade par une matrice de chambre	1 nL - 1 µL	+	++	-
Dilution lineaire par centrifugation et actionnement pneumatique	10 nL - quelques µL	--	++	+
Dilution linéaire par une architecture X-Y	µL - mL	++	--	++

Tableau I-2 : Analyse des techniques microfluidiques pour l'élaboration d'une gamme de dilution selon les critères suivants : gamme de volumes, capacité à être couplé avec un test ELISA, automatisation des opérations et impact sur la taille de l'instrument.

La méthode en flux continu n'est pas adaptée aux protocoles biologiques car elle ne permet pas de contrôler des volumes discrets. En effet, les instructions des kits sont données en fonction de volumes et non de débits. Il est donc difficile de coupler cette méthode avec un test ELISA car pour intégrer un tel test il est nécessaire de contrôler des volumes élémentaires de fluide.

Les techniques de dilutions en cascade avec une architecture en échelle ou en matrice sont intéressantes pour automatiser les opérations et mélanger efficacement des volumes calibrés.

Cependant, cette technique est démontrée sur des volumes de l'ordre de la centaine de nL alors que nous visons des volumes plus importants. Par ailleurs, le nombre d'actionneurs à implémenter dans l'instrument portable doit être minimisé, or l'architecture en matrice comporte déjà 16 vanes indépendantes pour seulement 4 niveaux de dilution. Il semble difficile de réduire le nombre d'actionneurs car les opérations ne peuvent pas être parallélisées. La technologie de fabrication des cartes utilisée pour le principe combinant la centrifugation et un actionnement pneumatique permet de gérer des plus grands volumes. En revanche, si l'architecture permet de mélanger et de stocker efficacement, il semble plus difficile de coupler ce principe à un ELISA tel que nous l'envisageons.

Au final, la technique utilisant une architecture en X-Y pour réaliser des dilutions linéaires est séduisante car elle permet l'obtention d'une gamme de dilution en peu d'étapes. Tous les volumes sont définis par la géométrie des chambres, il est donc aisé de dimensionner le système microfluidique en visant des volumes allant du μL à quelques centaines de μL et de rester compatible avec les protocoles visés. Cette approche paraît prometteuse à condition d'automatiser les flux et les changements de direction à chaque croisement. L'actionnement à la pipette et le repositionnement manuel du capot paraît peu compatible avec les spécifications d'un système prêt à l'emploi. Les choix techniques liés à l'actionnement des fluides et à l'architecture seront présentés dans le chapitre II qui va suivre.

Chapitre II:

Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

Sommaire

II.1. Contexte initial : la plateforme FlowPad	55
II.2. Architecture fluidique	57
II.2.1. Approche continue.....	57
II.2.2. Approche discrète.....	61
II.2.3. Choix de l'approche et de l'architecture.....	63
II.3. Techniques de contrôle des fluides dans une carte	64
II.3.1. Types de vannes	65
II.3.2. Chambres fixes	67
II.3.3. Chambres à volume variable	74
II.4. Bilan : choix de la technique de contrôle de fluides	77
II.5. Pilotage pneumatique	78
II.5.1. Banc expérimental.....	79
II.5.2. Adressage pneumatique et multiplexage.....	81
II.5.3. Programmation des étapes du protocole.....	82
II.5.4. Bilan du pilotage pneumatique.....	87
II.6. Réalisation de la cartouche microfluidique.....	87
II.6.1. Conception de la cartouche microfluidique.....	87
II.6.2. Carte microfluidique.....	88
II.6.3. Membrane élastique.....	91
II.6.4. Assemblage des cartes microfluidiques et du film étirable.....	93
II.7. Conclusion	97

Le chapitre précédent a permis d'analyser différents systèmes microfluidiques permettant de réaliser des protocoles biologiques comme par exemple les tests ELISA et d'identifier les limitations des systèmes actuels pour définir les objectifs des développements visés par la thèse. L'accent a été mis sur la complexité du protocole fluide à considérer et la nécessité de sélectionner un principe fluide. Dans ce chapitre, différentes architectures et techniques d'actionnement et de contrôle de fluides seront évaluées afin d'intégrer un protocole biologique complet avec une calibration dans une carte microfluidique ; l'objectif ultime est de réaliser toutes les opérations nécessaires à un test biologique dans un système automatisé et miniaturisé.

II.1. Contexte initial : la plateforme FlowPad

Le laboratoire LSMB travaille depuis plusieurs années sur des cartes microfluidiques en polymère au format carte de crédit. Ces cartes comprennent un réseau de canaux et de vannes pour contrôler des liquides et réaliser différentes opérations fluidiques. Un instrument est associé au pilotage de ces cartes (Figure II-1).



Figure II-1: A : Cartes microfluidiques et instrument pour piloter ces cartes (plateforme Flowpad).

Il comprend principalement un support standardisé pour connecter les cartes, des électrovannes, de l'électronique, un élément chauffant, des pompes péristaltiques et un outil de détection.

Cet instrument présente l'avantage d'être générique car il est compatible avec différents types de cartes. En effet, les entrées et sorties de la carte sont standardisées pour utiliser le même instrument. Le support permettant de connecter la carte microfluidique à l'instrument est générique pour toutes les cartes fabriquées dans le laboratoire, au format carte de crédit. Ce support est breveté [79] (Figure II-2) et utilisé pour connecter les entrées et sorties fluidiques et pneumatiques de la carte. Cette

approche a permis de développer rapidement de nombreuses cartes pour différents types d'applications.

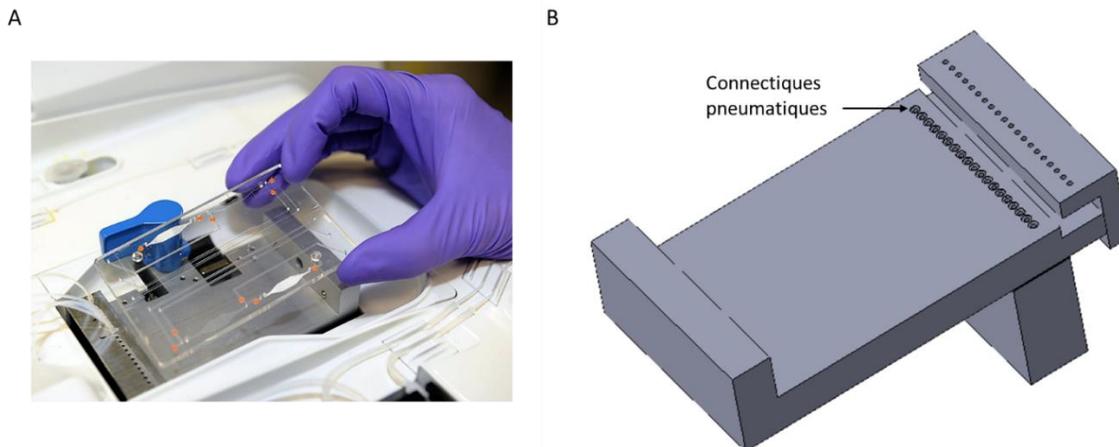


Figure II-2 : A : Image du support utilisé pour connecter les entrées et sorties pneumatiques de la carte. B : Vue 3D du support.

Les développements effectués pour la plateforme FlowPad constituent donc un point de départ pour la thèse. Par exemple, les cartes microfluidiques seront validées à l'aide du même support. Les standards mis en place pour ce support devront donc être respectés.

Cependant, certaines caractéristiques de cette plateforme ne sont pas compatibles avec nos objectifs. Tout d'abord, le pilotage des vannes impose une alimentation en pression de plusieurs bars (entre 2 et 5 bars). Le fonctionnement de cet instrument nécessite donc une connexion à un réseau d'air comprimé ou à un compresseur volumineux. Pour augmenter la portabilité du système, il est alors nécessaire de s'affranchir de l'alimentation en air comprimé en choisissant d'autres types d'actionnement ou des vannes s'actionnant à de plus faibles pressions (quelques centaines de millibars au lieu des plusieurs bars utilisés aujourd'hui) ce qui permettra d'envisager plus facilement l'intégration de sources pneumatiques.

De plus, l'instrument nécessite une alimentation électrique de 230 V. Notre objectif est de réduire cette tension à 12 V ou 24 V afin d'avoir la possibilité d'alimenter le système à l'aide d'une batterie. Ceci implique une conception électrique avec des composants basse tension et basse consommation.

Actuellement, la plateforme Flowpad mesure 30 X 30 X 50 cm et pèse environ 15 kg. Cet instrument est transportable, et a d'ailleurs été validé pour des applications de terrain mais son volume et son poids peuvent être optimisés afin de le rendre portable. L'objectif est d'atteindre une dimension de l'ordre de 25 x 15 x 15 cm pour un poids autour de 5 kg.

Ensuite, le système a été développé dans le but d'intégrer des protocoles d'analyse d'ADN/ARN en incluant la préparation des échantillons. Ainsi, les cartes microfluidiques développées jusqu'à présent

dans le laboratoire ne sont pas compatibles avec les protocoles ELISA et l'intégration d'une courbe de calibration. Une nouvelle architecture devra donc être conçue afin de répondre à ces objectifs.

Enfin, une dernière caractéristique essentielle à ajouter serait de stocker les liquides directement sur la carte microfluidique pour retirer toute connexion fluidique liquide externe. Nous souhaitons développer un instrument sec, c'est-à-dire que toutes les parties mouillées doivent être intégrées à la carte microfluidique qui définit la partie consommable.

II.2. Architecture fluidique

Pour intégrer un protocole biologique dans un système microfluidique, les différentes étapes du protocole et l'ordre des réactifs mis en jeu doivent être soigneusement analysés. Dans le cas du test ELISA hétérogène, il a été rappelé dans le chapitre précédent que les étapes du protocole d'un kit commercial classique comprenaient : une fonctionnalisation de surface (1), l'ajout de l'échantillon ou de la solution de référence (2), l'ajout d'un anticorps marqué par une enzyme (3), des étapes de lavages (4) et enfin l'ajout d'un substrat (5) (Figure II-3).

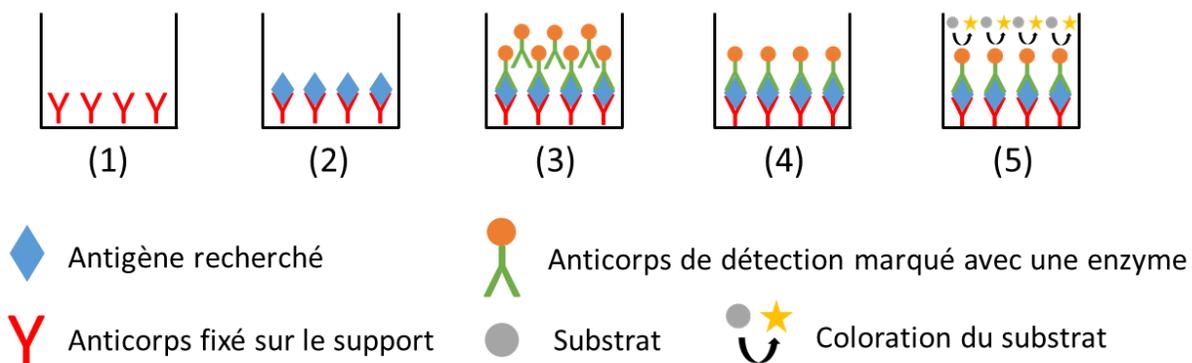


Figure II-3: Schéma d'un test ELISA en phase hétérogène en plaque à puits.

La difficulté à ce stade est de traduire ce protocole en un schéma nous permettant de construire une architecture. Pour cela, nous allons plus ou moins nous inspirer du formalisme utilisé en électronique et en automatisme en utilisant par exemple des schémas de câblage. Le but de ce type de schéma est de représenter l'adressage fluidique à construire entre les réservoirs contenant l'échantillon, les réactifs et les réservoirs des zones réactionnelles.

II.2.1. Approche continue

L'approche continue est une première technique pour construire l'adressage fluidique. Les solutions (échantillon, solutions de référence et réactifs) sont contenues initialement dans des réservoirs qui se vident progressivement au cours des différentes étapes du protocole dans des chambres réactionnelles.

Pour simplifier l'analyse, considérons dans un premier temps un protocole ELISA en phase homogène avec des témoins positifs et négatifs. La Figure II-4 est une représentation possible de la traduction d'un protocole de test ELISA en phase homogène à l'aide d'une approche continue.

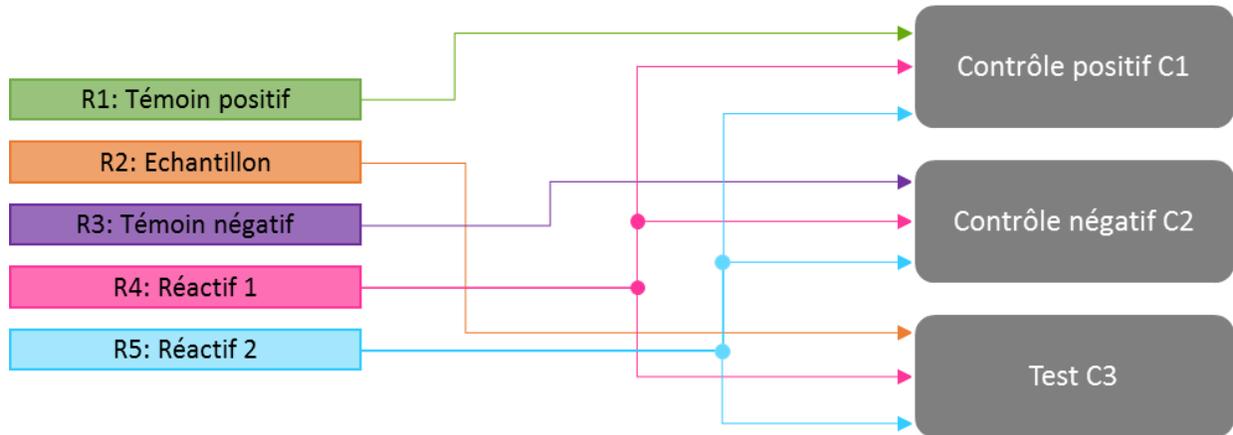


Figure II-4 : Représentation schématique d'un test ELISA en phase homogène en utilisant une approche continue.

Trois chambres de réaction (C1, C2 et C3) sont nécessaires dans le cas d'un test avec des contrôles positif et négatif. Ces chambres vont recevoir chacune trois solutions différentes, stockées initialement dans les réservoirs suivants :

- R1 pour la solution de référence qui est le témoin positif
- R2 pour l'échantillon à tester
- R3 pour la solution tampon qui est le témoin négatif
- R4 pour le réactif 1
- R5 pour le réactif 2

Ce protocole nécessite les étapes suivantes : l'injection de l'échantillon ou des témoins positif et négatif (1), l'injection du réactif 1 (2) et enfin l'injection du réactif 2 (3) (Figure II-5).

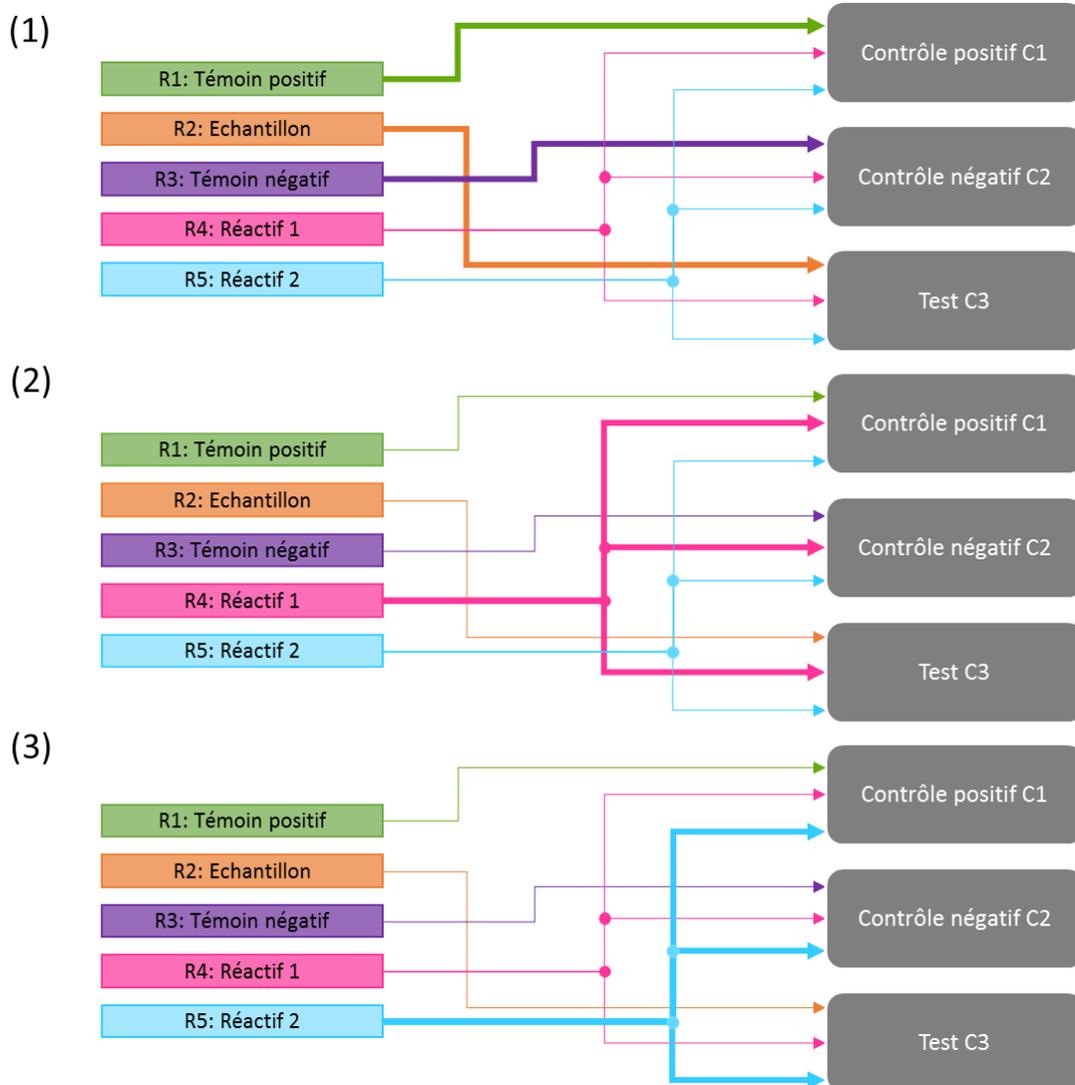


Figure II-5: Etapes d'un protocole ELISA en phase homogène réalisé avec une approche continue.

Cette représentation a l'avantage de visualiser les chemins fluïdiques mais reste limitée car elle ne prend pas en compte certaines contraintes liées au protocole. Par exemple, un critère important à respecter est de mener simultanément les opérations pour les trois chambres de réaction afin de pouvoir comparer les résultats. De plus, pour que les contrôles positif et négatif soient pertinents, les réactifs doivent chacun provenir d'un même réservoir. Ainsi, la validité du test et l'efficacité des réactifs peuvent être contrôlées avant de conclure sur le résultat du test ce qui permet d'éviter les faux positifs et les faux négatifs.

Les canaux fluïdiques provenant de R1, R2 et R3 doivent absolument être indépendants pour ne pas fausser les résultats. Les solutions doivent alors être mélangées simultanément en évitant les différents croisements entre les canaux fluïdiques issus de réservoirs différents. Une des conséquences est que les chambres présentent plusieurs entrées. Au final, ces contraintes complexifient l'intégration

du protocole car une multitude de voies se superposent. Ceci implique la fabrication délicate d'un réseau fluidique à plusieurs niveaux.

Considérons à présent le cas plus complexe du test ELISA en phase hétérogène limité également à des contrôles positif et négatif. Ce protocole comporte trois grandes étapes : la fixation de l'antigène (cible recherchée dans l'échantillon), la fixation de l'anticorps secondaire et enfin la révélation du résultat par un substrat (Figure II-6).

Les trois chambres de réaction C1, C2 et C3 vont recevoir chacune quatre solutions :

- Les solutions à tester (échantillon, solutions de référence pour les contrôles positif et négatif)
- Deux réactifs (anticorps marqué et substrat)
- La solution de lavage

Ces solutions proviennent de six réservoirs différents :

- R1 pour l'antigène qui est la solution de référence pour le témoin positif
- R2 pour l'échantillon
- R3 pour la solution tampon qui est la solution de référence pour le témoin négatif
- R4 pour le lavage
- R5 pour l'anticorps marqué
- R6 pour le substrat

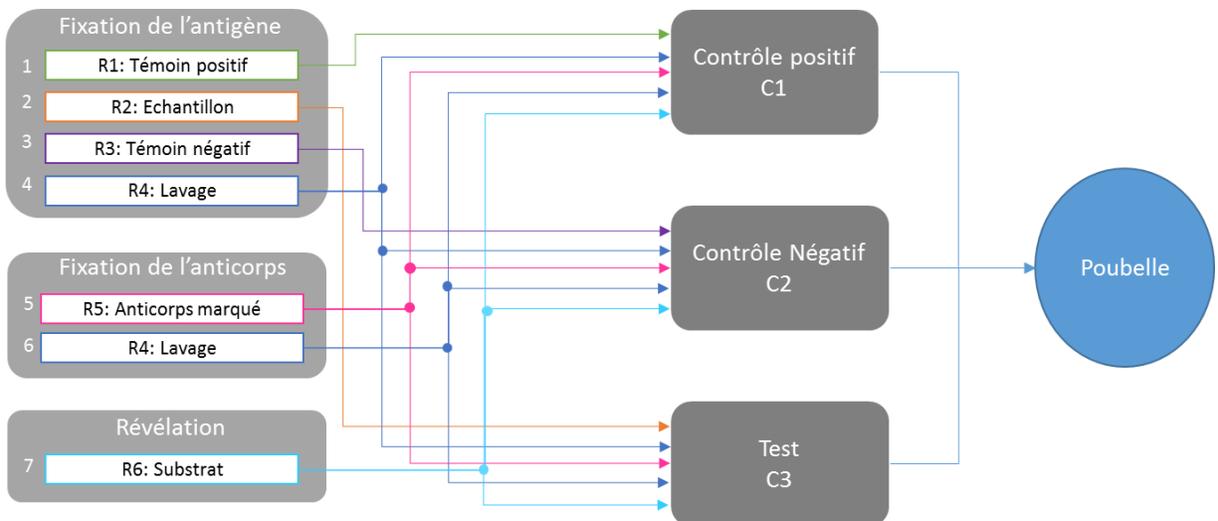


Figure II-6: Représentation schématique d'un test ELISA en phase hétérogène en utilisant une approche continue.

En plus des contraintes énoncées précédemment pour le test ELISA en phase homogène, ce test comporte des difficultés supplémentaires. Il a été souligné dans le chapitre précédent que la coloration du substrat était le témoin de la présence de la cible. Il est donc indispensable que le substrat ne rencontre pas l'enzyme dans le circuit fluidique pour éviter une coloration non spécifique. Pour cela, il est important que les canaux provenant de R5 et R6 soient indépendants. De plus, ce protocole

nécessite un réservoir poubelle supplémentaire car contrairement au test ELISA en phase homogène, les chambres de réaction doivent être vidées et lavées au cours du protocole. Ce réservoir implique une gestion supplémentaire des liquides.

Dans cet exemple, la multiplicité des croisements montre à l'évidence la complexité de l'intégration d'un protocole dans un circuit microfluidique par une approche continue. Par ailleurs, cette approche ne permet pas de mettre en évidence la quantité en volume des différents liquides à manipuler. Enfin, comme notre objectif n'est pas seulement d'intégrer des contrôles positif et négatif mais d'intégrer une courbe de calibration complète, le risque de croisements est considérablement amplifié.

II.2.2. Approche discrète

Une autre approche est de réfléchir en termes de volumes discrets plutôt qu'en fluide continue. Cette méthode consiste à créer des volumes définis à partir d'un réservoir commun avant d'effectuer des combinaisons de mélanges.

Reprenons l'exemple du test ELISA en phase homogène avec des témoins positif et négatif. A partir des deux réservoirs de réactifs, trois volumes discrets sont créés. Le nombre de volumes à créer est égal au nombre de tests à effectuer. Dans cet exemple, trois tests sont à effectuer (échantillon, témoin positif et témoin négatif).

Pour limiter les croisements, l'approche discrète peut être combinée avec une architecture X-Y c'est-à-dire une architecture en lignes et en colonnes. Chaque ligne correspond à une solution à tester (différentes solutions de références ou différents échantillons) et chaque colonne correspond à un mélange avec un réactif (Figure II-7).

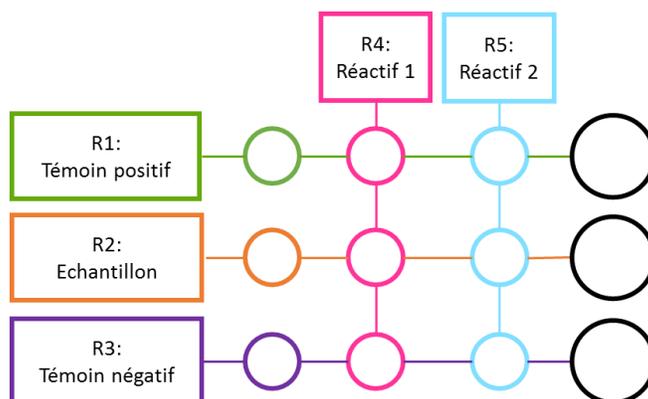


Figure II-7: Représentation schématique d'un test ELISA en phase homogène en utilisant une approche discrète et une architecture X-Y.

Le principe est de calibrer les volumes de réactifs dans la direction Y et d'effectuer les mélanges entre les réactifs et les solutions à analyser dans la direction X. La visibilité du protocole devient plus claire (Figure II-8). La première étape consiste à créer les volumes de réactifs et de solutions à tester (1). Puis, les solutions sont mélangées dans la direction X (2). Comme nous le verrons plus loin, cette structure, plus organisée que l'approche continue, permettra de gérer plus facilement les

croisements, de minimiser la longueur des chemins fluidiques et d'éviter les contaminations entre les différents tests.

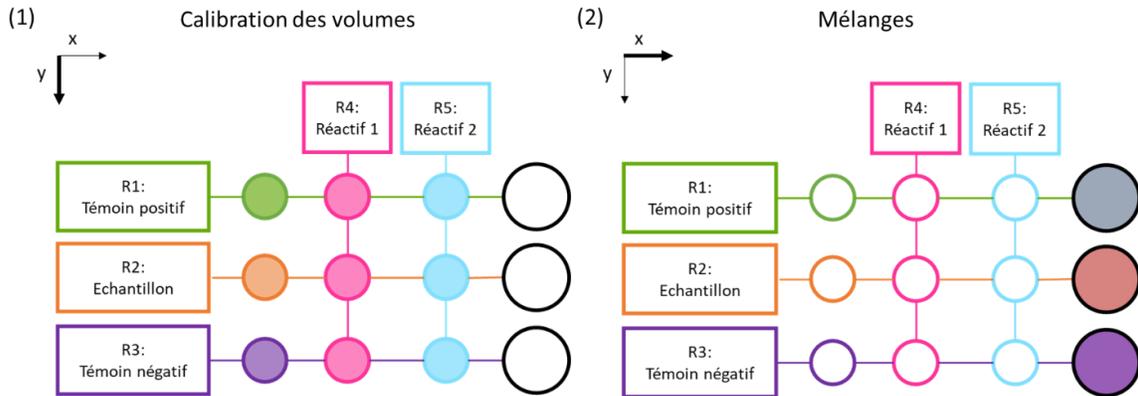


Figure II-8: Etapes du protocole ELISA en phase homogène réalisé avec une architecture XY et une approche discrète.

Envisageons à présent le cas du test ELISA en phase hétérogène. L'approche discrète couplée à une architecture X-Y peut également être envisagée pour ce type de protocole en ajoutant simplement une colonne pour le lavage et des réservoirs poubelles (Figure II-9).

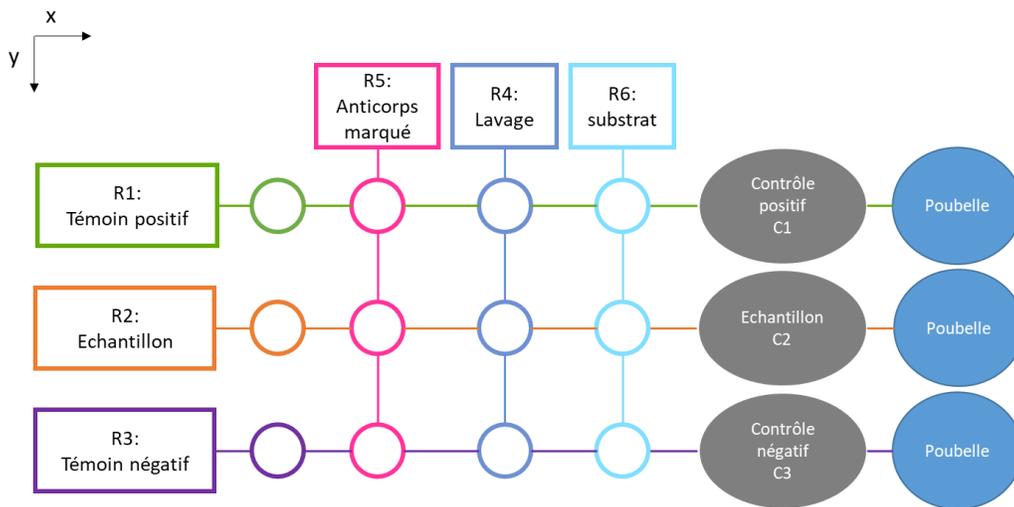


Figure II-9: Représentation schématique d'un test ELISA en phase hétérogène en utilisant une approche discrète et une architecture X-Y.

II.2.3. Choix de l'approche et de l'architecture

La mise en œuvre d'une courbe de calibration au cours du test implique de mener en parallèle un ensemble d'analyses sur des solutions de référence et sur l'échantillon. Ces solutions, comme évoqué ci-dessus, ne doivent pas du tout être en contact pendant le protocole pour éviter les contaminations et par ailleurs, les réactifs utilisés doivent provenir d'un même réservoir pour que le test soit pertinent.

L'approche choisie est donc l'approche discrète couplée à une architecture en X-Y. Pour intégrer un protocole de test ELISA en phase hétérogène avec une courbe de calibration, l'architecture représentée en Figure II-9 peut être facilement adaptée en ajoutant des lignes (Figure II-10). Ainsi, les analyses peuvent être effectuées en parallèle sur les solutions de référence ainsi que l'échantillon pour effectuer une calibration pendant le test.

Cette approche permet de simplifier l'architecture et d'identifier clairement les croisements et les aiguillages qu'il faudra contrôler pour éviter les contaminations (voir II.3 : Techniques de contrôle des fluides dans une carte).

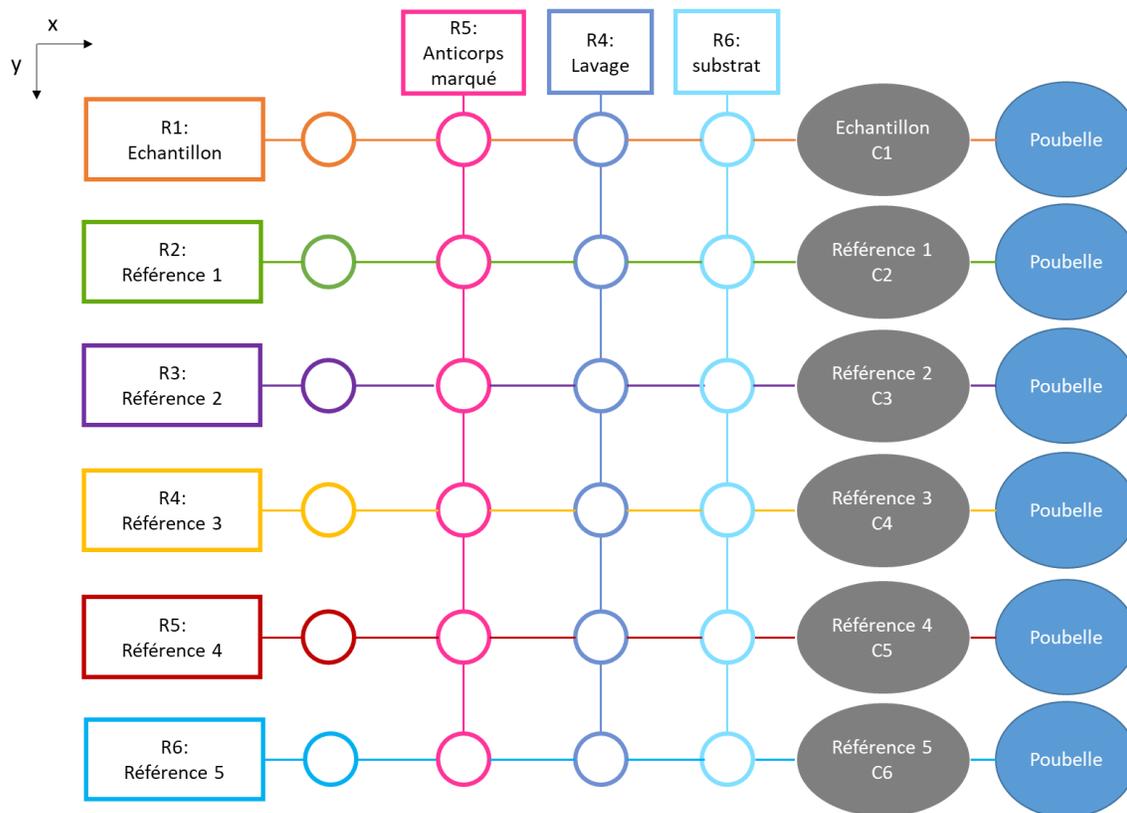


Figure II-10: Représentation schématique d'un test ELISA en phase hétérogène avec l'élaboration d'une courbe de calibration.

Après avoir choisi l'architecture, il est maintenant nécessaire de s'intéresser aux différentes techniques de contrôle de fluides en microfluidique afin d'automatiser les opérations.

II.3. Techniques de contrôle des fluides dans une carte

Dans un système microfluidique, le contrôle des fluides est assuré par la combinaison de deux éléments : les vannes et les chambres.

Dans l'architecture X-Y, les vannes doivent être situées entre chaque chambre (Figure II-11 A) et assurent deux fonctions (Figure II-11 B) : séparer les chambres afin de définir les volumes lors de la phase de calibration (1) et éviter les contaminations lors des phases de transferts (2).

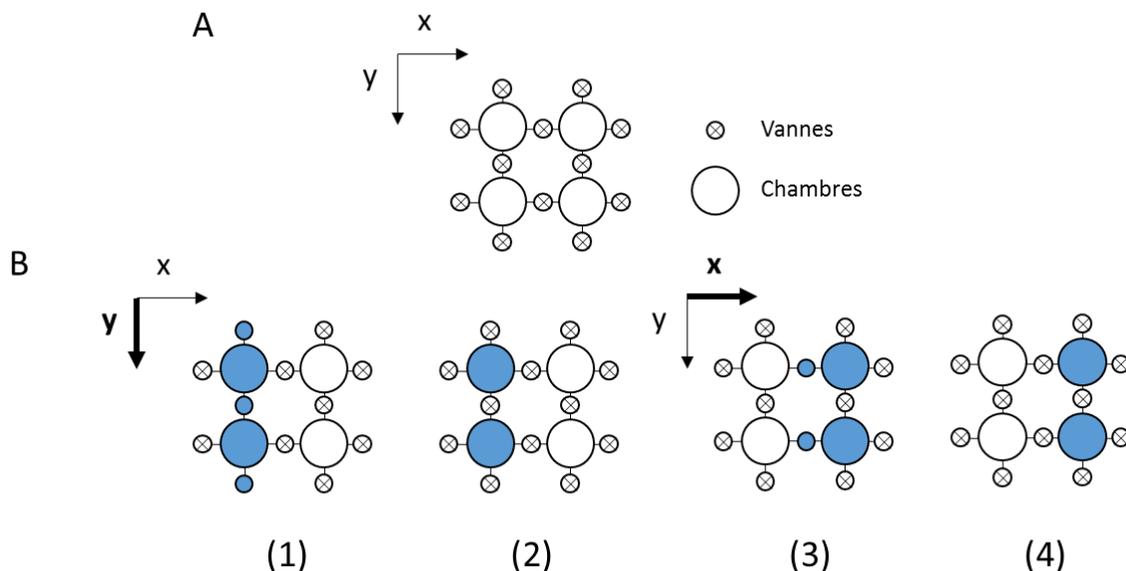


Figure II-11: A : Vue schématique du dessus d'une matrice de chambres et de vannes, B : opérations élémentaires dans une architecture en X-Y.

Dans cette architecture, deux types de volumes peuvent être distingués : les volumes d'intérêt et les volumes morts. Les volumes calibrés et utilisés pour un protocole sont considérés comme les volumes d'intérêt, tous les autres volumes du réseau doivent être considérés comme des volumes morts. Il s'agit notamment du volume des canaux reliant les chambres, et du volume des vannes. Ces volumes morts devront être considérés car ils peuvent impacter les volumes effectifs des mélanges et donc dégrader la précision de la calibration des volumes. Pour élaborer des dilutions avec une grande précision, l'enjeu sera donc de minimiser les volumes morts par rapport aux volumes d'intérêt.

Différents types de vannes sont décrits ci-dessous et sont comparés. Pour effectuer notre choix, les critères suivants doivent être pris en compte :

- Le système d'actionnement des vannes doit être compatible avec un instrument portable.
- Afin de réduire la taille de l'instrument, le nombre d'actionneurs doit être limité, plusieurs vannes doivent donc être pilotables ensemble.
- Afin d'obtenir des coefficients précis de dilution, le volume mort doit être minimisé.

Les chambres sont des éléments de stockage de fluide et nécessitent un actionnement afin de transférer le volume d'une chambre à une autre. Deux types sont envisageables : les chambres à volume fixe et les chambres à volume variable. Leurs principes sont très différents et sont détaillés dans les sections II.3.2 et II.3.3. Afin de choisir une technique de contrôle de fluides, ces deux types de chambre vont être comparés pour effectuer des opérations élémentaires en microfluidique comme calibrer un volume et mélanger deux volumes. Ces deux opérations sont essentielles notamment pour l'étape de la gamme de dilution en microfluidique.

D'autres critères doivent être pris en compte :

- La réalisation d'un protocole complet étant visé, un nombre important de chambres doit donc être intégré. Pour cela, il est préférable de choisir des chambres qui occupent la surface la plus faible possible.
- De plus, il est paru souhaitable de ne pas fondamentalement redévelopper les réactifs biologiques et d'adapter directement un kit biologique existant ce qui implique la maîtrise de grands volumes.
- Ensuite, pour atteindre d'importants facteurs de dilution, une faible quantité de diluant doit être mélangée avec un grand volume de standard. La technique choisie doit donc être capable de gérer une large gamme de volumes, typiquement du microlitre à la centaine de microlitres.
- Enfin, un dernier critère à prendre en compte pour le développement de la plateforme portable est le nombre d'actionneurs nécessaires pour contrôler l'architecture. En effet, plus ce nombre est important, plus l'instrument sera volumineux. La technique de contrôle des fluides choisie devra donc prendre en compte le nombre d'actionneurs nécessaires pour son pilotage.

II.3.1. Types de vannes

Les vannes sont des éléments essentiels dans les cartes microfluidiques. Elles permettent d'aiguiller les fluides, de bloquer un écoulement pour effectuer par exemple une étape d'incubation et également d'éviter les contaminations entre des chambres.

Une vanne comporte deux états : un état ouvert où le liquide peut circuler et un état fermé où le liquide est bloqué. Pour actionner une vanne, il existe différentes techniques dont certaines ont été abordées dans le chapitre précédent. Une vanne comporte une partie déformable. De préférence, il s'agit d'un matériau suffisamment élastique tel qu'un élastomère afin d'une part d'assurer la fonction d'étanchéité en position fermée et d'autre part d'autoriser un débattement suffisant pour permettre la circulation du fluide en position ouverte et limiter les pertes de charges. De plus, il est nécessaire de définir le mode d'actionnement pour déformer la membrane et effectuer le changement d'état.

Le mode d'actionnement peut être purement mécanique [80], électrostatique [81], pneumatique [82], [83], [84], thermique [85], piézoélectrique [86] ou encore magnétique [87], [88]. L'actionnement mécanique peut utiliser des pistons qui nécessitent un alignement par rapport aux vannes. Cette technique est donc difficilement versatile car il faudrait figer la position des vannes pour l'ensemble des cartes microfluidiques et quel que soit le protocole. Par ailleurs, nos applications nécessitent de

nombreuses vannes, cet actionnement n'est donc pas envisageable car il est difficile d'actionner plusieurs vannes avec le même piston sans un assemblage mécanique complexe. L'actionnement électrostatique nécessite l'intégration d'électrodes, des tensions importantes pour des faibles amplitudes de déformation ce qui n'est pas adapté. Un actionnement magnétique implique d'intégrer à la fois un niveau magnétique et électrique. Cette technique utilise également un courant important ce qui va chauffer le composant. Les vannes piézo-électriques ont des faibles amplitudes de déplacements (quelques micromètres). Les débits sont donc faibles pour des liquides. Ces vannes sont plutôt adaptées pour des gaz. Enfin, le changement d'état d'une vanne thermique est assuré par un changement de température, ce qui n'est pas instantané et peut également perturber le protocole biologique.

L'expérience du laboratoire nous a encouragé à nous orienter vers l'actionnement pneumatique. Le principe est simple à mettre en œuvre car le changement d'état de la vanne est provoqué par une variation du niveau de la pression en appliquant de l'air comprimé. Le rôle de l'instrument sera alors de piloter les jeux de pressions. Il s'agit donc de coupler la carte microfluidique à un automate pneumatique qui pourra par exemple être constitué de sources de pressions et des électrovannes afin de basculer la pression à appliquer sur les vannes. Une voie de pression peut ainsi piloter plusieurs vannes, ce qui est un grand avantage pour le pilotage de l'architecture choisie. Notons également que l'actionnement pneumatique est très utilisé et a fait ses preuves avec par exemple le processeur fluidique développé par l'équipe de S. Quake [62].

Deux principales mises en œuvre sont possibles. Les vannes peuvent être fabriquées soit à l'aide d'une pastille (diaphragme) de matériau élastique (Figure II-12A), soit à l'aide d'un film élastique (Figure II-12B). Ce matériau est assemblé entre une carte dite « fluidique » où le fluide va circuler et une carte dite « pneumatique » pour la circulation de l'air comprimé et donc l'actionnement des vannes.

Selon la méthode utilisée, la géométrie de la vanne sera différente. Dans le premier cas, on parlera de géométrie traversante puisque les canaux fluidiques doivent déboucher perpendiculairement à la pastille d'élastomère. Le fluide doit donc traverser la carte fluidique suivant son épaisseur. Dans le deuxième cas, on parlera de géométrie planaire car les canaux fluidiques peuvent rester dans le plan de la carte fluidique.

Le premier cas nécessite deux trous traversants par vanne dans la carte fluidique ce qui complexifie les étapes de fabrication. De plus, les canaux traversants peuvent constituer des volumes morts importants. Considérons le cas des vannes en séries, le fluide devra au niveau de chaque vanne circuler de part et d'autre de la carte fluidique. Il en résulte alors un volume techniquement incompressible qui provient en partie des canaux traversants (typiquement plusieurs μL). A contrario, dans le cas planaire, il est possible d'intégrer des vannes en séries en les rapprochant plus facilement et de réduire le volume de liquide séparant deux vannes consécutives.

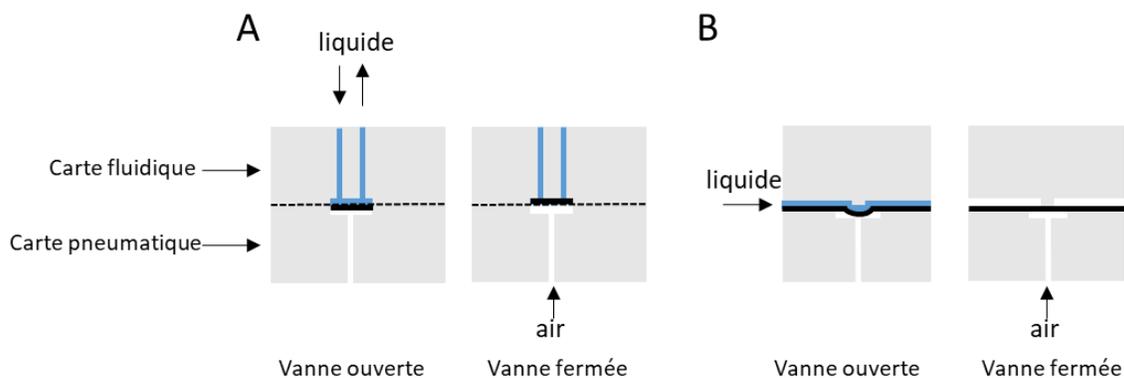


Figure II-12: (A) Vanne à géométrie traversante, (B) vanne à géométrie planaire.

Concernant l'assemblage de l'ensemble carte fluidique/carte pneumatique et des matériaux élastiques des vannes, il apparaît plus simple et moins onéreux d'un point de vue de l'industrialisation de manipuler un seul film continu que d'avoir à déposer une multitude de pastilles individuellement.

Pour l'ensemble de ces raisons, nous nous sommes orientés vers les vannes de type B à savoir planaires. La difficulté sera alors de trouver une méthode robuste d'assemblage entre le matériau élastique et les cartes microfluidiques pour pouvoir actionner des vannes sans provoquer de fuites et actionner d'autres vannes. Différentes méthodes d'assemblage seront détaillées dans ce chapitre.

II.3.2. Chambres fixes

(i) Principe

Une première technique microfluidique consiste à combiner des vannes et des chambres d'un volume défini pour stocker et transférer un volume donné (Figure II-13).

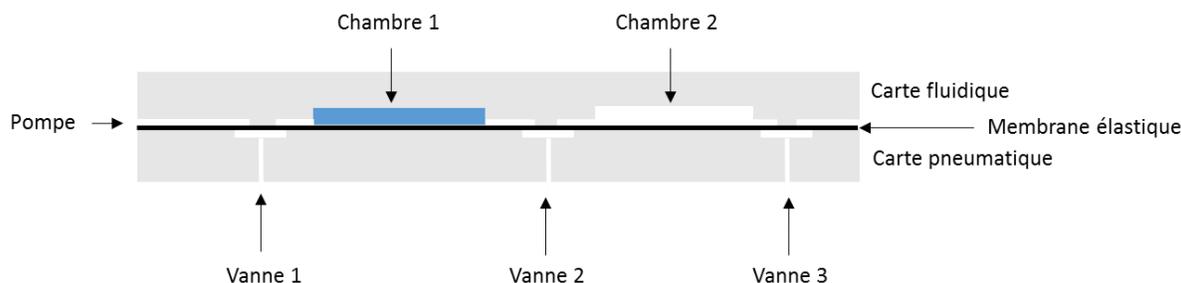


Figure II-13: Vue en coupe de la technique de remplissage de chambres fixes.

Pour transférer le liquide de la chambre 1 vers la chambre 2, une pression positive c'est-à-dire supérieure à la pression atmosphérique est appliquée en entrée dans le canal fluidique. Le liquide se déplace alors lorsque les différentes vannes 1, 2 et 3 sont ouvertes et s'arrête lorsque les vannes sont refermées.

(ii) Calibration de volumes

La première opération à maîtriser est la calibration de volumes. Manuellement, cette opération ne présente pas de difficultés et des outils tels que des pipettes peuvent être utilisés. En microfluidique, les chambres sont souvent utilisées pour calibrer des volumes. La difficulté est alors de remplir correctement cette chambre pour que le volume qu'elle contient soit précis.

Pour calibrer un volume en utilisant des chambres fixes, la technique consiste à ouvrir des vannes d'entrée et de sortie pour injecter un liquide et à refermer ses vannes lorsque les chambres sont remplies. Considérons le cas d'une chambre fixe délimitée par les vannes 1 et 2 en amont et en aval (Figure II-14). Le liquide est injecté dans la chambre à l'aide d'une source de pression positive et en ouvrant les vannes 1 et 2 (2). Puis, les vannes 1 et 2 sont fermées lorsque la chambre est remplie (3). Le temps de remplissage doit alors être connu afin de définir la séquence de fermeture des vannes. Notons également qu'une partie du fluide peut se trouver au-delà de la vanne aval. Ce volume peut être problématique pour la suite du protocole et constitue un certain volume mort difficilement contrôlable.

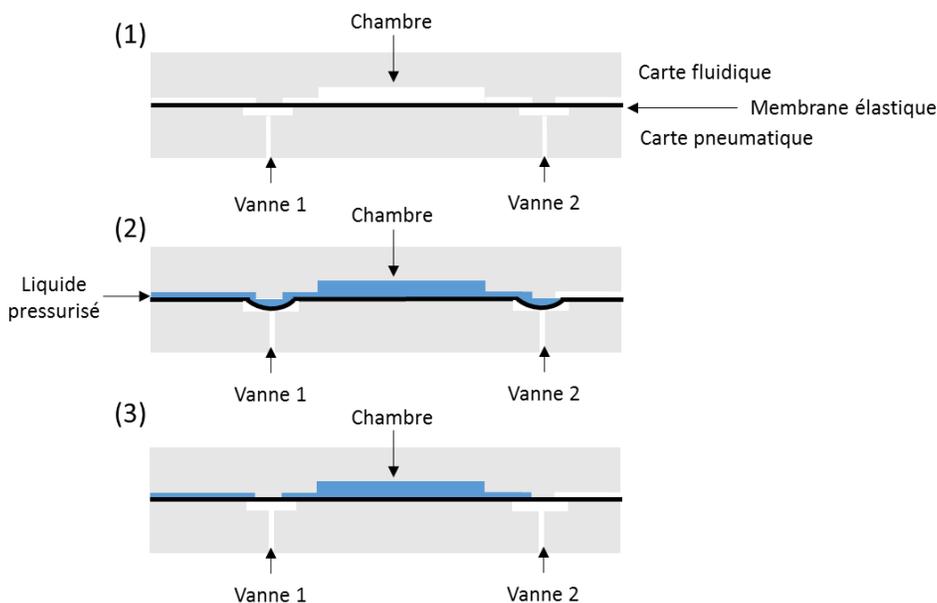


Figure II-14: Calibration d'un volume à l'aide d'une chambre fixe.

Pour s'affranchir du contrôle du remplissage de la chambre, une membrane hydrophobe peut être utilisée en étant placée après la chambre. Dans cette configuration, la vanne 2 reste fermée pendant le remplissage de la chambre. La membrane permet alors de laisser l'air s'échapper tout en retenant le liquide (Figure II-15).

II.3 : Techniques de contrôle des fluides dans une carte

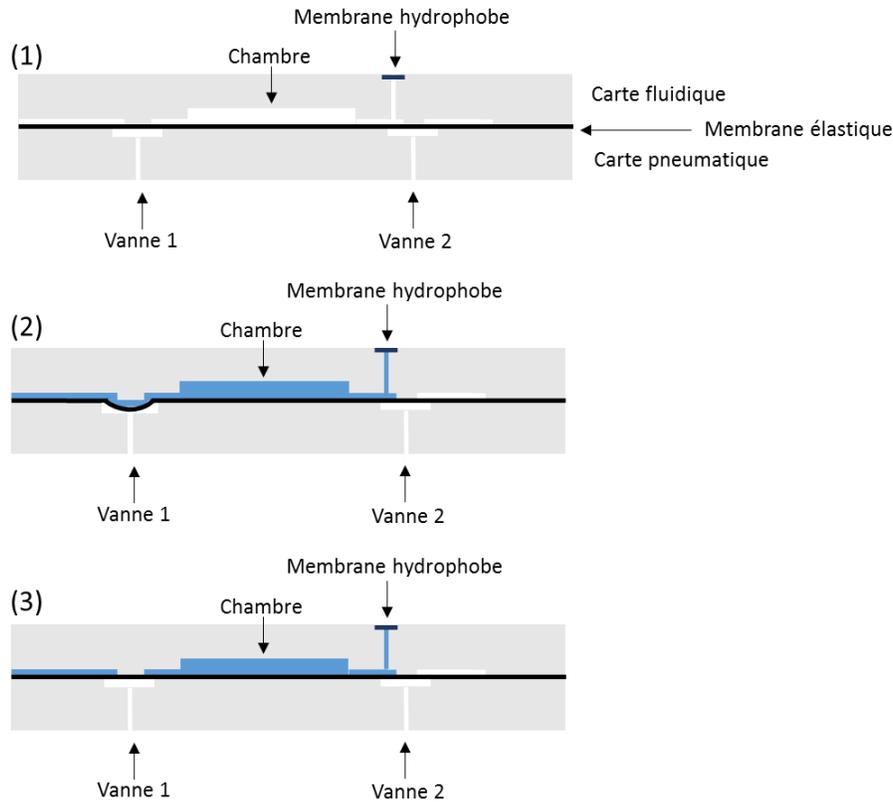


Figure II-15: Calibration d'un volume à l'aide d'une chambre fixe et d'une membrane hydrophobe.

L'efficacité de cette méthode de calibration a été utilisée dans le cadre de mon stage de PFE (Figure II-16) [89].

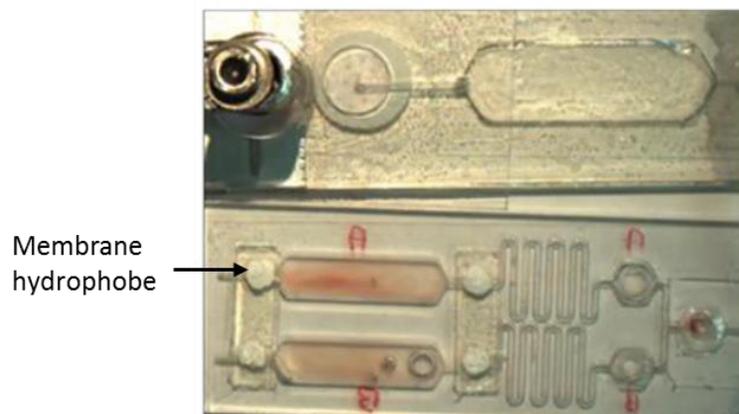


Figure II-16: Utilisation de membranes hydrophobes pour bloquer un écoulement [89].

Cette technique évite un contrôle précis du temps de remplissage. Cependant un espace supplémentaire est requis sur la carte pour chaque chambre et une étape d'assemblage supplémentaire est nécessaire pour le collage du filtre hydrophobe. Cette solution présente aussi certaines limitations d'un point de vue fonctionnel, la fonction de blocage par la membrane

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

hydrophobe ne peut s'effectuer qu'une seule fois et est définitif. Des allers-retours ne sont donc pas possibles. De plus, le volume piégé dans le canal au-dessus de la membrane peut conduire à des risques de contamination si un deuxième liquide est injecté.

Une autre difficulté concernant la calibration des chambres à volume fixe est de les remplir et de les vider complètement sans piéger de bulles afin de contrôler le volume qu'elles contiennent. L'expérience du laboratoire sur les chambres microfluidiques nous a incité à tester des chambres hexagonales (Figure II-17). Ce type d'entrée permet de former un ménisque qui va ensuite épouser la forme du réservoir. Des règles de conception sont à respecter pour assurer un remplissage complet ; par exemple, ces chambres ne peuvent pas être trop profondes ni trop larges. Ce type de chambre tend à occuper beaucoup de place sur la carte.



Figure II-17: Vue du dessus d'un réservoir de forme hexagonale.

Des expériences préliminaires d'architecture X-Y avec des chambres fixes ont été menées. Des premières cartes microfluidiques ont été réalisées et expérimentées. Globalement la carte est fonctionnelle, dans le sens où deux liquides peuvent être injectés dans des colonnes de chambres suivant la direction Y, puis transférer et mélanger suivant la direction X. La fonction d'aiguillage assurée par les vannes pneumatiques est donc bien fonctionnelle.

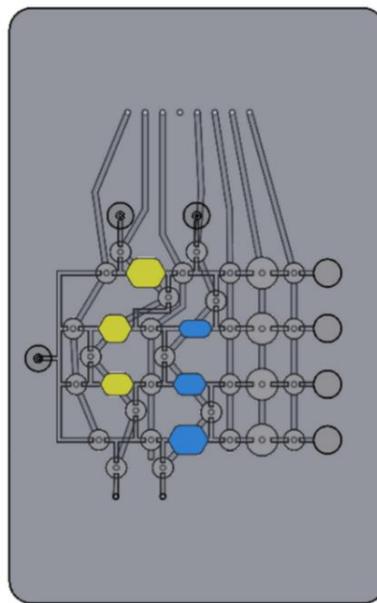


Figure II-18: Carte d'une première architecture en X-Y avec des chambres fixes.

Cependant deux problèmes majeurs sont apparus. Au remplissage, des bulles peuvent se piéger dans les chambres et à la vidange un film plus ou moins épais de liquide peut rester présent. Ces deux effets présentent un risque majeur par rapport à la précision de dilution que nous souhaitons atteindre (Figure II-19).

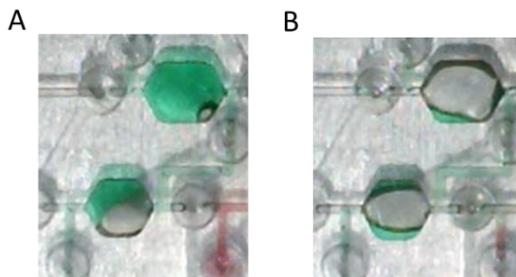


Figure II-19: Exemples de remplissage (A) et de vidange (B) de chambres fixes de géométrie type réservoirs de forme hexagonale.

Une autre géométrie de réservoir fixe qui peut paraître mieux adaptée pour une architecture X-Y est le losange [71]. Ainsi, des composants avec cette forme en losange ont été réalisés et testés. Si le remplissage semble mieux adapté (moins de bulles piégées), la vidange des réservoirs reste incomplète (Figure II-20). Un traitement de surface hydrophile pourrait éventuellement améliorer le remplissage et la vidange des chambres.

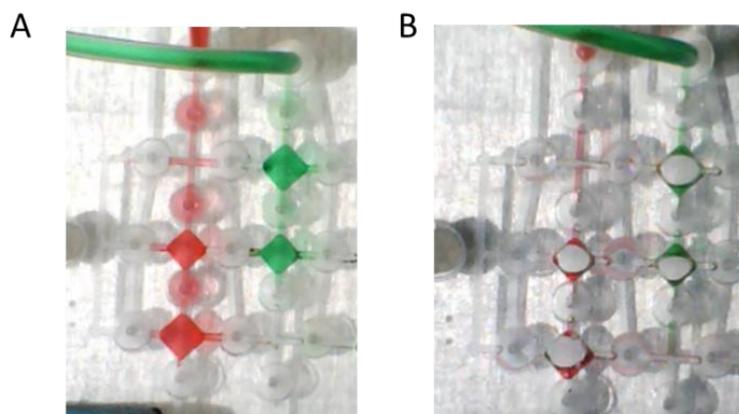


Figure II-20 : Exemples de remplissage (A) et de vidange (B) de chambres fixes en forme de losange.

(iii) Mélange de volumes calibrés

Le mélange est une opération qu'il est indispensable de maîtriser pour accomplir un protocole biologique. Cependant, il est bien connu que cette opération est complexe en microfluidique. En effet, l'écoulement est généralement laminaire à l'opposé des écoulements turbulents. Les lignes de courant sont stables et les liquides ne se mélangent pas. Ce type d'écoulement n'est donc pas favorable au mélange (Figure II-21, [90]).

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.



Figure II-21 : Exemple d'écoulement laminaire [90].

Ainsi des expériences préliminaires ont montré que deux chambres fixes, sans dispositifs supplémentaires pour améliorer le mélange, ne permet pas un mélange correct (Figure II-22).

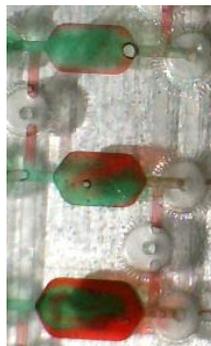


Figure II-22: Mélange entre un colorant vert et un colorant rouge dans une chambre fixe.

C'est pourquoi des éléments passifs ou actifs doivent être ajoutés dans l'architecture afin d'améliorer le mélange. Dans la littérature, différentes techniques de mélanges passifs et actifs ont été décrites [91]. Les techniques passives nécessitent d'ajouter une configuration géométrique dans l'architecture de la carte. Les serpentins sont souvent utilisés.

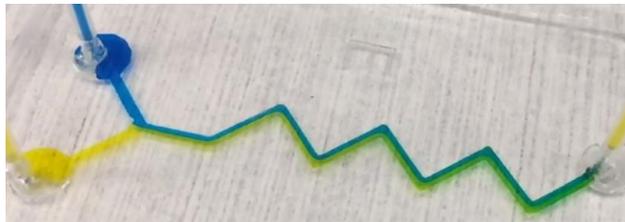


Figure II-23: Image d'un serpentín pour mélanger deux colorants [92].

Pour mélanger deux chambres fixes, il est donc possible d'ajouter un serpentín à la suite de ces deux chambres comme sur la Figure II-24. Cependant, dans une architecture en X-Y, il faudrait ajouter ce serpentín avant chaque chambre de mélange ce qui occuperait un espace trop important et rajoute un volume de fluide à considérer dans le calcul de la dilution.

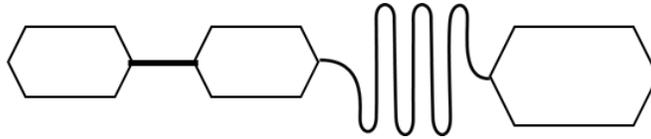


Figure II-24: Serpentin pour améliorer le mélange de deux chambres fixes.

Les techniques actives nécessitent l'apport d'une force extérieure pour perturber l'écoulement. Typiquement, l'acoustique (Figure II-25) [71], la diélectrophorèse ou des techniques magnétiques ou thermiques sont couramment employées dans les systèmes microfluidiques.

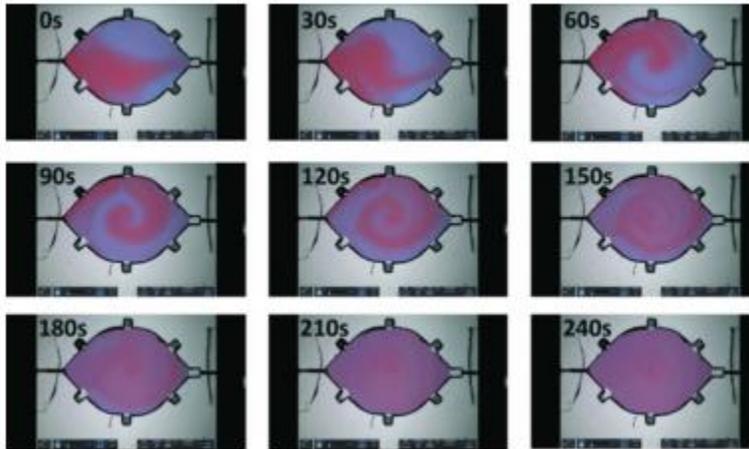


Figure II-25: Images d'un mélange entre deux liquides en utilisant un actionnement acoustique [71].

(iv) Nombre d'actionneurs pour la fonction mélange

Pour comparer le nombre d'actionneurs nécessaires au contrôle des chambres, un exemple de mélange entre deux chambres sera considéré. L'exemple suivant représente un mélange de deux chambres fixes selon l'axe X, préalablement remplies selon l'axe Y. Comme l'indique la Figure II-26, trois vannes pilotées chacune pneumatiquement par un actionneur différent seront nécessaires. Au total, la phase de mélange impliquera donc trois actionneurs (Figure II-26) et une source de pression externe (P_1).

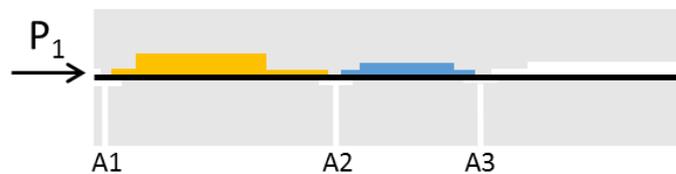


Figure II-26: Actionneurs nécessaires pour un mélange entre deux chambres fixes.

II.3.3. Chambres à volume variable

(i) Principe

La seconde technique de remplissage consiste à utiliser des chambres à volume variable. Cette technique emploie le principe de la fluidique étirable qui a été développé dans le laboratoire (EP3085444A1, [93]). L'empilement est similaire à celui décrit sur la Figure II-12 (B) correspondant à la vanne de géométrie planaire. Une membrane élastique est insérée entre la carte fluidique (supérieure) et la carte pneumatique (inférieure). La carte fluidique comporte les canaux permettant l'acheminement des fluides et la carte pneumatique comporte des chambres connectées à un réseau de canaux pneumatiques alimentés par de l'air comprimé.

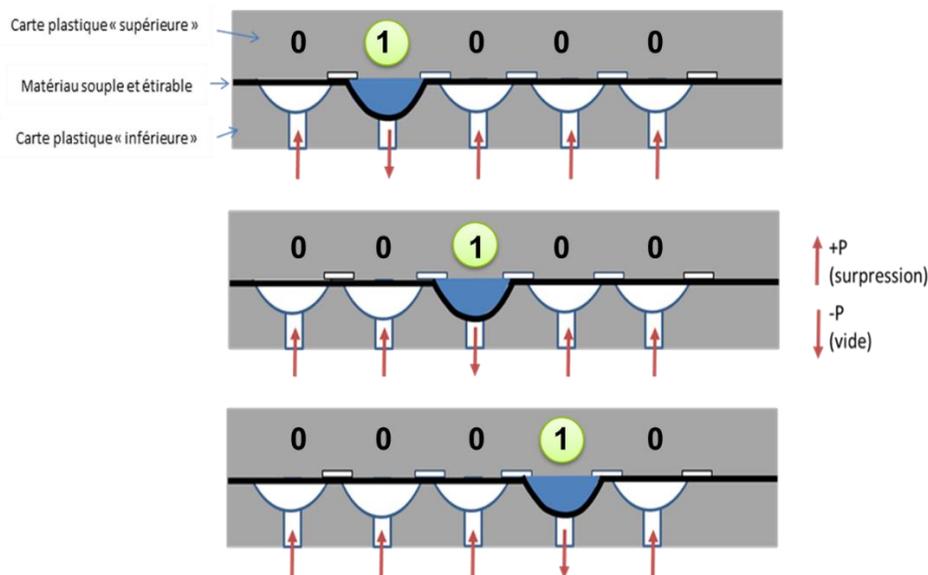


Figure II-27: Principe de la fluidique étirable.

De manière semblable aux vannes, la chambre oscille entre deux états : un état 0 fermé où la membrane est plaquée vers le haut (c'est-à-dire contre la carte fluidique) et un état 1 ouvert où la membrane est plaquée vers le bas (c'est-à-dire contre la carte pneumatique). Dans le cas de l'état 0, le volume d'intérêt (hors canal) est nul alors que dans le cas de l'état 1, ce volume est égal au volume de la chambre. En ce sens, cette méthode d'actionnement peut être appelée microfluidique discrète ou digitale.

Le changement d'état s'effectue par une variation du niveau de pression. Pour cela, la membrane étirable est contrôlée via la carte pneumatique. Ainsi pour fermer la chambre, une surpression est appliquée dans l'espace sous la membrane, via un orifice au fond de la chambre et pour ouvrir la chambre, cet espace est mis sous vide partiel via le même orifice. Une chambre peut également remplir la fonction de vanne puisque dans le cas où l'état est fermé, elle permet de bloquer un écoulement et d'isoler deux chambres.

Il est donc possible d'utiliser uniquement une matrice de ce type de chambres dans une architecture en X-Y et d'utiliser certaines chambres comme des vannes. Il est possible également de combiner ces chambres aux vannes décrites précédemment.

A noter que par son mode de fabrication et son principe de fonctionnement, la technique proposée ici n'est pas très éloignée de celle proposée par l'équipe de Quake ou de Mathies (voir chapitre I). Cependant, toute l'originalité vient du choix de l'élastomère hyperélastique dont les caractéristiques seront détaillées dans la section II.6.3. Une des conséquences est d'avoir des volumes de chambre potentiellement beaucoup plus grands que les volumes des canaux de jonction. De même, la possibilité de former des chambres en demi-sphère est un point à souligner. Ceci sera largement discuté dans la suite de ce manuscrit.

(ii) Calibration de volumes

La calibration de chambres à volume variable a été validée précédemment avec des sources de pressions négatives c'est-à-dire inférieures à la pression atmosphérique et des sources de pressions positives donc supérieures à la pression atmosphérique. A partir d'un puits rempli de liquide (Figure II-28, a), une chambre variable peut se remplir en appliquant une pression négative sous la membrane (Figure II-28, b). Sur la Figure II-28, l'état 0 désigne une chambre où une pression positive est appliquée (chambre fermée) et l'état 1 désigne une chambre où une pression négative est appliquée (chambre ouverte).

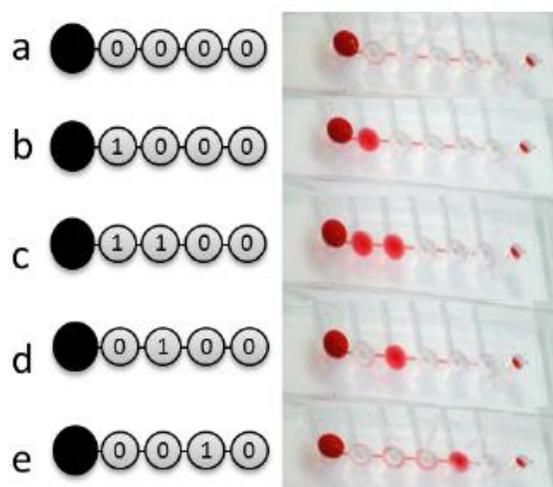


Figure II-28: Calibration d'un volume par la méthode des chambres variables [94].

Dans l'exemple qui suit, des vannes sont ajoutées de part et d'autre de la chambre. L'intérêt de ces vannes sera discuté plus loin. Elles permettent notamment de remplacer les chambres qui jouent le rôle de vannes, de gagner de l'espace sur la carte et de minimiser le volume mort.

Pour remplir la chambre, la deuxième vanne doit être fermée et le liquide doit être injecté à l'aide d'une pression positive au niveau fluidique (Figure II-29). La membrane se déforme progressivement pour atteindre le fond de la cuvette et la remplir.

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

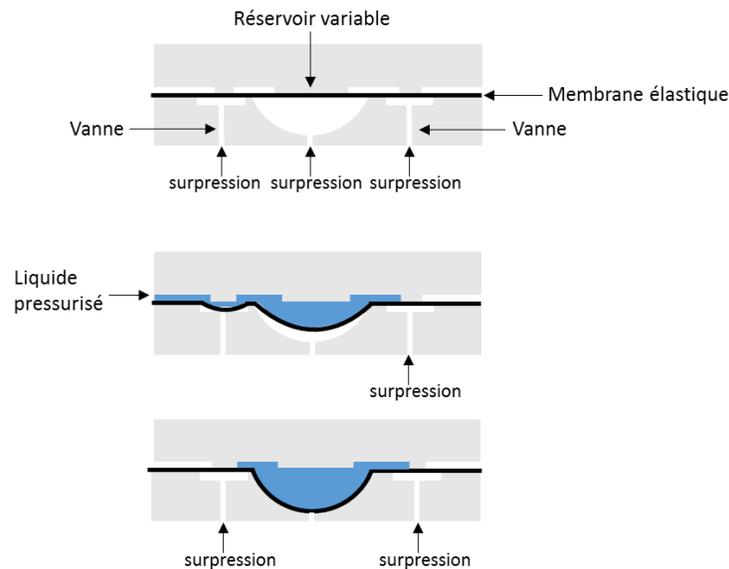


Figure II-29: Vue en coupe des étapes de remplissage d'une chambre à volume variable.

Cette déformation progressive limite alors le piégeage de bulles dans la chambre. Les bulles provenant de l'air des microcanaux seront abordées dans le chapitre III. Cette technique assure donc un remplissage plus complet que celle des chambres à volume fixe. De même, lors de l'étape de vidange, la déformation de la membrane assure une vidange complète de la chambre.

Un autre avantage est de calibrer précisément des volumes sans avoir à gérer les débits ni les temps de remplissage et sans ajout de membrane hydrophobe. Le volume de liquide est simplement calibré lorsque la membrane atteint le fond de la chambre.

Pour utiliser cette technique, les vannes de type « film » sont les plus adaptées car le film utilisé pour les vannes est également utilisé pour les chambres. Comme mentionné précédemment, les chambres variables peuvent être de forme hémisphérique ou cylindrique. Ces géométries occupent moins de place sur la surface de la carte et de plus grands volumes peuvent alors être intégrés dans la carte.

(iii) Mélange de volumes calibrés

L'utilisation de chambres à volume variable semble être favorable au mélange. En effet, lors du transfert d'un liquide, des recirculations sont visibles.

Le mélange peut également être amélioré en effectuant simplement des allers-retours successifs entre deux chambres car à chaque opération des recirculations apparaissent (Figure II-30) [94] .

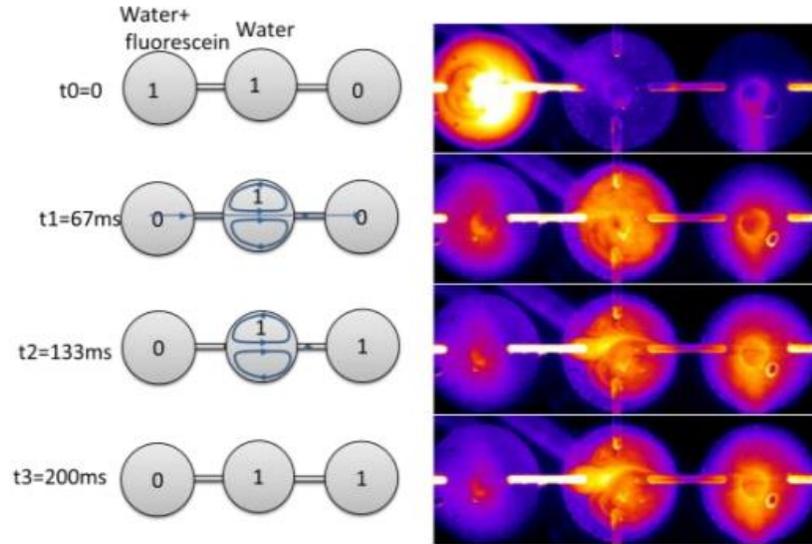


Figure II-30: Visualisation d'un mélange entre une solution de fluorescéine et de l'eau (couleurs modifiées) [94].

D'après ces expériences, la technique d'actionnement des chambres variables semble donc améliorer le mélange sans complexifier la géométrie ou sans ajouter d'éléments extérieurs.

(iv) Nombre d'actionneurs pour la fonction mélange

Un mélange entre deux chambres nécessite une troisième chambre pour le transfert et deux vannes. Les chambres et les vannes doivent être actionnées individuellement. Au total, une étape de mélange à l'aide de chambres variables implique donc 5 actionneurs.

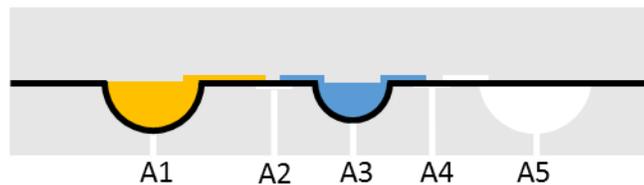


Figure II-31: Actionneurs A nécessaires pour un mélange entre deux chambres variables.

II.4. Bilan : choix de la technique de contrôle de fluides

Ces différents critères ont été comparés pour choisir la technique la plus adaptée à notre problématique (Tableau II-1).

	Chambres fixes	Chambres variables
Nombre d'actionneurs	3	5
Surface occupée sur la carte	Surface importante	Surface faible
Possibilité pour améliorer le mélange	Ajouter un serpentín	Aller-retour

Tableau II-1 : Comparaison entre les chambres fixes et les chambres variables.

Les chambres fixes présentent l'avantage d'être pilotables avec peu d'actionneurs. Les fluides sont injectés en entrée à l'aide d'une source de pression positive puis en actionnant les vannes les unes après les autres, des mélanges successifs peuvent être exécutés. Cependant, pour assurer un bon mélange et pour éviter un contrôle en débit du remplissage, ces chambres demandent des fonctions supplémentaires telles que les serpentins et les membranes hydrophobes.

Concernant le dimensionnement, celui des chambres à volume fixe semble plus complexe car elles sont définies par 4 paramètres (profondeur, largeur, longueur et angle d'ouverture). Les chambres variables peuvent être cylindriques ou en forme de calotte sphérique ce qui nécessite 2 paramètres. Il est également possible de choisir des chambres hémisphériques pour simplifier le dimensionnement (1 paramètre).

Ensuite, la profondeur des chambres à volume fixe doit être limitée pour que le remplissage s'effectue correctement. Dans le plan, il y a en effet une marche à franchir pour le liquide dans le cas de grands volumes. Ces chambres doivent donc avoir une surface importante pour atteindre un grand volume.

L'objectif est d'intégrer de nombreuses étapes de mélanges simultanément pour élaborer une gamme de dilution et effectuer des analyses en parallèle sur un échantillon et sur les solutions à différentes concentrations. Cet objectif implique l'intégration d'un nombre important de chambres sur la carte. Pour cela, la surface des chambres doit être minimisée.

Un autre critère important est l'efficacité du mélange. La technique des chambres variables semble prometteuse pour améliorer le mélange qui est une opération complexe. Pour ces raisons, le choix de la technique de contrôle de fluides s'est porté sur celle des chambres variables.

II.5. Pilotage pneumatique

La technique d'actionnement de fluides choisie implique le pilotage en pression des vannes et des chambres. Contrairement aux développements antérieurs présentés en Figure II-27, seules des sources de pressions positives seront utilisées dans le cadre de la thèse. Ce choix a été effectué suite au stage PFE qui a permis de développer des sources de pressions positives par une réaction chimique.

Ce choix impose l'utilisation de trois sources de pressions représentées sur la Figure II-32 :

- P_L pour pressuriser les canaux fluidiques
- P_V pour pressuriser les vannes
- P_C pour pressuriser les chambres

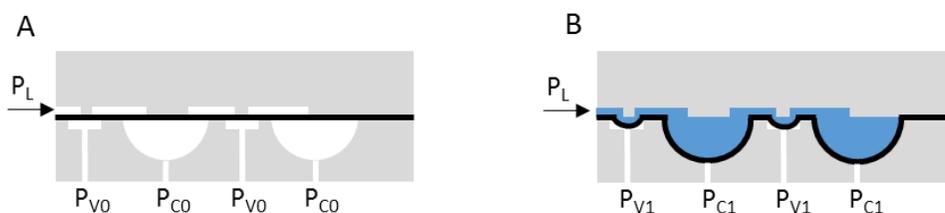


Figure II-32 : Vue en coupe représentant les pressions utilisées pour le pilotage de la carte. A : Position fermée des chambres et des vannes, B : position ouverte des chambres et des vannes.

P_L est une pression constante qui sera fixée au début du protocole. Les chambres et les vannes doivent au cours du protocole prendre deux états différents. Par convention, l'état 0 désigne l'état où les chambres et les vannes sont vides (Figure II-32, A) et l'état 1 désigne l'état où les chambres et les vannes sont remplies (Figure II-32, B).

Pour effectuer ce changement d'état, P_V et P_C vont être connectées à des électrovannes et vont prendre deux valeurs :

- P_{V0} ou P_{C0} pour pressuriser les vannes et les chambres,
- P_{V1} ou P_{C1} pour relâcher la pression sous les vannes et les chambres.

Les valeurs des pressions P_{V0} et P_{C0} sont respectivement plus grandes que celles de P_{V1} et P_{C1} . Cette convention de notation vient du fait que l'état 0 indique un état fermé (membrane plaquée vers le haut) alors que l'état 1 indique des positions ouvertes (membrane plaquée vers le bas)

Le choix des valeurs de pressions P_L , P_{C0} et P_{V0} sera discuté dans le chapitre III. A ce stade, il peut être précisé que P_L doit être plus grand que P_{C1} et P_{V1} afin de permettre les premiers remplissages de chambres. La pression la plus faible du système pneumatique doit donc correspondre aux valeurs de P_{C1} et P_{V1} . Cette pression sera la pression de référence du système et sera égale à la pression atmosphérique P_a d'où $P_{C1} = P_{V1} = P_a$.

II.5.1. Banc expérimental

Pour tester et valider ces choix techniques, un banc expérimental flexible doit être développé avant de concevoir l'instrument final. La première fonction du banc expérimental est de piloter les cartes microfluidiques. Pour cela, la pression doit être contrôlée au niveau de la carte pneumatique (Figure II-33). Pour réguler la pression, un contrôleur de pression (Fluigent, Fr) relié au réseau d'air comprimé et couplé à deux boîtiers de 8 électrovannes (SMC S070) sera utilisé. Les électrovannes sont reliées par des tuyaux au contrôleur de pression en entrée et reliées en sortie au support utilisé pour connecter les entrées pneumatiques de la carte. Pour piloter les électrovannes, une électronique comportant des optocoupleurs (ASSR-1420), des résistances et des diodes de protection a été

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

développée précédemment et rassemblée dans un boîtier. Ces boîtiers sont pilotés par un ordinateur via un microcontrôleur (Meilhaus electronic, redLab-1208F). Un programme en Microsoft Visual Studio, réalisé précédemment, sera utilisé pour piloter les électrovannes et réaliser des séquences d'actionnement.

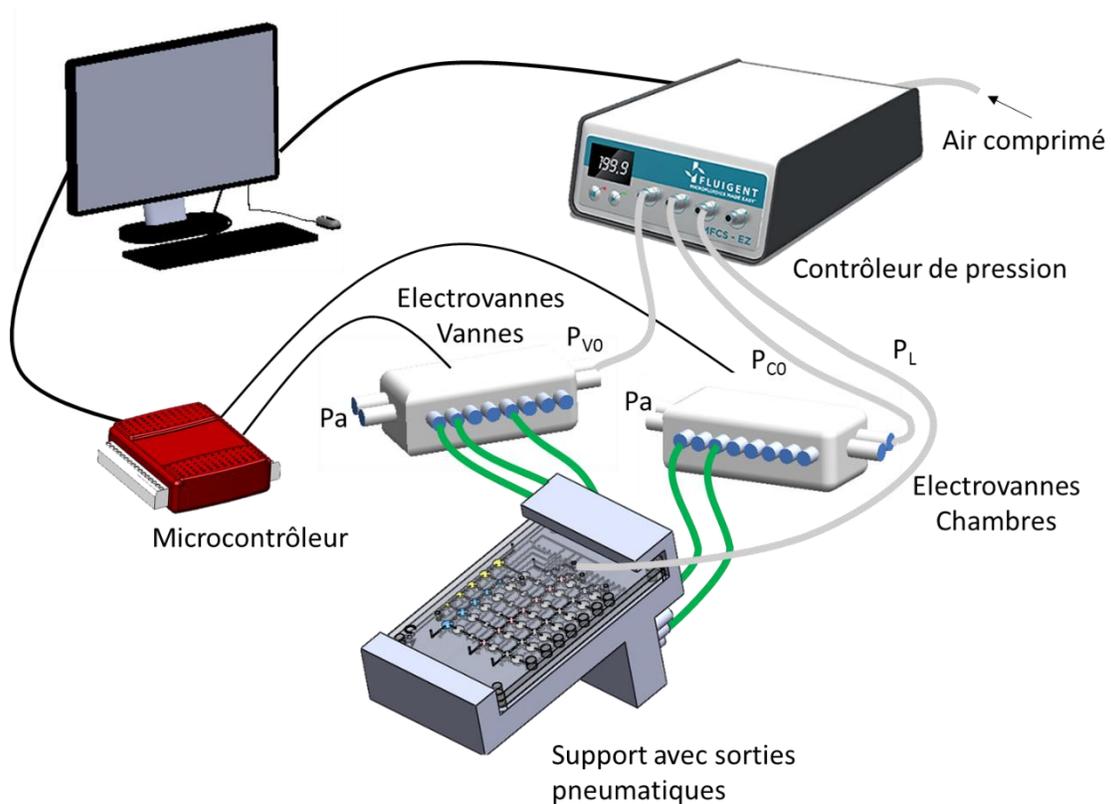


Figure II-33: Schéma du banc expérimental.

Pour injecter les liquides dans la carte, différentes méthodes seront expérimentées au cours de la thèse. Les liquides peuvent par exemple être préstockés sur la carte et pressurisés à l'aide d'un tube connecté à l'entrée du réservoir. Une autre option est d'utiliser des connectiques Luer. Ainsi, des seringues peuvent être connectées à la carte. L'embarquement de réactif sera abordé plus en détail dans le chapitre V.

Une deuxième fonction à laquelle doit répondre le banc est la visualisation optique des cartes microfluidiques. Pour cela, une caméra (Chameleon®, Edmund optics, 83-512) couplée à un objectif (Techspec®, Edmund optics, 59-871) a été utilisée. Pour visualiser de la fluorescence, un filtre pour des longueurs d'onde de 530 nm (Thorlabs, MF530-43) est ajouté et une lumière bleue émettant à 490 nm (Thorlabs, M490L3) est employée pour l'éclairage (Figure II-34).

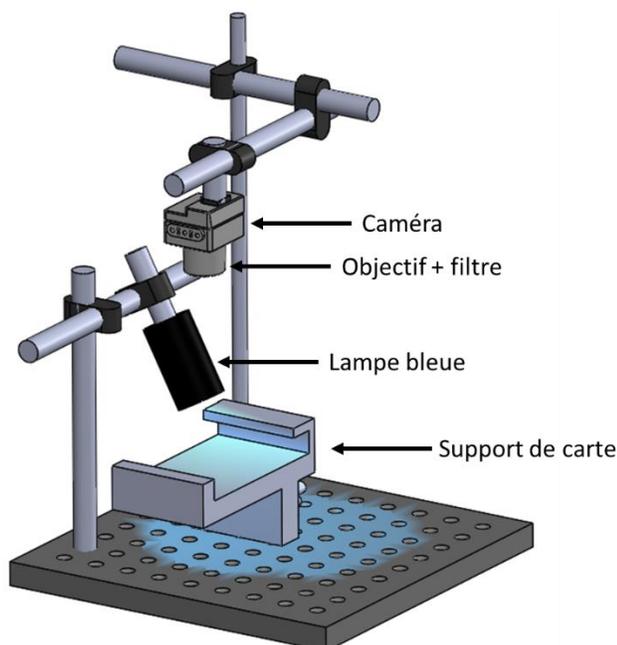


Figure II-34: Schéma du banc optique.

II.5.2. Adressage pneumatique et multiplexage

Pour limiter le nombre d'actionneurs, il est important de réfléchir aux réseaux de canaux pneumatiques et aux couplages de certaines colonnes de vannes et de chambres. L'architecture en X-Y permet d'effectuer les différentes actions telles que l'ouverture et la fermeture des vannes ou des chambres en parallèle. La Figure II-35 représente les vannes et les chambres pouvant être contrôlées simultanément.

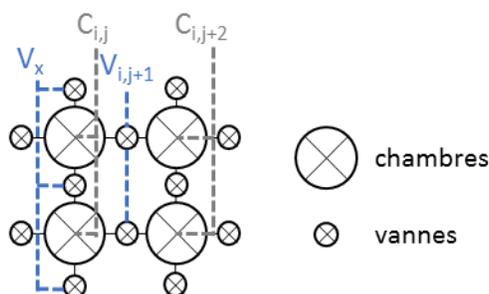


Figure II-35: Vue du dessus de l'architecture X-Y représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres.

L'indice i représente le numéro de la ligne où se situe la vanne ou la chambre et l'indice j celui de la colonne. Les vannes ou les chambres d'une même colonne sont désignées par la notation $V_{i,j}$ ou $C_{i,j}$. Cette notation sera utilisée tout au long de la thèse pour préciser l'adressage des chambres et des vannes. Les chambres $C_{i,j}$ sont alors alimentées par les pressions P_{C0} ou P_{C1} et les vannes $V_{i,j}$ par les pressions P_{V0} ou P_{V1} . Au cours du travail de thèse, l'adressage des entrées pneumatiques de la carte a été standardisé. Chaque sortie du support est alors connectée une fois sur deux à la pression P_V ou

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

P_C (Figure II-36). Ainsi le dessin de chaque nouvelle carte reste compatible avec le même banc sans avoir à reprendre le câblage pneumatique.

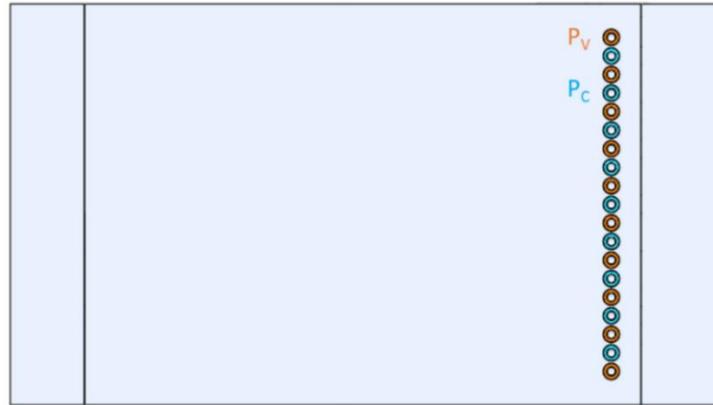


Figure II-36: Sorties du support standardisé.

Pour un indice j donné et quel que soit l'indice i , les colonnes V_{ij} ou C_{ij} peuvent être pilotées simultanément et donc actionnées par la même électrovanne.

II.5.3. Programmation des étapes du protocole

La mise en œuvre pratique d'un protocole biologique complet dans une carte microfluidique nécessite l'implémentation de fonctions microfluidiques complémentaires. Certaines ont été introduites précédemment telles que la calibration des volumes et le mélange. Une autre fonction importante est de parvenir à récupérer à partir d'un grand volume, une faible quantité de réactifs. Cette phase est appelée aliquotage.

Toutes ces fonctions doivent être maîtrisées dans le système microfluidique à l'aide de la technologie de chambres étirables. Ainsi, les séquences d'actionnement des chambres et des vannes pour mener les différentes opérations fluidiques doivent être définies. Pour cela, les notations de la Figure II-35 vont être utilisées. Les fonctions élémentaires décrites dans ce paragraphe seront expliquées avec une architecture X-Y simplifiée avec seulement 2 ou 3 lignes ou colonnes. Ce principe peut être appliqué à un plus grand nombre de chambres.

(i) Calibration des volumes

La première étape à intégrer pour l'élaboration d'un protocole biologique en microfluidique consiste à calibrer des volumes à partir d'un unique réservoir de réactif.

La Figure II-37 illustre le principe d'injection de réactifs dans la direction Y. Cette fonction demande seulement trois étapes pour remplir et calibrer une colonne de chambres de réactifs :

- Toutes les vannes et toutes les chambres sont fermées (1)
- Ouverture des vannes V_x et des chambres $C_{i,j}$ (2)
- Fermeture des vannes V_x (3)

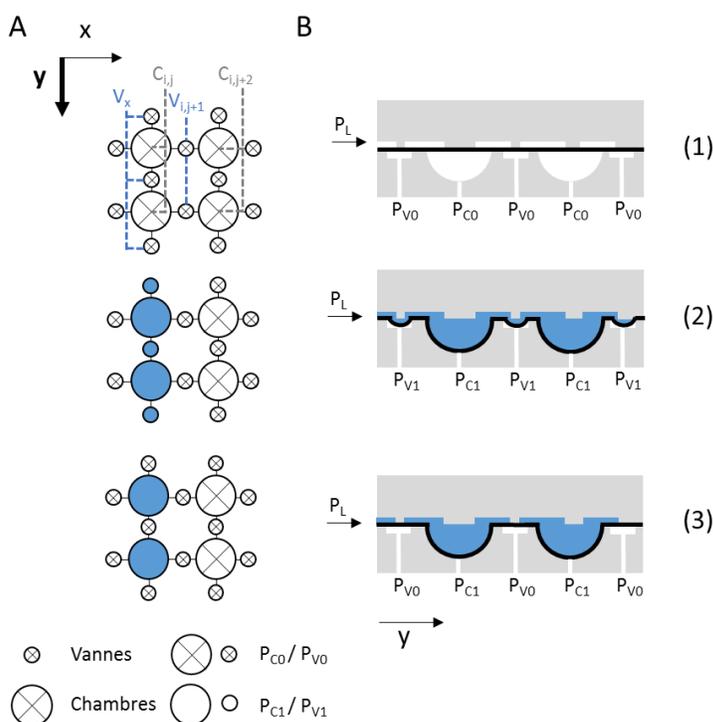


Figure II-37: Calibration de volumes à partir d'un réservoir de réactif en Y. Vue du dessus (A) et vue en coupe (B).

Les changements d'état de ces trois étapes sont représentés dans le Tableau II-2.

Etape	V_x	$C_{i,j}$	$V_{i,j+1}$	$C_{i,j+2}$
1	0	0	0	0
2	1	1	0	0
3	0	1	0	0

Tableau II-2 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour la phase de calibration.

Dans ce type de tableau qui sera utilisé tout au long de ce manuscrit pour décrire la programmation de chaque étape, les vannes connectées horizontalement V_x seront toujours séparées par un trait plus épais des vannes connectées verticalement $V_{i,j}$.

(ii) Mélange

Le mélange est une opération importante habituellement difficile à réaliser en microfluidique. Avec la technologie de chambres étirables, cette opération peut être intégrée en peu d'étapes sans ajouter de systèmes externes tels que de l'acoustique ou sans changer le design de la carte.

Les mélanges peuvent s'effectuer dans la direction X en transférant deux volumes dans une troisième chambre appelée chambre de mélange. Pour réussir cette opération, le volume de la chambre de mélange $C_{i,j+4}$ doit être égal à la somme des deux chambres à mélanger $C_{i,j}$ et $C_{i,j+2}$.

Six étapes sont nécessaires pour mélanger deux chambres. Les trois principales sont détaillées dans la Figure II-38 :

- Initialement, les chambres à mélanger sont séparées par une vanne (1).
- Les vannes de séparation ainsi que les chambres de mélange sont ouvertes (2).
- Les vannes et les chambres sont fermées les unes après les autres pour transférer tout le liquide vers la chambre de mélange (3).

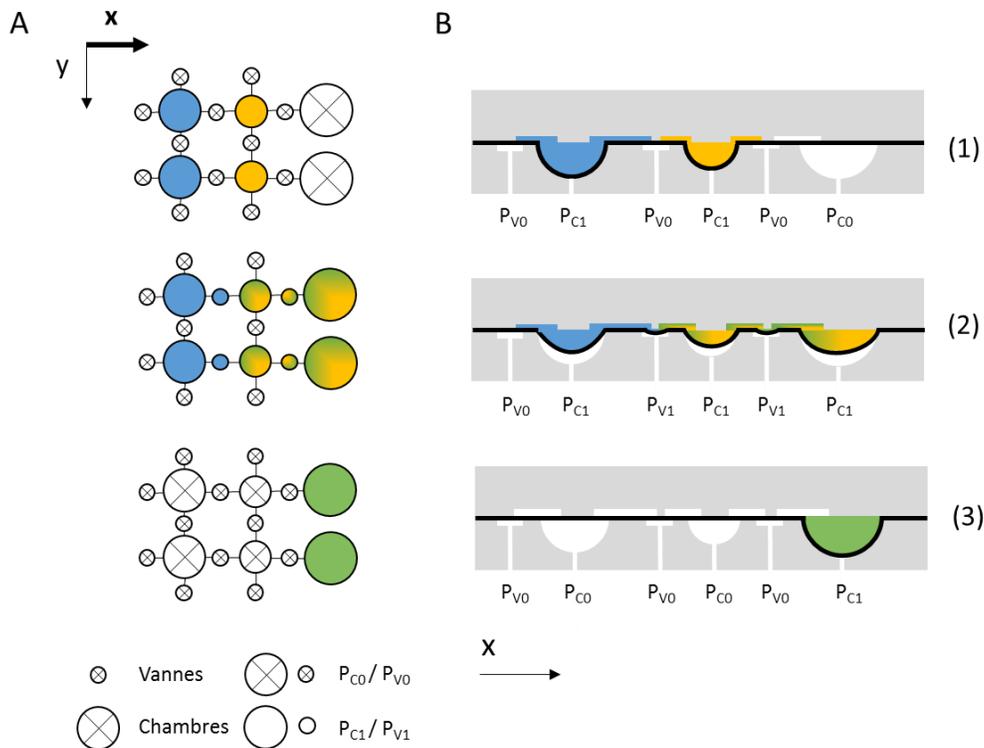


Figure II-38: Mélange entre deux chambres en X. Vue du dessus (A) et vue en coupe (B).

Les changements d'état des vannes et des chambres pour effectuer cette phase de mélange sont représentés dans le Tableau II-3.

Etape	V_x	$C_{i,j}$	$V_{i,j+1}$	$C_{i,j+2}$	$V_{i,j+3}$	$C_{i,j+4}$
1	0	1	0	1	0	0
2	0	1	1	1	1	1
3	0	0	1	1	1	1
4	0	0	0	1	1	1
5	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	1

Tableau II-3 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour la phase de mélange.

(iii) Aliquotage

Le but de cette fonction est de récupérer un faible volume à partir d'un volume plus important. L'opération d'aliquotage peut être facilement réalisée dans la direction X avec des chambres étirables (Figure II-39). Pendant cette étape, une fraction d'un grand volume de solution est transférée vers une chambre plus petite pour réduire le volume.

Cette opération est réalisée en cinq étapes. Les quatre principales étapes sont décrites dans la Figure II-39 :

- Initialement les volumes sont stockés dans les chambres $C_{i,j}$ (1).
- Les vannes $V_{i,j+1}$ et les chambres $C_{i,j+2}$ sont ouvertes (2).
- Les chambres $C_{i,j}$ sont actionnées pour être vidées partiellement dans les chambres $C_{i,j+2}$ (3).
- Les deux chambres sont isolées par les vannes $V_{i,j+1}$ (4).

A la fin, les chambres $C_{i,j}$ sont ouvertes pour stocker le liquide restant.

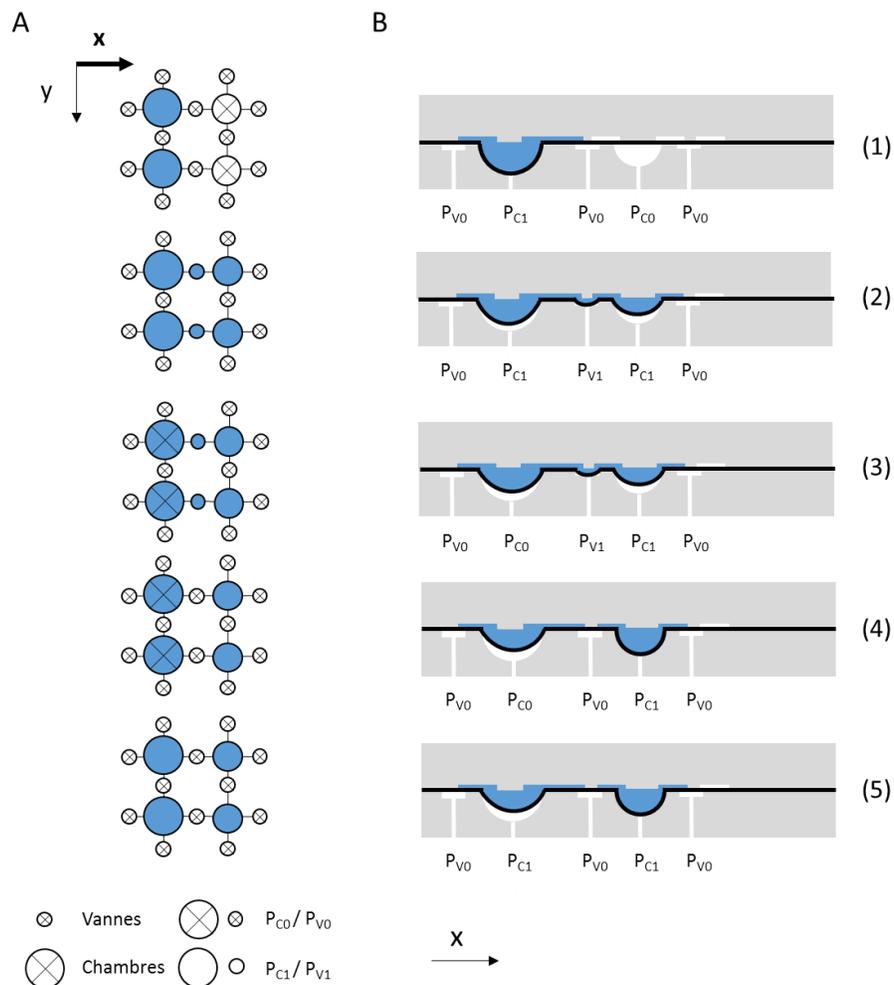


Figure II-39: Aliquotage d'une grande chambre vers une petite chambre en X. Vue du dessus (A) et vue en coupe (B).

Les changements d'état des vannes et des chambres pour effectuer la phase d'aliquotage sont représentés dans le Tableau II-4.

Etape	V_x	$C_{i,j}$	$V_{i,j+1}$	$C_{i,j+2}$	$V_{i,j+3}$
1	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0
3	0	0	1	1	0
4	0	0	0	1	0
5	0	1	0	1	0

Tableau II-4 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour la phase d'aliquotage.

II.5.4. Bilan du pilotage pneumatique

La combinaison de l'architecture X-Y avec la technique des chambres variables actionnées pneumatiquement permet de piloter une carte microfluidique complexe à l'aide d'un nombre d'actionneurs limité et à de faibles pressions. Ces choix techniques offrent donc la possibilité d'élaborer un protocole multi-étapes, intégrant une gamme de dilution tout en limitant l'instrumentation.

II.6. Réalisation de la cartouche microfluidique

II.6.1. Conception de la cartouche microfluidique

La technique d'actionnement des fluides retenue utilisant des chambres à volume variable pour les vannes et les chambres nécessite un assemblage de cartes microfluidiques avec une membrane super étirable (Figure II-40).

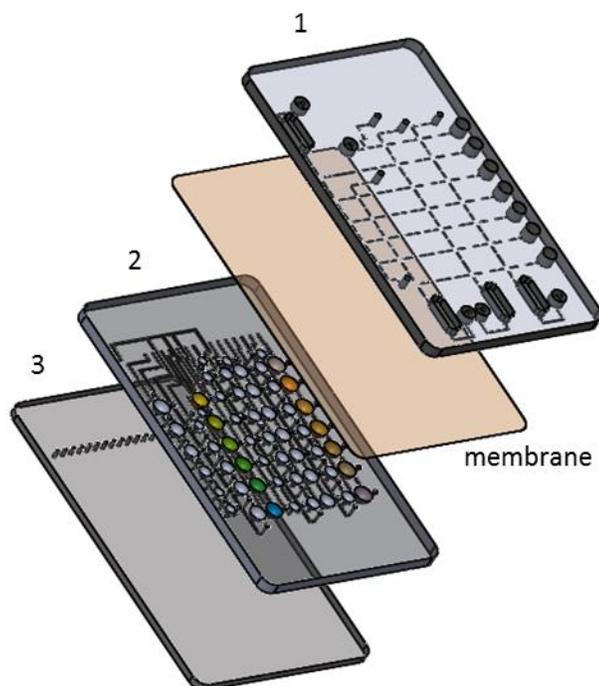


Figure II-40: Vue éclatée de l'assemblage des cartes microfluidiques avec la membrane étirable.

Les cartes microfluidiques sont au format carte de crédit (85,6 mm x 54 mm). L'épaisseur varie selon les cartes. La carte 1 de 3 mm d'épaisseur correspond à la carte fluide comportant un ensemble de canaux permettant la mise en communication des réservoirs étirables ainsi que les ouvertures pour les entrées et sorties fluidiques. La carte 2 de 3 mm d'épaisseur est la carte pneumatique qui comporte des cavités pour former les vannes, les chambres ainsi que des canaux pneumatiques qui seront reliés à une source de pression. La carte 3 de 1 ou 2 mm d'épaisseur permet de fermer les

canaux pneumatiques de la carte 2. Entre les cartes 2 et 3 se trouve la membrane étirable. Cette membrane a un rôle essentiel car elle est utilisée à la fois pour les chambres étirables et pour les vannes. Dorénavant, nous appellerons « cartouche microfluidique », l'assemblage des cartes microfluidiques et de la membrane élastique.

La réalisation concrète de la cartouche nécessite de choisir avec attention les matériaux, la méthode de fabrication et d'assemblage. En effet, il est important de choisir une méthode de fabrication et d'assemblage rapide pour tester de nombreux designs mais suffisamment fiable pour effectuer plusieurs expériences sur chaque cartouche. Les matériaux doivent également être adaptés aux besoins. Par exemple, la membrane élastique doit être déformable à de faibles pressions.

II.6.2. Carte microfluidique

(i) Choix du matériau

Historiquement, les cartes microfluidiques étaient fabriquées en silicium [95], matériau utilisé dans le domaine de la microélectronique, l'une des thématiques principales du LETI. Cependant, d'autres matériaux se sont révélés être plus intéressants en termes de coût par rapport aux surfaces mises en jeu [96].

Le PDMS (polydimethylsiloxane) mis en avant par l'équipe de G. Whitesides [97] grâce au procédé de « soft lithography » est l'un des matériaux les plus couramment employés dans la microfluidique. L'avantage est d'obtenir un dispositif simple en moins de 24h. Cependant, l'utilisation de ce matériau présente quelques inconvénients. La technique de fabrication n'est pas facilement industrialisable, ce matériau peut donc être utilisé dans un cadre de recherche mais pourra être difficilement utilisé pour de la production en grande série. Les applications visées vont nécessiter une production à grande échelle. Il est donc plus intéressant de travailler dès le début de la phase de développement avec les matériaux définitifs qui pourront être industrialisables. De plus, ce matériau est poreux à l'air. Cette caractéristique risque d'être problématique pour l'embarquement de réactifs liquides par exemple.

Le verre possède des propriétés intéressantes comme la transparence mais les procédés de fabrication sont complexes et ce matériau reste onéreux avec des procédés de fabrication proches du silicium.

Les cartes en thermoplastique sont également de plus en plus utilisées en microfluidique. Elles présentent un intérêt pour la fabrication à grande échelle en utilisant par exemple le moulage par injection. D'autres techniques peuvent être utilisées pour la fabrication à faible échelle comme l'embossage à forte température ou l'usinage. Différents thermoplastiques sont utilisés comme le COC (cyclic olefin copolymer), le COP (cyclic olefin polymer) ou le PMMA (poly (methyl methacrylate)).

Dans le laboratoire, le choix du matériau pour les cartes microfluidiques s'est porté sur le COC (cyclic olefin copolymer). Le COC n'est disponible qu'en granules pour l'injection mais le laboratoire s'approvisionne directement auprès de TOPAS pour obtenir des plaques.

Ce matériau possède des propriétés très intéressantes comparé au PDMS et au PMMA [98]. Contrairement au PDMS, le COC n'est pas poreux à l'air. Ensuite, il existe une variété de grades de COC qui ont des températures de transition vitreuse différentes : TOPAS-8007 ($T_v=78\text{ °C}$), TOPAS-5013 ($T_v=134\text{ °C}$), TOPAS-6015 ($T_v=160\text{ °C}$), et TOPAS 6017 ($T_v=130\text{ °C}$). Pour certains protocoles comme la PCR (Polymerase Chain Reaction), le protocole s'effectue à des températures de l'ordre de 90 °C , il est donc nécessaire de choisir un matériau résistant en température pour utiliser cet assemblage pour ce type de protocole. Il est également impossible d'usiner un matériau dont la température de transition vitreuse est trop basse. Le COC préférentiellement utilisé dans le laboratoire est le grade 5013.

Le COC est également résistant contre les solvants comme l'acétone, le méthanol, l'isopropanol. De plus, ce matériau possède des propriétés intéressantes en optique. Il est transparent à la lumière pour des longueurs d'onde supérieures à 400 nm et est faiblement autofluorescent. Ensuite, il est possible d'effectuer une stérilisation aux rayons gamma ce qui est important pour des applications médicales. Enfin, le COC est approuvé par la FDA et est beaucoup utilisé dans le domaine des dispositifs médicaux. C'est donc un matériau de choix pour les industriels de la microfluidique.

(ii) Conception et usinage des cartes

Les cartes sont dessinées à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) en 3 dimensions (Solidworks, Dassault systems).

Ce logiciel permet de concevoir les cartes ainsi que des assemblages de cartes en trois dimensions. La création de variables pour certains paramètres (taille vanne, distance canal vanne, espace entre les chambres...) permet de dessiner de nouvelles architectures de cartes rapidement à partir d'une architecture existante. Il existe également une bibliothèque de fonctions permettant de sélectionner certaines géométries préenregistrées et couramment utilisées dans le laboratoire. Un autre logiciel (Draftsight, Dassault systems) peut être utilisé pour de la conception en 2 dimensions.

Dans le laboratoire, deux équipements de micro usinage permettent de fabriquer les cartes microfluidiques. Le premier est le Charly4U (Charly Robot) (Figure II-41, A). Il dispose d'un logiciel (CharlyGraal) permettant de sélectionner pour chaque motif une profondeur et un type d'usinage (cycle de poche, contournement extérieur...). Cet équipement est en libre-service et a permis de développer rapidement des premiers composants pour faire des preuves de concept. Il est très utile pour des réalisations relativement simples et sans grande précision sur les géométries. Cependant, les plaques utilisées n'ont pas une épaisseur constante et cet équipement ne prend pas en compte les défauts de planéité. Il faudrait surfacer les plaques mais cela endommagerait l'état de surface. De plus, l'origine en Z s'effectue manuellement. Il y a donc un manque de précision au niveau de l'usinage dans la direction Z.

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

Un deuxième équipement plus robuste est également disponible (M7HP, Datron) (Figure II-41, B). Il permet de réaliser des cartes plus complexes avec une meilleure précision. En effet, il possède un palpeur qui mesure les défauts de planéité et les prend en compte afin de garder une section constante pour assurer une meilleure précision en Z. De plus, cet équipement est plus rapide et effectue le changement des outils automatiquement, il est donc plus adapté à la production d'un plus grand nombre de cartes et plus complexes et permet d'usiner des motifs plus fins.

Le temps d'usinage moyen dépend de la complexité de l'architecture et du nombre de perçages et est compris entre 10 min et 2h pour une face de format d'une carte de crédit. Les cartes peuvent être usinées par 4 pour plus de rapidité.

Cet équipement permet d'usiner les cartes microfluidiques dans des conditions propres car l'usinage s'effectue à l'éthanol et non à l'huile de coupe ce qui évite de contaminer les échantillons pour la suite.

A



B



Figure II-41: A : Equipement d'usinage Charly4U (A) et Datron M7HP (B).

Comme expliqué précédemment, il est intéressant de pouvoir tester un grand nombre d'architectures dans une phase de développement et de pouvoir les adapter et les modifier rapidement suivant les résultats obtenus. C'est pourquoi cette méthode de prototypage rapide est bien adaptée comparée à l'embossage thermique ou l'injection.

De plus, tous les équipements sont disponibles en interne au laboratoire ce qui permet d'être plus réactif lors de la conception d'une nouvelle architecture de carte.

II.6.3. Membrane élastique

(i) Choix du matériau

La membrane élastique est l'élément essentiel et original de la cartouche microfluidique. Dans le domaine académique, le PDMS (Polydiméthylsiloxane), un matériau qui appartient à la famille des silicones est beaucoup employé pour ses propriétés de déformations élastiques réversibles. Il a notamment été employé par l'équipe de S. Quake pour la fabrication de vannes [82] et par l'équipe de R. Mathies pour la fabrication de cartouches microfluidiques hybrides (PMMA/PDMS) comportant des chambres actionnables pneumatiquement [68].

Plus récemment, des nouveaux types de matériaux qualifiés d'hyperélastiques ont été utilisés par l'équipe de G. Whitesides pour la fabrication de robots souples (Figure II-42).



Figure II-42: Utilisation de l'Ecoflex® pour la fabrication de robots souples [99].

Ces robots souples sont réalisés principalement avec le matériau hyperélastique, Ecoflex® 00-50 (Smooth on, US). Ce matériau est aussi utilisé dans l'industrie cinématographique pour la fabrication de masques ou d'effets spéciaux (Figure II-43).



Figure II-43: Matériau « Ecoflex® » hyperélastique.

Il s'agit d'un silicone bi-composants dont les déformations sont plus importantes que le PDMS. Son module de Young vaut environ 200 kPa et son élongation maximale avant la rupture atteint 980 % (0.8-2 GPa et 7% - 40% pour le PDMS).

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

Ce matériau a fait l'objet d'une étude approfondie dans la thèse de Florian Pineda et a été initialement utilisé pour développer des capteurs électrofluidiques [100] puis des cartes microfluidiques [101] (Figure II-44).

Le choix de l'architecture à chambres étirables présente l'intérêt de s'inscrire dans la continuité de ces précédents travaux de thèse. Dans ces conditions, tous les développements présentés dans ce manuscrit ont été réalisés avec une membrane étirable en Ecoflex® 00-50.

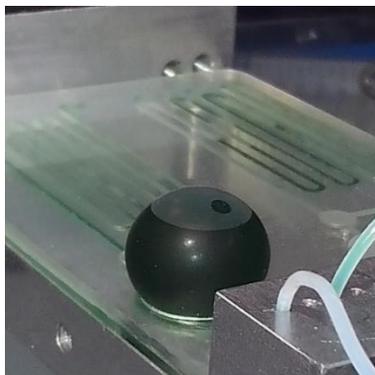


Figure II-44: Thèse de Florian Pineda [101]

D'autres matériaux sont actuellement utilisés pour réaliser des vannes dans le laboratoire tels que l'EPDM (Ethylène-Propylène-Diène Monomère), un caoutchouc ou le nitrile mais une pression de l'ordre de quelques bars doit être utilisée pour les fermer. Les vannes en Ecoflex® peuvent quant à elles être actionnées à quelques centaines de mBar.

De plus, pour la réalisation de chambres étirables dont les volumes peuvent atteindre la centaine de microlitres, il est également important que le matériau soit suffisamment élastique pour qu'il puisse se déformer et épouser la forme de la chambre. A titre d'exemple, les chambres en PDMS développées par l'équipe de R. Mathies peuvent contenir un volume de 120 nL qui n'est pas suffisant pour nos applications. Dans la thèse de Florian Pineda, il a été montré qu'un volume de 1,5 mL pouvait être créé avec une pression de seulement 40 mBar (Figure II-44). Il faut donc remarquer que la pression d'actionnement est faible, ce qui est un réel avantage dans l'objectif de simplifier l'instrumentation et le rendre portable.

Lors d'une phase de remplissage, la membrane élastique doit épouser parfaitement la forme de la chambre pour que le volume soit calibré. Pour atteindre une géométrie hémisphérique, la membrane doit s'étirer d'environ 30%. L'Ecoflex® dont le taux d'élongation est de 1000% est un candidat idéal pour remplir ces fonctions contrairement par exemple au PDMS dont le taux d'élongation se trouve être en dessous ou à la limite de la valeur de 30%.

(ii) Fabrication

Pour fabriquer la membrane hyperélastique, deux composants sont tout d'abord mélangés à masses égales puis ce mélange est déposé sur un substrat en silicium de 200 mm de diamètre. Ensuite, le substrat est placé sur une machine de centrifugation et le mélange est étalé par rotation à 3000 tr/min pendant 6,5 secondes. Ainsi, un film d'une centaine de microns d'épaisseur est obtenu, typiquement une valeur de 75 à 150 μm . Un temps de réticulation de 4h est ensuite nécessaire pour obtenir une membrane. Il est difficile de donner une valeur précise et fiable de l'épaisseur de la membrane. En effet, la technique de mesure du film (optique) n'est pas encore optimisée et adaptée pour ce matériau. De plus, le vieillissement du bi-composant qui se traduit par une augmentation de la viscosité peut entraîner une évolution de l'épaisseur du film. Enfin, l'épaisseur du film peut varier entre le centre et le bord du substrat utilisé pour le processus. Ce point de fabrication restera donc à être optimisé mais compte tenu du coefficient d'élongation, cette variation s'avère négligeable pour notre application.

II.6.4. Assemblage des cartes microfluidiques et du film étirable

Les cartes 2 et 3 sont assemblées grâce à un scellement thermique. Les deux cartes sont placées dans une presse et dans une étuve à 127°C, température de déformation sous charge (DTUL) du COC, pendant 80 min.

La principale difficulté dans cet assemblage est l'intégration de la membrane en Ecoflex®. Plusieurs techniques ont été expérimentées avant d'obtenir un assemblage robuste. A l'origine, un plaquage mécanique était utilisé mais les résultats n'étaient pas satisfaisants. Cette technique est efficace pour les motifs espacés mais lorsque les motifs sont trop rapprochés, des fuites apparaissent. Or, notre architecture va comprendre de nombreux motifs qui seront peu espacés pour limiter les volumes morts. D'autres essais ont été menés en utilisant un prétraitement au plasma O₂ avant d'assembler les cartes mais des fuites pneumatiques apparaissaient également au bout de quelques actionnements. La recherche d'une technique plus fiable a été nécessaire.

La solution est venue avec des adhésifs double face souvent utilisés en microfluidique. La difficulté ici vient de la nature des matériaux. En effet, le silicone utilisé dans cette étude ne garantit pas une adhésion suffisante sur les adhésifs standards. Dans ce contexte, différents adhésifs comprenant une colle silicone ont été testés. L'adhésif sélectionné est un adhésif double face Nitto de 85 μm d'épaisseur. Une face comporte une colle acrylique pour coller sur la carte et l'autre face comporte une colle silicone pour coller sur l'Ecoflex®. L'adhésif est approvisionné au format d'une feuille A4 et est conditionné entre 2 liners ce qui simplifie sa manipulation.

L'adhésif est prédécoupé dans les zones où la membrane ne doit pas coller les surfaces des cartes, c'est-à-dire à l'emplacement des vannes et des chambres. L'assemblage obtenu entre les cartes, l'adhésif et la membrane élastique est représenté sur Figure II-45.

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

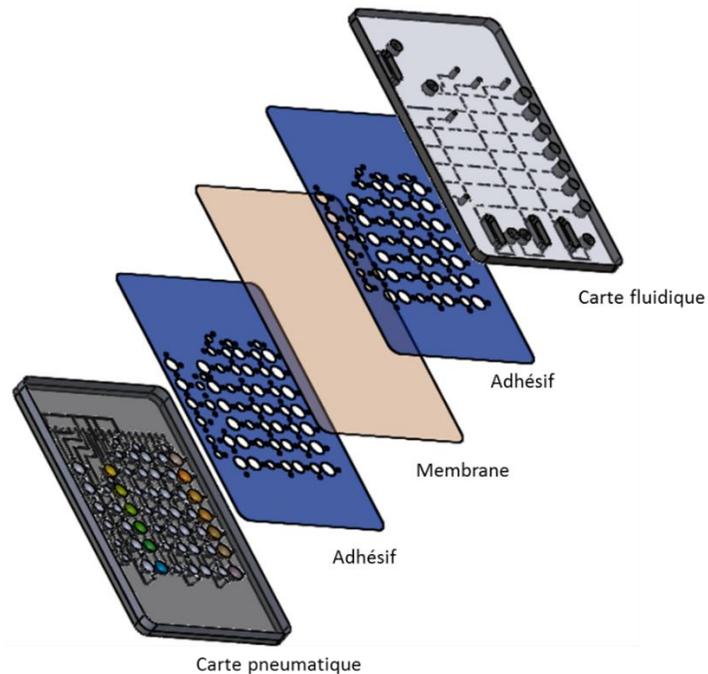


Figure II-45: Vue éclatée de l'assemblage de la membrane avec un adhésif double face.

Pour obtenir ces motifs, une mise en plan de la carte pneumatique est extraite du dessin réalisé sur Solidworks et convertie au format DXF. Une machine de découpe (Graphtec, Craft Robo) (Figure II-46) est ensuite utilisée pour lire ce fichier DXF et piloter une lame pour réaliser les motifs.



Figure II-46: Machine de découpe Graphtec, Craft Robo.

Un inconvénient de cette machine est le manque de précision dans la direction Y. En effet, la machine utilise un rouleau pour déplacer la feuille et ce déplacement crée des décalages par rapport au dessin demandé.

Un autre point critique est l'alignement de l'adhésif sur les motifs des cartes. Un support d'alignement a été utilisé. Quatre trous traversants dans les 4 coins des cartes et dans les adhésifs ont été ajoutés, et un support correspondant facilite le montage et l'alignement des différents éléments (Figure II-47).

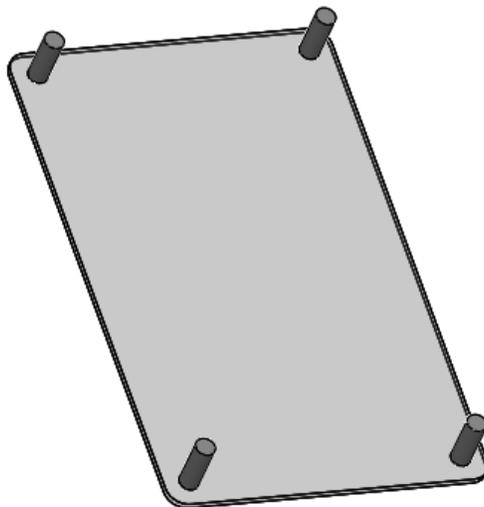


Figure II-47: Support d'alignement.

Enfin, une dernière difficulté concerne la manipulation du film étirable et son dépôt sur l'adhésif. Le film étant très élastique, sa manipulation demande une grande précaution. La technique la plus efficace consiste à utiliser une boîte de pétri comme support pour tendre le film puis de venir déposer le film à l'aide de la boîte sur la carte. Pour éviter de piéger des bulles lors du dépôt, des trous peuvent être ajoutés dans l'adhésif.

Les étapes d'assemblage sont détaillées dans la Figure II-48. Cinq grandes étapes sont nécessaires :

- Assemblage des cartes microfluidiques avec les adhésifs double face (1) et (2)
- Découpe du film d'Ecoflex® (3)
- Assemblage du film d'Ecoflex® avec une des cartes microfluidiques (4)
- Assemblage des cartes microfluidiques (5)

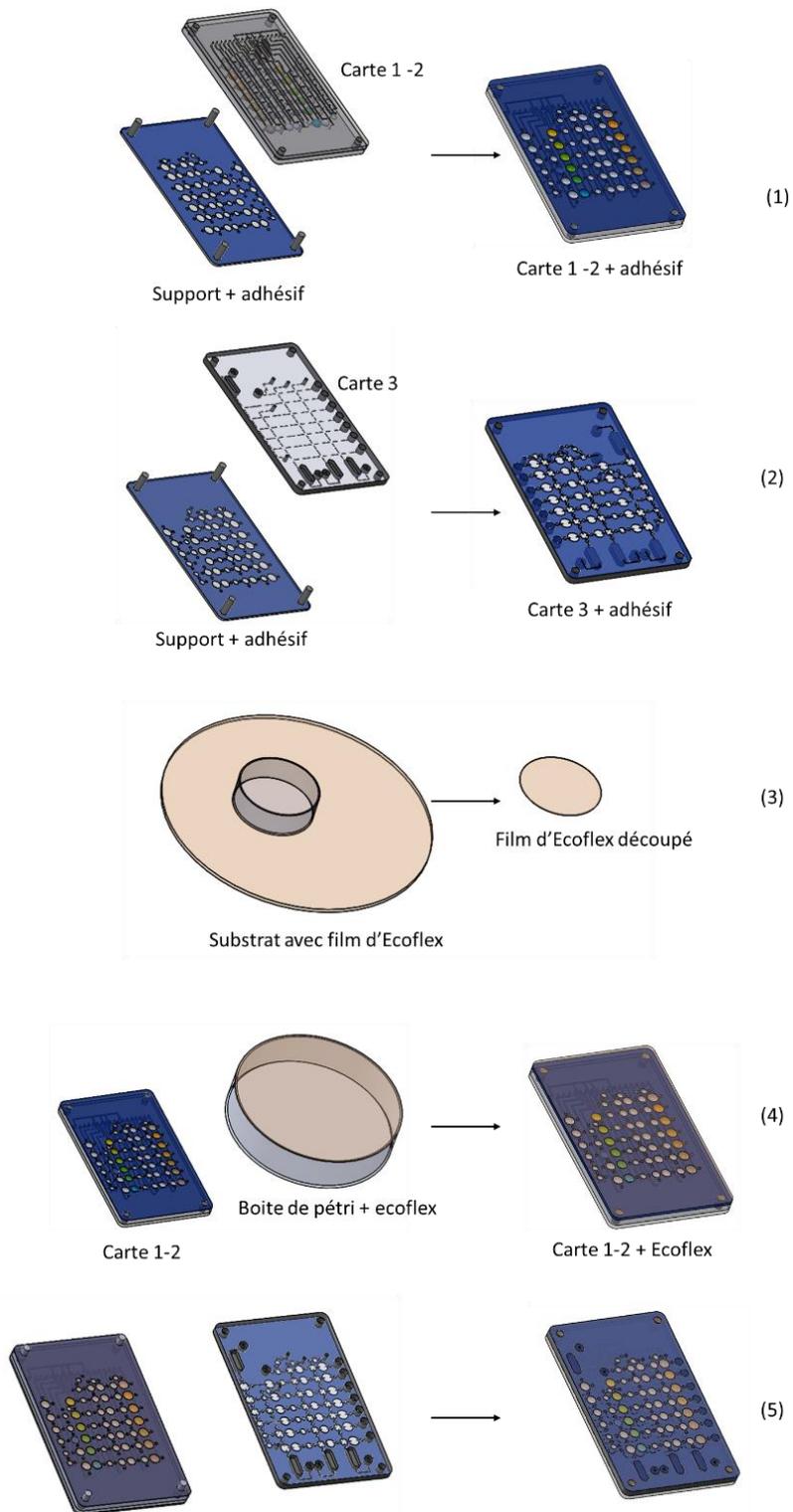


Figure II-48: Etapes d'assemblage de la cartouche microfluidique

Cette technique d'assemblage a été développée dans le cadre de la thèse et est désormais utilisée pour d'autres projets utilisant la membrane étirable. Cette technique est suffisamment robuste pour tester une même cartouche microfluidique de nombreuses fois et résiste aux pressions utilisées. Toutes les études ont été effectuées grâce à cette technique. Il faut désormais surveiller les éventuels problèmes de biocompatibilité liés à ce matériau. D'autres solutions plus facilement industrialisables pourront être envisagées dans des travaux futurs.

II.7. Conclusion

Ce chapitre a permis d'analyser des choix d'architectures et de techniques d'actionnement de fluides pour s'assurer de leur compatibilité avec les objectifs de la thèse. Le choix de l'architecture X-Y a été déterminant puisqu'elle facilite l'élaboration d'une courbe de calibration en autorisant les analyses en parallèle d'un échantillon et des solutions de référence. L'architecture est également modulable et peut être adaptée facilement à différents protocoles.

La méthode d'actionnement des liquides choisie, fonctionnant avec une membrane hyperélastique semble intéressante pour calibrer, mélanger et aliquoter facilement les fluides. Ces trois opérations sont nécessaires et doivent être maîtrisées pour l'intégration d'un protocole en microfluidique.

Ces choix sont également compatibles avec un deuxième objectif pour la thèse qui est le pilotage de la carte microfluidique par une plateforme portable et autonome. En effet, l'architecture X-Y réduit nettement le nombre d'actionneurs pneumatiques et la technique des chambres variables utilisant une membrane hyperélastique autorise l'utilisation de faibles pressions. Ainsi, ces choix offrent la possibilité de développer un instrument avec des sources de pressions intégrées. L'architecture X-Y combinée au mode d'actionnement et appliqué au cas de la gamme de dilution a fait l'objet du brevet 17054 LP[102].

Le banc expérimental dédié à la validation des cartes microfluidiques a été défini. Les éléments de ce banc constituent un point de départ pour l'instrument qui sera développé. Il sera alors nécessaire d'intégrer trois pompes ainsi que deux boîtiers de 8 électrovannes pour le pilotage des cartes. Le nombre d'électrovannes limite sera donc de 16 électrovannes. Les architectures de cartes devront être dessinées en prenant en compte cette contrainte.

Les fonctions de base ont été définies à l'aide d'une matrice de chambres simplifiée. Ces fonctions pourront être adaptées à des architectures plus complexes et les conventions définies au cours de ce chapitre seront réutilisées tout au long du manuscrit.

Les choix techniques seront tout d'abord validés sur la fonction seule de la gamme de dilution dans le chapitre III. Cet exercice permettra de valider la précision de la calibration des volumes par les chambres variables ainsi que l'efficacité des mélanges en parallèle dans une architecture X-Y. Ensuite, dans le chapitre III également, un exemple de protocole simple, le test enzymatique sera abordé afin de valider un premier protocole biologique intégrant une gamme de dilution, un aliquotage et deux

Chapitre II: Conception d'un nouveau système microfluidique dédié à un protocole multi-étapes et quantitatif.

mélanges. Pour finir, ces choix techniques seront appliqués à deux exemples de tests ELISA dans le chapitre IV : les tests ELISA en phase homogène et les tests ELISA en phase hétérogène.

Chapitre III:

Intégration d'une gamme de dilution dans un protocole avec calibration

Sommaire

III.1. Gamme de dilution : principes à la base de son intégration.....	102
III.2. Gamme de dilution : mise au point du mode de fonctionnement et observations préliminaires	105
III.2.1. Architecture de la carte.....	106
III.2.2. Programmation	107
III.2.3. Observations préliminaires qualitatives.....	109
III.2.4. Observations préliminaires quantitatives	112
III.2.5. Bilan des expériences préliminaires	113
III.3. La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.....	114
III.3.1. Optimisation des chambres	114
III.3.2. Règles de conception	116
III.3.3. Dimensionnement des vannes.....	117
III.3.4. Compensation des volumes morts des canaux fluidiques.....	120
III.3.5. Bilan des règles de conception définies.....	123
III.4. Etudes préliminaires sur la dynamique de mélange	123
III.4.1. Visualisation du mélange.....	124
III.4.2. Transferts fluidiques.....	125
III.5. Protocole de test enzymatique : validation d'une gamme de dilution.....	132
III.5.1. Le test enzymatique	132
III.5.2. Dimensionnement de la gamme de dilution pour le test enzymatique	134
III.5.3. Programmation	135
III.5.4. Validation de la gamme de dilution	135
III.6. Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet.....	138
III.6.1. Adaptation du protocole du test de glycémie.....	138

III.6.2. Démarche utilisée pour valider le test enzymatique dans une carte microfluidique	140
III.6.3. Première validation intermédiaire	140
III.6.4. Deuxième validation intermédiaire.....	142
III.6.5. Validation complète	149
III.7. Conclusions et perspectives	157

Un système d'analyse, s'appuyant sur une approche discrète, réalisé à partir de chambres à volumes variables contrôlées et organisées selon une architecture en X-Y, a été défini dans le chapitre précédent. L'objectif principal de ce chapitre est l'intégration de la gamme de dilution dans une carte. Cette intégration devient envisageable grâce aux choix définis précédemment.

Dans tout protocole biologique nécessitant une calibration, la première étape à réaliser est la préparation de la gamme de dilution afin d'obtenir différentes concentrations des solutions de référence à tester (Figure III-1, (1)). Après cette étape, ces solutions sont mélangées avec un ou plusieurs réactifs pour accomplir le test (Figure III-1, (2) et (3)).

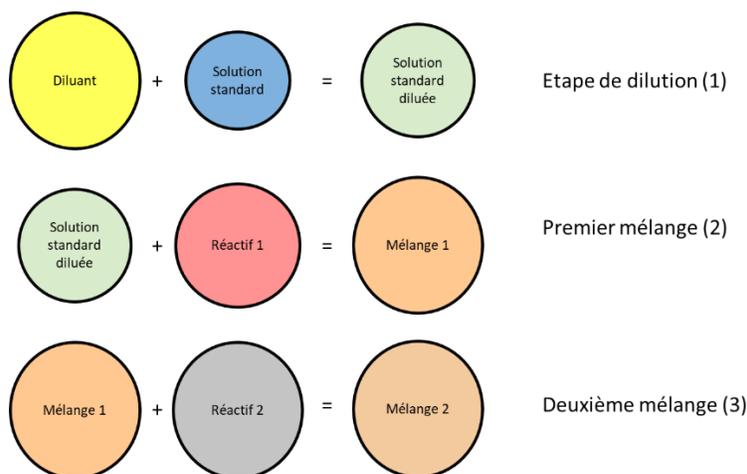


Figure III-1: Etapes d'un protocole biologique incluant une calibration.

Les trois premières sections de ce chapitre vont être consacrées aux différentes étapes qu'il faut franchir pour assurer l'intégration d'une gamme de dilution. Les principes à la base de cette intégration vont tout d'abord être exposés puis le mode de fonctionnement va être mis au point en effectuant des observations préliminaires pour aboutir à l'optimisation de la conception des chambres et de l'architecture dans la carte microfluidique. Les deux sections finales du chapitre seront consacrées à l'utilisation de cette gamme pour un premier protocole nécessitant une calibration, à savoir un protocole de test enzymatique ; ce protocole est plus simple qu'un test ELISA qui sera l'objet du chapitre suivant mais reste toutefois significatif. La gamme de dilution associée à ce protocole sera d'abord validée indépendamment dans une carte dédiée.

III.1. Gamme de dilution : principes à la base de son intégration

Deux techniques de dilution ont été étudiées dans le chapitre I (section I.3.4) : les dilutions en cascade et les dilutions linéaires. Pour atteindre en peu d'étapes et de manière simultanée un grand nombre de dilutions, la technique de dilution linéaire a été choisie. En effet, contrairement à la dilution en cascade, chaque mélange est indépendant et peut être réalisé en parallèle. Le principe de la dilution linéaire est de mélanger un volume de diluant V1 avec un volume de solution de référence (appelée également solution standard) V2 (Figure III-2). Le facteur de dilution F est alors :



Figure III-2: Exemple de dilution et calcul du facteur de dilution.

Pour atteindre une gamme complète de dilution, cette opération doit être répétée pour chaque facteur de dilution visé et elle demande donc d'être conduite dans des chambres de tailles différentes.

L'architecture proposée comporte une première colonne pour le diluant avec des volumes de chambres de plus en plus faibles et une deuxième colonne pour la solution de référence avec des volumes de plus en plus élevés (Figure III-3).

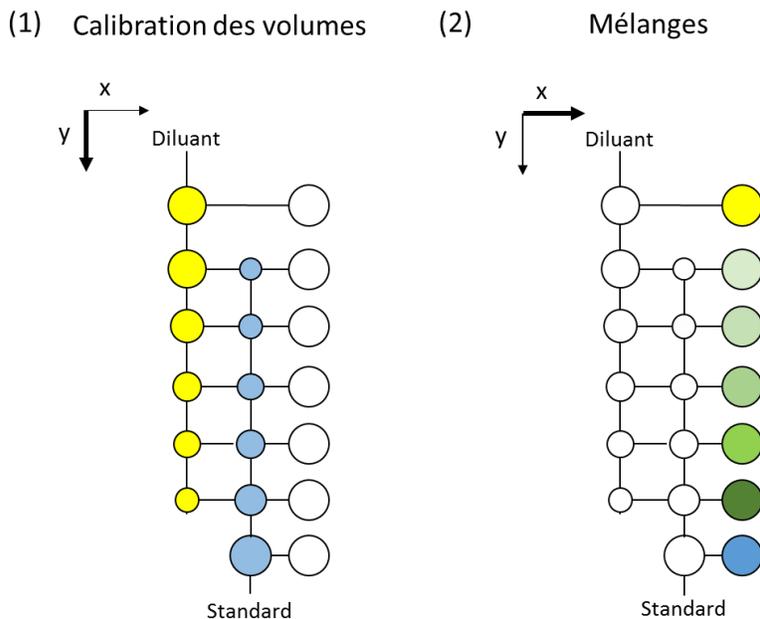


Figure III-3: Architecture en X-Y pour réaliser une gamme de dilution.

Le volume des chambres de la troisième colonne est égal à la somme des volumes des chambres des deux autres colonnes. Ainsi, le mélange de ces deux colonnes dans une troisième colonne permet d'obtenir différents facteurs de dilution et donc différentes concentrations de solution de référence. Par ailleurs, les deux premières colonnes sont décalées, afin que la première ligne soit dédiée uniquement au diluant et la dernière ligne à la solution standard. La première étape consiste à calibrer les volumes de diluant et de standard en les injectant simultanément dans la direction Y (1). Ensuite, les mélanges s'effectuent dans la direction X de manière simultanée (2).

Cette méthode présente plusieurs avantages. Comme il a été expliqué précédemment, contrairement à une dilution en cascade, chaque dilution est indépendante, donc les mélanges peuvent être effectués simultanément pour tous les coefficients de dilution ce qui est cohérent avec l'architecture X-Y choisie qui parallélise les opérations.

Enfin, les solutions ainsi créées par cette architecture peuvent être facilement utilisées pour réaliser un protocole complet en ajoutant des colonnes de réactifs ainsi qu'une ligne par échantillon à tester et en adaptant le nombre de lignes au nombre de points de la gamme de dilution. Dans l'architecture X-Y pour un test complet, les trois premières colonnes vont donc concerner la gamme de dilution puis les autres colonnes vont dépendre du protocole (Figure III-4).

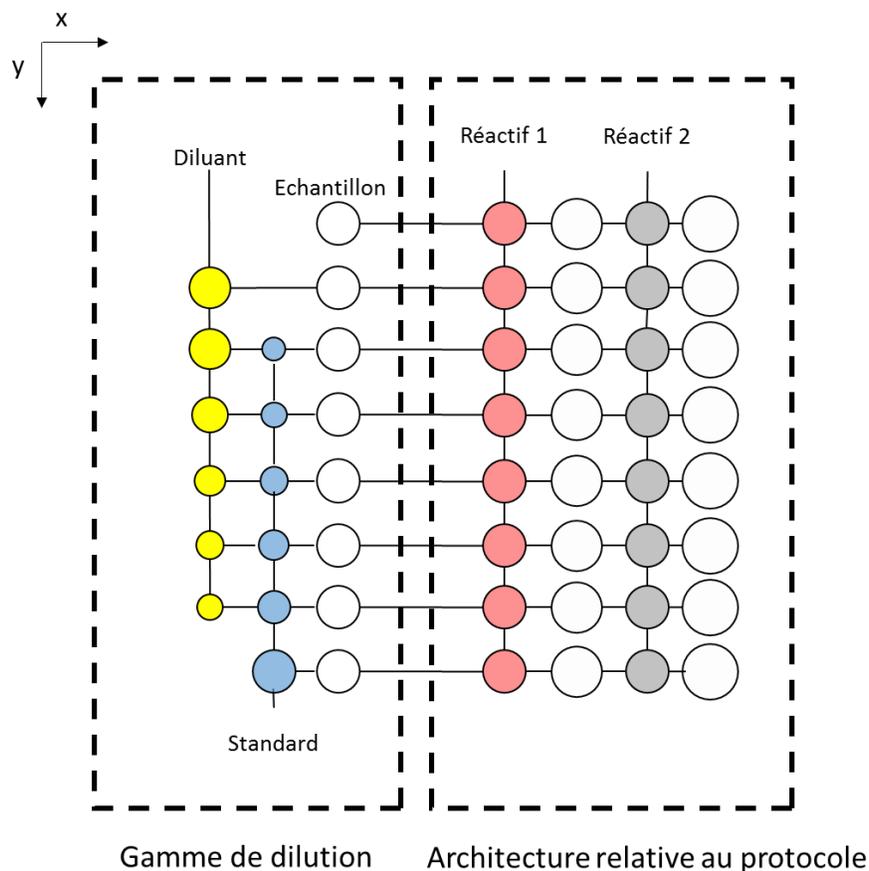


Figure III-4: Architecture X-Y générique à tous les protocoles.

Cette architecture facilite l'intégration de la gamme de dilution en amont d'un protocole et donc de la calibration du test biologique. Par exemple, la réalisation d'un protocole avec deux réactifs va nécessiter seulement quatre grandes étapes :

- **Calibration des volumes** : lors de cette étape, tous les réactifs sont injectés dans la direction Y. Les volumes de réactif de chaque ligne sont créés à partir d'un réservoir initial.
- **Gamme de dilution** : les volumes de diluant et de standard sont mélangés dans la direction X.
- **Mélange avec le premier réactif** : les solutions de référence ainsi que l'échantillon sont mélangés avec un premier réactif.
- **Mélange avec le second réactif** : de même, un deuxième mélange peut être effectué.

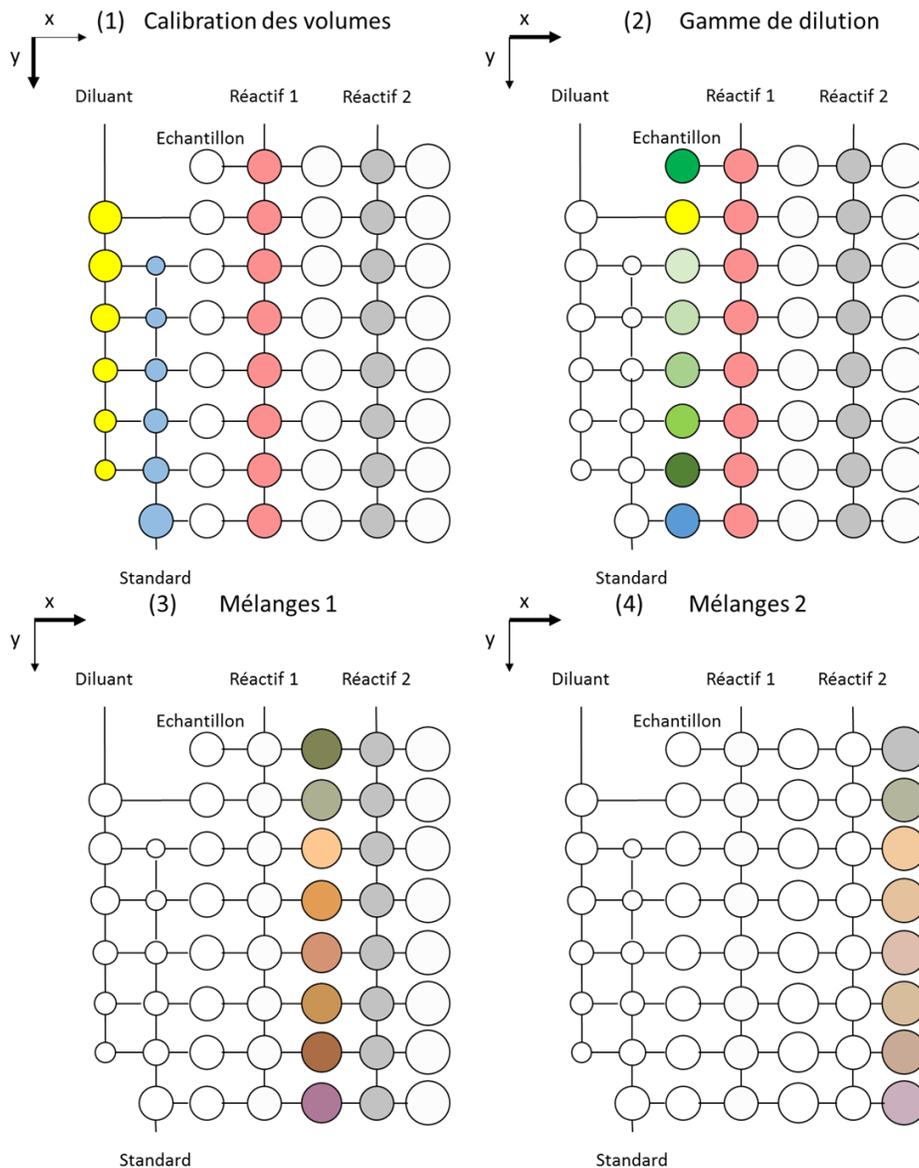


Figure III-5: Architecture X-Y combinant la gamme de dilution et la poursuite d'un protocole avec deux réactifs.

III.2 : Gamme de dilution : mise au point du mode de fonctionnement et observations préliminaires

La gamme de dilution va être validée et optimisée indépendamment du protocole biologique en utilisant des colorants. Plusieurs fonctions élémentaires sont mises en jeu dans cette étape. Les volumes doivent être calibrés avec précision et mélangés efficacement. Une étude sera alors menée pour optimiser la géométrie et les principes microfluidiques.

Pour cela, une évaluation préliminaire du fonctionnement d'une architecture sera effectuée à partir d'une visualisation des divers écoulements à l'aide de colorants ou de solutions fluorescentes ; une évaluation à caractère quantitatif suivra à partir de mesures de fluorescence. Les défauts éventuels pourront ainsi être identifiés de façon à pouvoir apporter les remèdes les plus pertinents. Enfin, une optimisation globale de la configuration géométrique de la carte sera enfin conduite via une proposition de règles bien définies. Pour commencer, une gamme de dilution permettant de réaliser six solutions avec des facteurs de dilution compris entre 1 et 1/5 sera validée en utilisant ces règles.

Avant d'aborder le test ELISA qui est le protocole visé plus spécifiquement dans le cadre de la thèse, un premier protocole biologique sera étudié et intégré dans une carte microfluidique. Le kit choisi est un kit pour un test enzymatique pour mesurer la concentration de glucose (GAGO-20, Sigma Aldrich).

Le glucose est un sucre utilisé par l'organisme comme énergie et transporté dans le sang. Chez les personnes atteintes du diabète, la quantité de glucose n'est plus régulée par l'organisme. Il est alors important d'avoir accès à la concentration de glucose pour adapter le traitement et pour maintenir son taux à une valeur acceptable pour l'organisme. Le glucose est une molécule simple à détecter car elle est présente en forte quantité dans le sang. De plus, le protocole biologique associé à son dosage est simple à mettre en œuvre, c'est pourquoi de nombreux appareils existent déjà pour accéder à cette valeur [103].

III.2. Gamme de dilution : mise au point du mode de fonctionnement et observations préliminaires

Plusieurs expériences avec des cartes différentes vont être menées pour valider le fonctionnement de l'architecture et du principe d'actionnement pour réaliser une gamme de dilution. Ces expériences vont permettre d'orienter les choix de conception et de lister les éventuels problèmes à résoudre et les éléments à optimiser afin de respecter deux critères principaux.

Tout d'abord, le critère essentiel à respecter est la précision de la calibration des volumes. Pour cela, chaque chambre doit avoir un volume reproductible et bien déterminé. Il faut donc s'assurer que chaque chambre soit remplie et vidée complètement sans problème de bulles ou de volumes morts.

Le deuxième critère à respecter est le mélange entre les solutions. Le mélange doit être homogène, rapide et si possible sans ajout de forces extérieures. Des études préliminaires seront effectuées pour évaluer la dynamique du mélange.

De nombreuses réalisations et expérimentations ont été menées. Pour des raisons de simplification, une seule architecture X-Y contenant des chambres variables sera expliquée et détaillée dans cette partie. Cette architecture permet de réaliser quatre solutions diluées entre 1 fois et 64 fois.

III.2.1. Architecture de la carte

(i) Dimensionnement

La carte intégrant une gamme de dilution contient deux colonnes pour calibrer les volumes de diluant et de référence. Chaque volume de diluant et de référence à mélanger doit être transféré vers une nouvelle chambre située sur une troisième colonne appelée colonne de mélange (Figure III-6). Une dernière colonne de puits permet de récupérer les différentes solutions pour les quantifier.

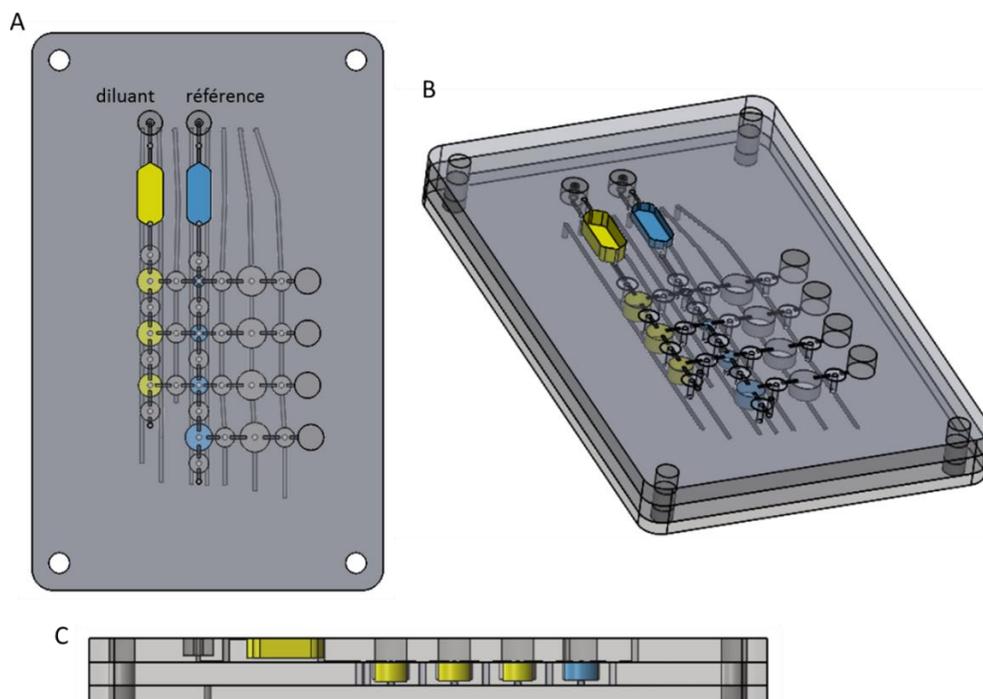


Figure III-6: Carte permettant de réaliser quatre solutions pour une gamme de dilution. (A) Vue de face, (B) vue en perspective, (C) vue en coupe.

Sur cette première carte, une gamme de dilution avec des coefficients compris entre 1 et 1/64 est visée. Le Tableau III-1 représente les dimensions utilisées pour chaque chambre. Les chambres dans cette version sont cylindriques et leurs volumes sont compris entre 0,5 et 32 μL . Les vannes utilisées dans cette version mesurent 1,5 mm de rayon et 0,1 mm de hauteur ce qui représente un volume de 0,7 μL . La géométrie des vannes a été présentée dans le chapitre II.

	Colonne 1			Colonne 2			Facteur de dilution
	Rayon (mm)	Hauteur (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Hauteur (mm)	Volume (μL)	
1	2	2,5	31,5	0,9	0,2	0,5	1/64
2	2	2,4	30	1,3	0,4	2	1/16
3	1,8	2,4	24,4	1,4	1,3	8	1/4
4	0	0	0	2,1	2,3	32	1

Tableau III-1: Dimensions des chambres pour réaliser une gamme de dilution avec quatre solutions.

(ii) Adressage des canaux pneumatiques

L'actionnement des vannes et des chambres est mis en œuvre via un réseau de canaux pneumatiques à travers lesquels une pression peut être appliquée. Les connexions pneumatiques sont représentées dans la Figure III-7 A en pointillés et en orange sur la Figure III-7 B. Pour rappel, chaque canal pneumatique vertical relie entre elles les vannes ou les chambres d'une même colonne qui seront alors pilotées simultanément. La sortie de ces canaux vers les électrovannes est standardisée.

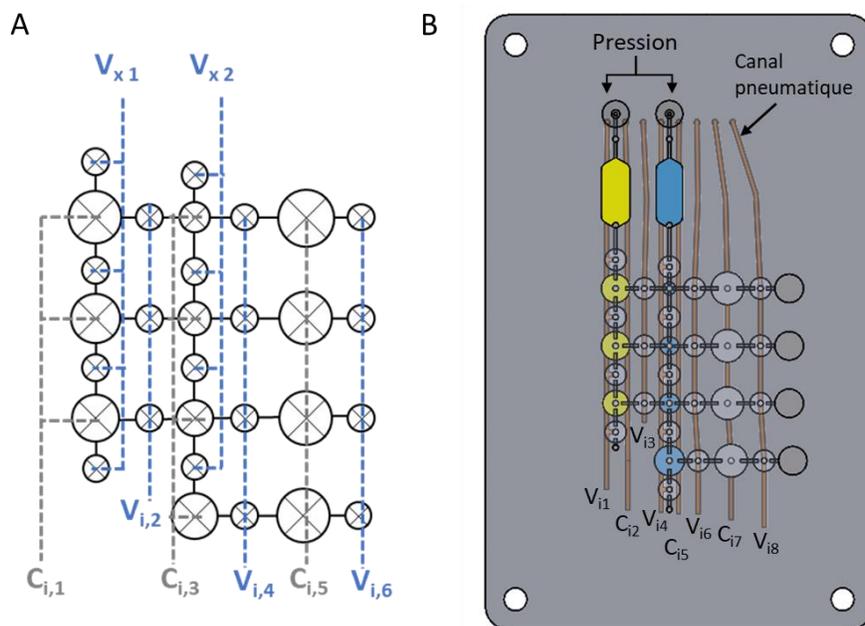


Figure III-7 : A : Vue schématique du dessus de la carte représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres. B : Vue 3D de la carte microfluidique et de ses connexions pneumatiques.

III.2.2. Programmation

La réalisation de la gamme de dilution dans cette carte microfluidique nécessite 3 grandes phases : la phase de calibration des volumes, la phase de mélange et la phase de transfert. Lors de la première phase, les colonnes 1 et 2 sont remplies dans la direction Y afin de calibrer les volumes de diluant et

de standard (Figure III-8, (1)), ces chambres sont ensuite isolées pour éviter les contaminations (Figure III-8, (2)), ensuite la phase de mélange est effectuée dans la direction X (Figure III-8, (3)).

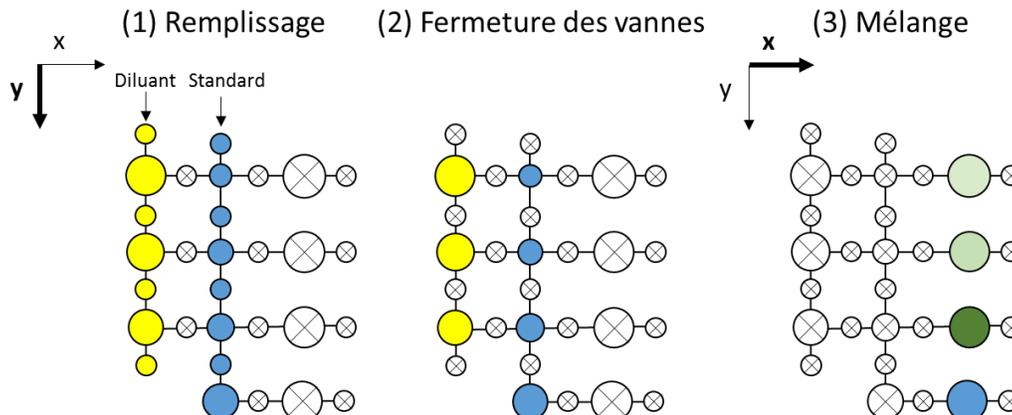


Figure III-8: Etapes 1 (1) et 2 (2) de la phase de calibration des volumes, étape 7 (3) de la phase de mélange.

Chaque phase comporte une succession d'étapes élémentaires qui consistent à basculer l'état de certaines vannes ou de chambres. Les changements d'état sont représentés dans le Tableau III-2. Pour rappel, l'état 0 désigne l'état où une pression est appliquée pour fermer la colonne (le liquide ne peut pas traverser) et l'état 1 où la colonne est à la pression atmosphérique (le liquide peut alors traverser la vanne ou remplir la chambre).

La phase de calibration des volumes comprend trois étapes :

- **Etape 0** : toutes les colonnes sont fermées
- **Etape 1** : ouverture des vannes V_{x1} et V_{x2} et des chambres $C_{i,1}$ et $C_{i,3}$
- **Etape 2** : fermeture des vannes V_{x1} et V_{x2}

La phase de mélange comprend cinq étapes :

- **Etape 3** : ouverture des vannes $V_{i,2}$ et $V_{i,4}$ et des chambres $C_{i,5}$
- **Etape 4** : fermeture des chambres $C_{i,1}$
- **Etape 5** : fermeture des vannes $V_{i,2}$
- **Etape 6** : fermeture des chambres $C_{i,3}$
- **Etape 7** : fermeture des vannes $V_{i,4}$

La phase de transfert comprend trois étapes :

- **Etape 8** : ouverture des vannes $V_{i,6}$
- **Etape 9** : fermeture des chambres $C_{i,5}$
- **Etape 10** : fermeture des vannes $V_{i,6}$

Phase	Etape	V_{x1}	V_{x2}	$C_{i,1}$	$V_{i,2}$	$C_{i,3}$	$V_{i,4}$	$C_{i,5}$	$V_{i,6}$
Calibration des volumes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	1	0	0	0
	2	0	0	1	0	1	0	0	0
Mélange	3	0	0	1	1	1	1	1	0
	4	0	0	0	1	1	1	1	0
	5	0	0	0	0	1	1	1	0
	6	0	0	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	0	0	0	1	0
Transfert	8	0	0	0	0	0	0	1	1
	9	0	0	0	0	0	0	0	1
	10	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau III-2 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour la gamme de dilution.

Suite à la construction de ces enchainements d'étapes, les états des électrovannes peuvent être programmés avec le microcontrôleur. Les états des électrovannes correspondent aux états 0 et 1 des colonnes de chambres et de vannes. Le programme entier du microcontrôleur associé aux électrovannes sera donc une liste d'instruction de 0 et de 1 correspondant au Tableau III-2.

Pour rappel, 0 et 1 désignent respectivement une chambre/vanne fermée ou ouverte et les vannes verticales ouvertes lors de l'injection des réactifs sont séparées dans le tableau par un trait plus épais. Les chambres et vannes du reste du tableau sont à la même position que dans l'architecture de la carte. Ce tableau permet donc de représenter rapidement l'état des chambres et également le mouvement des liquides dans l'architecture.

Différents programmes ont été testés. Par exemple, les colonnes $C_{i,1}$ et $C_{i,3}$ peuvent être remplies simultanément ou l'une après l'autre. Remplir ces colonnes lors d'une même étape est avantageux car cela est plus rapide. De plus, les vannes V_{x1} et V_{x2} s'ouvrent et se ferment en même temps et sont donc parfaitement synchronisées. Elles s'ouvrent au début du protocole puis sont fermées jusque-là fin. Il est donc possible de connecter ces deux colonnes au même actionneur afin de les piloter simultanément et de simplifier le nombre d'électrovannes.

Pour la suite, il a donc été choisi de connecter au même canal pneumatique les vannes V_{x1} et V_{x2} et de remplir les deux premières colonnes simultanément.

III.2.3. Observations préliminaires qualitatives

Des premières observations préliminaires vont nous permettre de mettre en évidence les améliorations à effectuer sur l'architecture pour intégrer une gamme de dilution. Des colorants sont tout d'abord utilisés pour une étude qualitative.

Pour la phase de calibration des volumes, une pression de 150 mBar est appliquée au niveau des réservoirs. Pour cette expérience préliminaire, la pression d'actionnement des chambres est égale à celle des vannes et vaut 250 mBar.

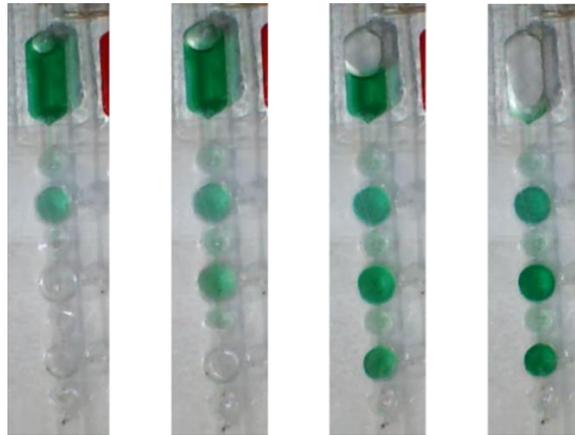


Figure III-9: Zoom sur le remplissage de la première colonne.

Visuellement, les chambres ne piègent pas de bulles lors du remplissage (Figure III-9). Cette première expérience confirme donc que les chambres à volume variable se remplissent complètement pour calibrer un volume.

Différentes étapes sont représentées dans la Figure III-10 : le remplissage de la colonne de diluant et de solution standard représenté respectivement par des colorants vert et rouge (Figure III-10 (1)), la fermeture des vannes V_x , pour isoler chaque chambre (Figure III-10 (2)), le mélange des différentes chambres (Figure III-10, (3)) et enfin le transfert des solutions vers des puits de sortie (Figure III-10, (4)).

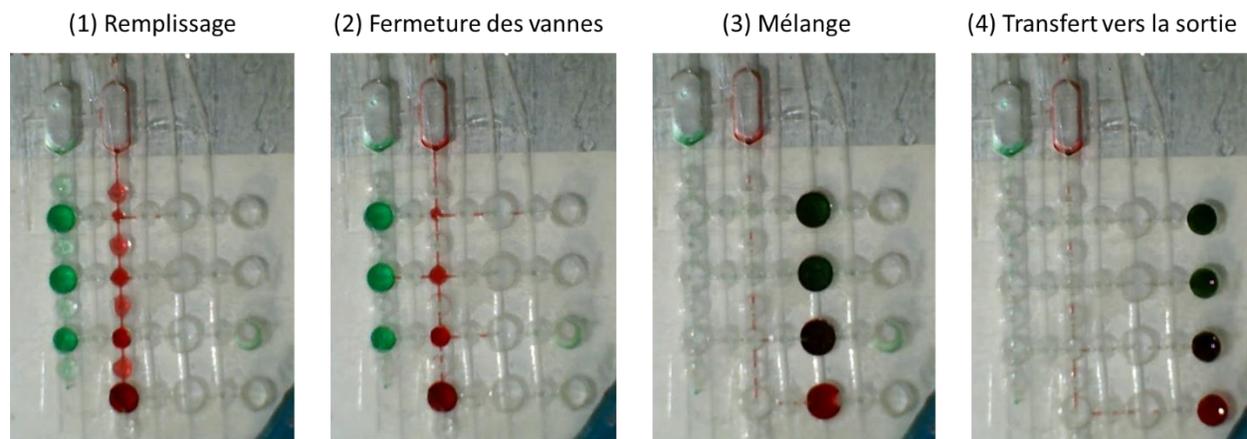


Figure III-10: Réalisation du protocole de dilution avec des colorants.

Lors de la phase de mélange, il peut être vérifié visuellement que les chambres se vident les unes après les autres sans piéger de liquide (Figure III-10 (3)). L'actionnement des chambres variables semble donc efficace pour vider complètement une chambre. De plus, la phase de mélange s'effectue en plusieurs étapes avec des transferts rapides qui semblent favoriser le mélange.

Si ces premières informations sont très encourageantes pour le fonctionnement de notre architecture avec la technique de chambres variables, il est important d'étudier de plus près la précision des volumes d'intérêt. En particulier, le ratio entre les volumes morts et les volumes des chambres doit être optimisé. Plus précisément, deux types de volumes morts sont à considérer : les volumes morts liés aux canaux et les volumes morts liés aux vannes.

(i) Volume mort lié aux vannes

A la fin de l'étape de remplissage des deux colonnes, les vannes situées sur le canal vertical (V_x) entre les chambres doivent être fermées afin de séparer les chambres de volume calibré (Figure III-11, (1)). Le liquide que contient ces vannes est alors réinjecté de manière non contrôlée dans l'ensemble du réseau. La comparaison entre les deux photos de la Figure III-11 montre que du liquide a tendance à revenir dans les réservoirs d'entrée après la fermeture des vannes. Par ailleurs, en raison du caractère élastique des membranes, la surpression induite par l'actionnement des vannes tend à réinjecter du liquide dans certaines chambres. Cela est clairement visible sur les chambres de la première colonne (Figure III-11, (2)). En résumé, le volume de liquide induit par l'actionnement de vannes devra être impérativement minimisé.

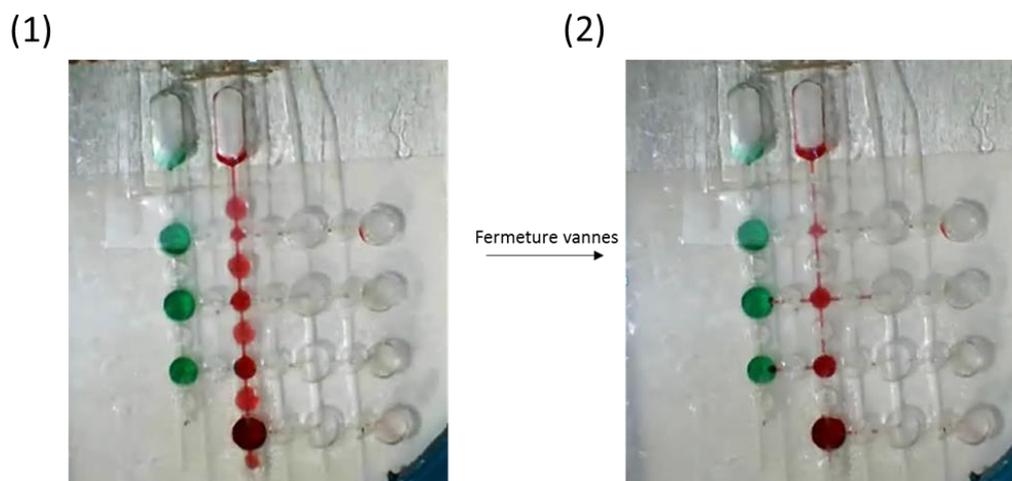


Figure III-11: Mise en évidence de l'impact des volumes morts liés aux vannes.

(ii) Volume mort lié aux canaux

Un autre problème a été mis en évidence également par une simple visualisation. Il s'agit du volume mort associé aux canaux. Initialement, les canaux sont remplis d'air. Lors de la première étape, l'air des canaux est poussé par le liquide jusqu'à la dernière chambre.

La Figure III-12 montre la visualisation d'une étape de remplissage à l'aide d'un liquide fluorescent. Sur cette image, la dernière chambre de la colonne de fluorescence n'est pas remplie complètement, ce qui va engendrer une erreur sur le facteur de dilution. Ce problème est particulièrement visible sur cette autre architecture où une petite chambre est présente à la fin d'une colonne. Le volume n'est alors pas calibré correctement ce qui risque d'engendrer des erreurs sur les coefficients de

dilution et sur la concentration de la solution finale. Une optimisation de l'architecture d'une colonne s'avère donc nécessaire afin de s'affranchir du problème de remplissage de la dernière chambre.

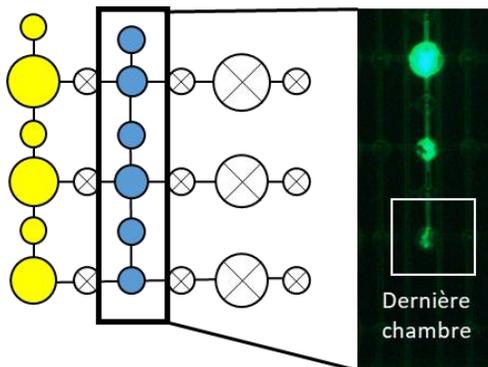


Figure III-12: Visualisation de l'étape de remplissage en fluorescence.

III.2.4. Observations préliminaires quantitatives

Une expérience est ensuite réalisée avec de la fluorescéine pour évaluer précisément les facteurs de dilution obtenus avec cette architecture. Les différentes solutions obtenues par la carte sont prélevées dans les puits de sortie et injectées dans une plaque 384 puits pour mesurer la fluorescence au spectromètre (TECAN infinite M1000, CH).

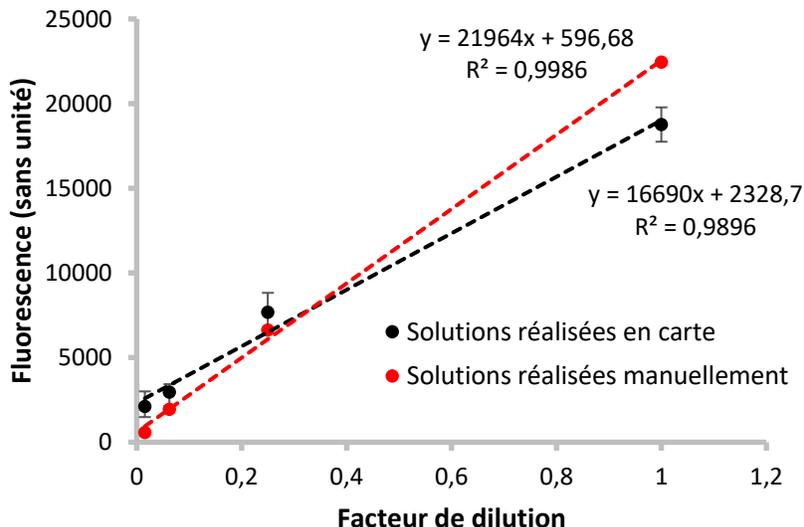


Figure III-13: Mesure de fluorescence en fonction du facteur de dilution.

La Figure III-13 représente les résultats moyens obtenus sur 10 expériences. Pour cette mesure, la longueur d'onde d'excitation est de 490 nm et la longueur d'onde d'émission est de 514 nm.

Dans cette figure, la droite rouge correspond à une dilution effectuée manuellement et la droite noire correspond à une dilution effectuée dans la carte microfluidique. L'analyse quantitative confirme les résultats mentionnés ci-dessus de l'analyse visuelle effectuée avec les colorants. Les mesures de fluorescence des solutions diluées avec la carte microfluidique ne correspondent pas précisément aux

III.2 : Gamme de dilution : mise au point du mode de fonctionnement et observations préliminaires

résultats attendus. Les valeurs sont plus élevées pour les trois premiers points et la dernière valeur est plus basse que la référence. Cette différence provient sans doute du volume mort associé au fonctionnement des vannes qui s'ajoute aux volumes d'intérêt. De plus, les chambres étant cylindriques, il est difficile de prévoir la pression qu'il faut appliquer pour remplir complètement ces chambres à l'aide de la membrane étirable. Il est donc probable que les chambres ne soient pas complètement remplies ce qui peut engendrer des erreurs sur les dilutions.

Facteur de dilution	Solutions en carte	Référence	Erreur relative (%)
1/64	2102	570	269
1/16	2951	1936	52
1/4	7667	6615	16
1	18761	22437	16

Tableau III-3: Erreurs relatives entre les solutions de fluorescéine réalisées en carte et manuellement.

L'erreur relative a été calculée (Tableau III-3). Concernant les trois premiers points, les solutions sont plus fluorescentes que prévues ce qui peut s'expliquer par un transfert de la fluorescéine contenue dans les vannes vers les solutions. Pour le dernier point, la valeur de fluorescence mesurée est plus faible que la solution de référence. Cette erreur peut provenir d'un transfert de diluant entre les colonnes 1 et 2 lors de la fermeture des vannes. Cependant, il faut être vigilant avec la fluorescence qui n'est pas stable à la lumière ; c'est pourquoi les prochaines études sont réalisées à l'aide d'un colorant.

III.2.5. Bilan des expériences préliminaires

Ces premières expériences ont permis de valider l'aspect fonctionnel de l'architecture X-Y couplée à des chambres variables. Les chambres se remplissent sans bulles à l'exception de la dernière chambre de la colonne qu'il reste à optimiser. La fonction des vannes est également vérifiée car les liquides sont correctement orientés dans la direction Y puis dans la direction X.

La technologie des chambres variables est donc encourageante mais l'erreur obtenue sur les facteurs de dilution est apparue excessive. Afin d'améliorer la précision de ces facteurs, des pistes existent. En effet, le développement et l'étude de cette première carte ont permis de repérer deux défauts majeurs dont la correction devrait permettre d'améliorer la précision. Les points à optimiser sont liés à la maîtrise des volumes morts. Leurs origines ont pu être identifiées et sont de deux types.

Le premier défaut est lié au volume mort des vannes. Les vannes présentent un volume actuellement de 0,7 μL plus important que le volume des plus petites chambres actuellement de 0,5 μL . A la fin de l'étape de remplissage, les vannes sont refermées et leur volume est réparti aléatoirement dans les différentes chambres ce qui modifie leur concentration. Pour limiter cet impact, le ratio entre le volume des vannes et de la plus petite chambre doit être augmenté. Une étude va donc être menée pour optimiser la dimension des vannes.

Ensuite, le deuxième défaut est lié aux volumes morts des canaux. Initialement, les chambres sont fermées par la membrane mais les canaux sont remplis d'air. Lors de la phase de remplissage, l'air

contenu dans ces canaux est poussé par le liquide et n'est pas évacué. La dernière chambre n'est donc pas complètement remplie. Pour éviter que ces volumes morts aient un impact sur la dernière chambre de chaque colonne, une chambre supplémentaire, qui ne sera pas utilisée pour le test doit être rajoutée. L'air provenant des canaux sera ainsi totalement évacué.

Un dernier paramètre à adapter est lié aux pressions utilisées pour le pilotage de la carte. Actuellement, deux sources de pression sont utilisées, une source pour pressuriser les réservoirs de liquides et une source pour actionner les chambres et les vannes. Lors de la fermeture des chambres pour transférer les liquides dans la direction X, il y a un risque de transfert de liquide dans la direction Y puisque les vannes sont actionnées à la même pression. Il serait donc plus prudent de dissocier ces deux pressions et d'ajouter une source de pression pour actionner les vannes à une pression plus importante que les chambres.

III.3. La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.

Sur la base des résultats obtenus, il est maintenant possible d'envisager une optimisation des chambres pour améliorer les résultats sur la gamme de dilution. Différentes géométries peuvent en effet être utilisées pour améliorer par exemple leur remplissage et pour simplifier leur conception. Ensuite, le choix de la géométrie des chambres va imposer une pression d'actionnement pour le fluide. Différentes dimensions de vannes devront alors être testées pour cette pression. Puis, différents paramètres pourront être optimisés tels que l'espace entre les chambres. Différentes solutions seront également présentées pour compenser les volumes morts liés aux canaux. Enfin, l'organisation de l'architecture sera également adaptée pour réaliser une gamme de dilution plus complète.

III.3.1. Optimisation des chambres

Les premières expériences ont été réalisées avec des chambres cylindriques. Outre la simplicité d'usinage, l'avantage de cette géométrie est de réduire la surface occupée par les chambres sur la carte. Cependant, des incertitudes sont présentes par rapport au remplissage complet des chambres en fonction des dimensions choisies (profondeur et rayon de la chambre) et en fonction de la pression appliquée (Figure III-15).

En effet, plus le ratio entre profondeur et le rayon de la chambre est important, plus il faut déformer la membrane élastique pour remplir la chambre. Ce ratio maximal n'étant pas simple à évaluer, d'autres géométries, plus simples à dimensionner peuvent être adoptées.

Dans la thèse de Florian Pineda, des expériences de soufflage ont montré que la membrane élastique lors de ses déformations sans contact adopte une succession de portion de sphères de rayon décroissant, tout en étant fixée à des bords rigides formant un cercle de rayon R (Figure III-14). Cette déformation a été expliquée avec un modèle de tension de surface. D'après ces expériences de soufflage, une membrane de 10 mm de rayon prend la forme d'une demi sphère à partir d'une pression

III.3 : La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.

de 30 mBar. Il s'agit d'une pression très faible qui traduit bien le caractère très élastique de la membrane.

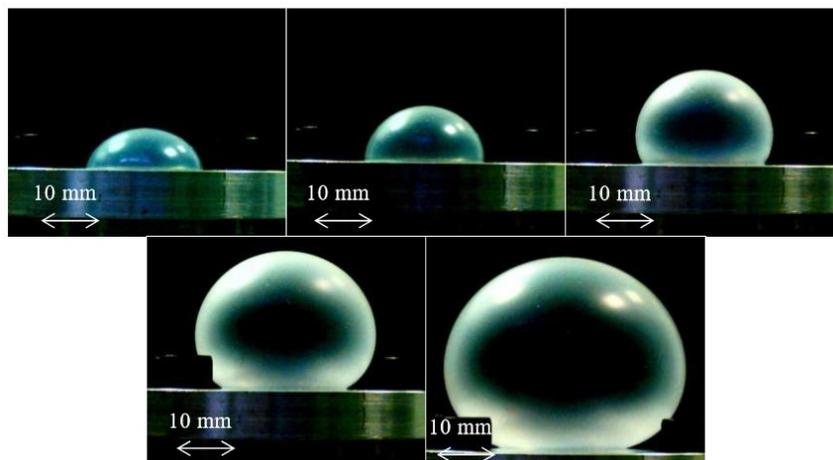


Figure III-14: Expériences de soufflage réalisées dans la thèse de Florian Pineda [104].

Les évolutions hypothétiques de la déformation de la membrane dans une chambre de type calotte sphérique et dans une chambre cylindrique sont représentées en Figure III-15. Dans les deux cas, la membrane se déforme progressivement sous une forme sphérique jusqu'à atteindre le fond de la chambre. Dans le cas d'une chambre cylindrique, la difficulté est de s'assurer que la membrane, malgré son élasticité, se plaque correctement tout autour de la chambre. Le plaquage est en effet difficile dans les coins du cylindre.

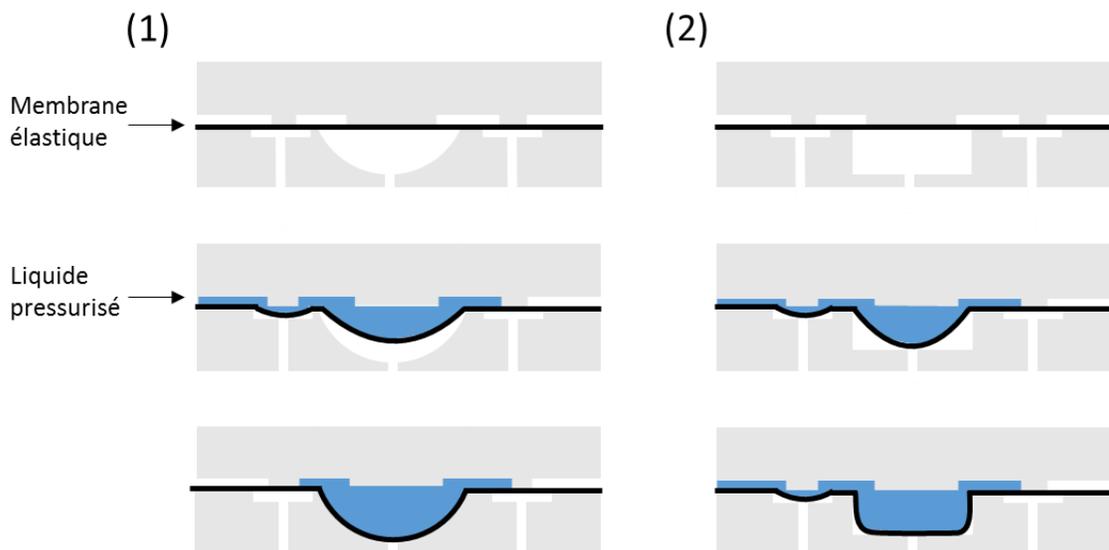


Figure III-15: Schéma de la déformation de la membrane dans une chambre de type calotte sphérique (1) et une chambre cylindrique (2).

En résumé, le cylindre est donc plus facile à usiner et présente un gain de place par rapport à la demi-sphère mais le volume de la chambre va dépendre de la pression appliquée qui devra être plus importante que dans le cas d'une chambre de type calotte sphérique.

C'est pourquoi la géométrie cylindrique ne sera pas retenue pour les architectures suivantes. De plus, pour maximiser l'encombrement et pour simplifier le dimensionnement, une géométrie hémisphérique sera désormais adoptée. En effet, il ne comporte qu'un seul paramètre (le rayon) pour un volume donné. Pour calculer les dimensions d'une chambre, il suffit d'utiliser l'équation suivante :

$$V = \frac{1}{2} \times \left(\frac{4}{3} \pi r^3 \right) \quad (\text{III.1})$$

Pour une carte microfluidique de 3 mm d'épaisseur, le volume maximal sera alors de 51 μL (pour un rayon de 2,9 mm). Pour augmenter le volume des chambres, des géométries de type calotte sphérique pourront être utilisées.

Les études menées par F. Pineda, sur les tests de soufflage ont montré que quelques dizaines de millibars sont nécessaires pour atteindre une forme en demi-sphère. Ainsi pour s'assurer d'un remplissage complet d'une colonne de chambres hémisphériques, une pression arbitraire de 150 mBar minimum a été choisie. Des expériences par visualisation qualitative ont confirmé que cette pression était bien suffisante pour assurer un bon remplissage de l'ensemble des chambres de chaque colonne. Cette pression nous permet d'effectuer un remplissage en seulement quelques secondes. La dynamique de remplissage des chambres sera étudiée dans la section III.4.

III.3.2. Règles de conception

Afin de faciliter la conception des cartes microfluidiques, des règles pour optimiser la configuration géométrique de la carte doivent être étudiées. Elles concernent plus précisément la distance D_{cv} entre les chambres et les vannes et la distance entre le centre d'une chambre et le canal fluide D_{cc} (Figure III-16).

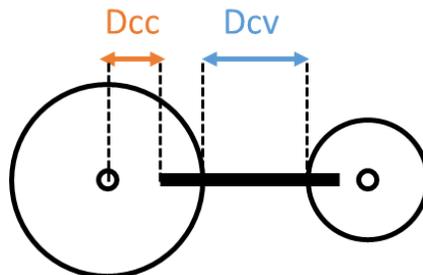


Figure III-16: Schéma des dimensions à choisir entre une vanne et une chambre.

(i) Distance entre les chambres et les vannes (D_{cv})

L'assemblage de la membrane étirable avec la carte en polymère s'effectue avec un adhésif double face prédécoupé au niveau des vannes et des chambres. Cette technique de prototypage présentée dans le chapitre II présente certaines limitations. Notamment, pour que l'adhésion et donc

III.3 : La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.

l'étanchéité soit efficace, une distance minimum entre les chambres et les vannes doit être respectée. Au cours du développement des premiers essais, un espace de 0,5 mm a été utilisé mais s'est révélé insuffisant avec l'apparition de nombreuses fuites. Ceci peut s'expliquer par la difficulté à découper de faibles dimensions précisément et à aligner l'adhésif correctement par une méthode qui reste manuelle.

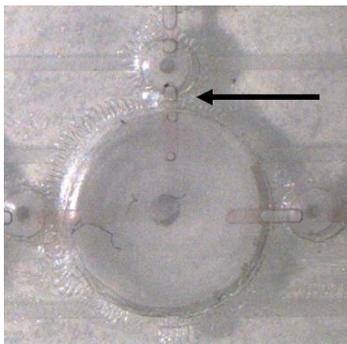


Figure III-17: Espace de 0,5 mm entre une chambre et une vanne.

Sous l'effet de la pression pneumatique, l'adhésif peut se décoller ce qui provoque des fuites pneumatiques entre la chambre et la vanne. L'observation du fonctionnement de plusieurs cartes a montré que la distance D_{cv} ne devait pas être plus petite que 0,8 mm pour des pressions de l'ordre de 500 mBar.

(ii) Distance entre le canal fluide et le centre d'une chambre (D_{cc})

La distance entre le canal et le centre d'une chambre D_{cc} est calculée en appliquant un coefficient choisi arbitrairement. Cette valeur a été sélectionnée par rapport à des expériences précédentes qui ont montré un bon fonctionnement des vannes et des chambres. Ce paramètre n'a pas été optimisé pour des raisons de temps. Il serait toutefois intéressant d'étudier l'influence de ce paramètre dans des futures études.

Pour une chambre ou une vanne de rayon r , l'écart D_{cc} sera simplement donné par l'équation suivante :

$$D_{cc} = 0,53 \times r \quad (\text{III.2})$$

III.3.3. Dimensionnement des vannes

L'objectif est de réduire le volume des vannes qui est un volume mort pour l'architecture sans générer de restrictions significatives qui pourraient limiter l'écoulement. Pour rappel, les vannes sont cylindriques pour faciliter l'usinage. Leur géométrie est caractérisée par les dimensions suivantes : (Figure III-18, B)

- Le rayon r

- L'espace D_{cc} entre l'arrivée du canal fluide et le centre de la vanne
- La hauteur H
- Le diamètre D du via

Le volume mort des vannes est donné par la relation :

$$V = H \times \pi \times r^2 \quad (\text{III.3})$$

Pour réduire le volume des vannes, une étude paramétrique va être effectuée. D'après l'équation III.3, H et r sont les paramètres importants. Les paramètres n'intervenant pas dans l'équation vont donc être fixés :

- Le diamètre du via sera fixée à 0,4 mm
- La largeur des canaux fluide sera fixée à 0,4 mm

De plus, la profondeur des vannes sera fixée à 0,1 mm, ce minimum est défini par la méthode de fabrication. L'espace entre l'arrivée du canal fluide et le centre de la vanne sera donnée par l'équation III.2. La carte ainsi développée pour tester des vannes de tailles différentes est représentée sur la Figure III-18, A. Cette carte comprend sept vannes de dimensions différentes et deux colonnes pour tester deux fois chaque vanne (Tableau III-4).

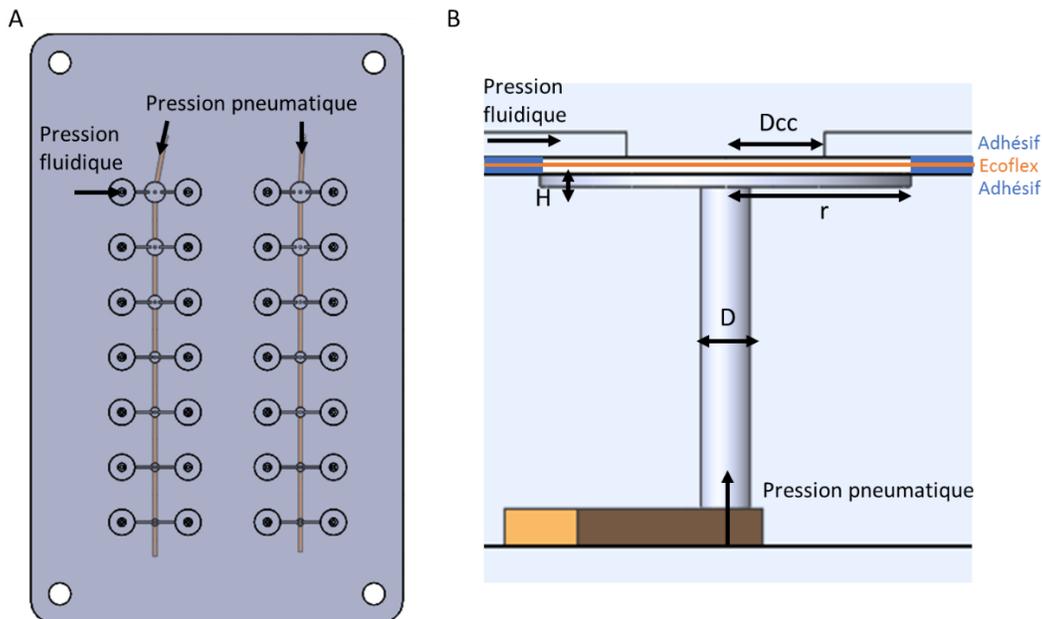


Figure III-18: (A) Architecture de la carte pour tester des vannes de tailles différentes. (B) Paramètres de la vanne.

Le rayon varie entre 0,5 mm et 1,5 mm (taille du rayon précédemment utilisée). Le tableau suivant (Tableau III-4) présente les différentes vannes testées.

III.3 : La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.

Vanne	r (mm)	Dcc (mm)	Volume de la vanne (μL)	Volume lié à l'adhésif (μL)
1	1,5	0,8	0,71	1,20
2	1,2	0,6	0,45	0,77
3	1	0,5	0,31	0,53
4	0,8	0,4	0,2	0,34
5	0,7	0,4	0,15	0,26
6	0,6	0,3	0,11	0,19
7	0,5	0,3	0,08	0,13

Tableau III-4: Dimensions des vannes testées.

La vanne 1, qui est la vanne précédemment utilisée, a un volume de 0,71 μL . L'adhésif ajoute un volume de 1,2 μL . L'objectif est de réduire le volume de cette vanne pour qu'il devienne négligeable par rapport aux chambres (minimum de 1 μL).

L'étanchéité de la vanne va dépendre de la pression du liquide (P_L) et de la pression pneumatique appliquée (P_V). En utilisant le banc expérimental, la présence d'une fuite sur une vanne est analysée en observant l'avancée d'un ménisque dans un tube connecté en sortie de la vanne. Concrètement, l'expérience consiste à fixer une pression d'actionnement P_V et à augmenter progressivement la pression du liquide P_L jusqu'à l'observation du déplacement du ménisque. Ceci permet de déterminer la pression de fuite appelée P_F . L'expérience est répétée pour des pressions pneumatiques P_V différentes (150, 200, 250, 300 et 350 mBar).

La pression P_L a été fixée précédemment à 150 mBar pour remplir les chambres. L'objectif de cette étude est donc de vérifier que les vannes sont bien étanches à cette pression. Il faut donc que P_F soit supérieure à 150 mBar.

Dans cette étude, toutes les vannes sont fonctionnelles à l'exception de la vanne 7 qui n'a pas pu être testée en raison d'un mauvais alignement avec l'adhésif. La technologie d'alignement actuelle impose donc une limite sur la réduction du volume mort des vannes. Le rayon r doit être a priori plus grand que 0,5 mm.

Comme prévu, plus la pression pneumatique imposée est importante, plus les vannes résistent à une pression fluide importante. Les résultats reportés sur la Figure III-19 montrent qu'à partir d'une pression P_V de 250 mBar, toutes les vannes résistent à une pression P_L de 150 mBar. Il faudra donc choisir une pression P_V supérieure à 250 mBar, typiquement une pression de 500 mBar permet de garantir une sécurité.

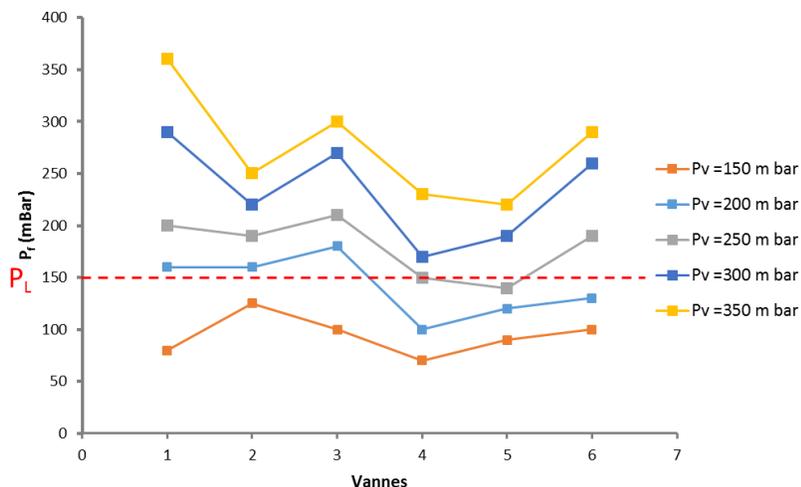


Figure III-19: Pression limite de fuite (P_L) relative à chaque vanne et pour différentes pressions pneumatiques (P_V) appliquées à la vanne.

La vanne 6 de rayon égal à 0,6 mm, semble convenir pour ce qui est de la limite de fuite et permet également de réduire au maximum le volume mort de la vanne. Par rapport à la vanne précédemment utilisée de rayon égal à 1,5 mm, le volume est alors divisé par 7 et vaut 0,1 μL ce qui est à présent négligeable par rapport au volume des chambres (volume minimum de 0,5 μL). En revanche, l'adhésif ajoute un volume de 0,2 μL ce qui reste conséquent. Cette vanne sera sélectionnée pour les architectures suivantes.

III.3.4. Compensation des volumes morts des canaux fluidiques

L'analyse qualitative d'architecture a permis de mettre en évidence le remplissage incomplet des chambres en fin de colonne lors de l'étape de calibration des volumes des réactifs (section III.2.3 et Figure III-20, A). Pour remplir complètement les dernières chambres, il faut compenser les volumes morts des canaux fluidiques en ajoutant une chambre supplémentaire en fin de chaque colonne (Figure III-20, B). Cette chambre va ainsi contenir les éventuelles bulles liées aux volumes morts sans perturber le protocole.

III.3 : La gamme de dilution : optimisation de la conception des chambres dans la carte microfluidique.

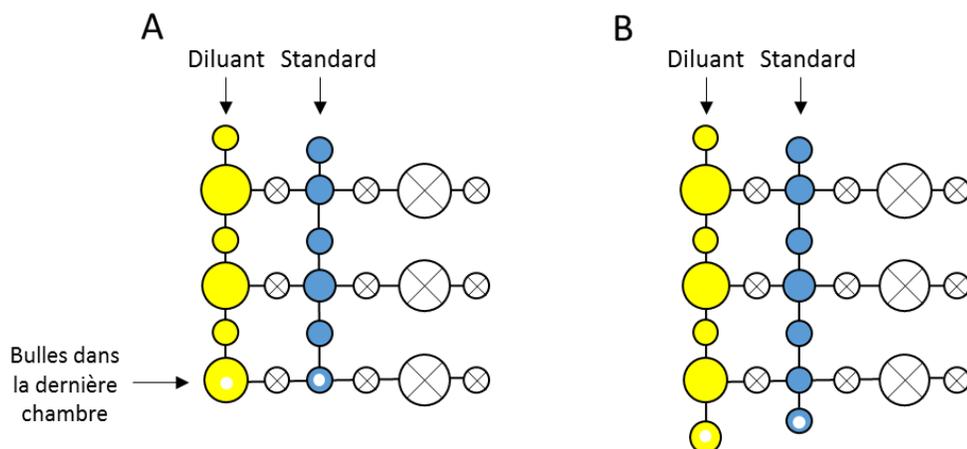


Figure III-20: A : Architecture sans ajout de chambre de compensation. B : Architecture avec une chambre de compensation.

Différentes versions pour ajouter cette chambre de compensation vont être détaillées. La première version est une chambre de forme cylindrique ajoutée à la suite d'une vanne (Figure III-21). Le problème de cette version est que la chambre ne peut pas être vidée car il n'y a pas de sortie. Or, plusieurs expériences doivent être réalisées sur une même carte. Il est donc nécessaire de pouvoir vider cette chambre avant de démarrer l'expérience suivante. De plus, de manière plus générale, il n'est pas idéal de garder un volume piégé dans la carte.

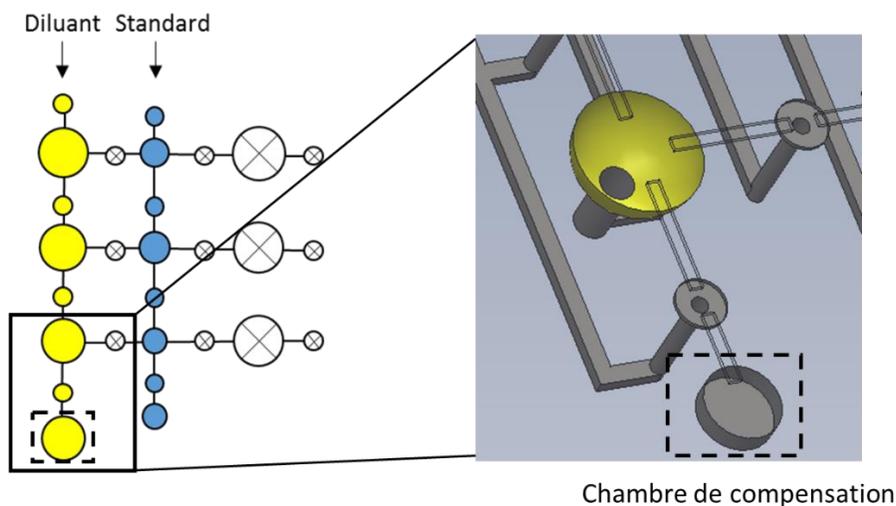


Figure III-21: Première version de la chambre de compensation.

Une deuxième version consiste à ajouter un via en sortie au niveau de la chambre de compensation. Ce via doit être bouché pendant la phase de remplissage pour éviter que le liquide s'échappe et pour pressuriser les chambres. Il peut être bouché à l'aide d'un adhésif. Puis, pour vider cette chambre, l'adhésif doit être retiré et de l'air injecté dans les canaux fluidiques. Cette technique est fonctionnelle mais demande de nombreuses manipulations.

Dans une dernière version, il s'agira donc de connecter pneumatiquement la chambre et d'ajouter un puits de sortie afin d'automatiser la vidange de la chambre (Figure III-22). Le liquide de la chambre de compensation est alors transféré vers le puits de sortie où il ne gêne pas le déroulement du protocole.

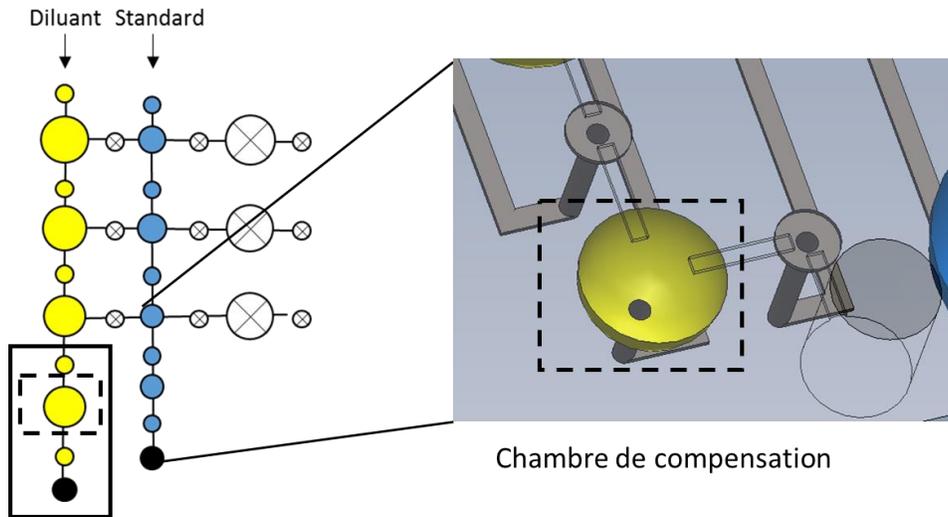


Figure III-22 : Troisième version de la chambre de compensation.

Pour ne pas ajouter d'électrovannes, cette chambre supplémentaire est connectée pneumatiquement aux chambres de la même colonne. La vanne de sortie est connectée à la colonne suivante pour vidanger la chambre supplémentaire lors de l'étape de mélange qui suit l'étape de remplissage (Figure III-23). Ainsi, la gestion de cette chambre supplémentaire n'ajoute ni actionneurs, ni étapes supplémentaires dans le protocole.

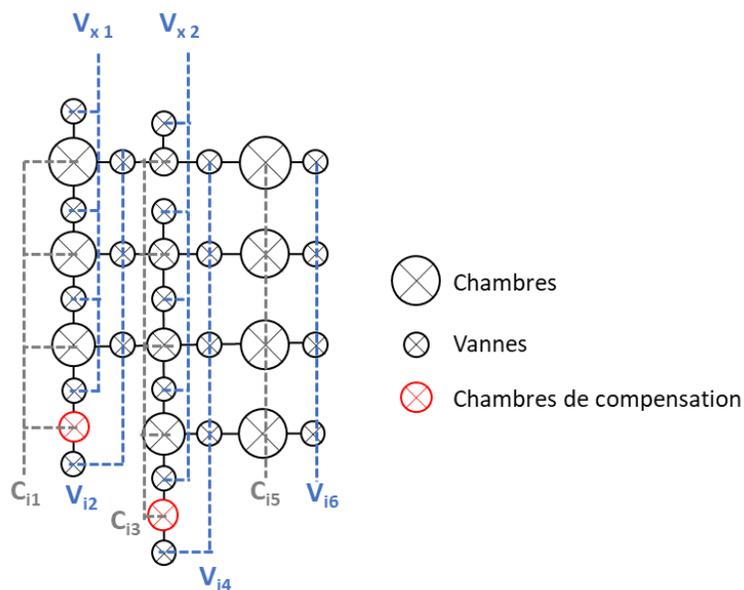


Figure III-23: Connexions pneumatiques des chambres de compensation.

III.3.5 Bilan des règles de conception définies

Les prochaines architectures développées dans le cadre de la thèse respecteront donc les règles de conception définies dans cette partie :

- Les chambres seront hémisphériques.
- Les vannes mesureront 0,6 mm de rayon et 0,1 mm de profondeur.
- La distance entre les chambres et les vannes D_{cv} sera de 0.8 mm.
- La distance D_{cc} entre le centre d'une chambre et l'arrivée du canal fluide sera donnée par la formule : $D_{cc} = 0.53 \times r$.
- Une chambre de compensation pilotable pneumatiquement sera ajoutée à la fin de chaque colonne de calibration de réactifs.

Ces règles de conception ont été définies pour des pressions sur les vannes (P_V) supérieures à 500 mBar et une pression d'entrée du liquide (P_L) de 150 mBar qui seront les pressions utilisées pour toutes les expériences qui vont suivre. La pression des chambres (P_C) devra être comprise entre P_L et P_V et sera entre 300 et 400 mBar.

III.4. Etudes préliminaires sur la dynamique de mélange

Comme expliqué précédemment, le mélange est une fonction complexe à réaliser dans un système microfluidique. En effet, pour assurer cette fonction, on ne peut bénéficier des avantages bien connus d'un régime turbulent qui découlent de la génération spontanée et aléatoire de tourbillons sur une vaste gamme d'échelles, cette génération ne pouvant être décrite que statistiquement. En effet, les régimes rencontrés restent laminaires. Ils sont stables et dépourvus de cette génération de cascades et de tourbillons.

L'atteinte d'un nombre de Reynolds critique propre à un type d'écoulement, permet de caractériser, la transition d'un régime laminaire vers un régime turbulent. Ce nombre apparait dans les équations de Navier-Stokes décrivant l'écoulement du fluide ; il évalue le rapport entre les forces d'inertie (déstabilisantes) et les forces visqueuses (stabilisantes). Dans le cas d'un canal, il se calcule avec la formule suivante :

$$Re = V_{moy} \times \frac{d}{\nu} \quad (\text{III.4})$$

Où d est une dimension caractéristique, ici le diamètre hydraulique du canal, qui est ici un micro canal, ν est la viscosité cinématique du fluide (ici une solution aqueuse) et V_{moy} , la vitesse moyenne dans une section du canal.

Or, en microfluidique, les nombres de Reynolds rencontrés sont faibles, voire très faibles, et éventuellement inférieurs à un, suite aux faibles dimensions des systèmes microfluidiques considérés et aux faibles vitesses qui y sont mises en jeux. La fonction de mélange en microfluidique est donc limitée par la vitesse de diffusion des molécules : on parle de transfert purement diffusif. Il n'est donc

pas étonnant que de nombreuses équipes de recherche se soient intéressées au problème du mélange en microfluidique [91].

Pour accélérer la fonction de mélange, et ajouter des transferts dit convectifs, il convient par exemple de concevoir des procédés produisant des structures tourbillonnaires « artificielles ». Notons au passage que dans le chapitre II (section II.3.2(iii)) [71], un composant microfluidique qui exploite des effets acoustiques pour homogénéiser des mélanges pour la réalisation d'une gamme de dilution a été reporté. Cette dernière solution est fondée sur des effets compressibles qui apporte un autre type de solution que la production de tourbillons.

Dans notre cas, le procédé qui a été choisi est, comme précisé plus loin, lié au principe de remplissage/vidange des chambres qui diffère des méthodes classiques par l'utilisation d'une membrane hyperélastique pouvant être actionnée et déformée à des faibles pressions. Dans cette section, sur la base d'un modèle très simplifié, la dynamique de mélange sera étudiée en visualisant un mélange entre deux chambres à l'aide d'une caméra rapide puis une étude portant sur les transferts fluidiques pourra être effectuée en mesurant la vitesse de remplissage d'une chambre. Enfin, des perspectives d'optimisation seront évoquées.

III.4.1. Visualisation du mélange

Pour forcer les transferts convectifs dans les liquides, la création de recirculations, qui constituent un type particulier de structures tourbillonnaires, est celle qui a été choisie dans notre système.

La carte réalisée pour les expériences préliminaires (section III.2) est utilisée pour visualiser le mélange entre une chambre de 2 μL de fluorescéine ($C_{i,j}$) et une chambre de 30 μL d'eau ($C_{i,j-1}$) dans une chambre de 32 μL ($C_{i,j+1}$) à l'aide d'une caméra rapide (150 images par seconde). Les images des différentes étapes sont représentées en Figure III-24.

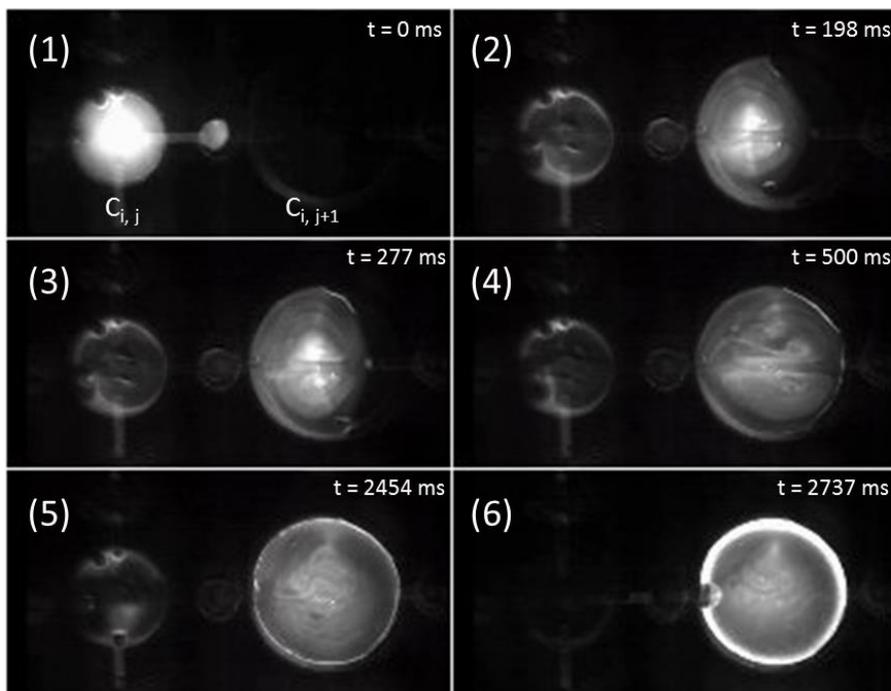


Figure III-24: Visualisation d'une étape de mélange entre une chambre de $2 \mu\text{L}$ de fluorescéine ($C_{i,j}$) et une chambre de $30 \mu\text{L}$ d'eau ($C_{i,j+1}$) en utilisant une caméra rapide (150 images par seconde).

En utilisant un actionnement pneumatique de 250 mBar, le transfert du fluide entre deux chambres s'avère être très rapide et est estimé à 150 ms. Des recirculations fluidiques peuvent être observées et la solution semble homogène après seulement un transfert de liquide. Le contour fluorescent présent sur l'image 6 est dû à un effet d'optique lié à la membrane et non à une inhomogénéité.

La configuration en calotte sphérique couplée à l'utilisation d'une membrane hyper élastique constitue une configuration d'écoulement originale pour la microfluidique. Lors du remplissage de cette calotte et même lors de sa vidange, des structures tourbillonnaires sont effectivement engendrées. A notre connaissance, cette configuration n'a pas encore été étudiée ni modélisée précisément.

Pour améliorer le mélange, il est également possible d'effectuer des allers-retours entre deux chambres. Cependant, le fait qu'un seul transfert semble déjà efficace pour une homogénéisation acceptable est un résultat intéressant.

III.4.2. Transferts fluidiques

(i) Introduction

L'étude a pour but de déterminer la dynamique de transfert du fluide en estimant notamment les vitesses moyennes observées et en calculant les différents nombres de Reynolds de l'écoulement. Plus généralement et en restant dans le contexte de cette thèse, il s'agira principalement d'identifier les

paramètres importants qui définissent la dynamique de remplissage. Pour cette étude, le cas simplifié du remplissage d'une seule chambre de 30 μL sous une pression de 150 mBar sera considéré.

(ii) Modèle d'études et hypothèses

Une carte simplifiée est utilisée pour cette étude. Elle est constituée d'une seule chambre de 30 μL qui se remplit par un micro canal comportant une vanne. Le canal est relié à un tube connecté à une source de pression. Les dimensions de la carte sont présentées dans le Tableau III-5, et un schéma de l'expérience est donné sur la Figure III-25.

Chambre		Canal		
Rayon (mm)	Volume (μL)	Profondeur (mm)	Largeur (mm)	Longueur (mm)
2,43	30	0,1	0,4	5,76

Tableau III-5: Dimensions de la chambre et du canal de la carte dédiée.

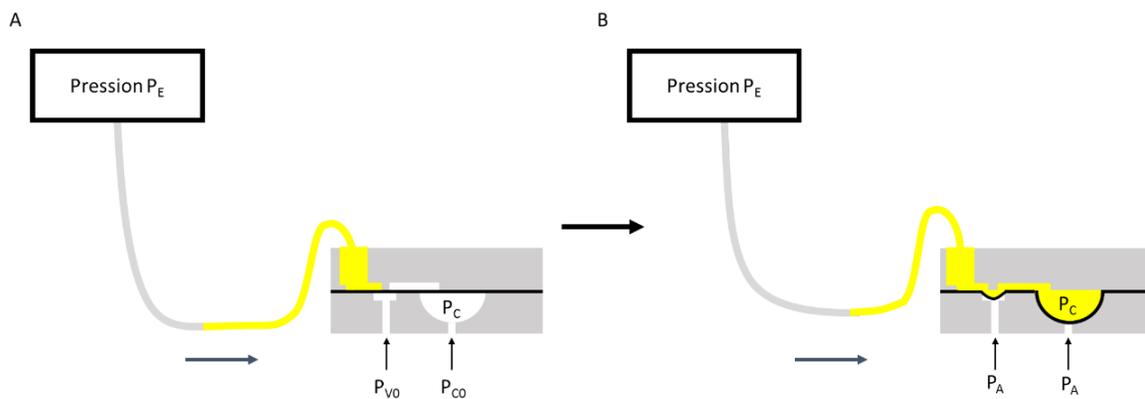


Figure III-25: Schéma de principe du banc expérimental dédié à la mesure de l'avancée d'un ménisque au cours du remplissage d'une chambre.

Le tube en amont et l'entrée de la carte sont initialement préremplis d'un liquide afin d'éviter les bulles. Puis, la chambre et la vanne sont pressurisées comme indiqué sur la Figure III-25 A. Une pression P_E est appliquée en entrée du tube et à $t=0$, les niveaux pneumatiques de la chambre et des vannes sont mis à la pression atmosphérique. Un écoulement s'établit afin de remplir la chambre (Figure III-25 B).

Il est classique de considérer que les temps associés aux écoulements de l'air gérés par la commande pneumatique sont négligeables devant les temps de transfert du liquide vers la chambre. Ainsi, l'ouverture des vannes et le temps de remise à P_A de la membrane sont instantanés. L'écoulement qui s'établit dans le micro canal est principalement gouverné par les pertes de charge du circuit hydraulique. Ici, la perte de charge appelée R_{hyd} permet de calculer le débit de fluide (Q) en fonction de la différence de pression en amont (P_E) et en aval du canal c'est à dire la chambre (P_C).

$$R_{hyd} = \frac{P_E - P_C}{Q} \quad (III.5)$$

Les pertes de charge dépendent de la géométrie des canaux et du type d'écoulement. Dans notre système, elles sont de deux types (Figure III-26) :

- Les pertes de charge régulières, qui sont dues aux frottements du fluide sur les parois du tuyau et des canaux.
- Les pertes de charge singulières au niveau des changements de sections tel que la connectique et la vanne.

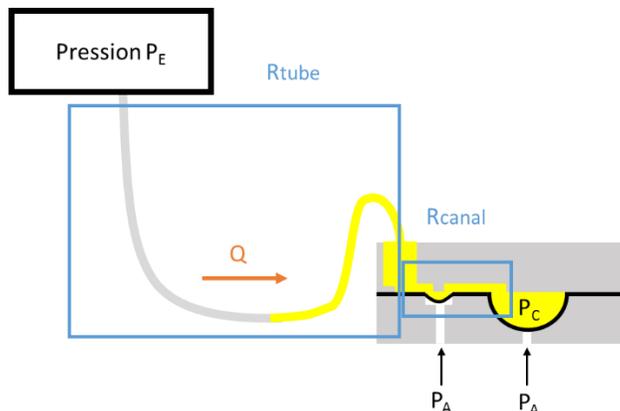


Figure III-26: Schéma des pertes de charge associées au système.

Il est clair comme dit plus haut que le nombre de Reynolds attendu est inférieur à 1000 ; cela a permis de négliger les pertes de charges singulières. La résistance hydraulique dans le tube (R_{tube}), propre à un régime laminaire, peut être calculée à l'aide de la formule suivante :

$$R_{tube} = \frac{8\eta L}{\pi a^4} \quad (III.6)$$

Avec,

- η , la viscosité de l'eau égale à 10^{-3} Pa.s,
- L , la longueur du tube égale à 42,58 mm,
- a , le rayon du tube égal à 0,5 mm.

Le calcul donne une valeur de $0,017 \cdot 10^{11}$ Pa.s.m³. Dans le canal rectangulaire de la carte, la résistance hydraulique R_{canal} , propre à un régime laminaire peut être calculée à l'aide de la formule suivante :

$$R_{canal} = \frac{12\eta L}{(1 - 0.63 \left(\frac{h}{w}\right)) h^3 w} \quad (III.7)$$

Avec,

- η , la viscosité de l'eau égale à 10^{-3} Pa.s,
- L , la longueur du canal égale à 5,76 mm,
- h , la hauteur du canal égale à 0,1 mm,

w, la largeur du canal égale à 0,4 mm.

Le calcul donne une valeur de $2,04 \cdot 10^{11}$ Pa.s.m³. Comme attendu, les pertes de charge liées aux tubulures sont négligeables par rapport à celles du canal qui présente la plus petite section. A t=0, la membrane n'est pas déformée et n'applique donc pas de pression sur le fluide. On peut donc considérer que P_C est nulle. Le débit au début de remplissage est donc simplement calculé par la relation suivante :

$$Q = \frac{P_E}{R_{canal}} \quad (\text{III.8})$$

A t=0 et pour P_E=150 mBar le débit théorique est de 4,4 mL/min. Au cours du remplissage, la membrane se déforme et exerce une pression sur le liquide présent dans la chambre et P_C augmente. Une diminution du débit au cours du remplissage est donc attendue, cette diminution sera fonction de la pression induite par la déformation de la membrane.

(iii) Vérification expérimentale

Des premières expériences ont été effectuées en mesurant l'intensité de fluorescence au cours du temps sur des images comme celles présentées en Figure III-24 pour en déduire l'évolution du volume de liquide dans les chambres. Ces résultats ne seront pas présentés car comme mentionné plus haut, il est apparu que la membrane produisait un effet de réflexion optique qui faussait les mesures. Une autre technique plus précise a donc été choisie.

Pour mesurer les vitesses et les débits de remplissage, un banc dédié permettant de mesurer l'avancée d'un ménisque dans la tubulure transparente connectée en amont du réservoir au cours du remplissage est utilisé.

Afin de connaître l'évolution de la pression P_C appliquée par la membrane sur le fluide, une première expérience consiste à augmenter progressivement la pression d'entrée P_E dans le tube jusque 150 mBar. Initialement, la vanne et la chambre d'entrée sont pressurisées avec une pression P_{V0} et P_{C0} (respectivement 500 et 400 mBar). Pour remplir la chambre, les pressions sont relâchées sous la membrane qui est alors à la pression atmosphérique. A chaque valeur de pression appliquée en entrée, l'avancée du ménisque est mesurée en prenant une image à l'aide d'une caméra placée au-dessus de la tubulure et en utilisant le logiciel ImageJ. Enfin, le volume de remplissage de la chambre est déduit en connaissant l'échelle associée à l'image (Figure III-27).

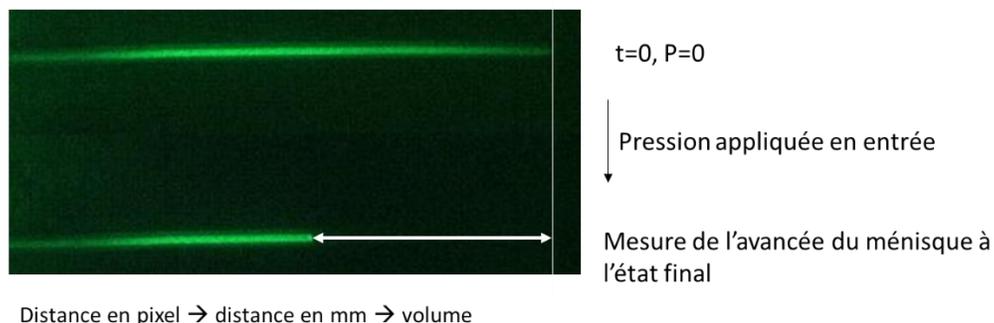


Figure III-27: Mesure de l'avancée du ménisque pour déduire le volume de remplissage de la chambre.

A partir d'une pression de 100 mBar, la chambre de 30 μL semble complètement remplie (Figure III-28).

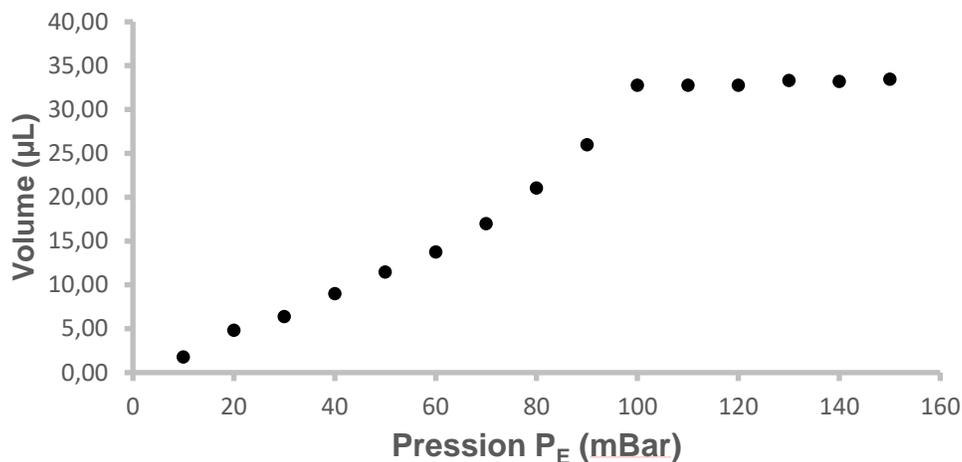


Figure III-28: Volume de remplissage de la chambre en fonction de la pression appliquée en entrée.

Une deuxième série d'expériences est effectuée pour quantifier la vitesse de remplissage d'une chambre. Initialement, la chambre et la vanne sont pressurisées comme indiqué sur la Figure III-25. Ensuite, une pression de 150 mBar est appliquée en entrée du tube. Puis, la chambre et la vanne sont ouvertes en relâchant la pression sous la membrane. L'avancée du ménisque est alors filmée au cours du temps (Figure III-29) à une vitesse de 15 images par seconde afin de déterminer l'évolution du volume de remplissage de la chambre de 30 μL en fonction du temps (Figure III-30).

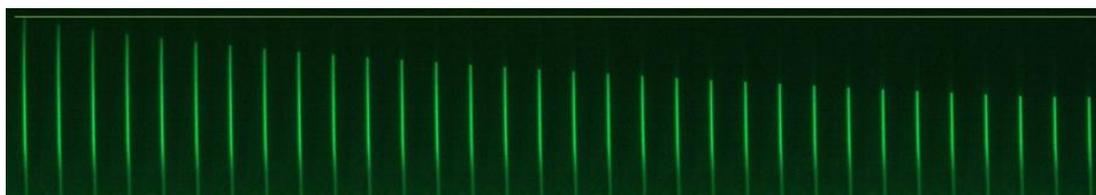


Figure III-29: Images de l'avancée du ménisque au cours du remplissage d'une chambre (15 images par secondes).

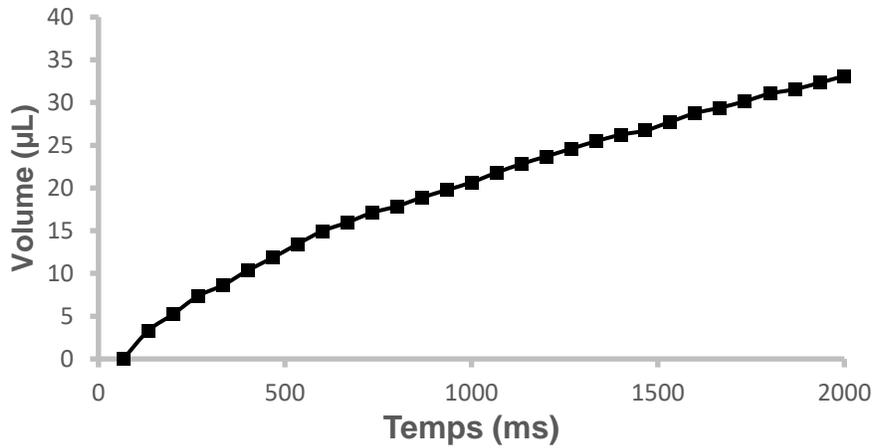


Figure III-30: Volume de remplissage en fonction du temps pour une pression de 150 µL.

Ces résultats montrent que la chambre de 30 µL est remplie en 2 s pour une pression de 150 mBar. Le débit au cours du temps est obtenu par la dérivation temporelle de cette courbe (Figure III-31). Les ondulations de la courbe de débit peuvent être attribuées à des imprécisions liées à la méthode de mesure du déplacement du ménisque. Le débit est maximum au début de l'expérience et atteint une valeur de 2,5 mL/min. Ce débit mesuré est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec notre modèle simplifié (2,5 mL/min au lieu de 4,4 mL/min), l'écart peut être expliqué par des imprécisions sur la mesure expérimentale et sur la géométrie des cartes ainsi que les nombreuses hypothèses simplificatrices.

Comme attendu, une décroissance du débit est observée. D'après la Figure III-28, la chambre est remplie pour une pression de 100 mBar. En fin de remplissage, la différence de pression associée à la perte de charge R_{canal} est de $\Delta P = P_E - P_C = 150 - 100 = 50$ mBar. Ainsi, une chute de débit correspondant à un facteur trois entre le début et la fin de remplissage est attendue ce qui est aussi assez cohérent avec les mesures expérimentales. Le débit vaut en effet expérimentalement environ 0,8 mL/min à la fin de l'expérience.

Dans la carte, la section du canal vaut 0,04 mm². La vitesse moyenne d'écoulement vaut alors initialement environ 1 m/s et décroît jusqu'à 0,3 m/s. De même, l'évolution du nombre de Reynolds en fonction du temps peut être déterminée en utilisant l'équation III.4 et le diamètre hydraulique D_H donnée par l'équation :

$$D_H = \frac{2hl}{l + 2h} \quad (\text{III.9})$$

Avec h la hauteur du canal, soit 0,1 mm et l la largeur du canal, soit 0,4 mm.

Cette équation donne une valeur de 0,13 mm pour le diamètre hydraulique du canal. Dans le canal, le nombre de Reynolds varie entre 30 et 144. Ce nombre est assez élevé pour une carte microfluidique. Les effets inertiels ne peuvent pas être négligés par rapport aux forces visqueuses ce qui explique la persistance des recirculations dans les chambres, favorables au mélange.

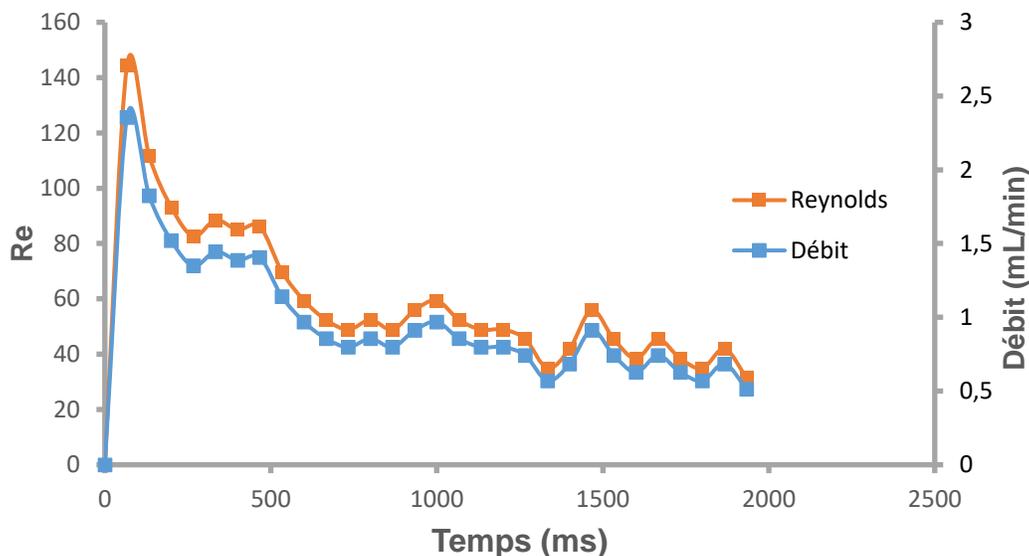


Figure III-31: Débit (courbe bleue) et nombre de Reynolds (courbe orange) en fonction du temps pour une pression de 150 mBar.

Pour augmenter davantage le débit et le nombre de Reynolds, une première solution est d'appliquer une pression plus forte en entrée. Par exemple, pour une pression de 400 mBar, le débit sera initialement de 0,1 mL/s soit 6,3 mL/min en utilisant la formule (III.8) et les pertes de charge calculées expérimentalement. A la fin du remplissage, le débit sera alors de 0,07 mL/s soit 4,7 mL/min. Ce calcul simple montre que plus la pression d'entrée sera forte, moins le débit sera influencé par la présence de la membrane : il dépendra essentiellement de la géométrie du système. Le débit sera alors quasi constant tout au long du remplissage assurant ainsi un brassage continu dans la chambre. Une deuxième solution pour augmenter le débit serait de diminuer les pertes de charge, c'est-à-dire d'augmenter la section des canaux de la carte microfluidique. Cependant, cette solution aurait pour effet d'augmenter les volumes morts et pénaliserait la précision des dilutions.

Cette étude donne les premières tendances en mettant en avant l'influence de la géométrie des canaux microfluidiques, des jeux de pressions, et de l'élasticité de la membrane. Ce travail gagnerait à être approfondi en développant des expériences fines. Par exemple, des cartes dédiées comportant des canaux seuls ou des vannes seules afin d'évaluer séparément les pertes de charge de chacun des éléments ont été réalisées. Cependant, il a été difficile d'analyser les résultats en raison de problèmes techniques concernant l'assemblage et la fabrication qui doivent être mieux stabilisés pour pouvoir comparer les données expérimentales et théoriques.

Enfin, dans le futur, des modèles d'écoulement plus élaborés pourraient être utilisés afin de mieux comprendre la dynamique de mélange. L'écoulement dans la chambre est complexe, car la géométrie des chambres évolue au cours du remplissage, et la forme en calotte sphérique laisse supposer que la topologie d'écoulement est tridimensionnelle. C'est à dire que la recirculation s'établit à la fois suivant un plan parallèle à la face supérieure de la chambre et également suivant un plan perpendiculaire à ce dernier plan et passant par l'axe du canal. Des codes de calculs multiphysiques

du type fluide-structure couplant un modèle de mécanique des fluides à nombre de Reynolds élevé à un modèle de déformation mécanique hyper élastique pourraient être utilisés. Une autre approche serait de développer des modèles analytiques sous certaines hypothèses simplificatrices, préservant le caractère sphérique de la déformation par exemple. Notons aussi que la dynamique de la partie pneumatique devra être étudiée.

Au final, dans le cadre des protocoles qui vont suivre, la fonction mélange sera effectuée par un seul transfert des chambres de calibration vers les chambres de mélange.

III.5. Protocole de test enzymatique : validation d'une gamme de dilution

Les travaux d'optimisation de la conception de la carte microfluidique visant la réalisation d'un test ELISA ont été exposés dans la section III.3. En tenant compte de ces résultats, une première gamme de dilution va être validée. Comme expliqué en début de chapitre, nous allons d'abord viser une gamme pour un facteur de dilution maximal de 5. Cette gamme nous permettra aussi de tester l'intégration d'un premier exemple de test à savoir un test enzymatique.

III.5.1. Le test enzymatique

Ce protocole sera utilisé comme outil de développement. Le test enzymatique est un exemple d'application biologique plus simple que le test ELISA ; sa réalisation permet d'aborder progressivement toutes les difficultés auxquelles nous serons confrontés dans le test ELISA. Les fonctions microfluidiques pourront ainsi être validées en évitant les problématiques de biologie et de chimie liées au protocole ELISA.

Les étapes du protocole du test enzymatique pour le glucose sont représentées schématiquement en Figure III-32. Ces étapes doivent être effectuées pour chaque solution de référence de glucose. Avant de commencer le test, la première étape est la préparation d'une gamme de dilution pour étalonner le système (Figure III-32 (1)).

III.5 : Protocole de test enzymatique : validation d'une gamme de dilution

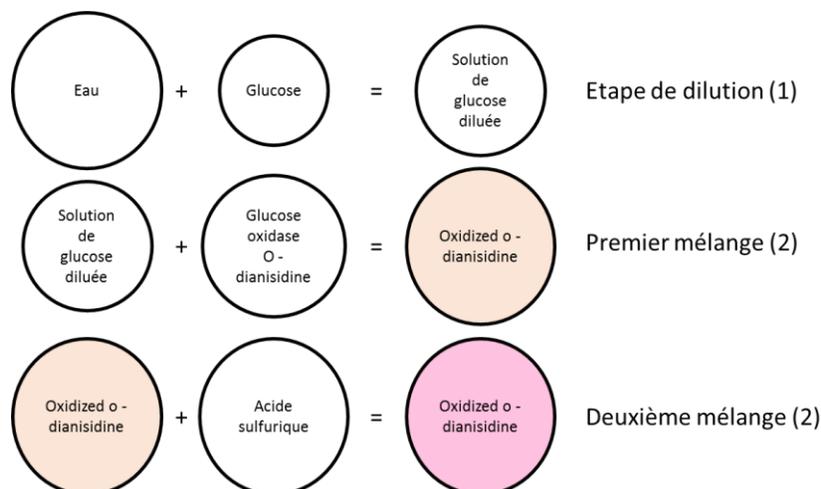


Figure III-32: Etapes du protocole de test enzymatique.

Ensuite, le protocole nécessite l'ajout successif de deux réactifs avec l'échantillon à tester ou les solutions de référence selon les réactions chimiques détaillées dans la Figure III-33. Le premier réactif est une enzyme (Glucose Oxydase) couplée avec un indicateur coloré (la Dianisidine). Son mélange avec le glucose provoque un changement de couleur de la solution qui passe du transparent à l'orange (Figure III-32 (2)). Le deuxième réactif est l'acide sulfurique qui permet de stopper la réaction. Son mélange avec la solution précédente change le pH et provoque un changement de couleur de la solution de l'orange vers le rose (Figure III-32 (3)).

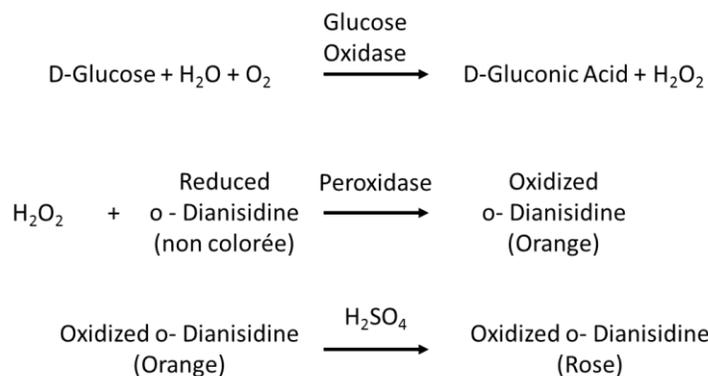


Figure III-33: Réactions chimiques mises en jeu dans le test de glycémie.

Avant de valider le protocole complet, les différentes étapes seront étudiées progressivement. Une première étape sera de réaliser la gamme de dilution en carte et de poursuivre manuellement le protocole (III.6.3). Puis, une deuxième étape sera d'ajouter une colonne à l'architecture de la gamme de dilution pour effectuer le premier mélange dans la carte (III.6.4). Enfin, une architecture permettant d'intégrer le protocole complet sera développée (III.6.5).

III.5.2. Dimensionnement de la gamme de dilution pour le test enzymatique

Pour le test enzymatique visé qui est un test de glycémie, la gamme de dilution recommandée par le kit nécessite 6 chambres avec les facteurs de dilution suivants : 0, 1/50, 2/50, 3/50, 4/50, 1. Pour simplifier, la solution initiale fournie dans le kit a été diluée par 10 afin d'obtenir les facteurs suivants : 0, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 1.

La carte suivante a été développée pour réaliser cette gamme de dilution (Figure III-34).

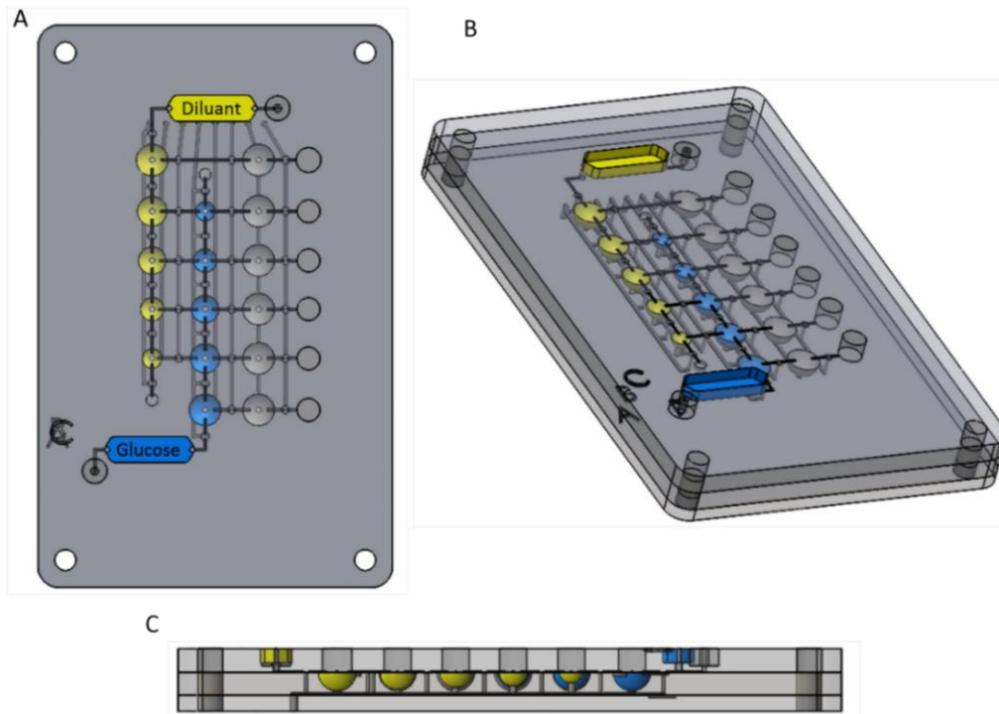


Figure III-34: Vue de la carte pour réaliser une gamme de dilution pour le test de glycémie. (A) Vue de face, (B) vue en perspective, (C) vue en coupe.

Cette carte comprend une colonne pour le diluant (représenté en jaune sur le dessin) et une colonne pour le glucose (représenté en bleu sur le dessin). Pour ajouter une solution de diluant pur dans la gamme de dilution correspondant au point 0 de la gamme, le réservoir de la solution standard (ici le glucose) a été déplacé vers le bas de la carte. En effet, pour faciliter l'injection, il paraît logique de toujours commencer par les chambres de plus grand volume, ainsi, les réservoirs de diluant et de standard doivent se trouver en position opposée sur la carte.

Cette architecture suit les règles de conception définies précédemment à l'exception de la chambre de compensation qui n'était pas connectée pneumatiquement à ce stade de l'étude. Il s'agit ici de la version 2 (voir section III.3.4).

Les dimensions utilisées pour cette carte sont représentées dans le Tableau III-6. Les chambres de la troisième colonne qui permettent de mélanger le diluant et le glucose sont toutes identiques. Le volume de ces chambres vaut 30 μL et le rayon qui est égal à la hauteur vaut 2,43 mm. Les vannes

III.5 : Protocole de test enzymatique : validation d'une gamme de dilution

utilisées sont celles choisies lors de l'optimisation de la taille des vannes. Le rayon des vannes mesure donc 0,6 mm et le volume représente 0,1 μL . Pour s'assurer d'une bonne précision des volumes, le volume minimal est ici de 6 μL .

Colonne 1 : Diluant			Colonne 2 : Standard			Dilution
Volume (μL)	R (mm)	H (mm)	Volume (μL)	R (mm)	H (mm)	
30	2,43	2,43	0	0	0	0
24	2,26	2,25	6	1,5	1,4	1/5
18	2,1	2	12	1,79	1,79	2/5
12	1,79	1,79	18	2,1	2	3/5
6	1,5	1,4	24	2,26	2,25	4/5
0	0	0	30	2,43	2,43	1

Tableau III-6: Dimensions de la carte pour réaliser une gamme de dilution.

III.5.3. Programmation

Les étapes de programmation sont similaires à l'architecture de gamme de dilution présentée dans la section III.2. Cependant, cette architecture présente des volumes de chambre et un nombre de lignes différents par rapport à la précédente mais ces modifications ne changent pas la programmation et les étapes du protocole (Tableau III-2).

III.5.4. Validation de la gamme de dilution

Pour valider la gamme de dilution dans la carte microfluidique, du bleu de bromophénol est dilué en utilisant cette carte et des mesures d'absorbance sont effectuées. Pour cela, 25 μL de chaque solution obtenue par la carte, sont prélevés dans les puits de sortie et déposés dans une plaque 384 puits pour mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 595 nm. L'expérience est réalisée 5 fois dans ces conditions. Visuellement, la Figure III-35 montre que la carte est fonctionnelle. Un dégradé de couleur violette est obtenu.

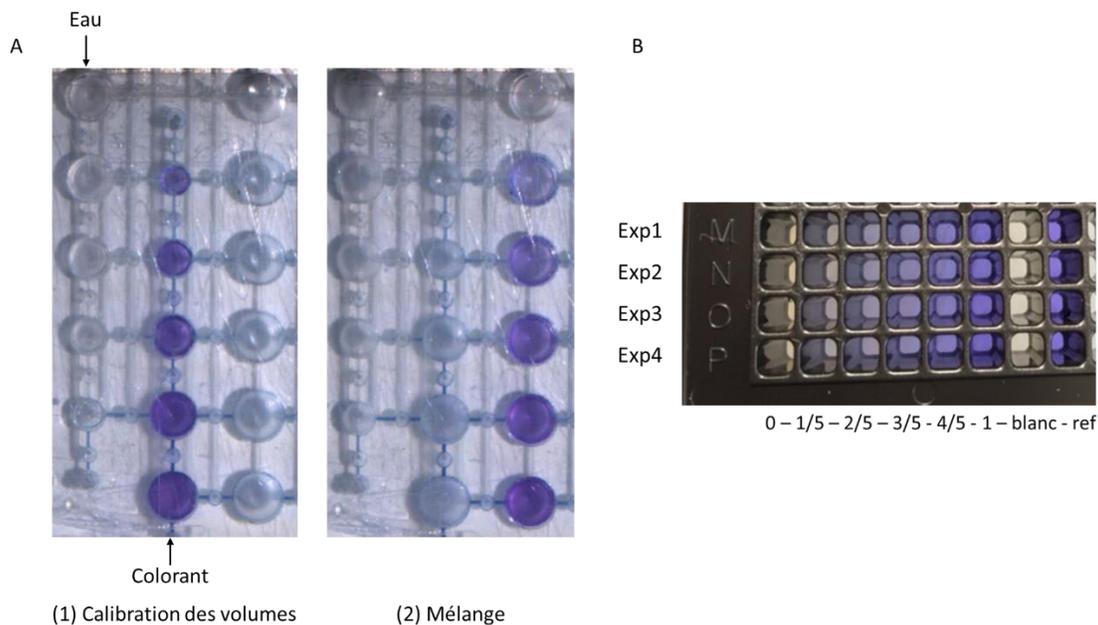


Figure III-35: A : Images de la gamme de dilution réalisée en carte microfluidique. B : Visualisation des puits de mesure pour 4 expériences.

Les mesures d'absorbance sur le TECAN de ces différentes solutions confirment bien ces résultats (Figure III-36). Pour chacune des expériences, une droite avec un coefficient de corrélation de 0,9974 est obtenue. Les barres d'erreur sont également très faibles ce qui montre une bonne reproductibilité.

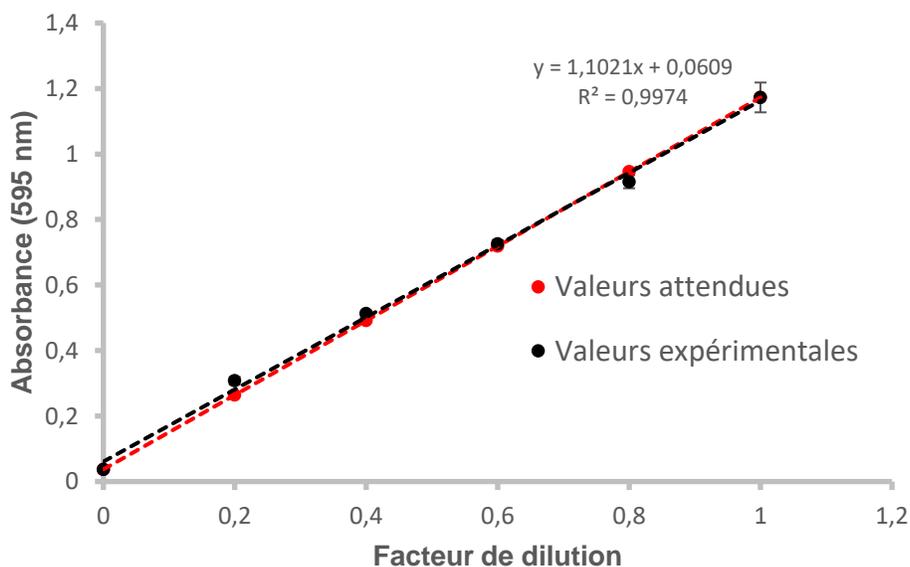


Figure III-36: Mesures d'absorbance en fonction du facteur de dilution, moyenne sur 5 expériences.

Les valeurs pour 5 expériences sont représentées dans la Figure III-37. En complément des courbes et des graphiques, les valeurs données par le TECAN sont présentées dans le Tableau III-7. Pour

chaque expérience, les absorbances du diluant (blanc) et du colorant non dilué (référence) sont également mesurées en tant que témoin pour le point 0 et pour le point 1.

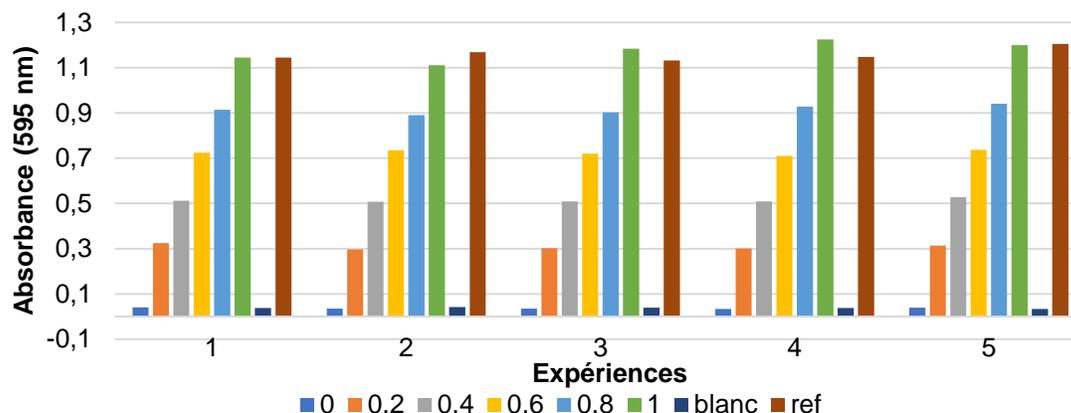


Figure III-37: Comparaison des valeurs entre les différentes expériences.

La moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (rapport écart-type sur moyenne) peuvent être calculés. Les coefficients de variation sont compris entre 1,5 % et 7%. Ce résultat est satisfaisant et prouve le bon fonctionnement de la carte et valide les différentes optimisations.

	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	Blanc	Ref
Exp 1	0,041	0,325	0,512	0,725	0,914	1,145	0,038	1,145
Exp 2	0,035	0,296	0,508	0,736	0,891	1,110	0,042	1,169
Exp 3	0,036	0,302	0,509	0,721	0,903	1,184	0,040	1,133
Exp 4	0,034	0,301	0,510	0,710	0,929	1,225	0,038	1,147
Exp 5	0,040	0,314	0,527	0,738	0,940	1,199	0,033	1,205
Gamme théorique	0,037	0,264	0,491	0,718	0,945	1,173		
Moyenne	0,037	0,307	0,513	0,725	0,915	1,172	0,038	1,159
Ecart-type	0,002	0,012	0,008	0,011	0,019	0,045	0,003	0,028
CV	7,46	3,78	1,58	1,57	2,17	3,88	8,75	2,45

Tableau III-7: Valeurs d'absorbance obtenues, écart-type, moyenne et coefficient de variation pour des facteurs de dilution compris entre 1/5 et 4/5 et pour les références 0 et 1.

D'autres optimisations pourraient être envisagées afin d'améliorer encore la précision et la reproductibilité. Cependant, la cause de ces variations est probablement liée à la méthode de mesure et non au fonctionnement de la carte. En effet, la mesure du blanc et de la solution de référence montre aussi des variations du même ordre qui peuvent s'expliquer par la précision de l'étape du pipetage ou de la méthode de mesure (spectromètre).

Les erreurs sur les coefficients de dilution obtenus à l'aide de la carte microfluidique ont ensuite été estimées (Tableau III-8). Les valeurs attendues sont les facteurs de dilution de la carte et les valeurs mesurées sont les facteurs de dilution calculés à l'aide des mesures d'absorbance en utilisant comme référence la mesure d'absorbance de la solution non diluée.

Facteur de dilution	1/5	2/5	3/5	4/5
Valeurs attendues	0,2	0.4	0.6	0.8
Valeurs mesurées	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.75 ± 0,02

Tableau III-8 : Valeurs attendues et valeurs mesurées pour des facteurs de dilution compris entre 1/5 et 4/5.

Les résultats sont reproductibles et les écarts entre les valeurs attendues et mesurées sont faibles. Ces expériences ont donc permis de valider les règles de conception définies précédemment en réalisant une première gamme de dilution nécessaire à la réalisation d'un test enzymatique.

III.6. Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

Après avoir validé à l'aide de colorants une gamme de dilution, l'objectif est d'intégrer un test enzymatique complet dans une carte microfluidique. Pour cela, une adaptation des volumes par rapport au protocole du kit commercial est nécessaire. Puis, différentes validations intermédiaires seront effectuées avant de réaliser le test complet.

III.6.1. Adaptation du protocole du test de glycémie

Pour rappel, la première étape du protocole de glycémie est la préparation de la gamme de dilution. Pour cela, le protocole du kit commercial recommande de préparer les solutions suivantes (Tableau III-9).

Tube	Eau (mL)	Glucose standard (mL)	Facteur de dilution
Blanc	1		0
Standard 1	0,98	0,02	1/50
Standard 2	0,96	0,04	2/50
Standard 3	0,94	0,06	3/50
Standard 4	0,92	0,08	4/50

Tableau III-9 : Préparation de la gamme de dilution dans le protocole de glycémie.

Les solutions de 1 mL de glucose sont ensuite mélangées avec deux réactifs selon le protocole suivant :

- Ajout de 2 mL de réactif (Enzyme + Dianisidine)
- Incubation de 30 min à 37°C
- Ajout de 2 mL de réactif stop (Acide sulfurique)
- Mesure de l'absorbance à 540 nm

D'après ce protocole, le volume des réactifs (enzyme + indicateur coloré et réactif stop) doit être deux fois plus élevé que la solution de glucose. Ce ratio devra donc être respecté pour l'adaptation des volumes dans la carte.

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

Pour simplifier les étapes de dilution, la solution de glucose initiale sera diluée par 10. Les volumes suivants seront donc utilisés pour la gamme de dilution dans la carte microfluidique (Tableau III-10). C'est précisément cette gamme qui a été validée précédemment.

Tube	Eau (μL)	Glucose standard (μL)	Facteur de dilution
Blanc	30		0
Standard 1	24	6	1/5
Standard 2	18	12	2/5
Standard 3	12	18	3/5
Standard 4	6	24	4/5

Tableau III-10: adaptation des volumes pour préparer la gamme de dilution dans une carte microfluidique.

Pour effectuer la suite du protocole, un volume de 5 μL doit être prélevé à partir de chaque mélange. Cette étape d'aliquotage permet de réduire les volumes utilisés pour la suite du protocole. Rappelons qu'il est préférable d'accomplir l'étape de dilution avec des volumes importants pour minimiser l'impact des volumes morts et pour augmenter la précision. Cependant, à chaque mélange, le volume des chambres est multiplié par trois. Il est donc indispensable de réduire le volume de 30 μL pour limiter la taille des chambres suivantes et la taille de la carte au format d'une carte de crédit.

Le protocole en carte microfluidique est donc le suivant :

- Préparation de la gamme de dilution (Tableau III-9)
- Aliquotage des solutions à 5 μL
- Ajout de 10 μL d'enzymes
- Incubation de 5 min à 25°C
- Ajout de 10 μL de réactif stop
- Récupération 20 μL de chaque solution
- Mesure de l'absorbance à 540 nm

La durée d'incubation est réduite à 5 min et peut s'effectuer à température ambiante. Ce protocole a été validé au préalable en plaque à puits. Une mesure d'absorbance intermédiaire à 440 nm peut être effectuée avant l'ajout du réactif stop.

III.6.2. Démarche utilisée pour valider le test enzymatique dans une carte microfluidique

L'objectif est de valider progressivement chaque étape du protocole du test enzymatique. Le protocole va être intégré progressivement dans une carte microfluidique pour vérifier que chaque étape fonctionne correctement et que les réactifs sont bien compatibles avec les matériaux utilisés. La première étape sera donc d'effectuer une gamme de dilution de solutions de glucose dans la carte microfluidique et de poursuivre le protocole dans une plaque à puits. La deuxième validation intermédiaire consistera à effectuer la gamme de dilution, l'étape d'aliquotage et l'ajout du réactif 1 (enzyme) dans une carte puis d'ajouter manuellement le réactif 2 (réactif stop). Enfin, la validation finale sera d'intégrer le protocole complet dans la carte. (Figure III-38).

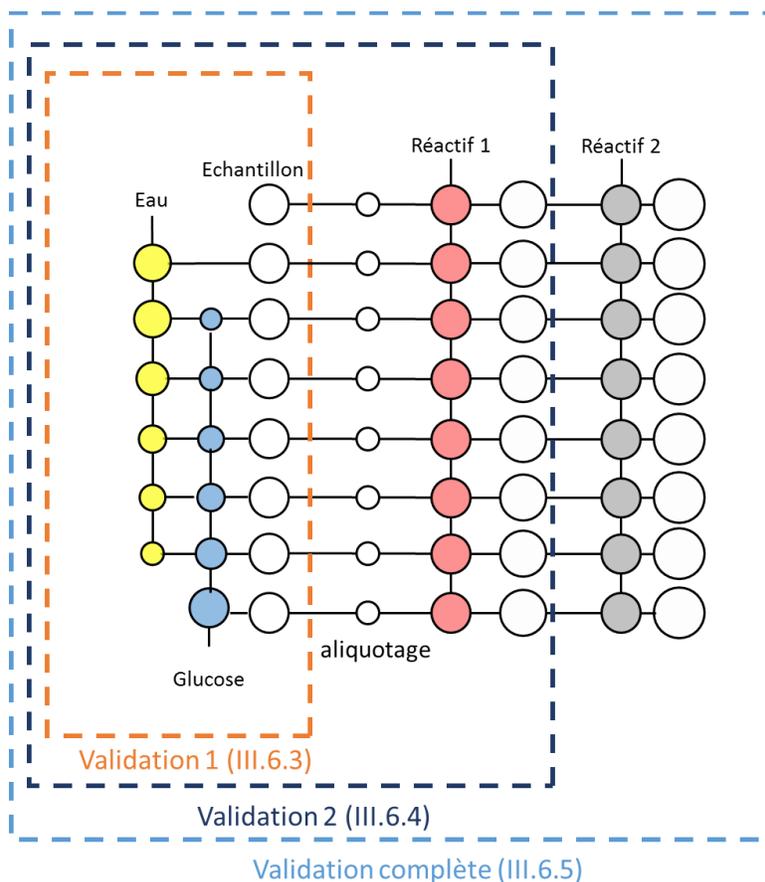


Figure III-38: Démarche pour valider le test enzymatique dans la carte.

III.6.3. Première validation intermédiaire

Pour la première validation du protocole de test enzymatique, la carte précédemment validée en colorants est utilisée pour réaliser la gamme de dilution puis la suite du protocole est validée manuellement (Figure III-39).

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

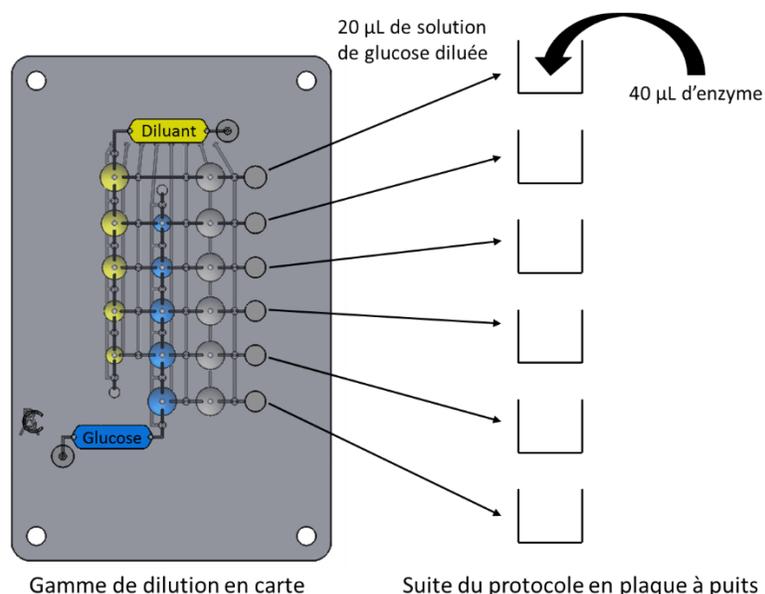


Figure III-39: Première validation intermédiaire du protocole de test enzymatique.

Le protocole peut être validé partiellement en s'arrêtant à l'étape de l'ajout de la solution d'enzymes. Pour cela, 20 µL de chaque solution sont récupérés en sortie de la carte de la gamme de dilution et 40 µL d'enzymes sont ajoutés. Ensuite, 20 µL sont récupérés et l'absorbance de ces solutions est mesurée à 440 nm. Les résultats montrent que le test se déroule correctement et que la gamme de dilution en carte est compatible avec la suite du protocole (Figure III-40).

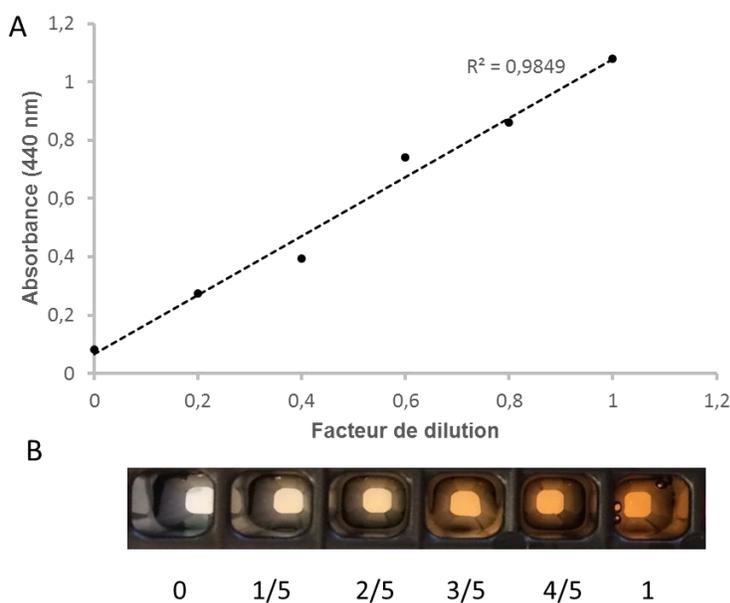


Figure III-40: Test de glycémie réalisé manuellement en utilisant une gamme de dilution réalisée en carte. A : Mesure d'absorbance à 440 nm. B : Photo des différentes solutions dans une plaque 384 puits.

La courbe obtenue est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,9849. L'absorbance augmente bien en fonction de la concentration en glucose.

Cette expérience est ensuite réalisée en utilisant le protocole complet, c'est-à-dire en ajoutant le réactif stop et les volumes compatibles avec la carte finale détaillée précédemment (Figure III-51). Pour cela, 5 μL de solutions de glucose sont récupérées en sortie de la carte de dilutions puis 10 μL de réactif 1 (enzyme) sont ajoutés manuellement et enfin 10 μL de réactif stop (acide sulfurique). La gamme d'absorbance est plus faible que précédemment car les volumes utilisés pour le test ainsi que les volumes mesurés sont plus faibles mais les résultats sont toujours cohérents (Figure III-41).

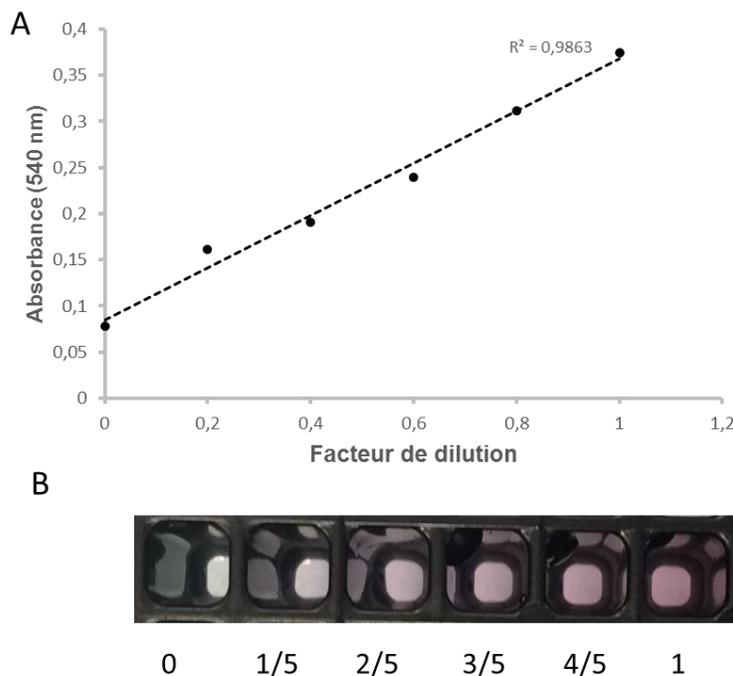


Figure III-41: Test de glycémie réalisé manuellement en utilisant une gamme de dilution réalisée en carte. A : Mesure d'absorbance à 540 nm. B : Photo des différentes solutions dans une plaque 384 puits.

III.6.4. Deuxième validation intermédiaire

La deuxième étape de validation du test enzymatique est de réaliser une carte permettant d'effectuer la gamme de dilution ainsi que le mélange avec le réactif 1 (enzymes).

(i) Dimensionnement

L'architecture de la carte est présentée ci-dessous (Figure III-42). Cette architecture comprend trois colonnes pour réaliser la gamme de dilution, une colonne pour réaliser un aliquotage, une colonne pour calibrer les solutions d'enzyme, une colonne pour faire le mélange et enfin des puits de sortie pour récupérer les différentes solutions et mesurer leur absorbance.

Les vannes situées avant les deux colonnes de mélange ont été supprimées. En effet, les chambres de mélanges peuvent jouer le rôle de vannes. Elles sont fermées durant la phase de remplissage des

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

colonnes d'eau et de glucose puis ouvertes pour effectuer la phase de mélange. La suppression de ces deux colonnes de vannes permet de gagner de la place sur l'architecture et de supprimer deux actionneurs ce qui est très intéressant.

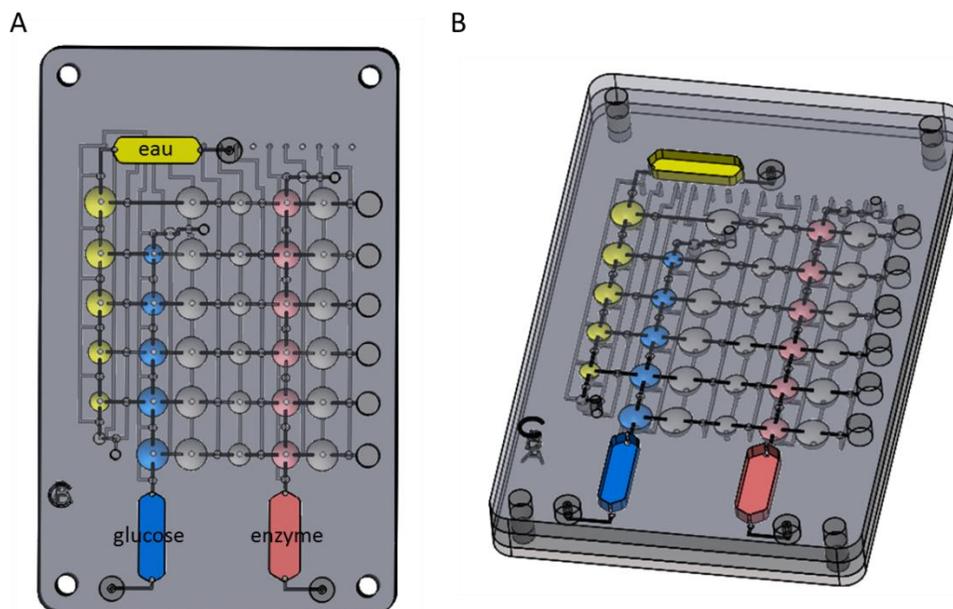


Figure III-42: A : Architecture de la carte permettant de réaliser une gamme de dilution ainsi que le mélange avec une solution d'enzyme. (A) Vue de face, (B) vue en perspective.

Les dimensions des chambres sont présentées dans le Tableau III-11. Les chambres varient entre 6 et 30 μL .

Le protocole suivant va être réalisé en carte :

- Préparation de la gamme de dilution
- Aliquotage de 10 μL
- Mélange avec 20 μL d'enzymes
- Incubation de 5 min
- Récupération de 25 μL
- Mesure de l'absorbance à 440 nm.

Colonne 1 : eau			Colonne 2 : glucose			Colonne 3: mélange		Colonne 4: aliquotage		Colonne 5: réactif 1	
Volume (μL)	r (mm)	h (mm)	Volume (μL)	r (mm)	h (mm)	Volume (μL)	r = h (mm)	Volume (μL)	r = h (mm)	Volume (μL)	r = h (mm)
30	2,43	2,43	0	0	0	30	2,43	10	1,7	20	2,12
24	2,26	2,25	6	1,5	1,4	30	2,43	10	1,7	20	2,12
18	2,1	2	12	1,79	1,79	30	2,43	10	1,7	20	2,12
12	1,79	1,79	18	2,1	2	30	2,43	10	1,7	20	2,12
6	1,5	1,4	24	2,26	2,25	30	2,43	10	1,7	20	2,12
0	0	0	30	2,43	2,43	30	2,43	10	1,7	20	2,12

Tableau III-11 : Dimensions de la carte pour intégrer une gamme de dilution et la première étape du test enzymatique.

(ii) Adressage pneumatique

L'adressage pneumatique est représenté sur la Figure III-43.

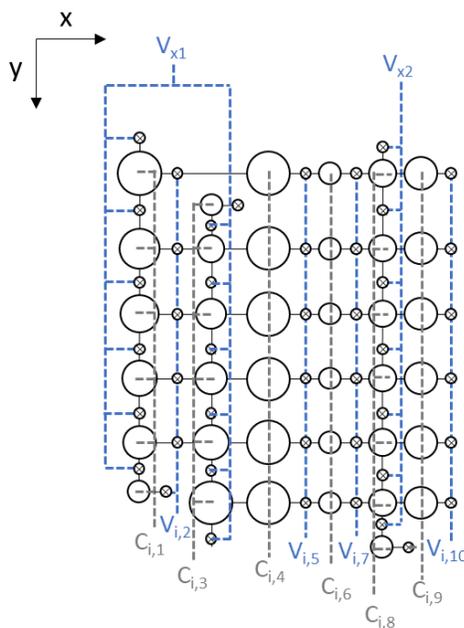


Figure III-43 : Vue schématique du dessus de la carte représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres.

Dans cette version, les vannes des deux premières colonnes de chambres sont pilotées ensemble par le même canal pneumatique ce qui permet de gagner un actionneur. Cette version nécessite 6 électrovannes pour alimenter les colonnes de vannes et 6 électrovannes pour les colonnes de chambres.

(iii) Programmation de la carte pour le test enzymatique partiel

L'intégration de la gamme de dilution et du protocole partiel dans la carte microfluidique nécessite 6 grandes phases :

- Calibration des volumes (eau et glucose) (Figure III-44 (1))

- Mélange (gamme de dilution) (Figure III-44 (2))
- Aliquotage (Figure III-44 (3))
- Calibration du réactif 1 (enzyme) (Figure III-44 (4))
- Mélange (réactif 1) (Figure III-44 (5))
- Transfert

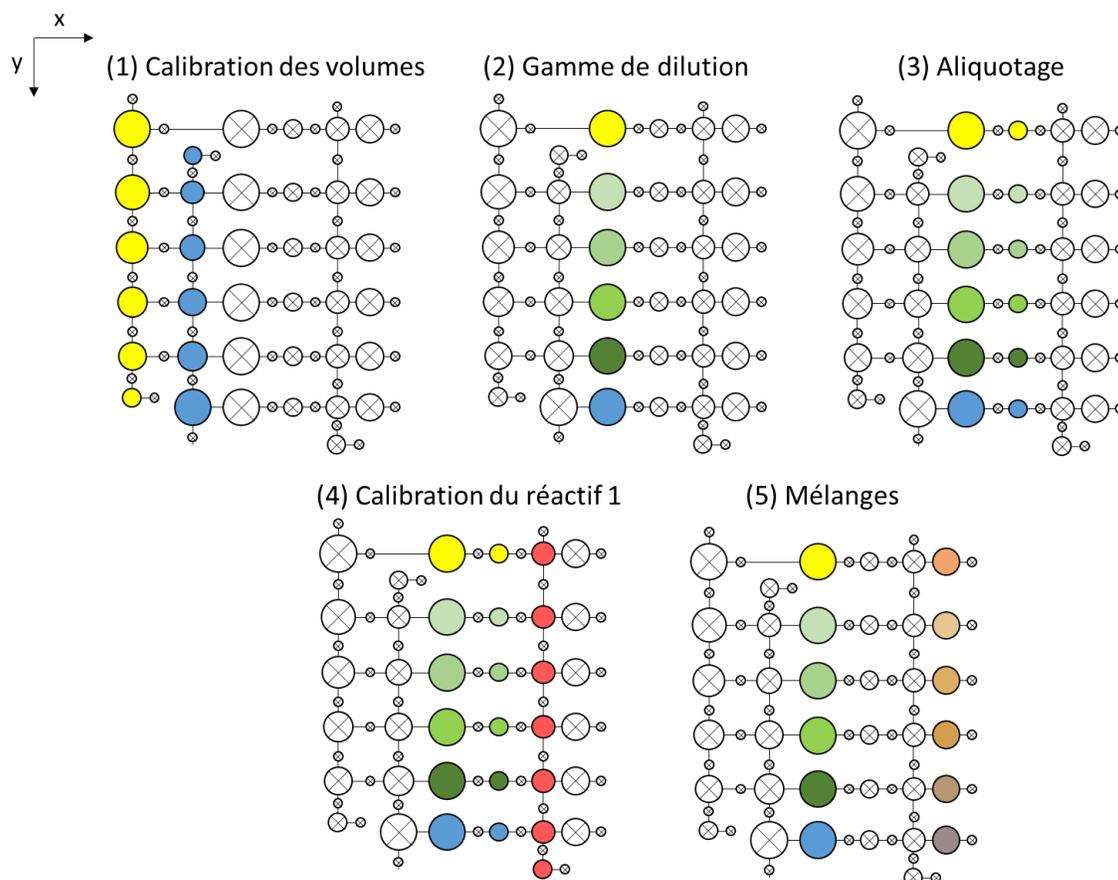


Figure III-44: Principales phases du protocole de test enzymatique partiel.

Les deux premières phases (calibration des volumes et mélange) pour élaborer la gamme de dilution sont similaires à celle présentées dans la section III.5.4. La phase d'aliquotage est nouvelle et n'a pas encore été détaillée. Elle comprend quatre étapes :

- Ouverture des vannes $V_{1,5}$ et des chambres $C_{1,6}$
- Fermeture des chambres $C_{1,4}$
- Fermeture des vannes $V_{1,5}$
- Ouverture des chambres $C_{1,4}$

La dernière étape permet de relâcher la pression sur les chambres $C_{1,4}$ et de stocker le liquide restant. Les changements d'état permettant d'effectuer les différentes étapes sont représentés dans le Tableau III-12.

Phase	Etape	V _{x1}	V _{x2}	C _{i,1}	V _{i,2}	C _{i,3}	C _{i,4}	V _{i,5}	C _{i,6}	V _{i,7}	C _{i,8}	C _{i,9}	V _{i,10}
Calibration des volumes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mélange	3	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Aliquotage	7	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Calibration des volumes	11	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
	12	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Mélange	13	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
	14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
	15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
	16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Transfert	17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tableau III-12 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour le test enzymatique partiel.

(iv) Résultats

La Figure III-45 représente les mesures d'absorbance des solutions préparées dans la carte microfluidique selon le protocole précédemment décrit. Un point de référence correspondant à un test effectué en plaque à puits pour une concentration de 0,1 mg/mL en glucose a également été ajouté. Ces résultats montrent que le dernier point (concentration égale à 0,1 mg/mL) est plus faible lorsque la carte microfluidique est utilisée pour faire le test par rapport au point de référence.

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

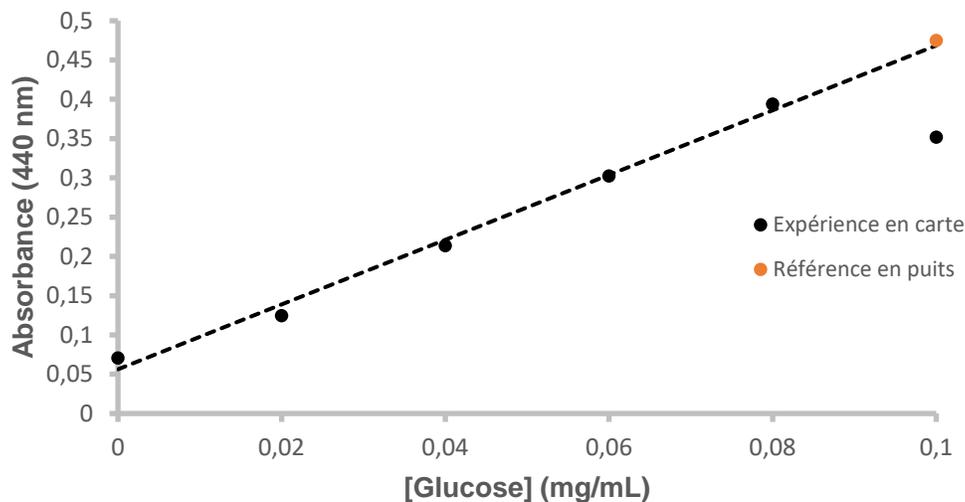


Figure III-45 : Mesure de l'absorbance à 440 nm en fonction de la concentration en glucose pour des solutions préparées dans la carte microfluidique et pour une solution préparée en plaque à puits.

Ce problème n'est pas apparu précédemment lors de la validation de la gamme seule en carte. La réaction semble inhibée pour les fortes concentrations en glucose. L'hypothèse la plus probable qui expliquerait cette limitation serait l'adsorption de l'enzyme. En effet, en cas d'adsorption, l'enzyme devient le réactif limitant et le test ne permet plus de quantifier la concentration en glucose.

Pour confirmer l'hypothèse de l'adsorption de l'enzyme, l'expérience suivante est effectuée. La solution d'enzymes est injectée dans la carte microfluidique puis prélevée pour réaliser un test de glycémie en plaque à puits. En parallèle, un test avec une solution d'enzymes n'ayant pas été injectée dans la carte est effectué en plaque à puits avec des volumes identiques. Le protocole est réalisé sans le réactif stop, l'absorbance sera donc mesurée à 440 nm.

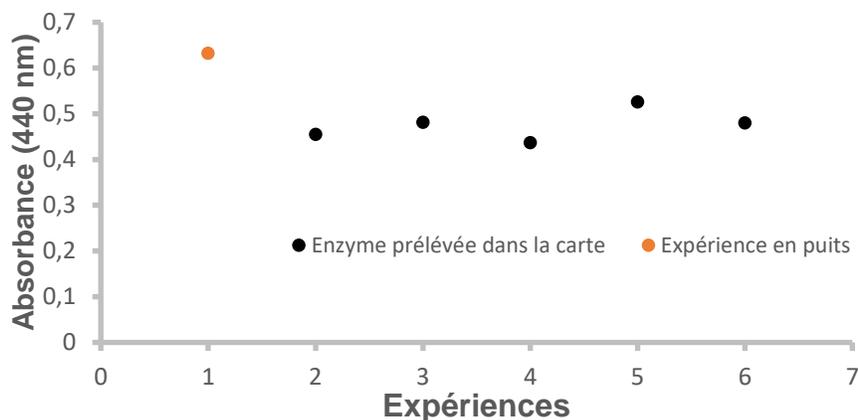


Figure III-46: Mesure de l'absorbance à 440 nm pour des solutions de glucose testées en plaque à puits avec une solution d'enzyme de référence (expérience 1) et pour des solutions de glucose testées avec une solution d'enzymes ajoutée puis prélevée dans une carte microfluidique (expériences 2 à 7).

Ce résultat confirme notre hypothèse (Figure III-46). La solution d'enzyme s'adsorbe bien dans la carte microfluidique. Il convient à présent d'effectuer des tests de compatibilité sur les différents matériaux de la carte c'est-à-dire l'Ecoflex®, l'adhésif et le COC afin d'identifier le matériau critique.

Pour cela, 25 μ L de solution d'enzymes sont alors déposés pendant 5 min (temps correspondant à la durée d'incubation dans le protocole) sur l'Ecoflex®, le COC, l'adhésif et dans un puits pour avoir une mesure de référence. Ensuite, un test de glycémie est effectué avec ces solutions (Figure III-47).

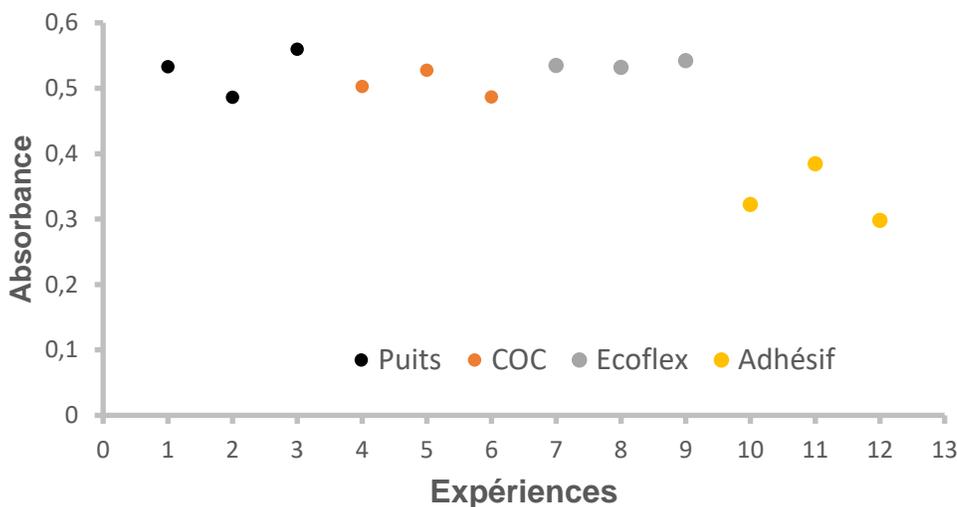


Figure III-47: Mesure de l'absorbance à 440 nm pour des solutions de glucose testées avec une solution d'enzymes de référence (expériences 1 à 3), avec une solution d'enzymes ayant été déposée pendant 5 min sur du COC (expériences 4 à 6), sur de l'Ecoflex® (expériences 7 à 9) et sur de l'adhésif (expériences 10 à 12).

Cette expérience montre clairement que l'adhésif pose un problème de compatibilité avec le protocole. La mesure d'absorbance est plus faible pour le test de glycémie effectué avec les solutions d'enzymes ayant été en contact avec l'adhésif. Il est difficile de se passer de ce matériau nécessaire à l'empilement technologique. Une alternative est d'utiliser une concentration plus élevée en enzyme pour s'affranchir de ce problème.

Une solution d'enzymes deux fois plus concentrée est alors utilisée pour les expériences suivantes afin que ce réactif ne soit plus le réactif limitant. Le test de glycémie est de nouveau réalisé en carte microfluidique en utilisant l'architecture de la Figure III-42 avec cette solution d'enzymes deux fois plus concentrée.

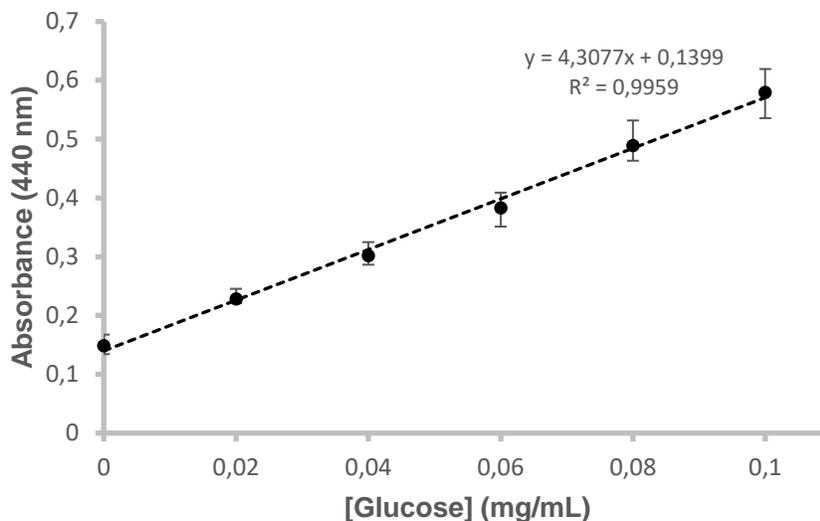


Figure III-48: Mesure de l'absorbance à 440 nm en fonction de la concentration en glucose.

Les expériences sont reproduites 6 fois. La courbe obtenue est linéaire (Figure III-48) ce qui montre que le problème a été résolu. De plus, des calculs de coefficients de variation confirment que les résultats sont reproductibles (Tableau III-13).

Manip Facteur de dilution	A	B	C	D	E	F	CV
0	0,13	0,16	0,15	0,17	0,14	0,14	8,47
0,2	0,22	0,23	0,23	0,22	0,25	0,22	4,19
0,4	0,32	0,29	0,32	0,30	0,29	0,29	5,45
0,6	0,36	0,39	0,41	0,41	0,35	0,37	6,00
0,8	0,47	0,48	0,50	0,49	0,46	0,53	4,84
1	0,54	0,54	0,60	0,61	0,57	0,62	6,08

Tableau III-13 : Mesures d'absorbance à 440 nm pour 6 expériences, calcul de coefficient de variation.

Cette architecture a donc permis de valider partiellement l'intégration du test enzymatique dans la carte microfluidique. L'intégration de la fonction d'aliquotage dans la carte microfluidique ainsi que la phase de mélange avec les enzymes a pu être validée.

III.6.5. Validation complète

La dernière carte développée a permis d'intégrer le protocole complet du test enzymatique, c'est-à-dire la gamme de dilution, le mélange avec les enzymes et le réactif stop (Figure III-49). Par rapport à l'architecture de la carte précédente, celle-ci nécessite l'ajout d'une colonne pour calibrer le réactif stop, d'une colonne pour le mélange et d'une colonne de vannes supplémentaires. Cette architecture comprend également une ligne supplémentaire pour ajouter un échantillon. Cela permet d'effectuer la mesure d'une solution de glucose de concentration connue et de vérifier que la courbe de calibration nous mène bien à la bonne concentration.

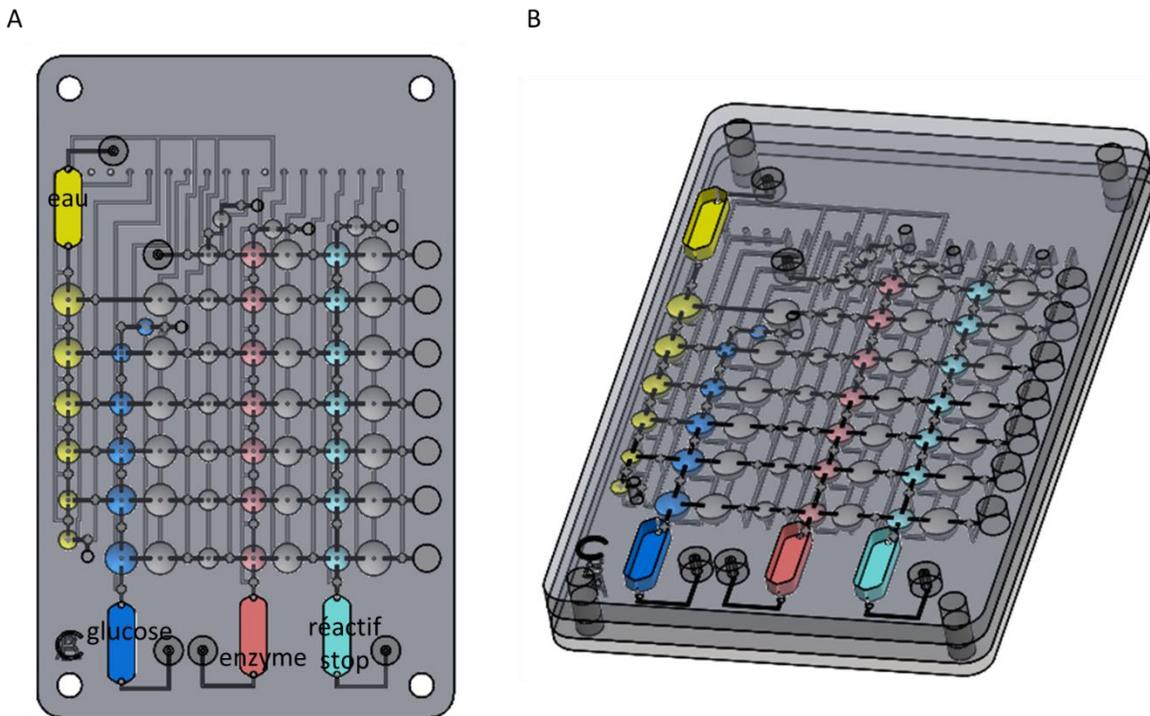


Figure III-49: Architecture de la carte permettant de réaliser le protocole complet du test de glucose. (A) Vue de face, (B) vue en perspective.

(i) Dimensionnement

Les volumes de la gamme de dilution vont être réduits afin que cette architecture soit limitée à une carte au format carte de crédit. Le volume maximal de la gamme de dilution est de 20 μL . Le volume de l'aliquotage est de 5 μL ce qui permet de réduire ensuite les volumes de réactifs à 10 μL .

Les dimensions utilisées pour cette carte sont représentées dans le Tableau III-14.

Colonne 1 : Eau		Colonne 2 : Glucose		Colonne 3 : Mélange		Colonne 4: Aliquotage		Colonne 5: Réactif 1		Colonne 5: Réactif 2	
Volume (μL)	r = h (mm)										
20	2,12	0	0	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68
16	1,97	4	1,24	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68
12	1,79	8	1,56	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68
8	1,56	12	1,79	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68
4	1,24	16	1,97	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68
0	0	20	2,12	20	2,12	5	1,34	10	1,68	10	1,68

Tableau III-14: Dimensions de la carte pour intégrer un test enzymatique complet.

Le protocole du test enzymatique réalisé dans la carte microfluidique est le suivant :

- Injection du glucose, de l'eau, du réactif 1 (enzyme) et de l'échantillon (solution de glucose concentrée à 0,05 mg/mL)

- Mélange du glucose et de l'eau pour réaliser la gamme de dilution
- Aliquotage à 5 μL
- Mélange des solutions de glucose avec 10 μL de réactif 1 (enzymes)
- Incubation de 5 min
- Injection du réactif 2 (acide sulfurique)
- Mélange des solutions avec 10 μL de réactif 2 (réactif stop)
- Récupération de 20 μL
- Mesure de l'absorbance à 540 nm

Cette carte va être validée qualitativement à l'aide de colorants puis plusieurs fois quantitativement avec les réactifs biologiques. Le test n'étant pas destructif, cela permet de valider aussi la réutilisation des composants.

(ii) Adressage pneumatique

L'adressage pneumatique est représenté dans Figure III-50. Cette architecture nécessite 7 électrovannes pour piloter les colonnes de vannes et 8 électrovannes pour piloter les colonnes de chambres. Ce nombre reste inférieur à celui imposé par nos contraintes, c'est-à-dire 16 électrovannes.

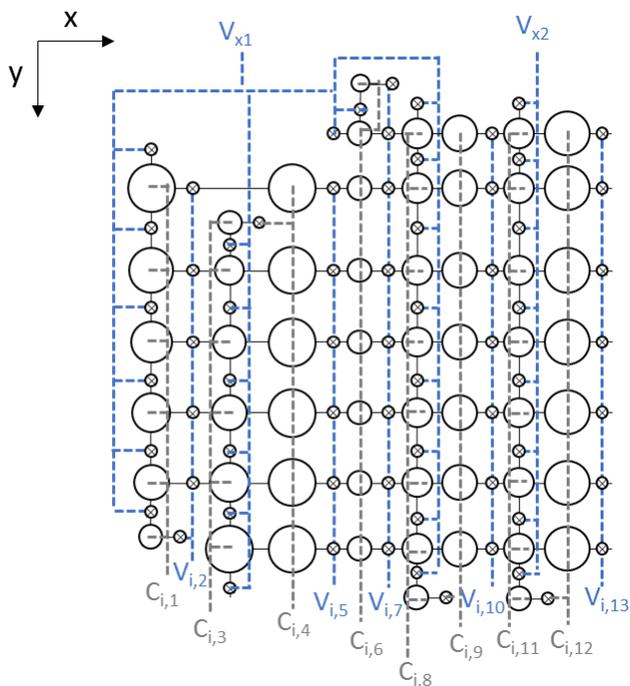


Figure III-50: Vue schématique du dessus de la carte représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres.

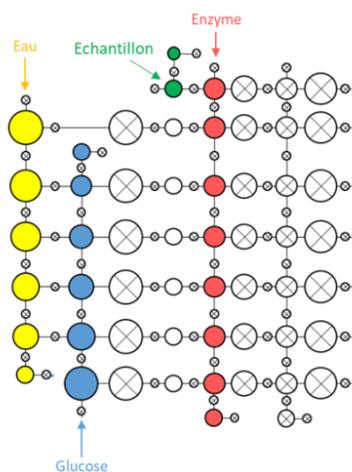
Dans cette version, les vannes de la colonne de réactif 1 ($C_{i,8}$) sont pilotées simultanément avec celles des colonnes de diluant et de glucose par le canal pneumatique V_{x1} ce qui permet de gagner une électrovanne. La vanne d'entrée de l'échantillon est également pilotée par V_{x1} .

(iii) Programmation de la carte pour le test enzymatique

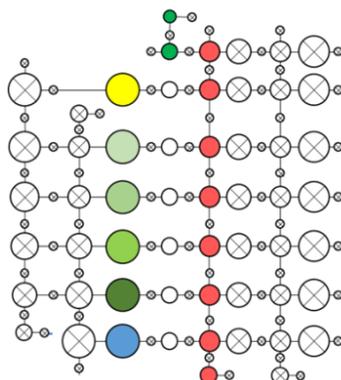
L'intégration du protocole complet de test enzymatique dans la carte microfluidique nécessite 7 grandes phases :

- Calibration des volumes (eau, glucose et enzyme) (Figure III-51 (1))
- Mélange (gamme de dilution) (Figure III-51 (2))
- Aliquotage (Figure III-51 (3))
- Mélange avec le réactif 1 (Figure III-51 (4))
- Calibration du volume de réactif stop (Figure III-51 (5))
- Mélange avec le réactif stop (Figure III-51 (6))
- Transfert vers les puits de sorties

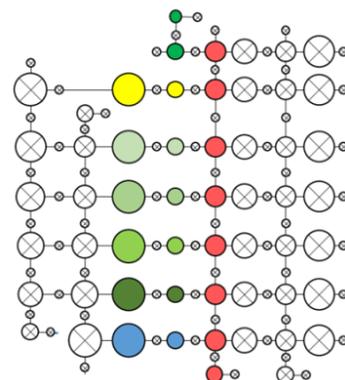
(1) Calibration des volumes



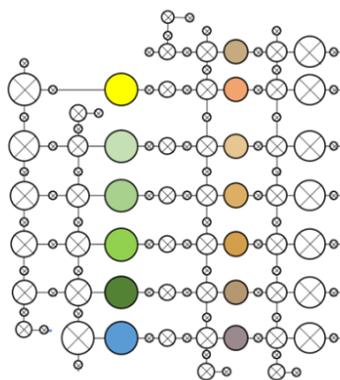
(2) Gamme de dilution



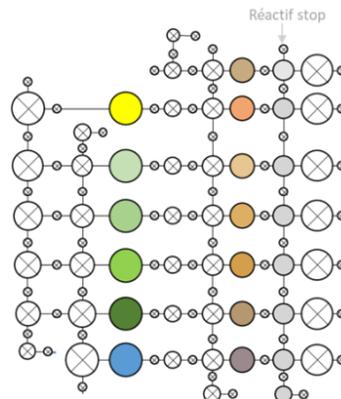
(3) Aliquotage



(4) Mélanges



(5) Calibration des volumes



(6) Mélanges

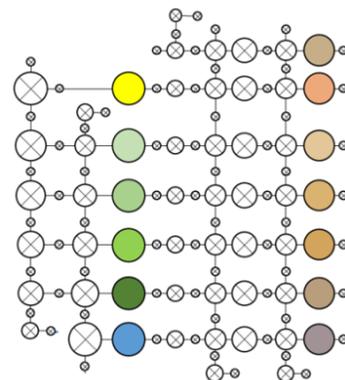


Figure III-51 : Principales phases du test enzymatique complet dans une carte microfluidique.

Par rapport à l'architecture précédente, le réactif 1 (enzyme) est injecté lors de la première phase. Le réactif stop est injecté lors d'une phase ultérieure pour éviter l'apparition de bulles pendant les 5 minutes d'incubation. L'échantillon peut être injecté pendant la première phase ou la phase d'aliquotage. Il suffit alors de ne pas ouvrir les chambres d'aliquotage reliées à celle de l'échantillon durant la phase 1 et d'ouvrir de nouveau les vannes V_{x1} durant la phase d'aliquotage.

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

Les changements d'état permettant d'effectuer les différentes étapes sont représentés dans le Tableau III-15.

Phase	Etape	V _{x1}	V _{x2}	C _{i,1}	V _{i,2}	C _{i,3}	C _{i,4}	V _{i,5}	C _{i,6}	V _{i,7}	C _{i,8}	C _{i,9}	V _{i,10}	C _{i,11}	C _{i,12}	V _{i,13}
Calibration des volumes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Mélanges	3	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Aliquotage	7	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Mélanges	13	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Calibration des volumes	17	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Mélanges	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
	20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	21	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Transfert	23	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau III-15: Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour le test enzymatique complet.

(iv) Validation fluide

La Figure III-52 montre les différentes phases du protocole de test enzymatique réalisées avec des colorants dans la carte microfluidique. Ce type de validation fluide est effectué systématiquement

lorsqu'une nouvelle architecture de carte est développée. Cette étape permet d'optimiser la programmation de la carte et de vérifier la bonne étanchéité des vannes et des chambres.

Ces images montrent que les différentes opérations se déroulent correctement. Le seul changement qui pourra être apporté est l'injection de l'échantillon. Rappelons que la chambre de l'échantillon est connectée aux chambres d'aliquotage et que la vanne d'entrée de l'échantillon est reliée aux vannes V_{x1} . L'injection de l'échantillon lors de la première phase peut alors poser problème car les chambres d'aliquotage restent ouvertes pendant l'étape de la gamme de dilution. Des fuites ont été constatées lors de la phase de mélange (2).

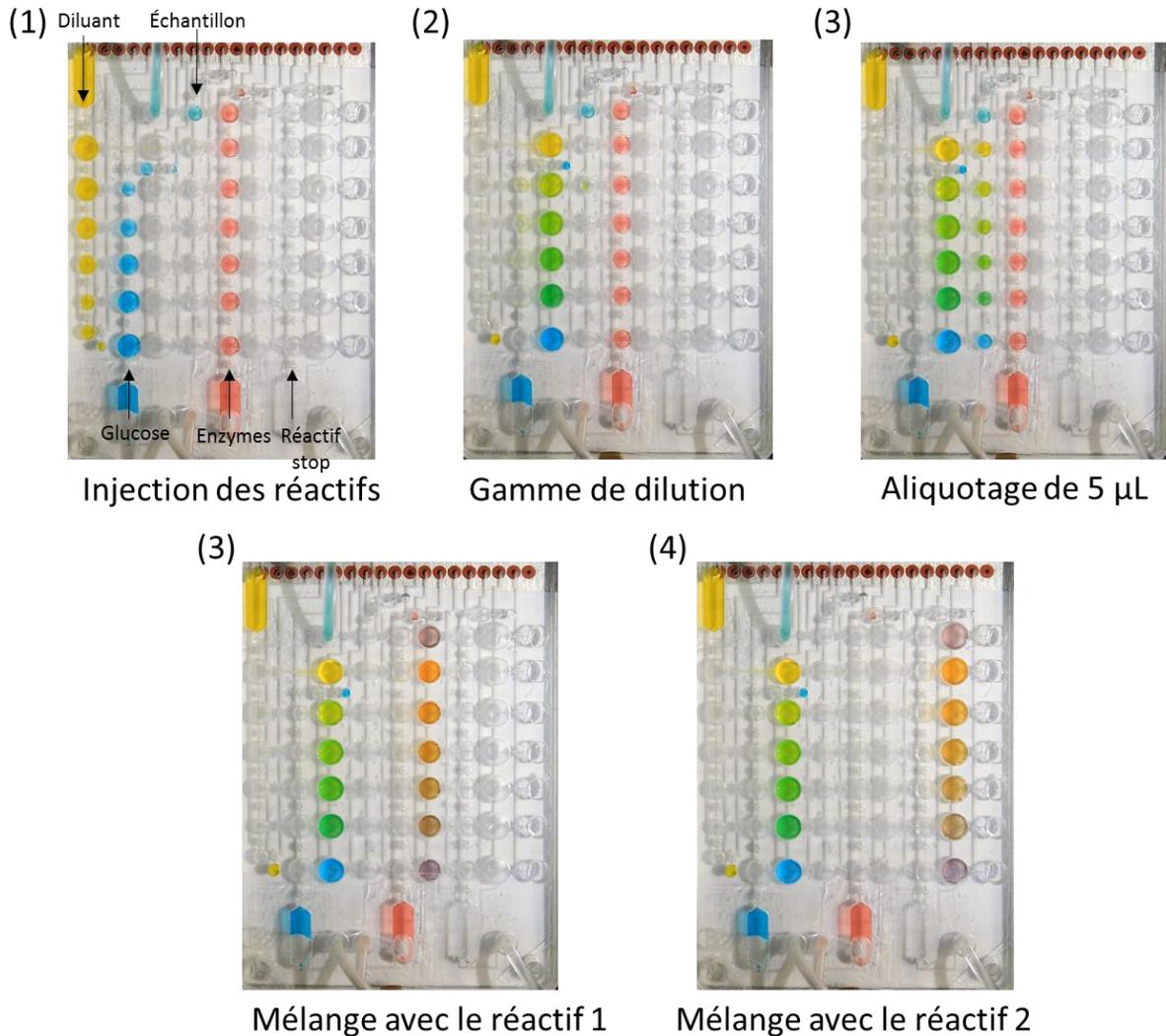


Figure III-52: Validation qualitative des étapes du protocole de test enzymatique.

(v) Validation quantitative

Suite à la validation fluide réalisée avec des colorants, un test de glucose complet est effectué dans la carte microfluidique. Pour cela, les solutions du kit biologique précédemment décrites sont utilisées (voir section III.5.1).

III.6 : Protocole de test enzymatique : réalisation d'un test complet

Pour cette expérience, l'échantillon est une solution de glucose de concentration égale à 0,05 mg/mL. La Figure III-53 représente la carte microfluidique au cours du protocole. Les différentes solutions de glucose deviennent orange suite au mélange avec les solutions d'enzyme et après 5 min d'incubation. Plus la solution est concentrée en glucose et plus la solution est colorée. Visuellement, un dégradé correspondant à la gamme de dilution (1, 4/5, 3/5, 2/5, 1/5, 0) est bien observé et l'échantillon présente une couleur intermédiaire (Figure III-53 A). Ensuite, en mélangeant avec les solutions de réactifs stop, les solutions deviennent roses et la graduation est plus marquée ce qui facilite aussi la mesure au TECAN (Figure III-53 B).

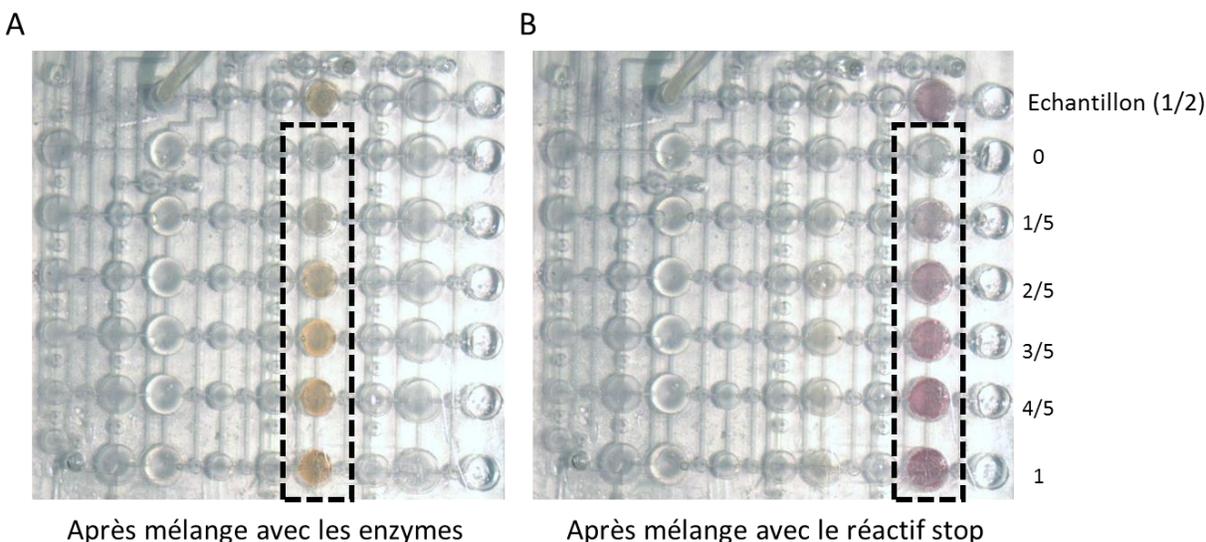


Figure III-53: A : Image de la carte microfluidique suite au mélange avec les enzymes et après 5 min d'incubation. B : Image de la carte microfluidique suite au mélange avec le réactif stop (acide sulfurique).

Pour quantifier les résultats, 20 μ L de chaque mélange sont prélevés et injectés dans une plaque 384 puits pour mesurer l'absorbance à 540 nm au TECAN. Cette expérience a été reproduite 5 fois. La courbe de calibration est linéaire ($R^2=0.985$) et peut être utilisée pour mesurer la concentration de l'échantillon. La concentration attendue pour l'échantillon était de 0,05 mg/mL. En utilisant la mesure d'absorbance de l'échantillon et la courbe de calibration, la valeur mesurée est de $0,047 \pm 0,02$ mg/mL.

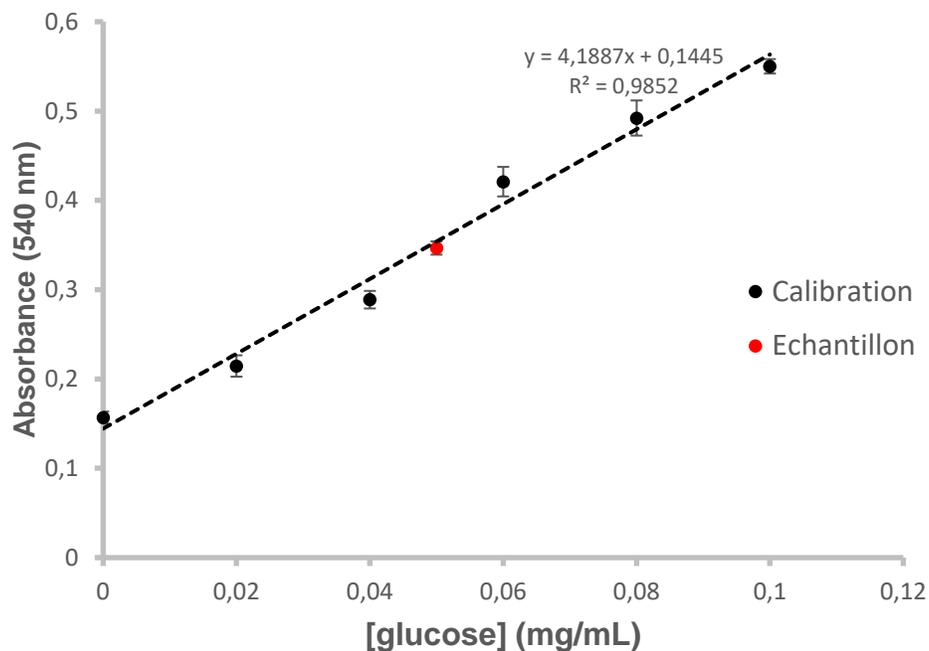


Figure III-54: Mesure de l'absorbance à 540 nm en fonction de la concentration en glucose. La valeur moyenne sur 5 expériences a été tracée.

Ces résultats sont très encourageants : la valeur calculée de la concentration de l'échantillon en utilisant la courbe de calibration est très proche de la valeur attendue.

Ces validations prouvent également la capacité de l'architecture X-Y couplée à l'actionnement pneumatique de chambres variables à réaliser un protocole en plusieurs étapes avec une courbe de calibration.

III.7. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce chapitre était de développer et de valider les fonctions élémentaires nécessaires à la réalisation d'un protocole ELISA dans une carte microfluidique. Pour cela, l'intégration d'un protocole simplifié, le test enzymatique dans un système microfluidique a été étudiée et réalisée.

Tout d'abord, des analyses d'architecture ont permis d'optimiser progressivement la carte microfluidique développée et de définir les plages de pression de l'actionnement pneumatique. Les chambres de géométrie hémisphérique ont été choisies pour simplifier le dimensionnement et s'assurer du plaquage complet de la membrane. Des chambres de volume variant entre 1 μL et 50 μL ont ainsi été réalisées. Des volumes supérieurs par exemple de l'ordre de 200 μL , ont également été atteints pour d'autres applications à venir.

Le volume des vannes a été minimisé afin d'en négliger les volumes morts par rapport aux volumes d'intérêt. Cependant, l'adhésif ajoute un volume mort supplémentaire et la technique d'assemblage associée impose un rayon de vanne minimal. D'autres vannes de plus faibles volumes tels que les vannes de type Quake pourraient être envisagées avec une autre technique d'assemblage comme l'utilisation de colles par sérigraphie. Enfin, une chambre supplémentaire a été ajoutée pour compenser les volumes morts liés aux canaux lors de l'étape d'injection des réactifs.

La démarche choisie pour valider le test enzymatique a été d'intégrer progressivement les différentes étapes de ce protocole dans une carte microfluidique. La première étape a été de valider la gamme de dilution. Les optimisations apportées ont permis de valider en carte une gamme de dilution pour des ratios de 5 maximum avec une très grande précision. Cette validation montre la capacité de l'architecture et de la technique d'actionnement de fluides choisies à réaliser un ensemble de mélanges en parallèle pour réaliser une gamme de dilution en peu d'étapes.

La première étape du protocole de test enzymatique ayant été intégrée dans une carte microfluidique, de nouvelles fonctions, telles que l'aliquotage et le mélange successif de plusieurs solutions en parallèle, ont pu être validées. Enfin, le test enzymatique complet a pu être intégré et validé en carte. Une solution de glucose de concentration connue a été testée en utilisant cette carte. La concentration attendue a pu être retrouvée à l'aide de la courbe de calibration, ce qui est très encourageant.

L'intégration de ce protocole a révélé des problèmes d'incompatibilité entre l'adhésif et certains réactifs tels que les enzymes. De plus, l'adhésif ajoute un volume mort, limite la taille des vannes et crée une surépaisseur qui doit probablement avoir un effet sur les pressions d'actionnement des chambres et des vannes. Une autre technique de fabrication a donc été étudiée afin de tenter de supprimer l'adhésif. Cette technique a fait l'objet d'un brevet. Le principe est de mouler directement le matériau hyperélastique liquide (Ecoflex®) dans la carte pour former des chambres et des vannes (Figure III-55).

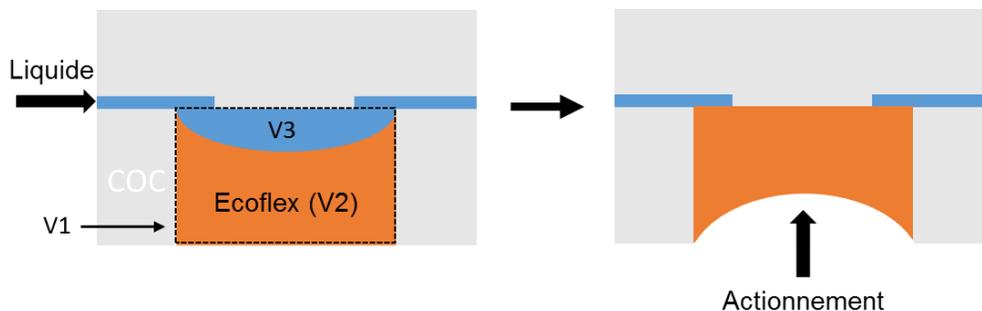


Figure III-55: Autre méthode de fabrication de chambres en Ecoflex®.

Un volume $V2$ d'Ecoflex® liquide est déposé précisément à l'aide d'une machine de dépôt dans une cavité traversante de volume $V1$ connu. Le polymère va former un ménisque qui va s'accrocher au niveau des bords par effet de capillarité. Ainsi, après polymérisation, le volume de la chambre formée est précisément calibré et se détermine par la différence de ces deux volumes soit $V1-V2$.

Une carte contenant des canaux peut être alors assemblée par scellement thermique. Cette technique évite donc l'utilisation d'adhésif. Des expériences ont montré que la technique est fonctionnelle et qu'une chambre peut être actionnée pour déplacer un volume.

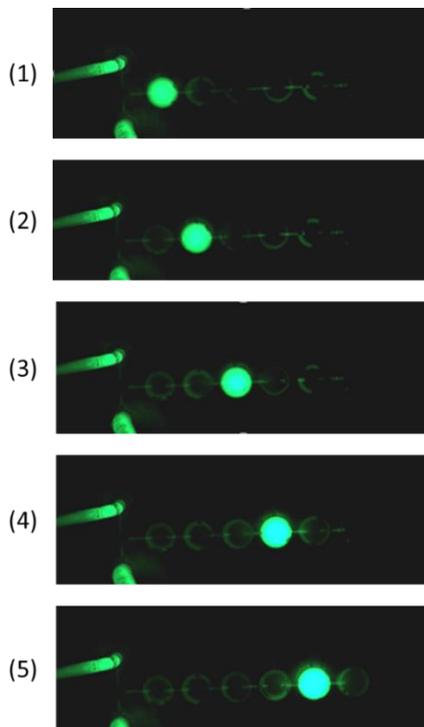


Figure III-56: Images d'un déplacement de liquide avec la technique d'assemblage de l'Ecoflex® moulé.

Des vannes peuvent être également formées en utilisant une technique similaire de moulage (Figure III-57). Un des intérêts est d'obtenir des vannes avec un volume mort minimum, en outre, quand les vannes sont ouvertes le canal fluide présente une géométrie continue, sans marche contrairement à l'assemblage nominal avec l'adhésif.

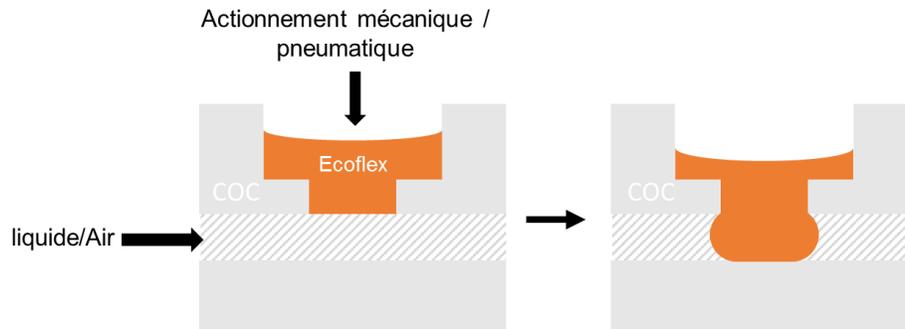


Figure III-57: Vanne en Ecoflex® utilisant la technique d'assemblage de l'Ecoflex® moulé.

Ces vannes peuvent être actionnées pneumatiquement ou mécaniquement. Elles ont été testées et se ferment à 600 mBar pour une pression en liquide de 150 mBar.

Cette technique est prometteuse mais n'a pas été approfondie dans le cadre de la thèse car son optimisation nécessitait un travail important. De plus, cette technique est moins adaptée aux protocoles à intégrer car il est à ce stade plus difficile de créer une large gamme de volumes de chambres. Enfin, ces vannes nécessitent un puits de remplissage pour l'instant trop encombrant pour notre architecture et des pressions d'actionnement plus importantes. La technique d'assemblage utilisant l'adhésif a donc été maintenue pour la suite de la thèse. Les assemblages restent simples, rapides, et suffisamment robustes pour poursuivre les études mais en prenant en compte le risque éventuel de biocompatibilité de l'adhésif suivant les protocoles.

En résumé, dans ce chapitre, une approche modulaire a été utilisée pour l'intégration du protocole de test enzymatique. Cette approche a également montré la capacité de l'architecture à s'adapter au protocole souhaité. Il est possible de changer facilement la géométrie des chambres, d'ajouter des lignes et des colonnes. Il s'agit bien d'une architecture générique qui s'inscrit au début de la démarche progressive qui a été adoptée ; il convient maintenant de la valider sur d'autres protocoles tels que les tests ELISA homogènes et hétérogènes qui seront abordés dans le chapitre suivant.

Chapitre IV:

Validation de tests ELISA

Sommaire

IV.1. Gamme de dilution pour le test ELISA	163
IV.1.1. Dimensionnement.....	163
IV.1.2. Validation fluidique.....	165
IV.1.3. Validation quantitative.....	165
IV.2. Test ELISA en phase homogène	167
IV.2.1. Protocole.....	167
IV.2.2. Adaptation du protocole de test ELISA en phase homogène.....	169
IV.2.3. Dimensionnement.....	170
IV.2.4. Adressage pneumatique.....	172
IV.2.5. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.....	173
IV.2.6. Validation du protocole de test ELISA en phase homogène dans une carte microfluidique	176
IV.3. Bilan de la validation du test ELISA en phase homogène	180
IV.4. Test ELISA en phase hétérogène.....	181
IV.4.1. Choix du protocole.....	182
IV.4.2. Démarche de développement d'une carte microfluidique pour les protocoles ELISA hétérogène.....	184
IV.4.3. Test du kit et adaptation du protocole.....	184
IV.4.4. Dimensionnement.....	188
IV.4.5. Adressage pneumatique.....	190
IV.4.6. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.....	193
IV.4.7. Validation fluidique.....	197
IV.4.8. Fonctionnalisation.....	198

IV.4.9. Expériences préliminaires.....	199
IV.4.10. Optimisation de la phase de lavage dans la carte microfluidique.....	204
IV.4.11. Validation quantitative du test ELISA en phase hétérogène	208
IV.5. Conclusions et perspectives	212

Dans ce chapitre, différentes architectures vont être développées pour l'intégration de tests ELISA dans des systèmes microfluidiques. Dans un premier temps, le protocole de test ELISA en phase homogène sera abordé. De manière similaire au test enzymatique, l'intérêt de cette famille de protocoles est d'impliquer uniquement des mélanges successifs. Il sera donc possible de s'inspirer des précédents travaux pour intégrer le test ELISA en phase homogène. Il faudra toutefois adapter l'architecture au protocole du kit et valider les réactions en cartes. Dans un second temps, l'intégration de protocole ELISA hétérogène sera étudié. Comparé au test ELISA homogène, les réactions s'effectuent en surface et non en volume. Il faudra alors mettre en œuvre les étapes de préparation des surfaces pour le greffage d'anticorps et intégrer la fonction de lavage. Cette étape est cruciale pour la réussite du test ELISA hétérogène et devra être validée avec attention. De plus, ce protocole demande une grande précision dans le contrôle des liquides car une réaction d'amplification est mise en jeu et peut rapidement fausser les résultats en cas de mélanges non désirés. L'adaptation des kits commerciaux exigera donc un travail plus conséquent que précédemment. Les tests ELISA qu'ils soient homogènes ou hétérogènes nécessitent des gammes de dilution plus étendues, c'est-à-dire avec des ratios plus importants que celles présentées précédemment. Le début de chapitre s'intéresse à l'établissement et la validation de ces nouvelles gammes de dilution.

IV.1. Gamme de dilution pour le test ELISA

IV.1.1. Dimensionnement

Pour les tests ELISA homogènes et hétérogènes, les kits recommandent généralement de préparer une gamme comprenant 8 solutions avec les facteurs de dilution suivants : 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 0. Par rapport au test précédent, l'intégration de la gamme de dilution présente alors une difficulté supplémentaire. La gamme présente plus de volumes à gérer avec de plus grands ratios, c'est pourquoi il est important de refaire une validation indépendamment du test ELISA.

Pour valider cette nouvelle gamme, une carte doit donc être développée. Un dessin de la carte est reporté sur la Figure IV-1.

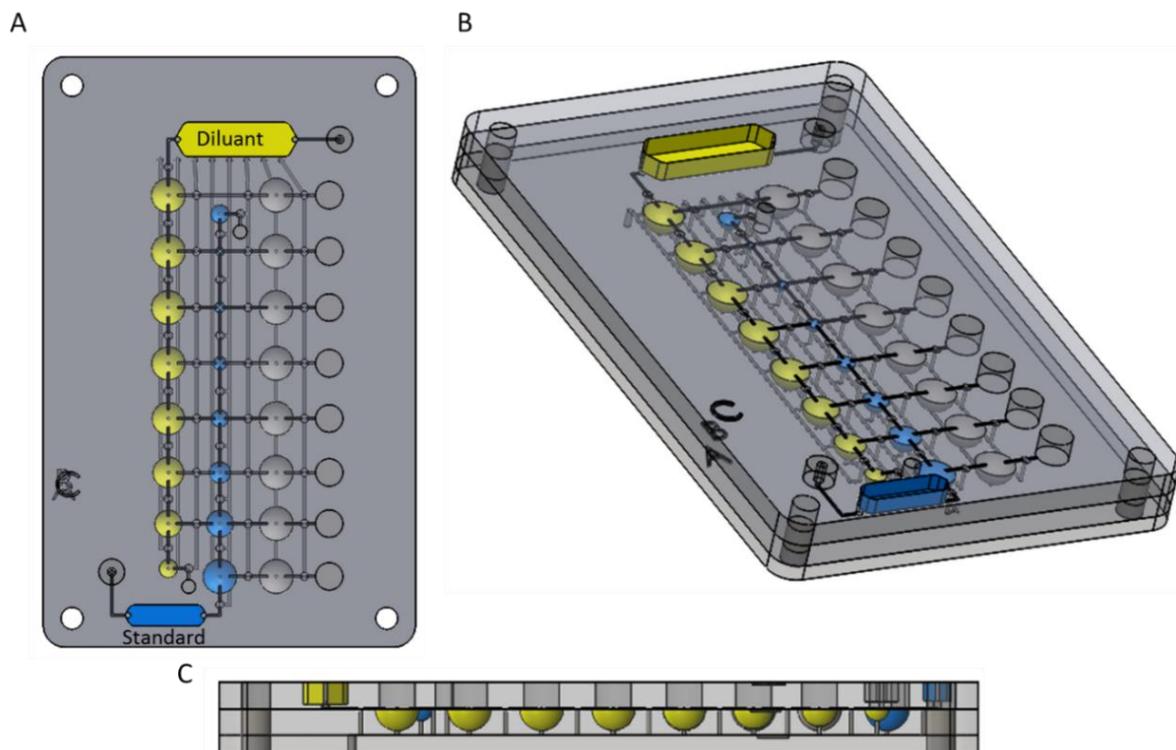


Figure IV-1: Vue de la carte pour réaliser une gamme de dilution pour le test ELISA : (A) vue de face, (B) vue en perspective, (C) vue en coupe.

Pour cette carte, les dimensions suivantes sont utilisées :

Colonne 1 : diluant		Colonne 2 : référence		Colonne 3 : Mélange		Dilution
Volume (µL)	R = h (mm)	Volume (µL)	R = h (mm)	Volume (µL)	R = h (mm)	Facteur de dilution
32	2,48	0	0	32	2.48	0
31,5	2,47	0,5	0,62	32	2.48	1/64
31	2,46	1	0,78	32	2.48	1/32
30	2,43	2	0,98	32	2.48	1/16
28	2,37	4	1,24	32	2.48	1/8
24	2,25	8	1,56	32	2.48	1/4
16	1,97	16	1,97	32	2.48	1/2
0	0	32	2,48	32	2.48	1

Tableau IV-1 : Dimensions des chambres de la carte pour réaliser une gamme de dilution pour un test ELISA.

Cette gamme comprend 8 chambres dans la direction Y avec des volumes variant entre 0,5 µL et 32 µL contrairement à la gamme précédente qui contenait 6 chambres avec des volumes variant entre 6 et 30 µL. Malgré ces modifications, l'adressage pneumatique et la programmation des étapes restent identiques grâce à l'actionnement parallélisé. Ils ne seront donc pas décrits ici.

IV.1.2. Validation fluïdique

La Figure IV-2 représente les différentes étapes du protocole, visualisées à l'aide de colorants en suivant le principe de fonctionnement expliqué précédemment. Ces images montrent un remplissage complet des chambres ainsi qu'une vidange complète, ce qui présume une bonne précision sur les ratios obtenus.

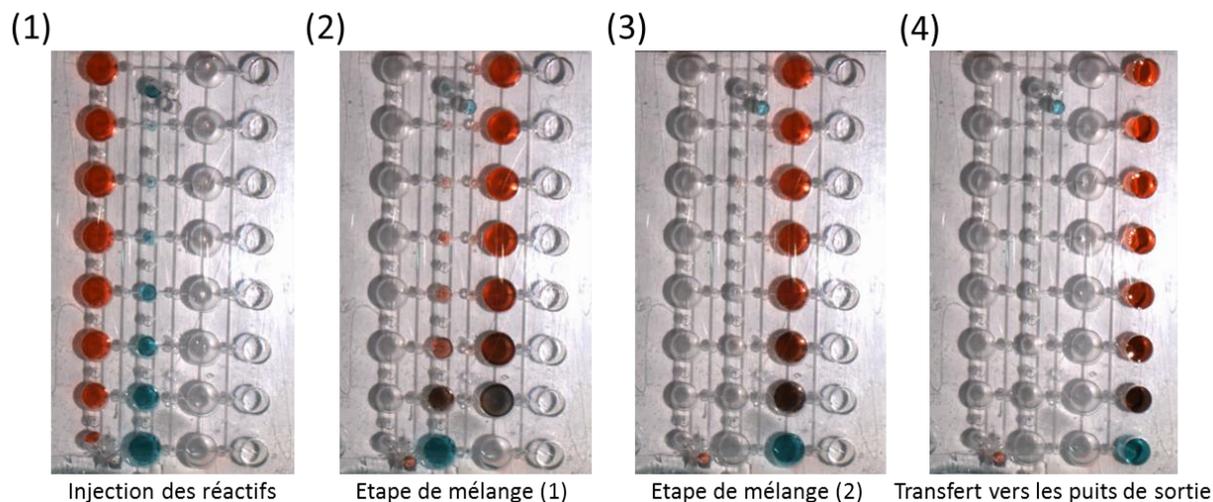


Figure IV-2: Visualisation des étapes pour réaliser la gamme de dilution.

IV.1.3. Validation quantitative

Ces différentes étapes sont ensuite réalisées de la même manière avec du bleu de bromophénol pour valider quantitativement la gamme de dilution avec une mesure d'absorbance comme pour la gamme précédente. Les expériences sont répétées 5 fois sur la même carte. La Figure IV-3 montre que la relation entre l'absorbance et les facteurs de dilution est fortement linéaire ($R^2=0.9995$). La carte reste donc fonctionnelle malgré les modifications apportées en termes de volumes et de nombre de chambres.

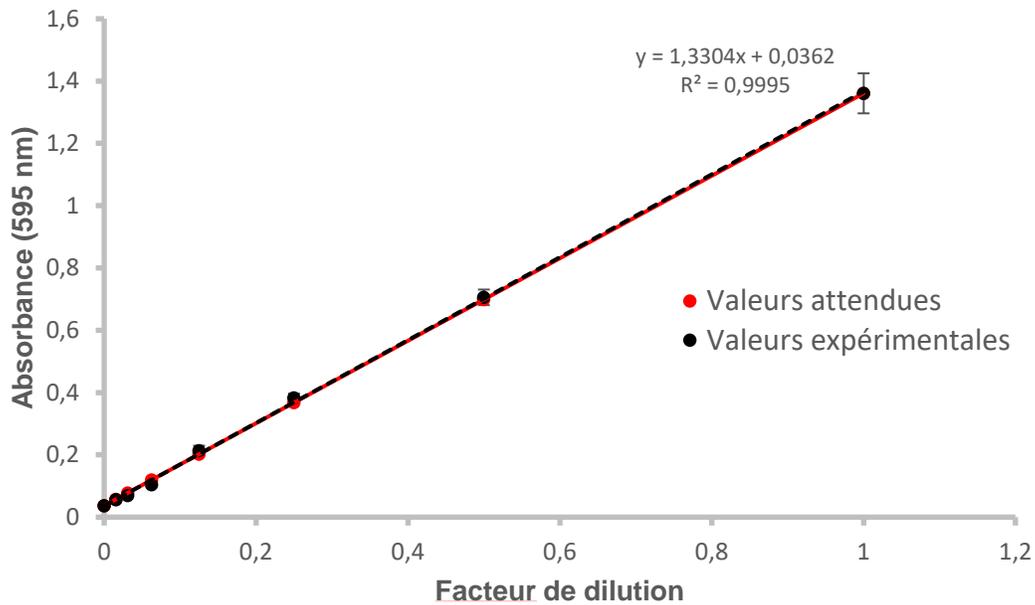


Figure IV-3: Valeurs d'absorbance moyenne pour les solutions diluées à l'aide de la carte microfluidique (moyenne de 5 expériences).

Les valeurs données par le TECAN sont représentées dans le Tableau IV-2. Des mesures d'écart-type et de moyenne sont également effectuées pour calculer le coefficient de variation sur les 5 expériences. Les coefficients obtenus varient entre 3,5 et 7,5%, ce qui montre que les expériences sont reproductibles.

	0	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
Exp 1	0,038	0,059	0,066	0,099	0,191	0,368	0,707	1,322
Exp 2	0,034	0,058	0,073	0,106	0,203	0,380	0,725	1,432
Exp 3	0,039	0,056	0,071	0,106	0,225	0,404	0,723	1,417
Exp 4	0,037		0,073	0,109	0,223	0,387	0,663	1,279
Exp 5	0,036	0,051	0,065	0,102	0,225	0,377	0,710	1,353
Gamme théorique	0,037	0,058	0,079	0,122	0,207	0,377	0,717	1,397
Moyenne des exp	0,037	0,056	0,070	0,104	0,213	0,383	0,706	1,361
Ecart-type	0,0018	0,0033	0,0039	0,0039	0,0159	0,0135	0,0251	0,0643
CV	5,01	5,86	5,59	3,73	7,47	3,51	3,55	4,73

Tableau IV-2: Valeurs d'absorbance obtenues, écart-types, moyennes et coefficients de variation pour des facteurs de dilution compris entre 1/64 et 1/2.

En comparant les valeurs attendues avec les valeurs d'absorbance mesurées, les erreurs sur les facteurs de dilution obtenus peuvent alors être estimées (Tableau IV-3).

Facteur de dilution	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2
Coefficients attendus	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5
Coefficients obtenus	0,014 ± 0,003	0,025 ± 0,003	0,051 ± 0,004	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,5 ± 0,01

Tableau IV-3 : Ecart entre les coefficients de dilution attendus et les coefficients de dilution obtenus avec la carte microfluidique.

Les coefficients de dilution obtenus avec la carte microfluidique sont proches des valeurs attendues avec des erreurs comprises entre 0,001 et 0,01. Ces résultats montrent l'efficacité de cette carte microfluidique à réaliser une gamme de dilution pour un test ELISA. Le développement d'une gamme de dilution plus complexe c'est-à-dire avec plus de chambres et des ratios de volumes plus importants ne pose donc pas de difficultés avec l'architecture X-Y et les chambres à volume variable.

IV.2. Test ELISA en phase homogène

Le principe du test ELISA en phase homogène a été expliqué dans le chapitre I section I.1.2(ii). Ce test présente un protocole simplifié sans étapes de fonctionnalisation de surface ni d'étapes de lavage. Deux kits utilisant des technologies différentes sont alors étudiés : le test AlphaLisa de chez Perkinelmer et le test utilisant le principe du FRET de chez Cisbio. Pour quantifier les résultats sans développer un banc optique dédié, nous allons choisir le test de chez Cisbio dont la détection est compatible avec le TECAN infinite M1000 du laboratoire, ce qui n'est pas le cas du protocole AlphaLisa.

IV.2.1. Protocole

Parmi les kits existants, le kit sélectionné est le n°62SGLPEF permettant de mesurer la concentration du glucagon d'un échantillon de sérum. Le protocole pour ce test est représenté en Figure IV-4.

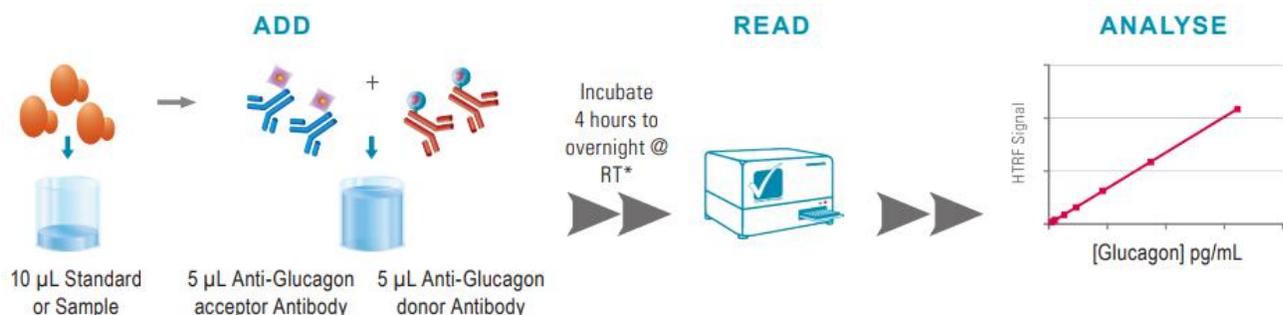


Figure IV-4: Protocole pour le test ELISA homogène Cisbio pour le glucagon.

Ce test doit être effectué dans des plaques 384 puits blanches. La première étape consiste à préparer la gamme de dilution (Figure IV-5). Le kit recommande de préparer les solutions suivantes :

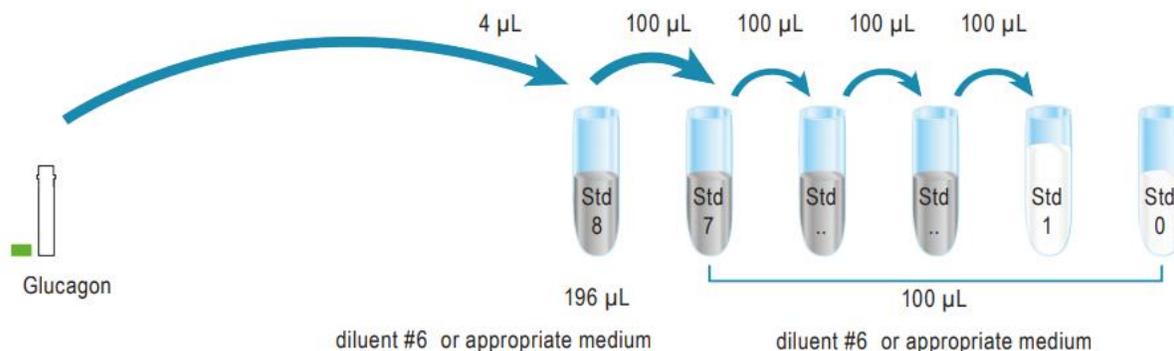


Figure IV-5: Préparation d'une gamme de dilution pour le test du glucagon.

La méthode de dilution conseillée par le kit est une dilution en cascade. La première dilution correspond à un facteur 1/50 puis à chaque étape, la solution précédente est diluée par deux. Les solutions à préparer selon les recommandations du kit sont représentées dans le Tableau IV-4.

Solution standard	Dilutions	Concentration (pg/mL)	Facteur de dilution
Solution stock	Solution stock	100 000	1
Standard 8	4 µL de solution stock + 196 µL de diluant	2000	1/50
Standard 7	100 µL de standard 8 + 100 µL de diluant	1000	1/100
Standard 6	100 µL de standard 7 + 100 µL de diluant	500	1/200
Standard 5	100 µL de standard 6 + 100 µL de diluant	250	1/400
Standard 4	100 µL de standard 5 + 100 µL de diluant	125	1/800
Standard 3	100 µL de standard 4 + 100 µL de diluant	62,5	1/1600
Standard 2	100 µL de standard 3 + 100 µL de diluant	31,25	1/3200
Standard 1	100 µL de standard 2 + 100 µL de diluant	15,6	1/6400
Standard 0	100 µL de standard 1 + 100 µL de diluant	0	0

Tableau IV-4 : Solutions à préparer pour réaliser la gamme de dilution en suivant les recommandations du kit.

Pour la suite du protocole, 10 µL d'échantillon ou de solution standard sont nécessaires. Ensuite, 5 µL d'anti glucagon d2 et 5 µL d'anti glucagon Tb²⁺ sont ajoutés. Puis, il y a une étape d'incubation de 4h à température ambiante. Enfin, pour la détection, les paramètres représentés en Figure IV-6 sont utilisés.

Measurement	Donor emission	Acceptor emission
Plate	[COS384fw.pdf]	[COS384fw.pdf]
Mode	Fluorescence Top	Fluorescence Top
Excitation Wavelength	317 nm	317 nm
Excitation Bandwidth	20 nm	20 nm
Emission Wavelength	620 nm	665 nm
Emission Bandwidth	10 nm	10 nm
Gain	optimal	optimal
Number of Flashes	50-125	50-125
Flash Frequency	100 Hz	100 Hz
Integration Time	500 µs	500 µs
Lag Time	60 µs	60 µs
Settle Time	0 ms	0 ms
Z-Pos.	calculated from well	Same as Label 1

Figure IV-6: Paramètres pour mesurer un signal HTRF donné par la société Cisbio sur le TECAN Infinite M1000 [105].

Il s'agit de paramètres optimisés pour la détection du test ELISA utilisant un signal HTRF. Deux mesures sont effectuées à une longueur d'onde d'excitation de 317 nm : une mesure à une longueur d'onde d'émission de 620 nm et une à 665 nm. Le ratio suivant doit alors être calculé :

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Signal 665 nm}}{\text{Signal 620 nm}} \times 10^4 \quad (\text{IV.1})$$

Ce ratio correspond à l'émission de l'anticorps accepteur sur l'émission de l'anticorps donneur. Ensuite, le coefficient delta F, qui correspond au rapport du signal sur le bruit, est calculé.

$$\text{Delta F (\%)} = \frac{\text{Ratio (solution standard ou échantillon)} - \text{Ratio (contrôle négatif)}}{\text{Ratio contrôle négatif}} \times 100 \quad (\text{IV.2})$$

IV.2.2. Adaptation du protocole de test ELISA en phase homogène

Pour intégrer le test ELISA en phase homogène décrit précédemment, le protocole doit être adapté aux volumes d'une carte microfluidique. Pour simplifier l'étape de préparation de la gamme de dilution, la solution de référence correspondant à la solution fournie par le kit va être diluée 50 fois avant son injection dans la carte. La gamme de dilution en carte sera réalisée à partir de cette solution prédiluée (Tableau IV-5). De plus, par rapport au protocole initial, la solution de concentration égale à 16,5 pg/mL va être supprimée. En effet, un ratio de 128 impliquerait des

chambres trop petites et semble difficile à atteindre sans remettre en cause les règles de dimensionnement.

Solution standard	7	6	5	4	3	2	1	0
Concentration (pg/mL)	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	0
Facteur de dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0

Tableau IV-5 : Solutions à préparer dans la carte microfluidique pour la gamme de dilution.

Ces différentes solutions vont être préparées en mélangeant les volumes suivants dans la carte microfluidique développée (Tableau IV-6).

Solution standard	7	6	5	4	3	2	1	0
Eau (µL)	15	63	48,4	37,5	26,3	15	10	0
Glucagon (µL)	0	1	1,6	2,5	3,8	5	10	15

Tableau IV-6 : Volumes utilisés dans la carte microfluidique pour préparer les solutions de la gamme de dilution.

Pour effectuer la suite du protocole, un volume de 10 µL de chaque solution de référence doit être prélevé. Cette étape d'aliquotage, déjà présente et validée dans le protocole de test enzymatique permet de poursuivre le protocole avec un volume adapté. La suite du protocole ne va pas être modifiée car les volumes d'anticorps nécessaires (5 µL) sont facilement intégrables.

IV.2.3. Dimensionnement

La carte développée pour intégrer le test ELISA en phase homogène est présentée dans la Figure IV-7. Cette carte est très semblable à la carte du test enzymatique mais va comporter deux principales différences.

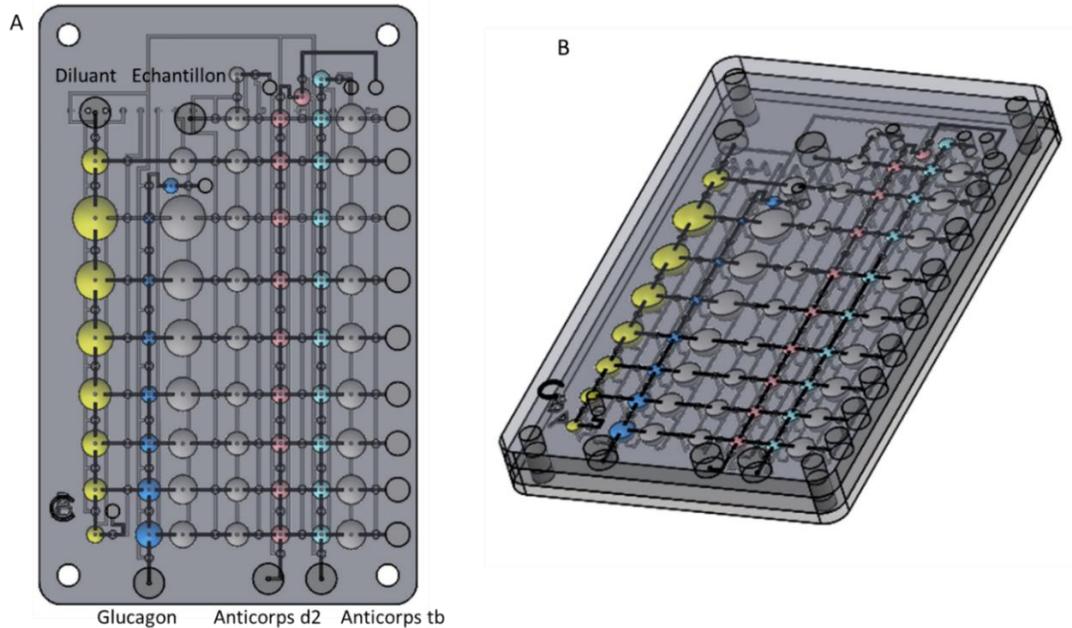


Figure IV-7: Architecture de la carte permettant de réaliser un test ELISA en phase homogène pour le glucagon. (A) Vue de face, (B) vue en perspective.

Pour améliorer la précision de cette gamme, le volume de la plus petite chambre va être augmenté à 1 μL au lieu de 0,5 μL . Cette modification impose l'intégration d'une chambre de dilution de 64 μL ce qui augmente sensiblement l'espace occupé notamment suivant la direction X (horizontale). Pour que la taille de l'architecture reste compatible avec le format d'une carte de crédit, le volume des chambres de mélange va être adapté pour certains facteurs de dilution. Ainsi, les volumes importants de chambres sont utilisés uniquement pour les grands ratios. La colonne d'aliquotage permettra de rééquilibrer les volumes prélevés pour poursuivre le protocole sur un même volume de solution à tester.

Une deuxième différence dans cette architecture vient du fait qu'il n'y a pas de chambres de mélange entre les deux colonnes d'anticorps. En effet, dans le protocole, il n'y a pas d'étape d'incubation avant d'effectuer le deuxième mélange. Les deux mélanges peuvent donc s'effectuer consécutivement sans stockage intermédiaire ce qui permet de supprimer une colonne de chambres de mélange et de gagner de l'espace sur la carte.

Ces deux modifications sont nécessaires pour pouvoir dessiner l'ensemble du protocole dans le format d'une carte de crédit et de rester ainsi compatible avec le banc expérimental et l'instrument qui sera développé. Cependant, il en résulte une modification de l'adressage pneumatique et de la programmation fluide qui seront présentés dans les sections IV.2.4 et IV.2.5.

L'architecture comprend les éléments suivants :

- La colonne 1 pour calibrer les différents volumes de diluant

- La colonne 2 pour calibrer des volumes de glucagon
- La colonne 3 pour mélanger les volumes calibrés de diluant et de glucagon
- La colonne 4 pour aliquoter les solutions à 10 μL et injecter l'échantillon
- La colonne 5 pour calibrer les volumes d'anticorps d2 à 5 μL
- La colonne 6 pour calibrer les volumes d'anticorps tb à 5 μL
- La colonne 7 pour mélanger les anticorps
- La colonne 8 pour récupérer les solutions dans des puits de sortie

Les dimensions des chambres sont présentées dans le Tableau IV-7.

Colonne 1: Diluant		Colonne 2: glucagon		Colonne 3: mélange		Colonne 4: aliquotage		Colonne 5: anticorps d2		Colonne 6: anticorps tb	
Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)
15	1,93	0,0	0,00	15	1,93	10	1,7	5	1,34	5	1,34
63	3,22	1,0	0,78	64	3,25	10	1,7	5	1,34	5	1,34
48,4	2,85	1,6	0,91	50	2,88	10	1,7	5	1,34	5	1,34
37,5	2,62	2,5	1,06	40	2,67	10	1,7	5	1,34	5	1,34
26,3	2,32	3,8	1,21	30	2,43	10	1,7	5	1,34	5	1,34
15,0	1,93	5,0	1,34	20	2,12	10	1,7	5	1,34	5	1,34
10,0	1,68	10,0	1,68	20	2,12	10	1,7	5	1,34	5	1,34
0,0	0,00	15,0	1,93	15	1,93	10	1,7	5	1,34	5	1,34

Tableau IV-7: Dimensions de la carte pour intégrer un test ELISA homogène pour le glucagon.

Cette carte va être validée qualitativement à l'aide de colorants puis quantitativement avec les réactifs biologiques. Avant de présenter ces résultats, l'adressage pneumatique et la programmation de la carte vont être détaillés.

IV.2.4. Adressage pneumatique

L'adressage pneumatique est représenté sur la Figure IV-8. Cette architecture nécessite 6 électrovannes pour piloter les colonnes de vannes et 7 électrovannes pour piloter les colonnes de chambre. Pour limiter le nombre d'actionneurs, toutes les vannes V_x sont pilotées ensemble.

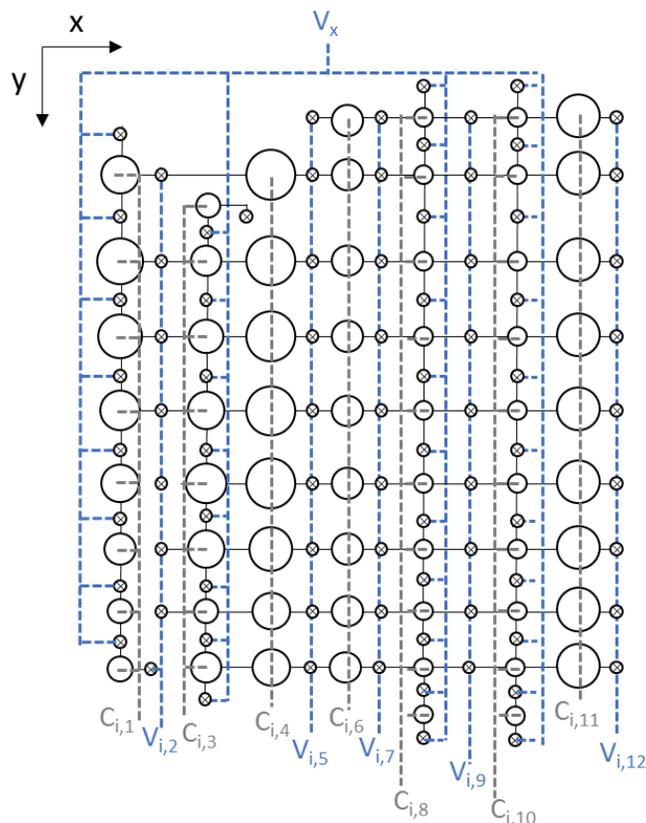


Figure IV-8 : Vue schématique du dessus de la carte représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres.

Une autre modification dans cette version concerne l'injection de l'échantillon. Dans l'architecture du test enzymatique, l'échantillon était injecté dès le début du protocole. Cela impliquait alors d'ouvrir les chambres $C_{i,6}$ dès le début du protocole ce qui présentait un risque de fuite lors de l'étape de dilution. Pour éviter cela, un changement de connexion de la vanne d'entrée de l'échantillon a été apporté. Par conséquent, cette vanne n'est plus connectée aux vannes V_x mais aux vannes $V_{i,5}$ qui s'ouvrent au début de la phase d'aliquotage.

IV.2.5. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.

L'intégration du protocole complet de test ELISA homogène dans la carte microfluidique nécessite cinq grandes phases :

- Calibration des volumes (eau, glucagon, anticorps) (1)
- Mélange (gamme de dilution) (2)
- Aliquotage et injection de l'échantillon (3)

- Mélange (2 anticorps) (4)
- Transfert vers les puits de sortie

Les principales étapes du protocole sont représentées de manière schématique en Figure IV-9.

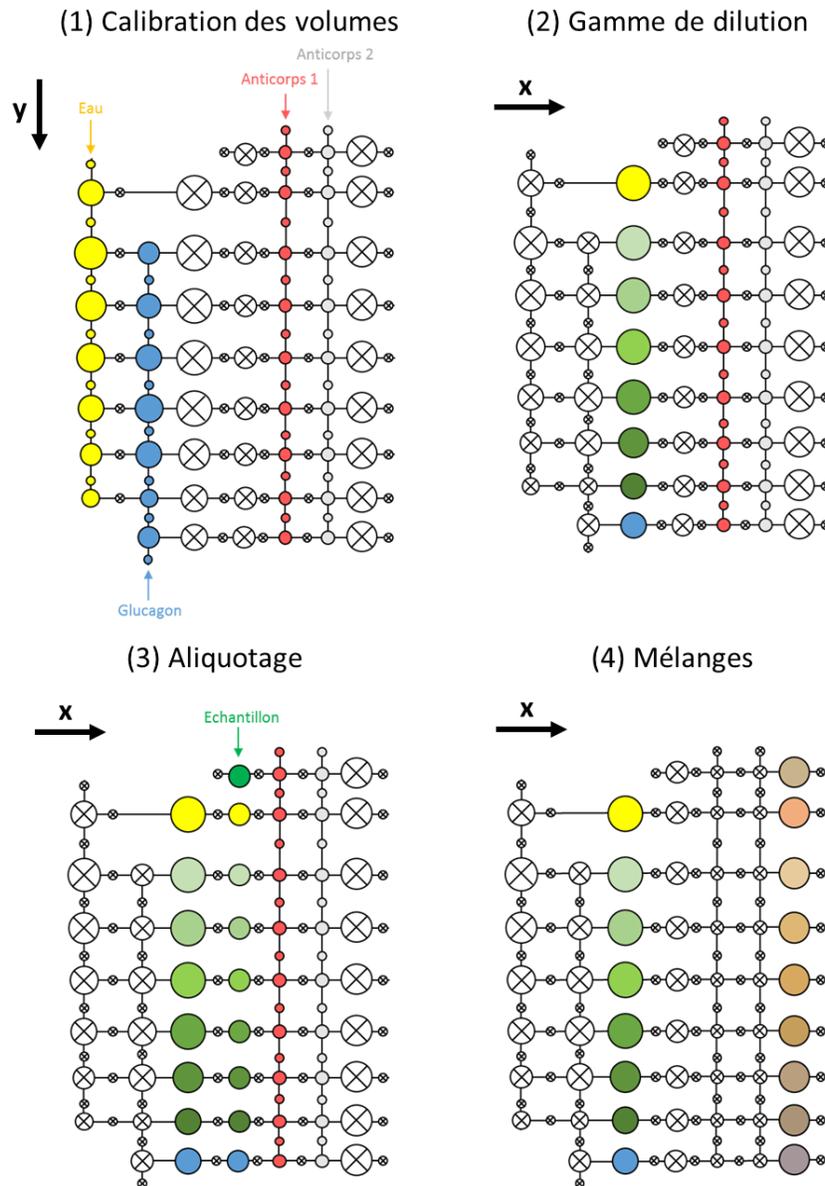


Figure IV-9 : Principales étapes du test ELISA en phase homogène dans une carte microfluidique.

Comme expliqué précédemment, les réactifs sont tous injectés suivant les colonnes $C_{i,1}$, $C_{i,3}$, $C_{i,8}$, $C_{i,10}$ dès le début du protocole sauf l'échantillon qui est injecté lors de la phase d'aliquotage. L'injection des réactifs s'effectue à l'étape 1 reporté dans le Tableau IV-8. Les colonnes $C_{i,1}$ et $C_{i,3}$ sont mélangées

dans $C_{i,4}$ pendant la première phase de mélange. L'aliquotage permet de former des volumes de 5 μL dans chacune des chambres de la colonne $C_{i,6}$.

Enfin, une seconde phase de mélange permet de transférer les solutions de 5 μL et celles des deux anticorps dans les colonnes $C_{i,8}$ et $C_{i,10}$ vers la colonne $C_{i,11}$. Au final, les solutions sont transférées après une incubation vers les puits de sortie en ouvrant les vannes $V_{i,12}$ et en refermant les chambres $C_{i,11}$. On peut noter que la colonne $C_{i,4}$ reste ouverte en permanence après l'aliquotage, pour éviter qu'une chambre contenant du liquide soit en surpression pendant toute la durée du protocole et ainsi éviter un transfert de fluide entre ces différentes vannes.

Phase	Etape	V_x	$C_{i,1}$	$V_{i,2}$	$C_{i,3}$	$C_{i,4}$	$V_{i,5}$	$C_{i,6}$	$V_{i,7}$	$C_{i,8}$	$V_{i,9}$	$C_{i,10}$	$C_{i,11}$	$V_{i,12}$
Calibration des volumes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Mélanges	3	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
	4	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
	5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
	6	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Aliquotage	7	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	8	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
	10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Mélanges	11	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	12	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
	13	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
	14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0
	15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
	16	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Transfert	17	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	19	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau IV-8: Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour le test ELISA en phase homogène.

Au total, 19 étapes sont nécessaires à la réalisation d'un protocole ELISA en phase homogène dans une carte microfluidique. Ce protocole comprend 6 étapes de moins que le test enzymatique. En effet, il possède une étape d'incubation en moins, ce qui a permis de supprimer une colonne et des étapes. La durée du protocole dans la carte est alors de l'ordre de la minute sans compter l'étape d'incubation de 4h.

IV.2.6. Validation du protocole de test ELISA en phase homogène dans une carte microfluidique

L'architecture du test ELISA en phase homogène est l'architecture la plus complète réalisée jusqu'à présent. Le dessin des cartes illustre bien que la limite du format d'une carte de crédit est quasiment atteinte. D'un point de vue technologique, il peut y avoir un risque de placer des chambres trop près des bords de cartes. Par ailleurs, vu le nombre important de chambres et de vannes, la surface de collage de l'adhésif se trouve réduite. Enfin, de manière générale, l'augmentation du nombre de vannes et de chambres présente un risque du point de vue de l'assemblage. Si une vanne reste bouchée, ou si une fuite apparaît sur une chambre alors la carte ne sera pas fonctionnelle ou donnera un mauvais résultat d'où la nécessité de tester la carte en utilisant par exemple la méthode de visualisation avec des colorants.

(i) Validations fluidiques

Les premières validations montrent un dysfonctionnement au niveau du remplissage des chambres dans la direction Y. Les écoulements semblent en effet bloqués. Pour comprendre ce problème, les vannes sont observées à l'aide d'une loupe binoculaire.

La Figure IV-10A représente les vannes d'une même colonne et la Figure IV-10B, leur emplacement sur une carte.

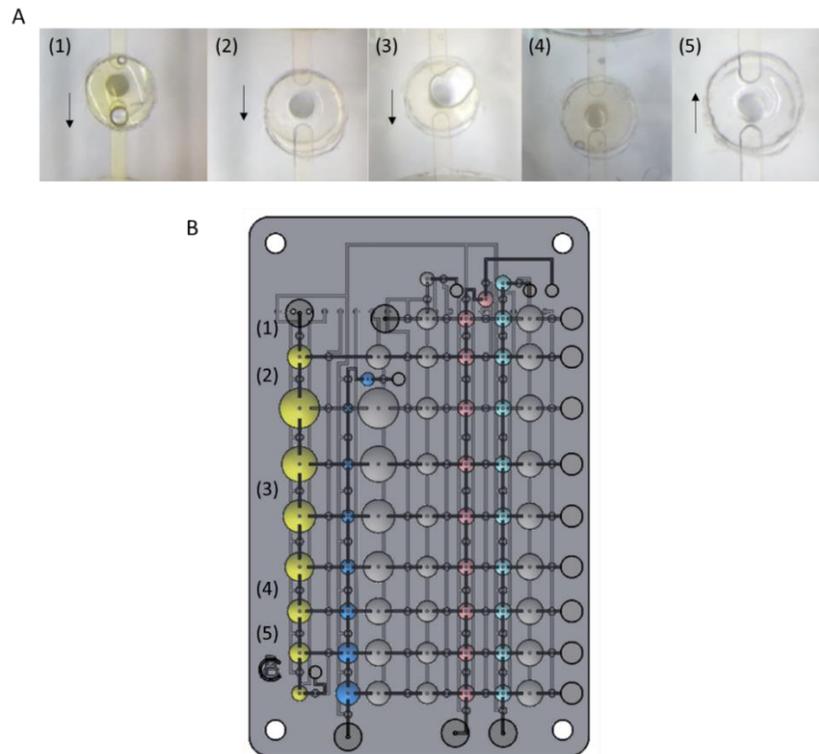


Figure IV-10: A : décalage de l'adhésif au niveau des vannes sur une même colonne, B : emplacement des vannes représentées.

Les découpes de l'adhésif au niveau des vannes situées sur les bords présentent un décalage par rapport aux motifs usinés sur les cartes. Le décalage n'est pas dans le même sens pour les vannes du haut ((1) et (2)) et celles du bas de la carte ((4) et (5)). Seule la vanne située au milieu de la carte (3) est superposée à la découpe. Pour rappel, l'adhésif est positionné à l'aide d'un support d'alignement et ne peut pas être étiré. Il ne s'agit donc pas d'un problème d'alignement au moment du montage des cartes mais d'un problème d'imprécision de fabrication. La précision de la machine d'usinage (Datron) ne peut pas être remise en cause, c'est donc la machine de découpe d'adhésif. En effet, après découpe, les dimensions du contour de l'adhésif ont été mesurées et paraissent plus grandes que celle des cartes dans la direction Y.

Ce décalage provient donc du manque de précision de la machine en Y. Il faut préciser que la machine de découpe utilise une méthode d'entraînement par rouleau pour l'adhésif suivant une première direction, et un principe d'entraînement par courroie crantée pour l'outil de découpe suivant une deuxième direction. La méthode d'entraînement suivant la première direction nous paraît moins précise que la méthode d'entraînement suivant la deuxième direction. Or, il se trouve que les adhésifs sont découpés en position portrait ce qui implique d'orienter la plus grande longueur du dessin des cartes vers la direction la moins précise. Pour contourner ce problème, l'adhésif d'une carte initialement découpé en mode portrait sera donc découpé en mode paysage. L'idée est donc d'orienter

le dessin de cartes dans la direction de découpe la plus précise. De plus, pour limiter les risques de mauvais alignements, les canaux fluidiques sont allongés de 0,1 mm (Figure IV-11). Ainsi, il est possible de relâcher les tolérances sur l'alignement.

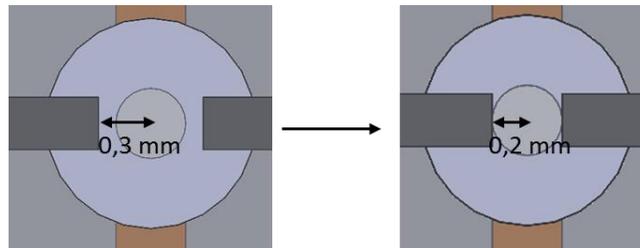


Figure IV-11: Dimensions de l'espace entre l'arrivée du canal fluide et le centre de la vanne.

La Figure IV-12 montre les principales étapes du protocole du test ELISA en phase homogène avec des colorants dans la carte microfluidique. Sur ces images, le diluant (eau) est représenté par un colorant jaune, le glucagon par un colorant bleu, l'échantillon par un colorant vert, les anticorps d2 par un colorant rouge et enfin les anticorps tb par de l'eau non colorée. Ces images montrent que les différentes opérations se déroulent correctement. L'injection de l'échantillon lors de la phase d'aliquotage ne pose pas de problème et permet d'éviter les fuites pendant la phase de réalisation de la gamme de dilution.

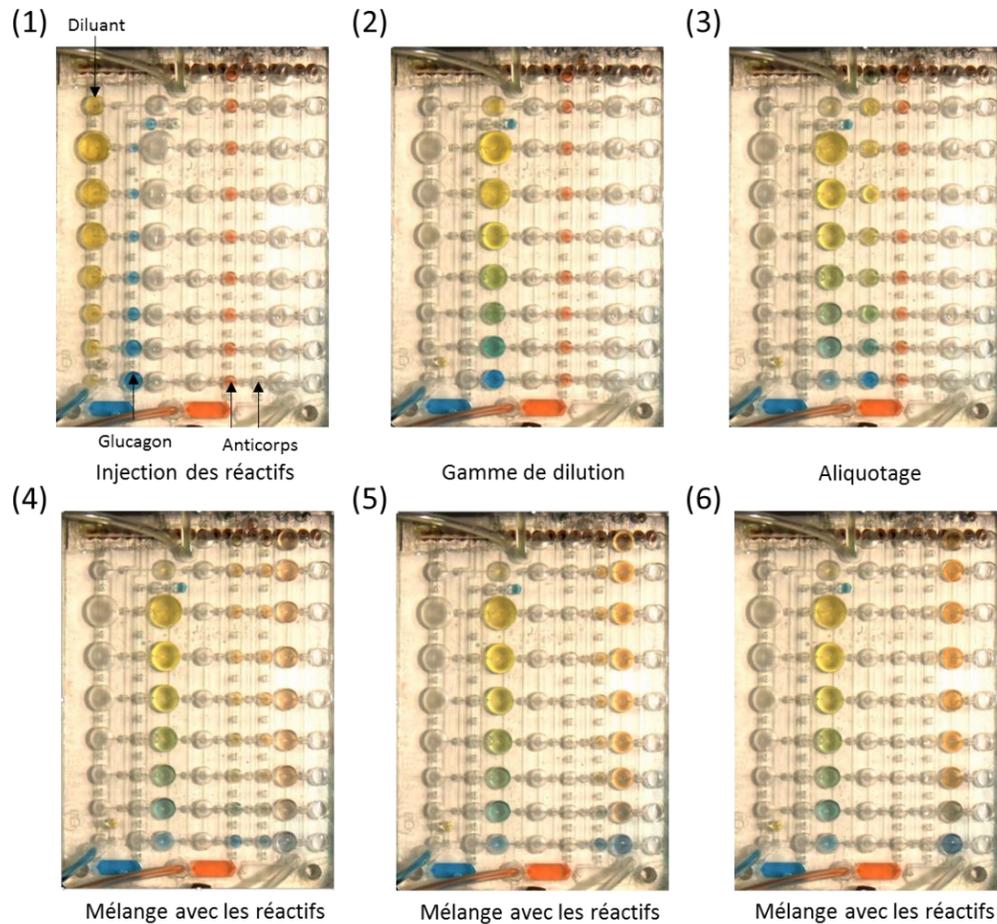


Figure IV-12: Validation qualitative des étapes du protocole du test ELISA en phase homogène.

(ii) Validations quantitatives

Suite aux validations qualitatives avec des colorants, la carte microfluidique peut être utilisée pour effectuer un test ELISA homogène pour le glucagon. Pour rappel, les étapes du protocole dans la carte sont les suivantes :

- Injection du glucagon, de l'eau et des anticorps
- Mélange des solutions de glucagon et de l'eau pour préparer la gamme de dilution
- Aliquotage de ces solutions à 10 μL et injection de l'échantillon
- Mélange des solutions de références et de l'échantillon avec les anticorps
- Incubation de 4h
- Lecture au TECAN du signal HTRF à 665 nm et à 620 nm

L'échantillon est représenté ici par une solution de glucagon de concentration égale à 1000 pg/mL . Pour quantifier les résultats, 15 μL sont prélevés dans les puits de sortie et injectés dans une plaque

384 puits blanche (Corning, CLS3824BC). Le signal HTRF est ensuite mesuré en utilisant les paramètres détaillés précédemment (voir section IV.2.1).

La courbe de calibration est alors obtenue en traçant le signal HTRF en fonction de la concentration des solutions de référence en glucagon (Figure IV-13).

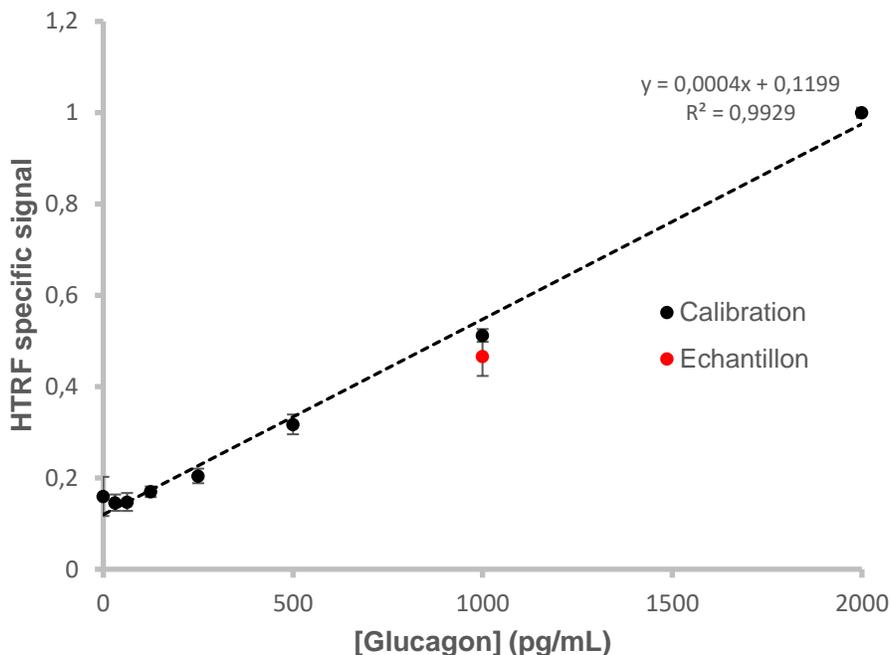


Figure IV-13: Mesure du signal HTRF en fonction de la concentration en glucagon (moyennes sur trois points).

En utilisant cette courbe, la valeur mesurée pour l'échantillon est de 866 pg/mL \pm 150 pg/mL, au lieu de 1000 pg/mL. La source de cette erreur pourrait provenir de la sensibilité de la détection mais aussi des opérations de pipetage de faibles volumes nécessaires pour transférer les solutions de la carte vers la plaque micropuits. L'expérience est effectuée trois fois et se révèle reproductible au vu des faibles barres d'erreurs. Contrairement au test enzymatique abordé dans le chapitre III, des problèmes de compatibilité entre les matériaux et les réactifs n'ont pas été observés.

IV.3. Bilan de la validation du test ELISA en phase homogène

Cette première validation montre la possibilité de réaliser un test ELISA en phase homogène en utilisant une architecture en X-Y combinée à un actionnement de chambres à volume variables. Toutes les opérations nécessaires au protocole peuvent être automatisées grâce au système développé et de plus, une courbe de calibration est fournie au cours de l'analyse. Une des principales difficultés

a été d'augmenter la taille et le nombre de chambres à intégrer tout en gardant un format de carte de crédit et une technique d'assemblage fonctionnelle. Pour cela, la méthode de dimensionnement a été modifiée.

Les tests ELISA homogènes sont très prometteurs pour simplifier l'intégration et l'automatisation de tests immunologiques dans des systèmes microfluidiques. Cependant, ces tests sont encore peu répandus et ne sont pas encore adaptés pour des applications de type « point of care ». En effet, la famille de tests ELISA homogène proposée par Cisbio présente une grande variété de kits et de cibles mais les échantillons compatibles avec ces tests sont souvent des cellules et non des échantillons facilement accessibles tels que du sérum. Les applications des tests proposés concernent le domaine de la recherche et ne sont pas toujours qualifiés pour le diagnostic médical. Il n'est donc pas possible d'utiliser à l'heure actuelle les kits proposés Cisbio pour des tests de terrain. Le test Alphasisa, un autre test ELISA en phase homogène a également été envisagé mais la détection semblait complexe. Des lasers puissants sont nécessaires ce qui compromet la portabilité souhaitée du système final.

Pour toutes ces raisons, nous avons souhaité étudier les tests ELISA en phase hétérogène malgré la complexité du protocole. Ces tests sont bien plus répandus dans le domaine des analyses biologiques et sont considérés comme des tests de références. Les échantillons utilisés sont facilement accessibles (sérum, sang total, urine...) et de plus la détection peut être colorimétrique ce qui simplifie son intégration dans un instrument portable. Sur le plan plus scientifique et technique, il est aussi intéressant d'évaluer notre système d'actionnement microfluidique pour ce type de protocole qui sera plus complexe qu'une succession de mélanges en phase homogène avec notamment des étapes de lavage.

IV.4. Test ELISA en phase hétérogène

Le principe général du test ELISA hétérogène a été présenté dans la section I.1.2(i) du chapitre I. Il existe un grand nombre de kits et le protocole peut présenter des variantes mais globalement le principe reste semblable. Nous avons choisi de nous intéresser à la famille de test ELISA en sandwich qui est la plus couramment utilisée.

Pour rappel, les étapes d'un protocole ELISA en phase hétérogène sont les suivantes (Figure IV-14).

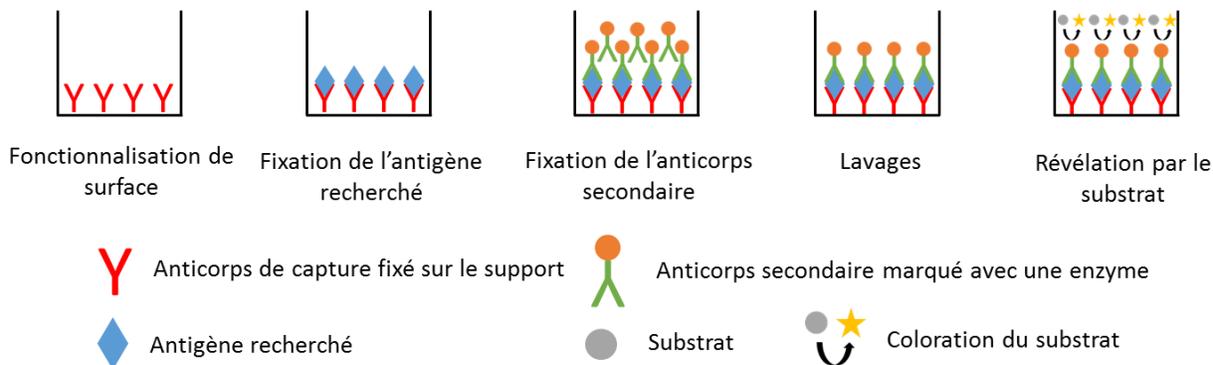


Figure IV-14 : Etapes d'un protocole ELISA en phase hétérogène.

IV.4.1. Choix du protocole

Dans la continuité de notre démarche, nous avons choisi de ne pas redévelopper de protocoles et d'utiliser directement un kit commercial de test ELISA. Cependant, cette démarche ne peut pas être aussi facilement appliquée que dans le cas des protocoles homogènes précédemment étudiés.

Les kits utilisés comprennent généralement une plaque à puits fonctionnalisée avec des anticorps de capture, un anticorps secondaire fixé à une enzyme et un substrat qui va réagir avec l'enzyme. La plaque à puits apporte une nouvelle fonction par rapport aux protocoles en phase homogène : la capture sur une phase solide. Cette surface de capture doit alors être intégrée dans les cartes pour s'affranchir de la plaque à puits. Des chambres devront donc être fonctionnalisées dans la carte microfluidique intégrant le protocole. Une autre solution serait d'utiliser des billes magnétiques fonctionnalisées. Cette deuxième voie semble plus risquée. En effet, cela implique de coupler la technologie des chambres étirables avec la manipulation de billes puis de maîtriser le greffage des billes. Il est également nécessaire d'ajouter un aimant ce qui ajoute une fonction à l'instrument à développer. Au contraire, la fonctionnalisation de surface sur les cartes est une opération qui a été auparavant validée au sein de notre environnement et ne demandera pas de développement supplémentaire. La piste des billes magnétiques est néanmoins intéressante et sera évoquée dans les perspectives.

Pour intégrer un kit commercial dans un système microfluidique, il est nécessaire de trouver et d'adapter la solution d'anticorps de capture correspondante au kit. Il est en effet important que la solution d'anticorps de capture soit différente de la solution d'anticorps secondaire (lié à l'enzyme) pour éviter que ces deux anticorps ciblent la même zone sur la protéine. Les kits commerciaux ne souhaitant généralement pas dévoiler leur savoir-faire ne précisent pas quels anticorps de capture sont utilisés pour greffer la plaque à puits et une stratégie différente va être adoptée pour contourner ce problème. La combinaison de la streptavidine et de la biotine, qui sont des protéines connues pour leur forte interaction non covalente, sera utilisée. Cette approche permet également de développer

des cartes génériques. Une même carte pourra valider différents protocoles car les étapes seront semblables quel que soit la cible à détecter.

Le choix de la cible s'est porté sur la troponine qui est une cible intéressante car il s'agit d'un biomarqueur cardiaque utilisé pour la détection d'infarctus. La difficulté est de parvenir à détecter précisément une faible présence de ce biomarqueur afin de détecter au plus tôt une atteinte cardiaque comme un infarctus. Ce choix de cible est donc bien adapté à notre système quantitatif. Le kit sélectionné est le EIATNI1 développé par AMS labs qui utilise le couplage intermédiaire sélectionné (streptavidine – biotine) pour le greffage d'anticorps.

Le protocole de chez AMS labs comprend les réactifs suivants :

- Solutions de référence de troponine I à différentes concentrations (0, 1, 3, 6, 15 et 30 ng/mL)
- Enzyme conjuguée (Anticorps monoclonaux couplés à la HRP et anticorps couplés à la biotine)
- Réactif de lavage (PBS-Tween)
- Substrat (TMB)

Les étapes du protocole sont représentées dans la Figure IV-15.

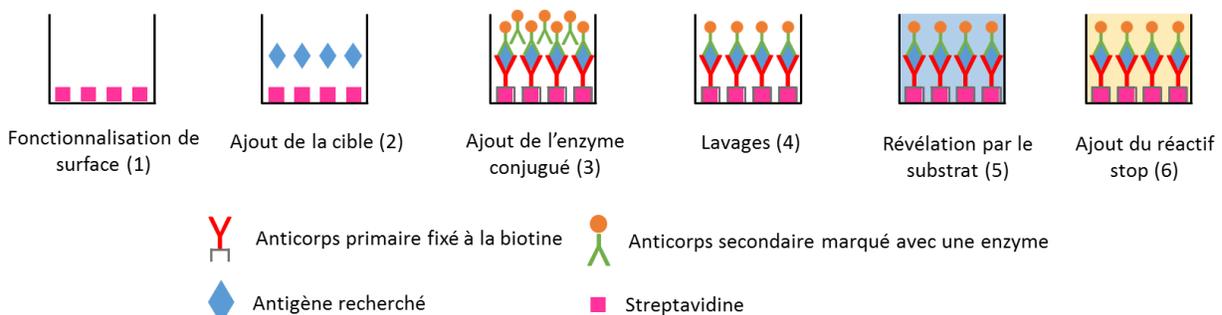


Figure IV-15 : Etapes du protocole du test ELISA en phase hétérogène pour la troponine.

Le kit fournit une plaque à puits fonctionnalisée avec de la streptavidine (1). Ensuite, l'étape suivante consiste à ajouter la solution de troponine (2) puis la solution d'enzyme (3). L'anticorps primaire peut alors se greffer sur la surface du puits par l'intermédiaire de la biotine et de la streptavidine. Des étapes de lavage sont ensuite nécessaires pour retirer les anticorps qui ne se sont pas greffés en l'absence de cible (4). Le substrat est ajouté dans l'étape suivante et se colore en bleu en présence d'enzyme et donc de la cible (5). Un dernier réactif est ajouté pour stopper la réaction (6). La coloration devient alors jaune.

IV.4.2. Démarche de développement d'une carte microfluidique pour les protocoles ELISA hétérogène.

Le développement va nécessiter plusieurs adaptations et validations préliminaires. Dans un premier temps, il est nécessaire d'analyser les possibilités d'adaptation du protocole pour faciliter l'intégration dans une carte microfluidique. Plus précisément, le protocole doit être légèrement simplifié et les volumes adaptés. C'est l'objet de la prochaine section. Une fois le protocole adapté, une analyse d'architecture permettra de dessiner la carte à réaliser et de définir sa programmation. Cette carte sera validée dans un premier temps avec des colorants. La suite de l'étude portera sur les aspects plus chimiques et biologiques. Il faudra réaliser l'étape de fonctionnalisation de la surface de capture (IV.4.8), étudier la compatibilité des matériaux avec le test (section IV.4.9(ii)), optimiser les étapes de lavage (section IV.4.10) ainsi que certaines conditions du test.

IV.4.3. Test du kit et adaptation du protocole

(i) Test du kit ELISA

Le kit ELISA va tout d'abord être testé dans la plaque à puits fournie en suivant les conditions recommandées par le protocole.

Le protocole à effectuer en plaque à puits est le suivant :

- Ajout de 25 μL de référence/échantillon
- Ajout de 100 μL d'enzymes conjuguées
- Incubation de 15 min
- Lavage : 3 fois avec 350 μL de tampon de lavage
- Ajout de 100 μL de substrat (la solution devient bleue)
- Incubation de 15 min
- Ajout de 100 μL de solution stop (la solution devient jaune)
- Mesure de l'absorbance à 450 nm.

Pour rappel, le kit fournit les solutions calibrées suivantes :

Solutions	A	B	C	D	E	F
Concentrations (ng/mL)	0	1	4	8	16	30

Tableau IV-9: Solutions calibrées fournies par le kit.

Des solutions supplémentaires sont préparées afin de mesurer plus de points sur la gamme et de tester la sensibilité du kit:

Solutions	A		B		C	D	E	F
Concentrations (ng/mL)	0	0,5	1	2	4	8	16	30

Tableau IV-10: Solutions calibrées testées pour élaborer la courbe de calibration.

Deux tests vont être effectués : un test qui va s'arrêter à l'étape du substrat (test A) et un autre qui va suivre le protocole complet (test B). Il s'agit de comparer les résultats et de voir l'influence du réactif stop qui pourrait être supprimé pour gérer un réactif en moins.

Une image de la plaque à puits à la fin des deux tests est représentée en Figure IV-16. Dans les deux cas, le dégradé de couleur est bien présent et présume le bon fonctionnement du test.

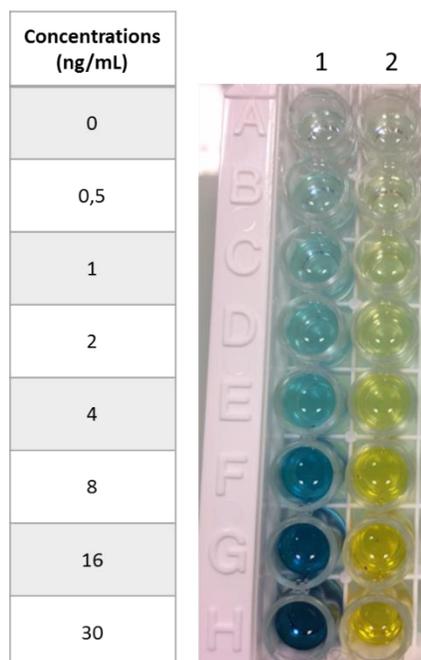


Figure IV-16: Image de la plaque à puits pour le test effectué jusqu'à l'étape de l'ajout de substrat (1) et pour le test effectué complètement (2).

Des mesures d'absorbance sont ensuite effectuées pour quantifier ces résultats (Figure IV-17). Les solutions du test A sont mesurées à 630 nm (bleu) et les solutions du test B sont mesurées à 450 nm (jaune).

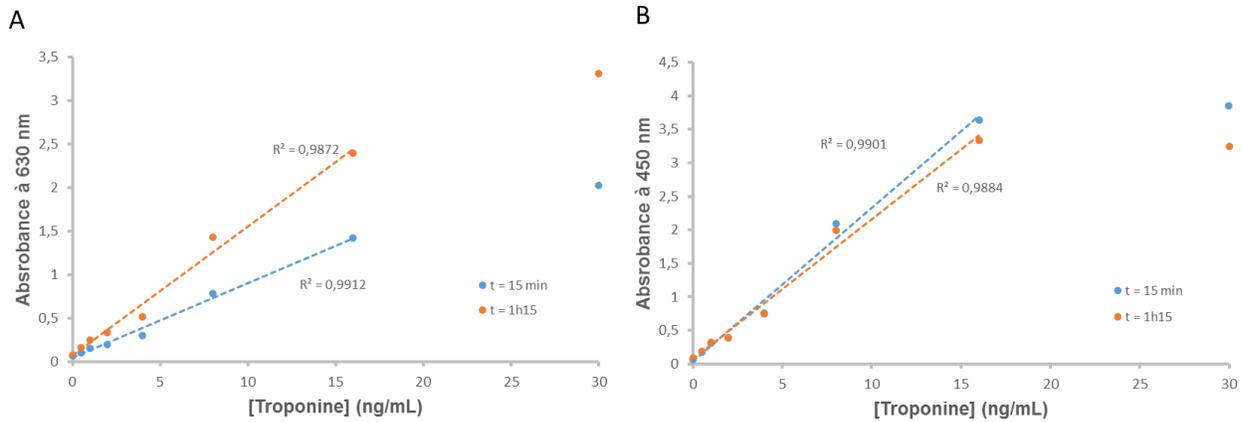


Figure IV-17: Mesures d'absorbance en fonction de la concentration en troponine. Mesures à 630 nm pour le test effectué jusqu'à l'ajout du substrat après 15 min et 1h15 (A) et mesures à 450 nm pour le test complet après 15 min et 1h15 (B).

Les deux graphiques représentent des droites pour les sept premiers points avec des coefficients de corrélation de 0,98 ou 0,99. Ensuite, le test semble saturer à 15 ng/mL. Ces deux tests sont fonctionnels. La différence entre ces deux graphiques est l'amplitude obtenue. Au bout de 15 min, l'amplitude obtenue pour le test sans réactif stop est de 2 alors qu'elle est de 3,8 pour le test avec réactif stop. Le test sans réactif stop risque donc d'être moins précis.

En augmentant le temps d'incubation à 1h15, les résultats évoluent pour le test A comme attendu et évoluent peu pour le test B. L'amplitude est alors de 3,3 pour le test sans réactif stop. Pour augmenter le signal, il est donc possible de laisser incuber plus longtemps le substrat. Cependant, il faut bien mesurer l'absorbance des solutions de référence et de l'échantillon à tester en même temps pour pouvoir comparer les résultats.

De plus, l'intégration microfluidique du réactif stop impliquerait d'ajouter une colonne. Pour simplifier l'architecture, nous avons fait le choix de s'affranchir de cette colonne. La conséquence sera une réduction de la sensibilité du test. Cette perte de signal pourrait être compensée en effectuant une phase d'incubation suffisamment longue pour atteindre un seuil de détection compatible avec les appareils de mesures mais pour un test de terrain, des temps d'incubation courts seront maintenus.

(ii) Adaptation des volumes de réactifs du protocole

La deuxième phase du travail est d'adapter les volumes de réactifs. Le kit fournit la gamme du Tableau IV-11. L'objectif est de mettre en œuvre la gamme dans la carte en choisissant les dimensions compatibles avec notre technique et validées en début de chapitre.

Solutions standards	A	B	C	D	E	F
Concentrations (ng/mL)	0	1	4	8	16	30

Tableau IV-11: Solutions de référence à tester pour élaborer une courbe de calibration.

Pour cela, les volumes suivants vont être mélangés dans la carte microfluidique développée (Tableau IV-12). Les concentrations diffèrent légèrement des solutions de référence fournies par le kit pour simplifier le calcul des volumes à mélanger mais l'amplitude de la gamme est inchangée.

Solutions standards	A	B	C	D	E	F
Eau (μL)	10	29	18	8	5	0
Troponine (μL)	0	1	2	2	5	10
Facteur de dilution	0	1/30	1/10	1/5	1/2	1
Concentrations (ng/mL)	0	1	3	6	15	30

Tableau IV-12: Volumes utilisés dans la carte microfluidique pour préparer les solutions de la gamme de dilution pour le test ELISA hétérogène pour la troponine.

La suite du protocole va être également adaptée. Les expériences précédentes ont montré que le réactif stop pouvait être supprimé. Ainsi, le protocole peut se limiter aux étapes suivantes :

- Ajout de 25 μL de référence/échantillon
- Ajout de 100 μL d'enzymes conjuguées
- Incubation de 15 min
- Lavage : 3 fois avec 350 μL de tampon de lavage
- Ajout de 100 μL de substrat (la solution devient bleue)
- Incubation de 15 min
- Mesure de l'absorbance à 630 nm

Une étape d'aliquotage est nécessaire après la formation de la gamme de dilution. Afin d'intégrer ces étapes dans une carte microfluidique, tous les volumes vont être divisés par 5 à l'exception du volume du réactif de lavage qui sera réduit à 20 μL pour éviter de stocker des volumes de 70 μL (350 μL divisé par 5) sur la carte.

Le protocole devient alors :

- Ajout de 5 μL de référence/échantillon
- Ajout de 20 μL d'enzymes conjuguées
- Incubation de 15 min
- Lavage : n fois avec 20 μL de tampon de lavage
- Ajout de 20 μL de substrat (la solution devient bleue)

- Incubation de 15 min
- Mesure de l'absorbance à 630 nm

Le nombre de lavages (n) devra être testé pour obtenir un lavage efficace dans la carte.

IV.4.4. Dimensionnement

Suite au choix des volumes mis en jeux, la carte microfluidique peut être développée. Le nombre de réactifs à gérer est plus important que le test ELISA en phase homogène. Cinq réactifs sont nécessaires au protocole au lieu de quatre pour le test précédent. De plus, les volumes sont plus importants. Il est donc nécessaire d'optimiser l'architecture pour qu'elle soit adaptée à la taille d'une carte de crédit. Le protocole comporte également des étapes de lavage qu'il va falloir gérer dans la carte microfluidique. Une des conséquences sera l'ajout d'une sortie permettant d'évacuer tous les réactifs ainsi que le tampon de lavage vers une poubelle commune.

Différentes architectures ont été évaluées dans le but de minimiser le nombre de colonnes. Ainsi, il y a un intérêt de coupler sur une même colonne le réactif de lavage et l'enzyme. Les trois architectures les plus intéressantes sont présentées ci-dessous. Elles sont dessinées dans leur totalité avec le logiciel SolidWorks afin d'analyser et comparer leur implantation dans le format de type carte de crédit (Figure IV-18).

L'architecture A comporte une solution de référence de moins que les autres qui correspond à la solution la plus diluée et donc à la ligne qui comporte les plus grandes chambres. Cette architecture permet de gagner de l'espace dans les deux directions et donc de laisser un espace suffisant entre le bord de la carte et les premiers motifs de canaux ou de chambres (3,6 et 1,8 mm).

L'architecture B contient toutes les solutions de références à tester, elle est donc plus complète. Cette architecture présente néanmoins le défaut de comporter des motifs très proches du bord (3,5 et 1,5 mm) ce qui est risqué d'un point de vue technologique pour l'assemblage du film étirable.

Enfin, l'architecture C regroupe sur une même colonne les trois réactifs suivants : enzyme, lavage et substrat ce qui augmente la distance entre les motifs et les bords de la carte (4,72 et 5,16 mm). Ce dernier choix est très risqué pour l'application car la colonne de substrat n'est pas séparée de la colonne d'enzyme. Or, il est très important que le substrat ne rencontre pas la solution de d'enzyme pour éviter toute contamination qui entrainerait une coloration non spécifique.

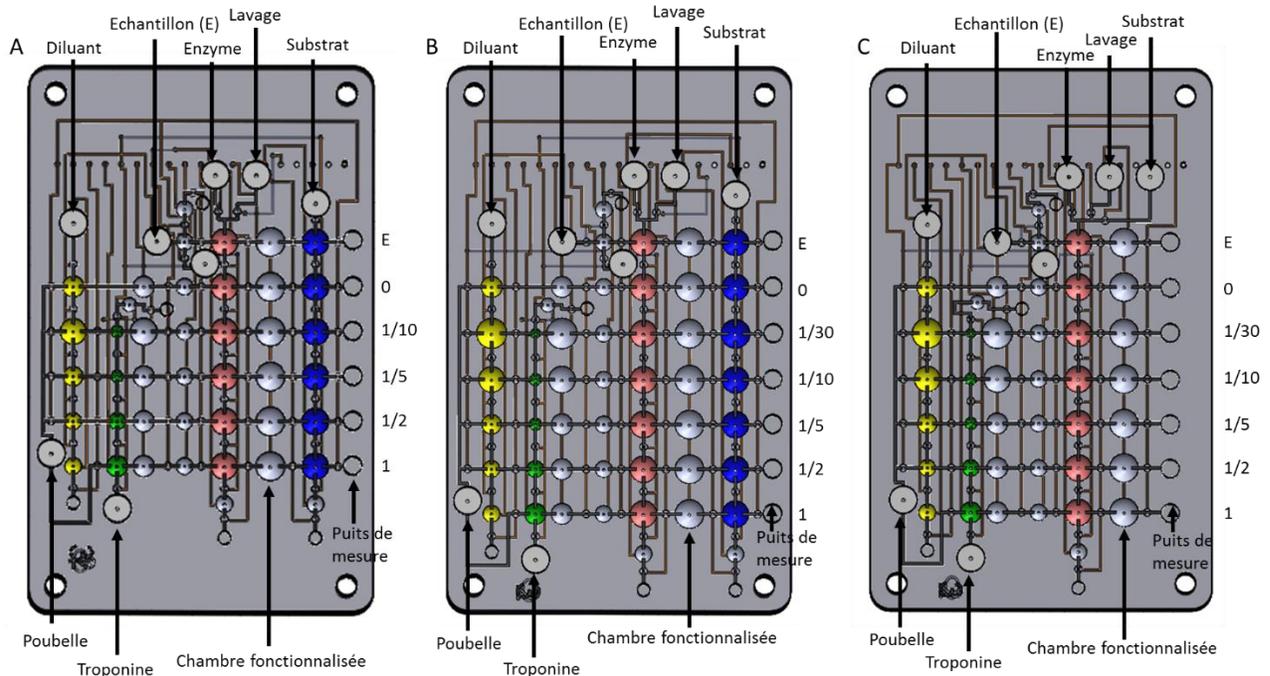


Figure IV-18: Architectures envisagées pour le test ELISA en phase hétérogène.

L'architecture B sera l'architecture retenue malgré le risque technologique. Elle présente l'avantage d'être plus fidèle que l'architecture A au protocole du kit en permettant d'intégrer une gamme plus étendue. La solution C est apparue comme étant la plus risquée en raison de la contamination possible entre l'enzyme et le substrat. L'architecture retenue (B) comporte les colonnes suivantes :

- La colonne 1 pour calibrer différents volumes de diluant
- La colonne 2 pour calibrer des volumes de troponine
- La colonne 3 pour mélanger les volumes calibrés de diluant et de troponine
- La colonne 4 pour aliquoter les solutions à 5 μL et injecter l'échantillon
- La colonne 5 pour calibrer les volumes d'enzyme ou les volumes de lavage à 20 μL
- La colonne 6 pour effectuer la réaction entre les enzymes et les solutions de troponine dans une chambre fonctionnalisée avec de la streptavidine
- La colonne 7 pour calibrer les solutions de substrat à 20 μL
- La colonne 8 pour récupérer les solutions dans des puits de sortie

La sortie nécessaire aux étapes de lavage est située à gauche de la colonne jaune ($C_{i,1}$) pour le diluant. Lors des lavages, les solutions seront évacuées vers la gauche sans contaminer la colonne de substrat et les puits de transfert. Les volumes de liquides à évacuer sont importants, de l'ordre de 1 mL. En guise de poubelle, un tube de seringue (1 mL) est directement inséré dans la carte. Pour cela, une ouverture conique au format des embouts de seringues, c'est-à-dire au format Luer, est usinée dans la carte. Les dimensions utilisées pour cette carte sont détaillées dans le Tableau IV-13.

Colonne 1: Eau		Colonne 2: Troponine		Colonne 3: Mélange		Colonne 4: Aliquotage		Colonne 5: Enzyme/lavage		Colonne 6: Chambre fonctionnalisée		Colonne 7: Substrat	
Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	R=h (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)	Volume (μL)	Rayon (mm)
10	1,68	0	0,00	10	1,68	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12
29	2,40	1	0,78	30	2,43	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12
18	2,05	2	0,98	20	2,12	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12
8	1,56	2	0,98	10	1,68	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12
5	1,34	5	1,34	10	1,68	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12
0	0,00	10	1,68	10	1,68	5	1,34	20	2,12	25	2,29	20	2,12

Tableau IV-13 : Dimensions de la carte pour intégrer un test ELISA hétérogène pour la troponine.

IV.4.5. Adressage pneumatique

Comme attendu, la carte développée pour le test ELISA en phase hétérogène comporte un plus grand nombre de vannes et de chambres et donc un réseau de canaux pneumatiques plus complexe que les architectures précédentes (Figure IV-19 A).

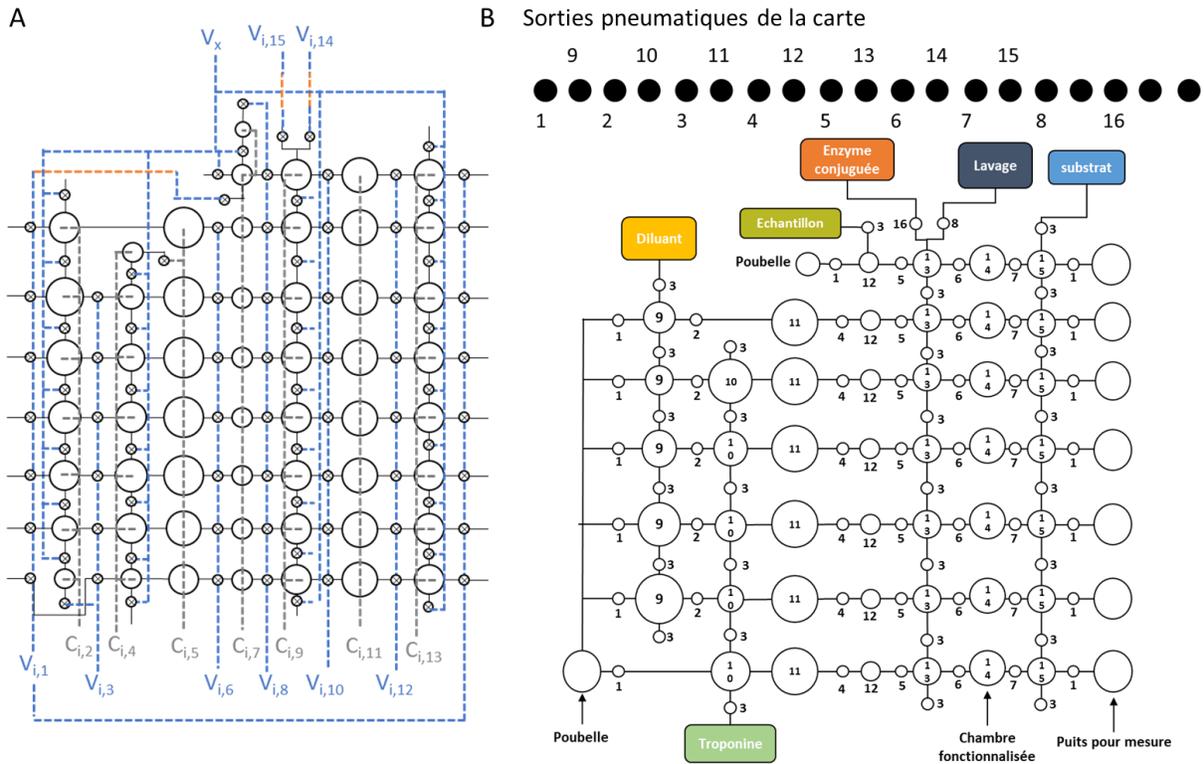


Figure IV-19: A :Vue schématique du dessus de la carte représentant les connexions pneumatiques des vannes et des chambres par colonne. B : Vue des connexions des sorties pneumatiques.

De nombreux croisements (représentés en orange) apparaissent sur le schéma, un deuxième niveau pneumatique est donc ajouté pour éviter ces croisements.

La Figure IV-19 B représente les connexions avec les sorties pneumatiques de la carte (de 1 à 16). Cette architecture nécessite 9 électrovannes pour piloter les vannes et 7 électrovannes pour piloter les chambres. Pour rappel, le banc expérimental comprend deux boîtiers de 8 électrovannes : un boîtier pour alimenter les vannes et un boîtier pour alimenter les chambres. Pour piloter cette carte, une modification est apportée au banc (une embase de 8 électrovannes est remplacée par une embase de 9). Le nombre total d'actionneurs reste ainsi inférieur à la limite fixée (16 électrovannes).

La limitation du nombre d'actionneurs implique des redondances supplémentaires dans les connexions pneumatiques. Notamment, il est nécessaire de connecter entre elles certaines colonnes de vannes qui s'actionnent normalement de manière distincte. Par exemple, les vannes de sortie situées à gauche de la colonne pour le diluant sont connectées avec les vannes situées à gauche des puits de transferts ($V_{i,1}$).

Cependant, toute redondance peut générer un risque d'incohérence du protocole ou de contamination. Une méthode pour visualiser ces risques, sur l'ensemble des enchainements fluidiques du protocole a été mise en place. Celle-ci consiste à représenter à l'aide de schémas simplifiés l'évolution temporelle du protocole. Toutes les vannes et chambres sont référencées par un numéro d'adressage, et un code couleur permet de définir l'état (ouvert en vert et fermé en blanc). Cette démarche est laborieuse mais est adaptée à la vision spatiotemporelle du protocole.

Un exemple de ce type de schéma (Figure IV-20) montre que l'ouverture des vannes situées à gauche des puits de mesure n'aura pas de conséquences pendant l'étape de lavage puisque ces vannes sont séparées par les vannes 7 et les chambres 15.

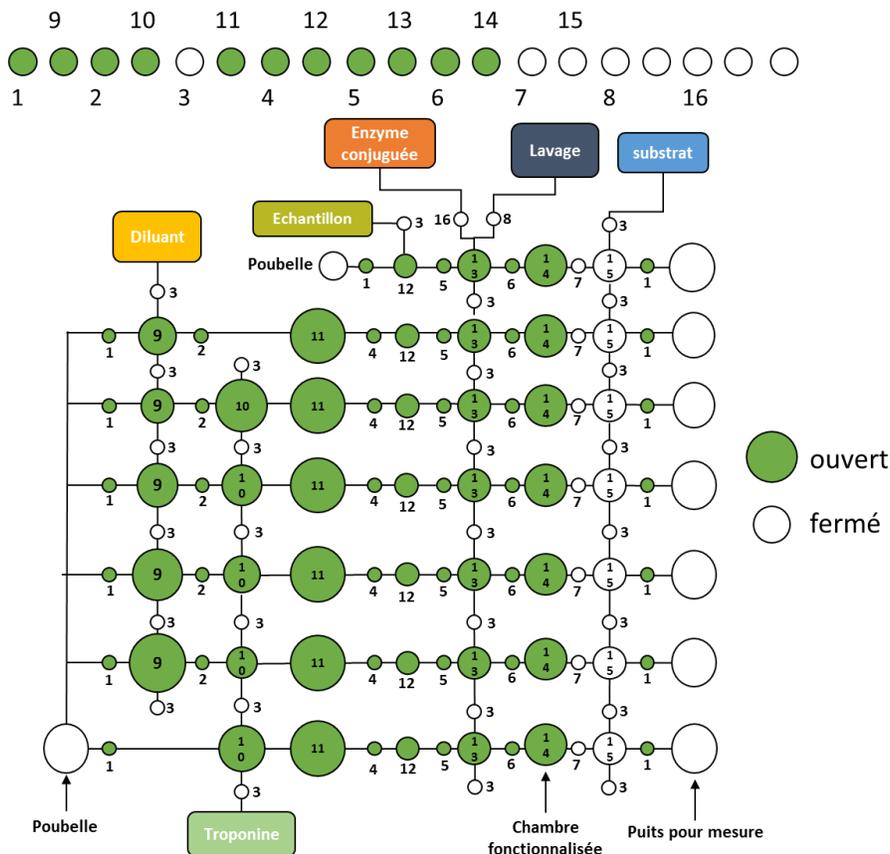


Figure IV-20: Ouverture des vannes et des chambres pour l'étape de lavage (phase de vidange).

La gestion des lavages nécessite également des ajustements dans la connexion des vannes par rapport aux architectures précédentes. La vanne à l'entrée de l'injection de l'échantillon ne peut plus être connectée aux vannes $V_{i,6}$. En effet, lors de la phase de vidange (Figure IV-20), il est nécessaire d'ouvrir les vannes $V_{i,6}$ pour transférer les liquides vers la poubelle située à gauche de la carte. Si la vanne d'entrée de l'échantillon est connectée à $V_{i,6}$ alors les liquides de la ligne de l'échantillon iront dans l'entrée de l'échantillon et non dans le réservoir poubelle. Cette vanne va donc être connectée aux vannes V_x .

IV.4.6. Programmation de la carte pour le test ELISA homogène.

Le protocole nécessite neuf grandes phases :

- Calibration des volumes (eau, troponine, enzymes) (Figure IV-21 (1))
- Mélange (gamme de dilution) et aliquotage (Figure IV-21 (2))
- Injection de l'échantillon et de l'enzyme (Figure IV-21 (3))
- Mélange (enzyme + solutions de troponine) (Figure IV-21 (4))
- Vidange (Figure IV-21 (5))
- Lavage (Figure IV-21 (6) et (7))
- Calibration des volumes de substrat (Figure IV-21 (8))
- Transfert vers les chambres fonctionnalisées (Figure IV-21 (9))
- Transfert vers les puits de sorties

Le nombre de phases reflète la complexité de ce protocole par rapport à un protocole ELISA en phase homogène. Les premières étapes sont similaires au test ELISA en phase homogène puis des étapes de vidange et de lavage sont ajoutées. Leur intégration augmente nettement le nombre d'étapes.

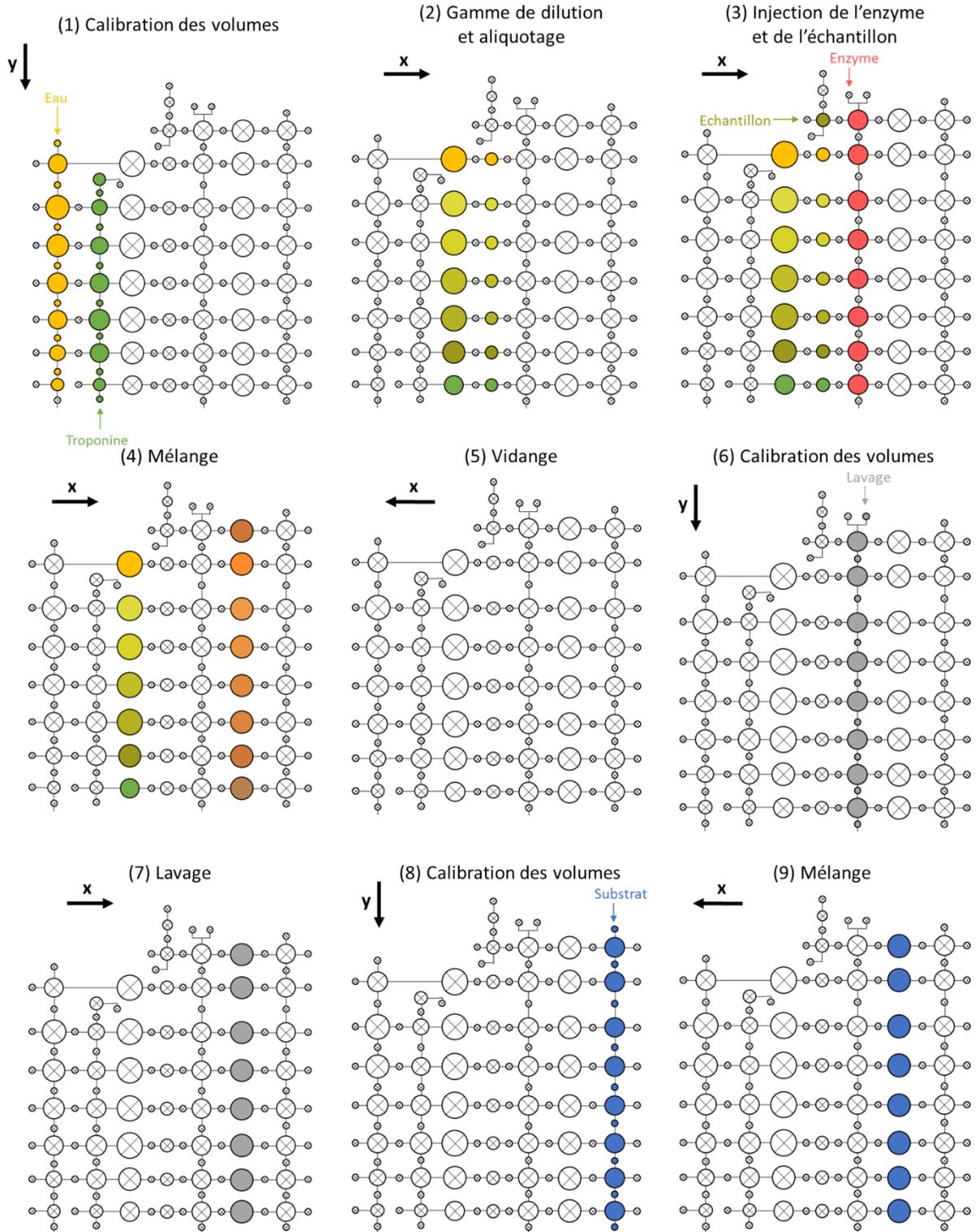


Figure IV-21: Principales étapes du test ELISA en phase hétérogène dans une carte microfluidique.

Les étapes de programmation sont résumées dans le Tableau IV-14 pour la première partie du protocole et le Tableau IV-15 pour la seconde partie.

Phase	Etape	V _x	V _{i,14}	V _{i,15}	V _{i,1}	C _{i,2}	V _{i,3}	C _{i,4}	C _{i,5}	V _{i,6}	C _{i,7}	V _{i,8}	C _{i,9}	V _{i,10}	C _{i,11}	V _{i,12}	C _{i,13}
Calibration des volumes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mélanges	3	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Aliquotage	7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Calibration	11	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Mélanges	13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Vidanges	18	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	19	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	20	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	21	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau IV-14 : Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour le test ELISA en phase hétérogène (1^{ère} partie).

Phase	Etape	V _x	V _{i,14}	V _{i,15}	V _{i,1}	C _{i,2}	V _{i,3}	C _{i,4}	C _{i,5}	V _{i,6}	C _{i,7}	V _{i,8}	C _{i,9}	V _{i,10}	C _{i,11}	V _{i,12}	C _{i,13}
Lavages (n fois)	30	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	35	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	36	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	37	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	38	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	39	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	41	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	42	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	43	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Calibration des volumes	47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Transfert vers les chambres fonctionnalisées	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Transfert vers les puits	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau IV-15: Programmation des états des colonnes de vannes et de chambres pour le test ELISA en phase hétérogène (2^{ème} partie).

Dans ces deux tableaux, les colonnes V_{i,14} et V_{i,15} correspondent aux vannes d'entrées de l'enzyme et du lavage. Les autres colonnes suivent la logique de l'ordre des vannes de gauche à droite comme indiqué sur la Figure IV-19. Ces tableaux mettent en évidence les étapes supplémentaires comparé aux protocoles précédents. Les deux principales phases à ajouter sont la phase de vidange et la phase

de lavage. La phase de vidange consiste à ouvrir toutes les chambres et les vannes entre la poubelle et la chambre fonctionnalisée ($C_{i,11}$) puis à fermer chaque chambre ou vanne les unes après les autres pour vider complètement la carte. Ensuite, le tampon de lavage est injecté lors de l'étape 30 puis transféré vers la chambre à laver (étapes 31 à 34). Cette étape est ensuite suivie d'une vidange complète de la carte. La phase de lavage sera répétée n fois. Le nombre n sera choisi à l'aide d'expériences dédiées à l'analyse du lavage qui seront présentées dans la section IV.4.10.

Au total, sans compter les éventuelles étapes de lavage supplémentaires, 57 étapes sont nécessaires pour ce protocole. A titre comparatif, seulement 18 étapes étaient nécessaires pour le test ELISA en phase homogène.

IV.4.7. Validation fluïdique

Avant de débuter les validations biologiques, la carte développée va être testée fluïdiquement à l'aide de colorants (Figure IV-22).

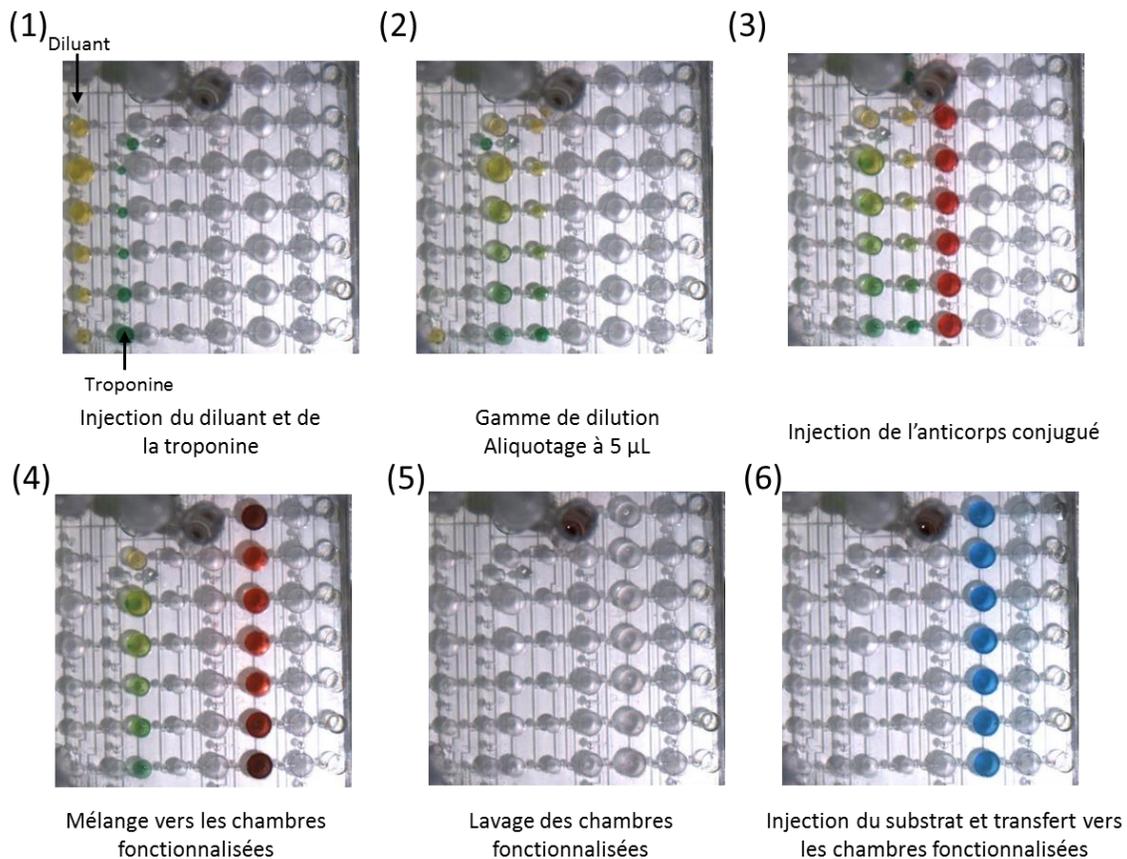


Figure IV-22: Validation fluïdique de la carte pour le test ELISA homogène.

Cette validation est importante car elle permet de vérifier que cette architecture est fonctionnelle. Par exemple, il faut vérifier que les redondances dans les connexions pneumatiques n'engendrent pas de fuites ou que la technique d'assemblage et de fabrication sont compatibles avec les dimensions de l'architecture (problèmes éventuels de fuites sur les bords). Sur les images, les puits de mesure restent vides jusqu'à la fin du protocole ce qui confirme l'étanchéité des vannes. Lors de l'étape de lavage, la carte semble visuellement propre ce qui sera à confirmer à l'aide des réactifs biologiques.

IV.4.8. Fonctionnalisation

Pour intégrer le protocole dans la carte microfluidique, il est nécessaire de mettre au point le procédé de fonctionnalisation de la surface avec la streptavidine. Pour cela, les compétences du laboratoire de chimie LETI/DTBS/SMAVI/L2CB vont être utilisées. Jusqu'à présent les cartes ont été fabriquées en COC mais la fonctionnalisation de ce matériau demande de nombreuses étapes telles qu'un traitement au CO₂ supercritique qui fragilise les cartes. Il s'avère que la fonctionnalisation est plus simple à réaliser sur le PMMA, un autre polymère que le COC utilisé dans le laboratoire. Dans le cadre de la thèse, la carte fluidique sera donc réalisée en PMMA et les autres niveaux resteront en COC. Les étapes de fonctionnalisation comprennent :

- Traitement au plasma O₂ à l'aide d'une machine de dépôt en phase vapeur (MVD100E, Orbotech)
- Dépôt d'une solution de streptavidine à l'aide d'une machine de dispense de faible volume.

La solution de streptavidine est mélangée avec 10% d'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), une solution de couplage. La machine de dépôt est la machine SciFlex (Sciencion) (Figure IV-23). Elle permet de programmer le dépôt de gouttes pour obtenir une matrice.



Figure IV-23: Machine de dispense SciFlex.

Les cartes sont incubées pendant une nuit avec la solution de streptavidine puis deux lavages sont nécessaires :

- Lavage au PBS 1X – 0,1% de tween pendant 5 min sous agitation
- Lavage au PBS 1X pendant 5 min sous agitation

Une solution de streptavidine marquée au Cy3 est utilisée. Ainsi, il est possible de vérifier la fonctionnalisation à l'aide d'un scanner en observant les spots fluorescents visibles sur la Figure IV-24. Les canaux sont également visibles mais il s'agit d'une auto fluorescence qui ne doit pas être prise en compte. Cette vérification est effectuée systématiquement avant l'assemblage de la carte.

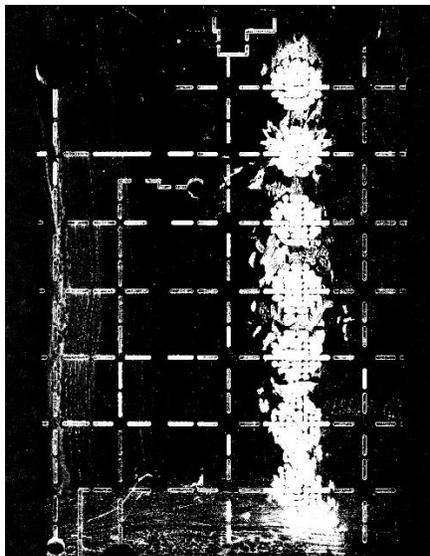


Figure IV-24: Image au scanner de la fonctionnalisation à la streptavidine de la carte fluide en PMMA.

IV.4.9. Expériences préliminaires

L'intégration du test nécessite quelques validations et optimisations préalables. Le premier point est la qualité des lavages. En effet, comme expliqué précédemment, un mauvais lavage de la carte entraîne une coloration non spécifique du substrat qui fausse les résultats. Il est donc très important de vérifier que cette étape est fonctionnelle en carte. Pour une concentration nulle en troponine, il faut alors un signal proche de 0.

Ensuite, une deuxième question concerne la compatibilité des réactifs et de la solution de référence de troponine sur les différents matériaux. Par exemple, il faudra vérifier qu'il n'y a pas d'adsorption non spécifique sur les matériaux. Une des conséquences serait alors de perdre le signal.

Il faut également valider la compatibilité du greffage (fonctionnalisation du PMMA à la streptavidine) avec le protocole et également le travail en faibles volumes. Pour cela, des cartes dédiées seront utilisées pour réaliser un protocole complet dans des puits en PMMA, fonctionnalisés.

Ces expériences préliminaires nécessitent une pluralité d'expérimentations. La préparation des cartes est longue ainsi que la durée des tests car pour chaque expérience, il faut effectuer des duplicats ou des triplicats et également des témoins positifs et négatifs. Ensuite, ces tests demandent une grande quantité de réactifs. Or, le processus de commandes nécessite plusieurs mois de délai ce qui limite la disponibilité des kits en cas de besoin. De plus, un kit contient une quantité importante d'anticorps conjugués et de substrats mais peu de solution de référence en troponine. Pour limiter les coûts de cette étude, une solution de référence de troponine (T9924 Sigma) achetée en complément de celle disponible dans un kit sera alors utilisée.

Les résultats des tests en plaque à puits de la troponine Sigma présentés en annexe 1 montrent que cette troponine est compatible avec le kit de chez AMS labs. Cependant, les mesures d'absorbance obtenues sont plus faibles que celle de la troponine du kit et les faibles concentrations ne sont pas détectables. Il faudra donc utiliser des concentrations plus élevées pour les validations.

(i) Test manuel dans des cartes à puits usinées en PMMA

Des expériences préliminaires sont effectuées manuellement dans des cartes en PMMA au format lame de verre contenant des puits (Figure IV-25). Ces tests permettent de tester le greffage de la streptavidine et le bon déroulement du protocole dans du PMMA avant de l'intégrer dans une carte microfluidique. Les chambres utilisées mesurent 1,9 mm de hauteur et 2,29 mm de rayon ce qui correspond à un volume de 31 μL , ce qui permet de se rapprocher de la taille des chambres microfluidiques qui seront utilisées dans la carte.

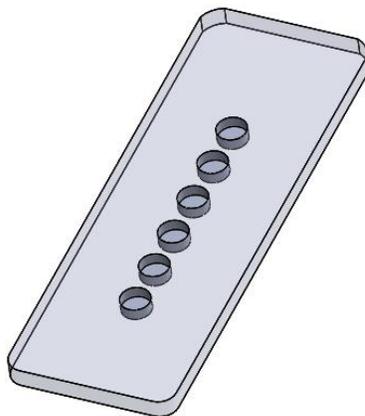


Figure IV-25: Vue 3D de la carte en PMMA utilisée.

Le protocole effectué manuellement est le protocole qui a été adapté pour la carte microfluidique (voir section IV.4.3(ii)) :

- Ajout de 5 μL de référence/échantillon
- Ajout de 20 μL d'enzymes conjuguées

- Incubation de 15 min
- Lavage : n fois avec 20 μL de tampon de lavage
- Ajout de 20 μL de substrat (la solution devient bleue)
- Incubation de 15 min
- Mesure de l'absorbance à 630 nm

Les expériences sont réalisées en triplicat. Le premier paramètre concerne le nombre de lavages nécessaires. Des expériences présentées en annexe 2 montrent que 5 lavages doivent être effectués avec 20 μL de tampon de lavage. De plus, il est également important de nettoyer les cartes aux ultrasons (15 min dans l'éthanol puis 2 fois 15 min dans l'eau). En effet, les cartes sont usinées à l'aide d'une machine de micro usinage. Ce mode opératoire entraîne la formation de copeaux qu'il est important d'éliminer. De plus, il y a un risque de dépôt métallique provenant de l'outil qui pourrait réagir avec le substrat et donc contaminer l'expérience.

Ces différentes optimisations ont permis de valider le protocole dans les puits en PMMA (Figure IV-26). L'absorbance augmente en fonction de la concentration en troponine. La moyenne sur trois expériences est représentée.

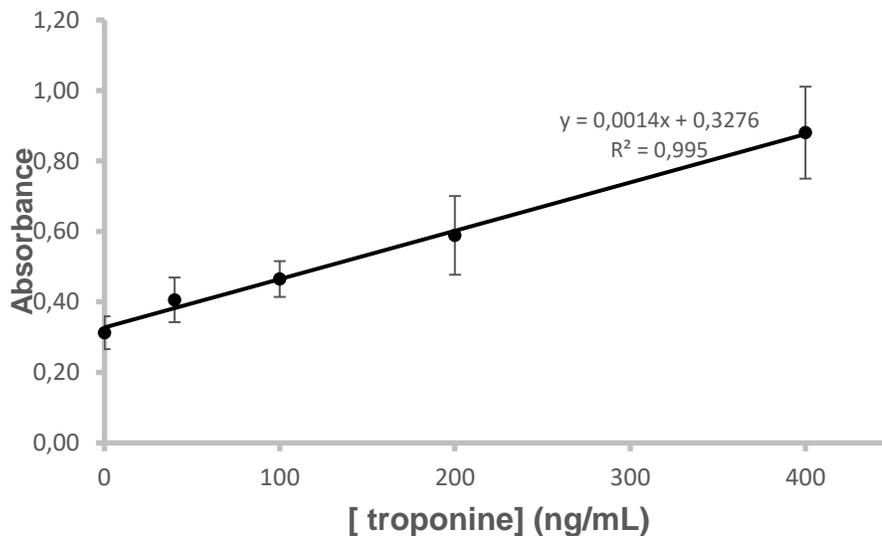


Figure IV-26: Mesure de l'absorbance à 650 nm en fonction de la concentration en troponine, expériences réalisées manuellement en triplicat dans des puits en PMMA fonctionnalisés.

Il faut noter que les barres d'erreurs restent importantes ce qui montre une grande variabilité dans les résultats pour les trois cartes. Ces barres d'erreurs justifient d'une part l'intérêt de calibrer le test à chaque expérience et d'autre part, indiquent qu'un travail d'optimisation serait à poursuivre. A ce stade de l'étude, ces résultats sont suffisants pour poursuivre les travaux sur l'intégration du test ELISA.

(ii) Validation de la compatibilité des matériaux avec les réactifs et la solution de troponine

En parallèle de l'étude précédente, il faut vérifier que les solutions utilisées dans le protocole ne s'adsorbent pas sur les matériaux. Pour cela, les solutions à tester (troponine, enzyme, substrat) sont incubées pendant 15 min avec l'adhésif ou l'Ecoflex®. Puis, un test est effectué en utilisant ces solutions dans la plaque 96 puits fournie par le kit. Pour chacune des configurations, trois concentrations en troponine sont utilisées (0, 50 et 100 ng/mL). Les résultats sont présentés en Figure IV-27.

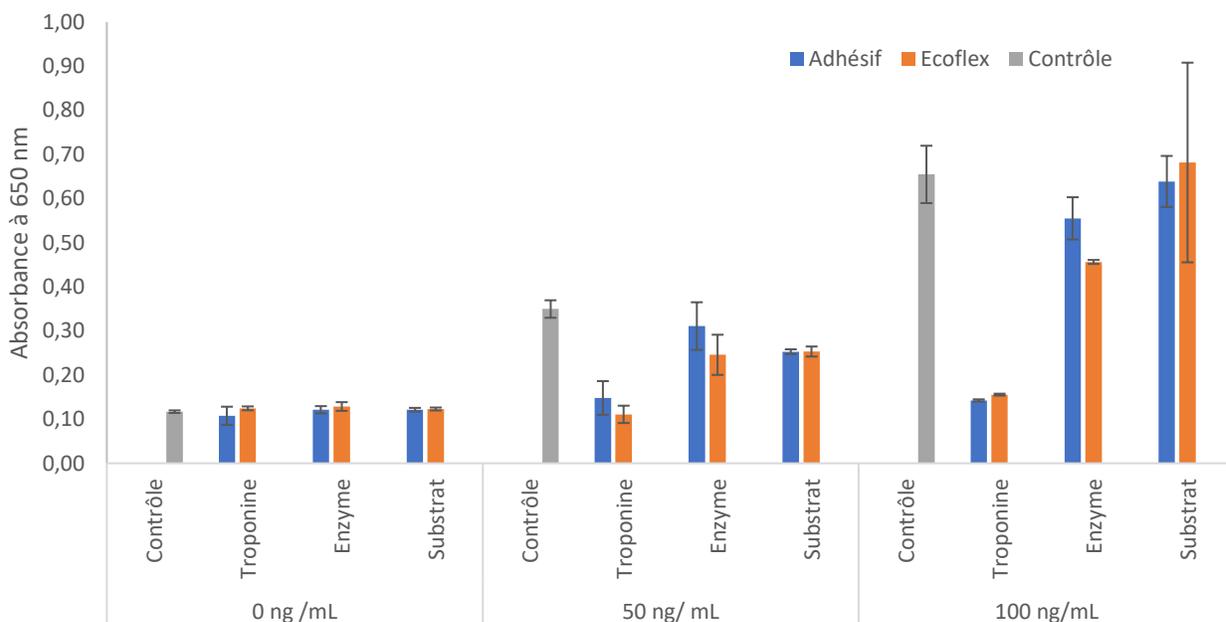


Figure IV-27 : Mesure d'absorbance en fin d'expérience pour les différentes configurations.

Ces expérimentations montrent que la solution de troponine est complètement adsorbée par les deux matériaux. En effet, lorsque le test est effectué avec la troponine incubée sur les matériaux, l'absorbance n'augmente pas en fonction de la concentration en troponine comme attendu. Ce constat est nettement visible pour la concentration de 100 ng/mL. L'enzyme est également adsorbée mais en moins grande quantité.

Pour limiter l'adsorption de la troponine sur les matériaux, un tampon de blocage (Superblock® Sigma, 37515) contenant des protéines est testé. Cette solution est souvent utilisée dans la littérature [44], [106]). Par ailleurs, la troponine est diluée avec une solution de plasma contenant également des protéines au lieu de l'eau. Ainsi, ces protéines vont se fixer sur les matériaux et bloquer l'adsorption de la troponine. En conséquence, de nouveaux tests sont menés avec le protocole suivant

pour comparer l'influence de la combinaison du plasma et de la solution de Superblock® sur les différents matériaux :

- Incubation des matériaux 2h avec le tampon de blocage
- Incubation de la troponine diluée dans du plasma avec les matériaux
- Récupération de la solution de troponine
- Protocole dans la plaque 96 puits fournie par le kit
- Récupération de 15 μL
- Mesure de l'absorbance dans une plaque 384 puits

Les résultats sont représentés en Figure IV-28.

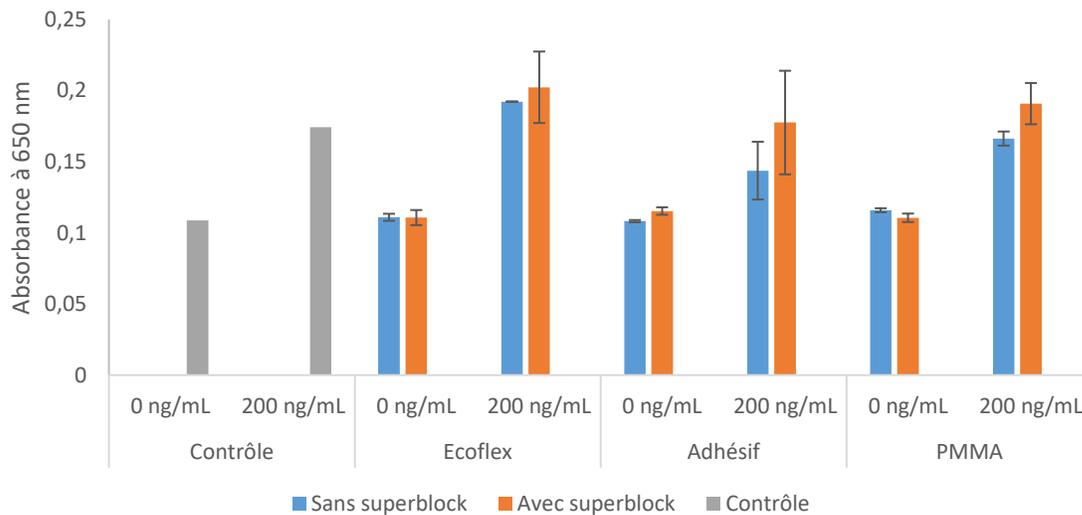


Figure IV-28: Absorbance à 650 nm en fonction de la concentration en troponine diluée dans le plasma et pour différentes incubations en présence des matériaux.

Ces expériences montrent clairement l'intérêt de diluer la troponine dans le plasma afin de limiter son adsorption. Les résultats sont plus proches de la référence que dans le cas précédent. De plus, le Superblock® améliore également les résultats. En effet, les meilleurs résultats, c'est-à-dire les signaux d'absorbance les plus proches de la référence, sont obtenus pour la combinaison de la dilution dans le plasma et de l'incubation au préalable des matériaux dans le Superblock®.

(iii) Conséquences de l'étude préliminaire sur l'intégration d'un test ELISA dans les cartes microfluidiques

Les expériences préliminaires ont permis de définir les conditions optimales pour réaliser le test ELISA dans la carte microfluidique dans le cadre de ce travail de thèse. Bien que ce travail doive être approfondi, plusieurs enseignements sont à retenir.

Il est difficile d'obtenir des informations directes car les triplicats ne sont pas toujours reproductibles et les écarts entre les différents résultats sont parfois faibles mais il est possible d'observer des tendances.

- Les cartes doivent être nettoyées aux ultrasons avant d'effectuer la fonctionnalisation.
- Après assemblage, une étape d'initialisation est nécessaire. Cette étape consiste à incuber complètement toutes les chambres et les canaux avec le tampon de blocage Superblock® pour limiter l'adsorption de la troponine et des réactifs sur les matériaux de la carte.
- Les solutions de référence de troponine doivent être diluées dans le plasma plutôt que dans l'eau. Ceci permet de limiter les phénomènes d'adsorption de la troponine sur l'ensemble du réseau microfluidique. De plus, cette matrice est plus représentative puisque le test final sera effectué sur du plasma.
- La solution de référence en troponine achetée séparément du kit semble moins efficace. Il faudra donc utiliser des concentrations élevées pour valider le protocole dans la carte microfluidique. La concentration maximale sera de 400 ng/mL et la gamme de dilution sera produite à partir de cette gamme en utilisant les mêmes ratios que ceux présentés dans le Tableau IV-12.

IV.4.10. Optimisation de la phase de lavage dans la carte microfluidique

Le lavage est une étape importante qu'il faut valider dans la carte microfluidique avant d'effectuer le protocole complet. Il faut dans un premier temps vérifier que la solution d'enzymes est bien lavée pour éviter que le substrat se colore de manière non spécifique. Pour cela, un protocole simplifié qui ne concerne que les étapes à partir de l'incubation de l'enzyme est considéré. Une carte microfluidique est alors testée sans greffage avec le protocole suivant :

- Injection des enzymes
- Incubation des enzymes pendant 15 min dans la colonne des chambres fonctionnalisées
- Vidange
- Lavage
- Injection du substrat
- Incubation du substrat pendant 15 min dans la colonne des chambres fonctionnalisées
- Mesure de l'absorbance à 650 nm

Si le substrat change de couleur après l'étape d'incubation, alors cela signifie que le lavage n'a pas été efficace. Comme expliqué précédemment, la phase de lavage comprend plusieurs étapes comme la vidange des réactifs présents dans les chambres fonctionnalisées, l'injection du tampon de lavage, le transfert de ce tampon vers les chambres fonctionnalisées et enfin la vidange de ce tampon.

La phase de lavage peut être modifiée en effectuant plusieurs fois cette opération ou en effectuant des allers-retours avec le tampon entre la chambre fonctionnalisée et la chambre voisine. La Figure IV-29 représente la phase de lavage sans allers-retours, c'est-à-dire en transférant une fois le tampon vers la colonne de chambres fonctionnalisées. Cette opération peut ensuite être répétée plusieurs fois.

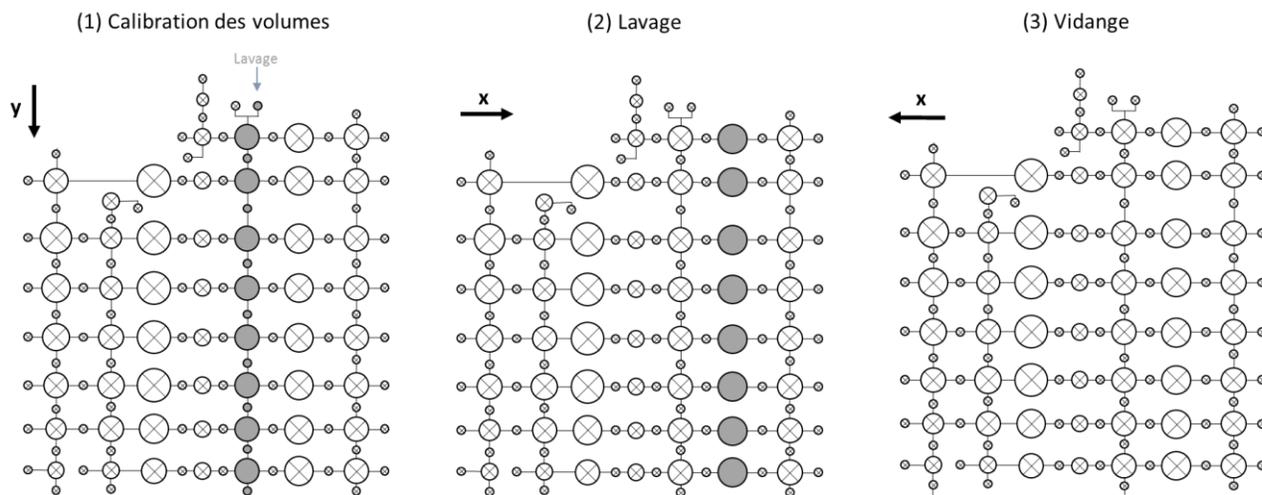


Figure IV-29: lavage sans allers-retours.

Des allers-retours avec la solution de lavage peuvent être ajoutés et sont représentés en Figure IV-30, c'est-à-dire remplir une première fois les chambres puis les vider et les remplir de nouveau.

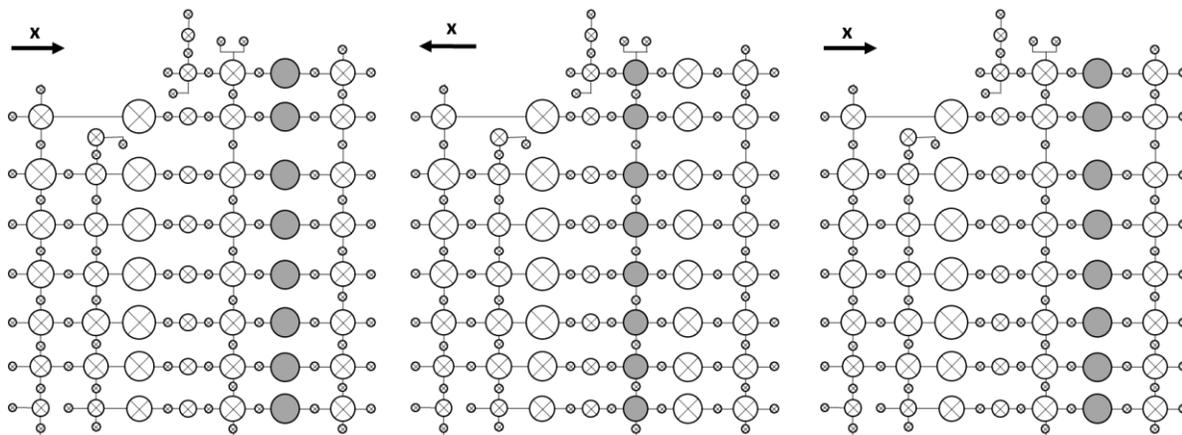


Figure IV-30: Lavage avec allers-retours.

La Figure IV-31 représente des images de cartes prises à la suite du protocole détaillé précédemment.

Quatre configurations sont testées :

- 5 lavages sans allers-retours (Figure IV-31, A)
- 10 lavages sans allers-retours (Figure IV-31, B)
- 5 lavages avec 3 allers-retours à chaque lavage (Figure IV-31, C)
- 8 lavages avec 3 allers-retours à chaque lavage (Figure IV-31, D)

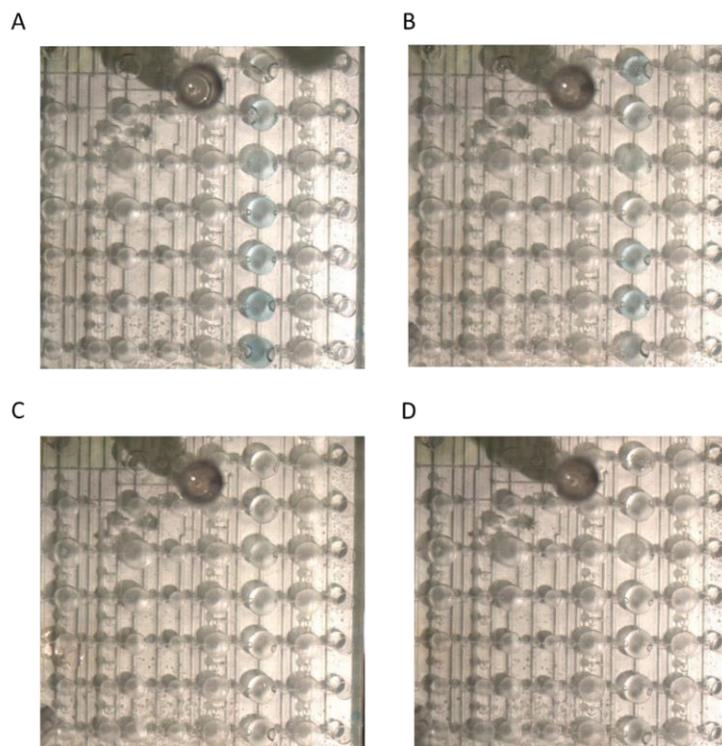


Figure IV-31: Images obtenues suite à 15 min d'incubation du substrat dans la chambre fonctionnalisée après différents types de lavage. A : 5 lavages, B : 10 lavages, C : 5 Lavages avec allers-retours, D : 8 lavages avec allers-retours.

Qualitativement, les mélanges effectués avec les allers-retours semblent plus efficaces car les solutions ne sont pas colorées en bleu. Pour rappel, la coloration bleue du substrat apparaît suite à une rencontre avec la solution d'enzymes.

Pour quantifier ces résultats, les solutions de substrat sont récupérées dans les puits de sortie et l'absorbance est mesurée à 650 nm (Figure IV-32).

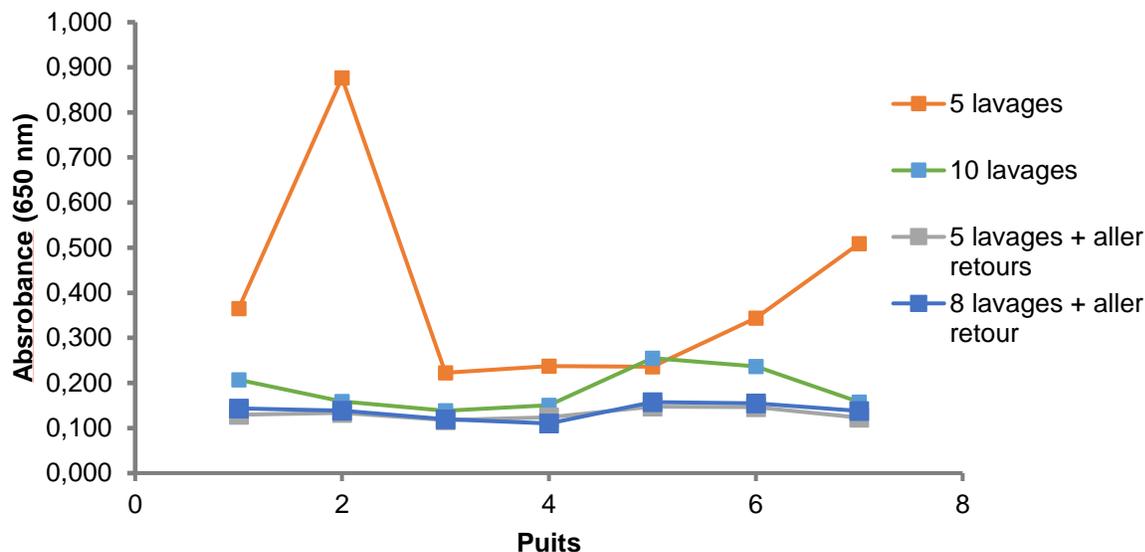


Figure IV-32 : Mesures d'absorbance effectuées à la fin du protocole pour différents types de lavage.

Les mesures d'absorbance confirment que les lavages sans aller-retour sont moins efficaces car les valeurs sont plus élevées et non spécifiques (courbes orange et vertes). Dans une expérience, les puits rencontrent les mêmes réactifs, les valeurs doivent donc être identiques et les différences proviennent d'un signal non spécifique. Concernant les lavages avec allers-retours, les mesures sont plus faibles et reproductibles. De plus, il ne semble pas y avoir de différence entre 5 et 8 lavages. Les étapes de lavage seront donc effectuées avec 5 lavages avec des allers-retours.

La programmation des étapes de lavage est alors modifiée pour ajouter ces allers-retours supplémentaires qui sont répétés cinq fois. Le lavage représente au total alors 105 étapes. Au final, 700 μL de liquide de lavage est donc nécessaire ce qui est compatible avec la vision d'un instrument portable.

Phase	Etape	V _x	V _{i,1}	C _{i,2}	V _{i,3}	C _{i,4}	C _{i,5}	V _{i,6}	C _{i,7}	V _{i,8}	C _{i,9}	V _{i,10}	C _{i,11}	V _{i,12}	C _{i,13}	V _{i,14}	V _{i,15}	
Lavages (5 fois)	28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	39	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	40	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	41	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	42	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	43	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	46	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	47	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tableau IV-16 : programmation des étapes de lavage avec 3 allers-retours.

IV.4.11. Validation quantitative du test ELISA en phase hétérogène

Suite aux expériences préliminaires et aux choix d'optimisations effectués, le protocole ELISA peut être réalisé dans la carte microfluidique développée. Le protocole a été décrit dans la section IV.4.3(ii). et les conditions expérimentales, dans la section IV.4.9(iii).

Pour rappel, le réseau fluidique est initialement incubé pendant deux heures avec une solution de blocage (Superblock®) pendant 2h. La concentration de la solution de référence en troponine (Sigma) pour réaliser la gamme de dilution est de 400 ng/mL. Cette solution va être diluée dans la carte avec du plasma selon les ratios décrits dans le Tableau IV-12. Pour représenter un échantillon à tester, cette solution de troponine est diluée deux fois.

La Figure IV-33 représente des images du test ELISA hétérogène dans la carte.

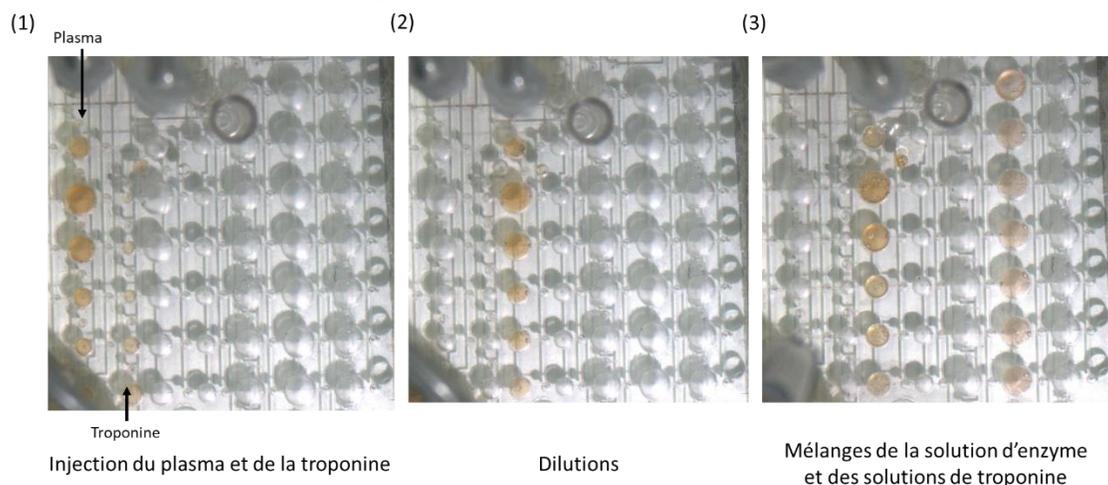


Figure IV-33: Images de différentes étapes du test ELISA hétérogène dans la carte microfluidique.

Ces images montrent que les chambres sont remplies sans bulle lors des étapes d'injection du plasma et de la troponine (1), ce qui permet de calibrer précisément les volumes. Ensuite, ces différentes solutions sont mélangées pour diluer la troponine à différentes concentrations (2). Enfin, les solutions sont aliquotées à 5 μ L puis mélangées avec la solution contenant les anticorps conjugués dans la chambre fonctionnalisée (3).

Après une étape d'incubation de 15 min, la carte est complètement vidée et 5 lavages sont réalisés. Ensuite, le substrat est injecté et transféré vers les chambres fonctionnalisées avant une deuxième étape d'incubation de 15 min. Les images de l'incubation au bout de 5, 10 et 15 min sont représentées en Figure IV-34.

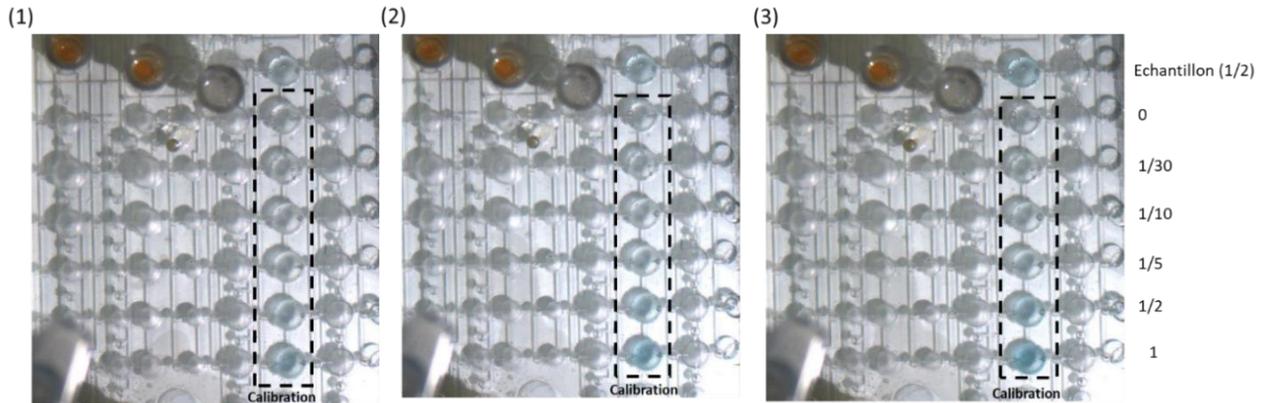


Figure IV-34: Images de la carte microfluidique à la fin du protocole de test ELISA après 5 (1), 10 (2) et 15 (3) min d'incubation du substrat dans la chambre fonctionnalisée.

Ces images montrent clairement l'évolution de la coloration bleue avec le temps d'incubation et la coloration bleue augmente avec la concentration en troponine. Les solutions sont ensuite transférées vers les puits de sortie puis prélevées pour être analysées au TECAN. Des mesures d'absorbance sont alors effectuées pour quantifier les résultats (Figure IV-35).

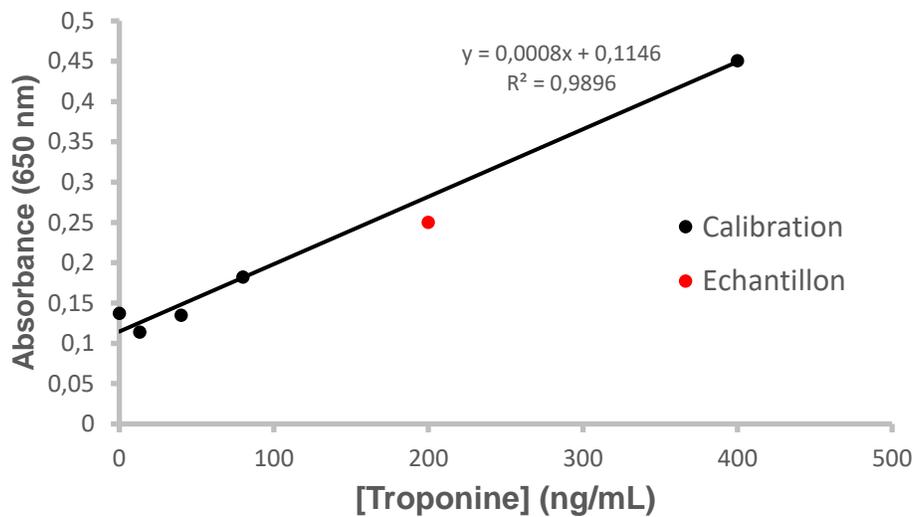


Figure IV-35: Test ELISA hétérogène effectué dans une carte microfluidique. Mesure d'absorbance à 650 nm en fonction de la concentration en troponine.

La courbe de calibration obtenue avec la carte microfluidique, si elle n'est pas parfaite, est très prometteuse avec un coefficient de corrélation de 0,9896. Le niveau de signal est suffisamment élevé pour être aisément détecté à l'aide du TECAN.

Ces résultats n'ont été possibles qu'à la suite des différentes optimisations présentées dans la section IV.4.9. La concentration de l'échantillon estimée à l'aide de la courbe de calibration est de 169,5 ng/mL, cette valeur est très cohérente par rapport à celle attendue qui est de 200 ng/mL. L'écart

entre ces deux valeurs peut s'expliquer par des erreurs de manipulations au moment du transfert vers la plaque à puits. Par exemple, le point de la solution de référence en troponine n'a pas été représenté sur ce graphique car un problème est apparu lors du transfert. Une possibilité pour éviter l'étape de transfert est d'utiliser un autre mode de détection comme la caméra. Les images peuvent être traitées sur le logiciel ImageJ pour obtenir une image en noir en blanc en sélectionnant le canal rouge. Puis, en mesurant le niveau de gris (Figure IV-36 B), la courbe suivante est obtenue (Figure IV-36 A).

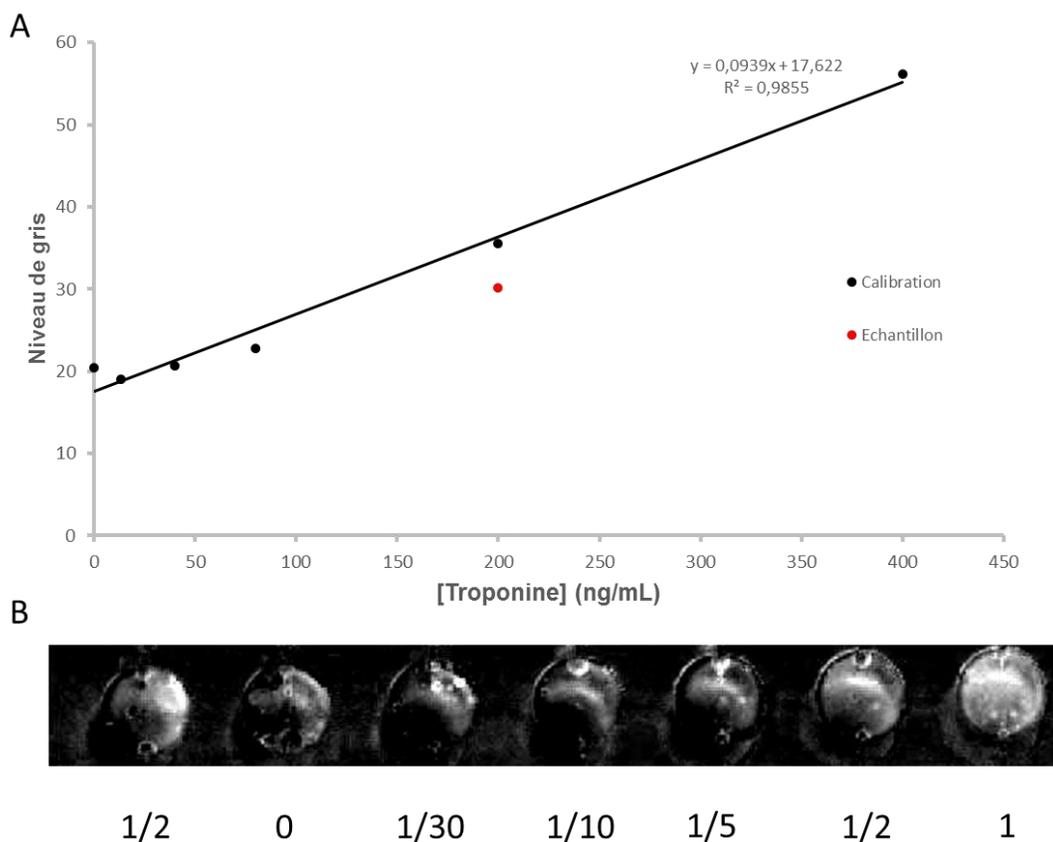


Figure IV-36: Test ELISA hétérogène effectué dans une carte microfluidique. A : Mesure du niveau de gris à l'aide d'ImageJ en fonction de la concentration en troponine. B : Image traitée sur ImageJ pour mesurer le niveau de gris.

Cette courbe représente bien l'évolution de la couleur bleue en fonction de la concentration en troponine et montre que le point qui n'a pas été représenté sur la courbe précédente était bien valable avant le transfert. Cependant, la qualité de l'éclairage n'avait pas été optimisée initialement pour effectuer une quantification et cette mesure ne permet pas d'obtenir des résultats suffisamment précis.

Plusieurs optimisations seront discutées par la suite mais un point important à signaler ici concerne l'utilisation du réactif Superblock®. Il s'avère que ce réactif est très mouillant et moussant car il doit

être saturé en surfactant et en agent mouillant. Il en résulte la formation de bulles et de mousses notamment pendant les phases de remplissage des colonnes et de transfert. Un premier remplissage de troponine et de plasma est alors effectué, suivit d’une étape de vidange vers la poubelle avant de remplir une deuxième fois de manière plus précise.

L’utilisation du Superblock® induit certainement une variabilité sur la calibration des volumes et impacte le remplissage et la vidange des chambres. Une solution pour limiter cet effet serait éventuellement de sécher la carte après l’incubation au Superblock®. Malgré ces quelques remarques, cette expérience montre qu’il est possible d’intégrer un test ELISA hétérogène avec une courbe de calibration dans le système microfluidique.

IV.5. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, deux tests ELISA ont été validés. Le premier était un test ELISA homogène pour le glucagon. L’intégration de ce protocole a permis de valider une architecture intégrant une gamme de dilution plus étendue que pour le test enzymatique (jusqu’à 1/64). Cette architecture complexe a nécessité des ajustements dans la conception et l’assemblage des cartes microfluidiques afin d’être plus précis.

Dans un deuxième temps, le test ELISA en phase hétérogène a été abordé. Les deux tests ELISA ont été comparés dans le Tableau IV-17.

	ELISA homogène	ELISA hétérogène
Nombre de réactifs	2	3
Nombre de chambres	54	48
Nombre de vannes	83	86
Nombre d’étapes	19	144 dont 105 pour les lavages
Durée du protocole	4h d’incubation + 1 min de fluidique	30 min d’incubation +5 min fluidique
Détection	HTRF	Absorbance

Tableau IV-17 : Comparaison des tests ELISA homogène et hétérogène.

Ce tableau reflète la complexité fluidique du test ELISA hétérogène par rapport au test homogène. 144 étapes sont nécessaires pour le test ELISA hétérogène au lieu de seulement 19 pour le test ELISA homogène. Ce nombre s’explique par la nécessité de réaliser plusieurs lavages (5 fois). Les étapes de fabrication et de préparation de la carte sont également plus longues et complexes pour le test ELISA hétérogène. Malgré ces difficultés supplémentaires, ce test a été intégré avec succès dans un système

microfluidique piloté avec seulement 16 actionneurs ce qui est en accord avec le cahier des charges fixé en début de thèse. Des réflexions sur les architectures et l'adaptation du protocole ont également permis de respecter le format d'une carte de crédit malgré le nombre de réactifs à gérer. Ce protocole, dont l'intégration était en effet l'un des objectifs de la thèse, a permis d'étudier les limites de la technique d'actionnement et de l'architecture.

De nouveaux problèmes comme l'intégration d'étapes de lavage ou la fonctionnalisation de surface ont été abordés. De plus, la complexité du protocole a été accrue. En effet, la réaction enzymatique qui provoque une amplification du signal ne tolère pas de contamination ce qui implique d'utiliser une technique de contrôle des fluides robuste. Par exemple, si les vannes fuient, l'enzyme risque de se mélanger au substrat de manière non contrôlée, ce qui fausse obligatoirement les résultats. Cet aspect démontre un des intérêts de la courbe de calibration qui assure la validité du test contrairement à un seul point de mesure où le doute de contamination peut persister. Le greffage apporte également une difficulté supplémentaire. En cas de mauvais greffage, aucun signal n'est détecté. Grâce à la courbe de calibration, il est encore une fois possible de savoir si la carte microfluidique est défectueuse, ce qui évite les faux négatifs.

Ces difficultés ont nécessité de longues optimisations avec par exemple l'ajout d'une étape d'incubation avec un réactif bloquant (Superblock®). Les validations en carte sont encourageantes mais les niveaux de sensibilité sont pour l'instant critiquables.

Plusieurs pistes d'optimisation seraient à explorer afin d'améliorer ces résultats. Au niveau de la chimie et de la biologie, il serait intéressant d'étudier d'autres matériaux pour limiter l'adsorption non spécifique. Des traitements de surface pourraient être également analysés.

Des optimisations dans le domaine de la microfluidique doivent être apportées. L'injection des réactifs dans la direction Y est maîtrisée grâce à l'ajout d'une chambre poubelle. En revanche, dans la direction X, le volume mort des canaux et des vannes n'est pas compensé. Les volumes des solutions de référence ne sont pas précis à la suite du remplissage des chambres et l'étape d'aliquotage en souffre. Il faudrait par exemple réduire le volume mort des canaux, changer le type de vannes ce qui impliquerait de travailler sur une autre technique d'assemblage que l'adhésif. Il serait intéressant d'ajouter des microcanaux de drainage afin de vider de manière optimale les chambres. Par ailleurs, du liquide reste parfois piégé au centre de la chambre après la fermeture.

Pour optimiser la sensibilité du test, un premier objectif serait de développer un système de détection proche de la carte microfluidique. Actuellement, les solutions sont prélevées et mesurées dans le spectromètre TECAN qui n'est pas adapté aux petits volumes. De plus, le transfert de la carte vers la plaque à puits peut créer des imprécisions. Le système de détection serait relativement simple à développer et consisterait à ajouter une diode et une photodiode de la bonne longueur d'onde au système. Cependant, la difficulté serait d'injecter le liquide sans bulles dans la chambre de mesure. Actuellement, des bulles apparaissent au niveau des vannes lors de l'étape d'incubation. Il faudrait alors trouver un film plus étanche à l'air pour éviter l'apparition de ces bulles dans le système. Un

autre objectif serait également de chercher optimiser la chambre de mesure : retrait du film, optimisation du chemin optique, élimination des bulles...

Enfin, pour effectuer le test complet sans manipulation à partir d'une goutte de sang, il serait nécessaire d'ajouter sur cette carte un module d'extraction de plasma. Dans notre laboratoire, plusieurs briques ont été développées pour l'extraction de plasma et sont compatibles avec la technologie utilisée. Il sera donc possible de les combiner avec la carte microfluidique pour le test ELISA hétérogène.

Chapitre V:

Développement d'un démonstrateur portable et autonome

Sommaire

V.1. Développement de l'instrument	217
V.1.1. Cahier des charges.....	217
V.1.2. Choix du microcontrôleur.....	219
V.1.3. Génération de la pression	221
V.1.4. Régulation de la pression.....	224
V.1.5. Réseau pneumatique associé aux sources de pressions.....	225
V.1.6. Pilotage des électrovannes.....	228
V.1.7. Pilotage de l'instrument via un écran tactile et premiers tests	230
V.1.8. Conception du circuit électronique.....	232
V.1.9. Système final à intégrer.....	236
V.1.10. Conception du boîtier	237
V.1.11. Assemblage de l'instrument.....	238
V.1.12. Première application : utilisation de cet instrument pour la fête de la science 2017 .	242
V.1.13. Bilan et validation à la fête de la science	248
V.2. Intégration des réactifs	249
V.2.1. Description de la technique développée.....	249
V.2.2. Validation : couplage de cette technique avec une gamme de dilution et utilisation de l'instrument pour piloter cette carte.....	253
V.3. Conclusions et perspectives.....	256

Les chapitres précédents ont permis de valider l'intégration de protocoles complexes avec une calibration dans une carte microfluidique. Les validations ont été effectuées à l'aide d'un banc expérimental. L'objectif à présent est de remplacer les éléments nécessaires au pilotage d'une carte microfluidique par un instrument portable et autonome.

Ce chapitre sera divisé en deux parties. La première sera consacrée au développement de l'instrument qui sera présenté de manière didactique, en expliquant pas à pas son développement et son assemblage afin de pouvoir facilement le reproduire sans connaissance particulière en électronique et en instrumentation. Cet instrument devra pouvoir fonctionner en mode démonstration tout en étant compatible avec l'intégration future des protocoles ELISA. La deuxième partie sera dédiée à l'intégration des réactifs liquides et à leur injection dans les cartes microfluidiques. Pour cela, une technique brevetée sera présentée et validée à travers son intégration dans une carte de dilution.

V.1. Développement de l'instrument

V.1.1. Cahier des charges

Pour définir le cahier des charges, la liste des modules nécessaires au pilotage des cartes va être établie à partir du banc expérimental. Pour rappel, les cartes microfluidiques développées ont été validées avec le banc décrit dans le chapitre II qui contient les éléments suivants (Figure V-1) :

- Un contrôleur de pression (MFCS de la société Fluigent) alimenté en air comprimé
- Deux boîtiers d'électrovannes
- Un microcontrôleur
- Un ordinateur pour piloter le logiciel du MFCS et les électrovannes à l'aide d'un programme en Visual Studio Express (Microsoft)
- Un support avec des sorties pneumatiques standardisées pour connecter la carte microfluidique

Ce banc comporte plusieurs inconvénients pour son intégration dans un système portable. Tout d'abord, une alimentation en air comprimé est nécessaire au MFCS ce qui contraint la portabilité. Il faudra donc intégrer des pompes dans l'instrument pour qu'il soit autonome en air comprimé. Ensuite, un ordinateur est utilisé pour le pilotage du contrôleur de pression et du microcontrôleur. Pour supprimer l'ordinateur, un autre système de contrôle de pression et un autre microcontrôleur seront donc nécessaires. Un écran tactile fera l'interface entre l'utilisateur et l'instrument.

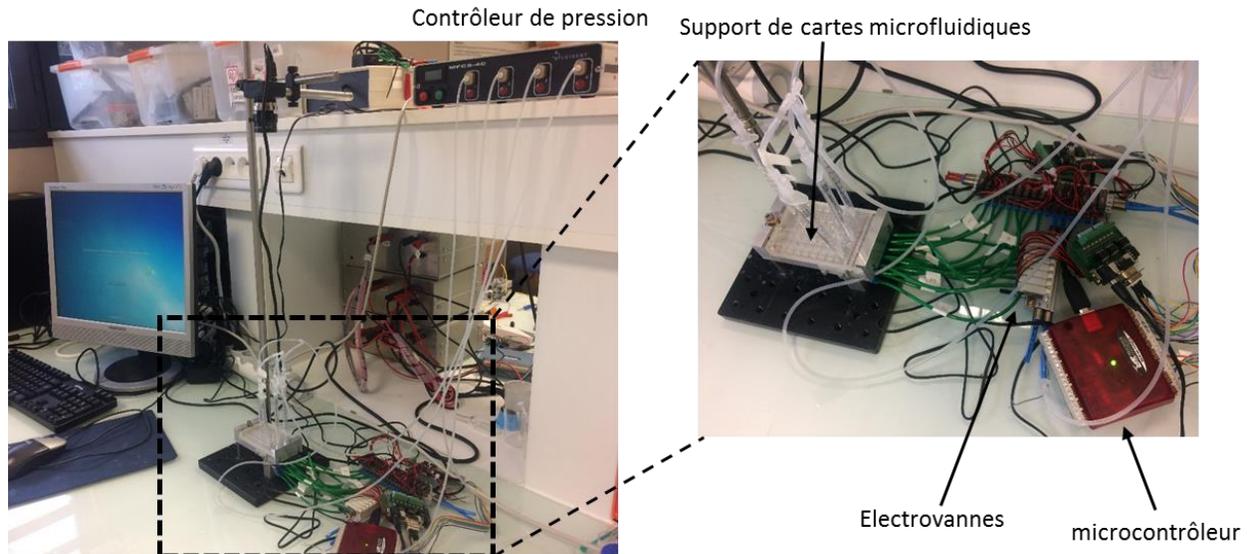


Figure V-1: Photo du banc expérimental utilisé pour la validation des cartes.

Les choix techniques effectués pour le développement des cartes ont permis de simplifier l'instrumentation. La pression utilisée pour actionner les cartes est limitée à 600 mBar et seulement 16 électrovannes sont nécessaires au pilotage des vannes et des chambres.

L'instrument va donc comporter les éléments suivants :

- 3 générateurs de pressions pneumatiques appelés par la suite « micro-pompes »
- Un système de contrôle de pression pour la régulation en pression
- 2 boîtiers d'électrovannes
- Un microcontrôleur
- Un écran tactile
- Un support avec des interfaces pneumatiques standardisées pour actionner la carte microfluidique
- Un boîtier dédié afin d'assembler et d'intégrer les éléments précédents

Certains éléments utilisés dans le banc expérimental tels que les électrovannes ou le support de cartes pourront être intégrés sans modification dans l'instrument. Le pilotage de chacun de ses éléments sera validé individuellement avec une plaque de prototypage avant de concevoir un circuit électronique sur un PCB.

Le montage à réaliser est représenté en Figure V-2. La première étape sera de tester les sources de pressions. Pour cela, il faudra coupler des pompes à un système de régulation de pression. La deuxième étape sera de tester le pilotage des électrovannes avec l'écran tactile. Puis, un circuit électronique rassemblant les composants électroniques devra être conçu sur un PCB. Enfin, un boîtier devra être réalisé avant d'assembler l'instrument.

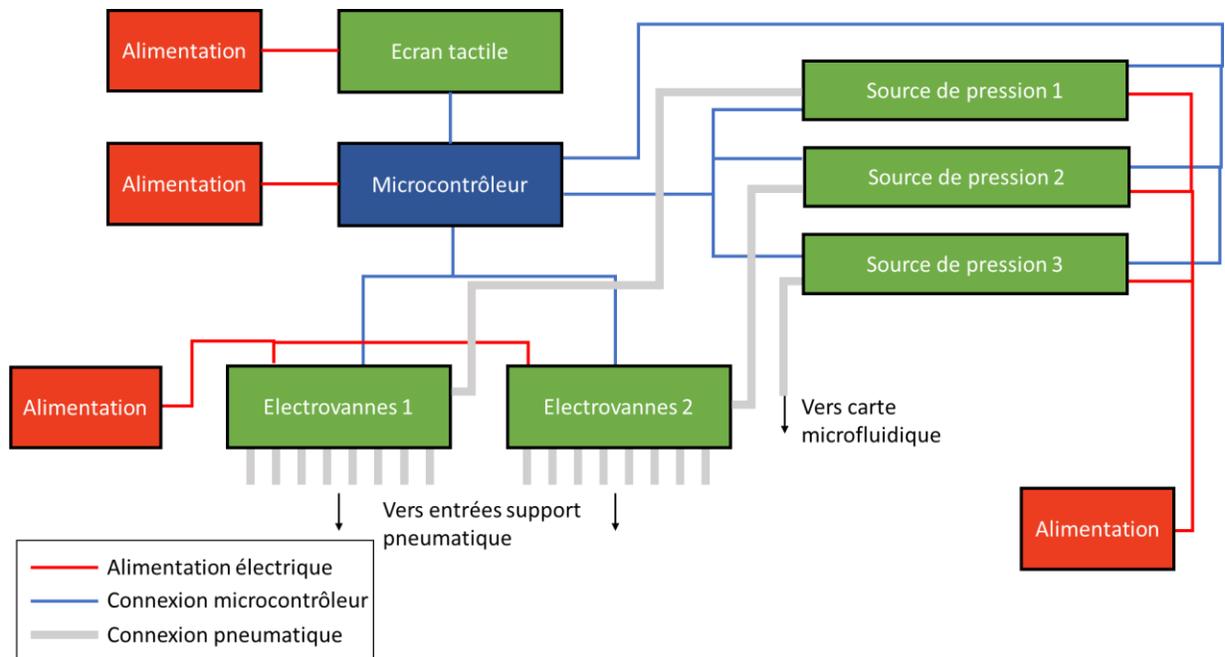


Figure V-2: Schéma du montage à réaliser pour l'instrument portable.

V.1.2. Choix du microcontrôleur

Le microcontrôleur permet de programmer les composants électroniques. Dans le banc expérimental, il s'agissait d'un boîtier d'acquisition Meilhaus Electronic qui permettait de piloter les boîtiers d'électrovannes (Figure V-3).

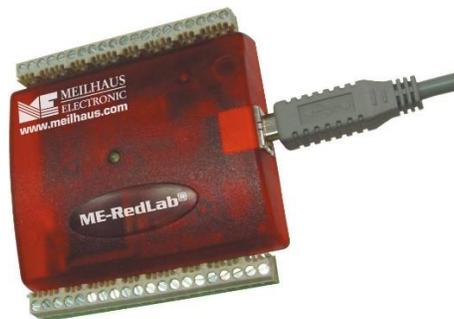


Figure V-3: Interface d'instrumentation du banc expérimental Meilhaus Electronic.

Ce type d'interface d'instrumentation se pilote en USB par un ordinateur. Pour l'instrument portable et autonome, le microcontrôleur sélectionné est un Arduino. Ce microcontrôleur possède une mémoire qui permet de stocker un programme. Ainsi, la connexion à l'ordinateur est uniquement nécessaire lors du chargement du programme.

Un autre avantage de l'Arduino est l'accès aux programmes qui sont « open source ». Il existe une communauté très importante de partage d'informations ainsi que des documentations en libre accès. Ainsi, les composants électroniques peuvent être programmés très rapidement.

L'Arduino comprend les éléments suivants :

- Un port USB pour interagir avec un ordinateur et charger le programme.
- Un port d'alimentation 7-12 V pour la mise en tension de la carte
- Des broches analogiques/numériques
- Des broches d'alimentation 3/5V.

Il existe différents types d'Arduino qui comprennent des caractéristiques différentes telles que leur taille ou le nombre de sorties. Pour s'assurer d'avoir un nombre de sorties suffisant, l'Arduino choisi est le Mega 2560 contenant 54 sorties numériques.



Figure V-4: Arduino Mega sélectionné pour l'instrument portable.

Le programme de l'Arduino s'effectue à l'aide d'un logiciel gratuit directement fourni par le fabricant (Figure V-5). Il s'écrit en langage C/C++. Dans le programme, les variables sont déclarées au début. Ensuite, le programme comporte toujours deux fonctions principales. La fonction *setup ()* qui permet en général d'initialiser les données d'entrées et de sorties et la fonction *loop ()* qui permet d'envoyer les instructions.

A titre d'exemple, le programme de la figure V-5 permet simplement de faire clignoter une LED avec les fonctions *digitalWrite* dans une boucle :

- *digitalWrite(Led, HIGH)* pour allumer la LED
- *digitalWrite (Led, LOW)* pour éteindre la LED.

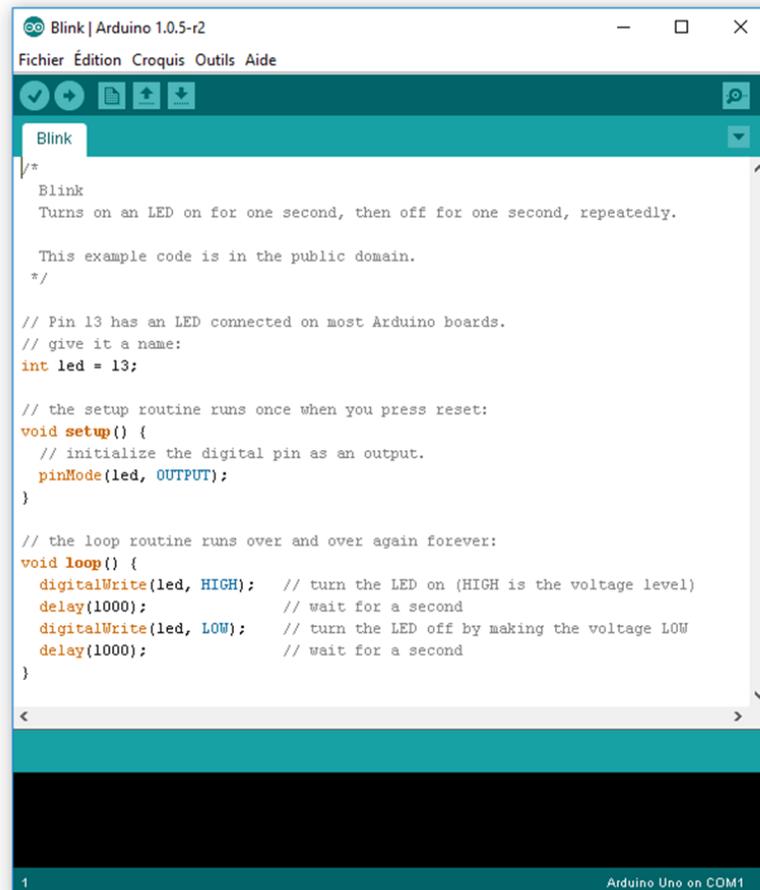


Figure V-5: Interface du logiciel Arduino.

Sur le même principe, la fonction *digitalWrite* sera utilisée pour changer l'état des électrovannes.

V.1.3. Génération de la pression

Une source de pression devra comprendre une micro-pompe, un capteur de pression et un réseau pneumatique indépendant. Dans le chapitre II, il a été expliqué que trois sources de pression positive étaient nécessaires au pilotage de la carte microfluidique. Ainsi, le système doit embarquer trois micro-pompes permettant de générer trois pressions différentes.

(i) Choix des pompes

Les pompes doivent correspondre aux critères suivants :

- Délivrer une pression minimale de 500 mBar
- Taille limitée (quelques cms)
- Faible alimentation électrique

La micro-pompe choisie est représentée en Figure V-6. Il s'agit d'une pompe à membrane Koge de référence KPM14. Ce type de pompe est couramment utilisé dans des dispositifs médicaux tels que les tensiomètres portables.

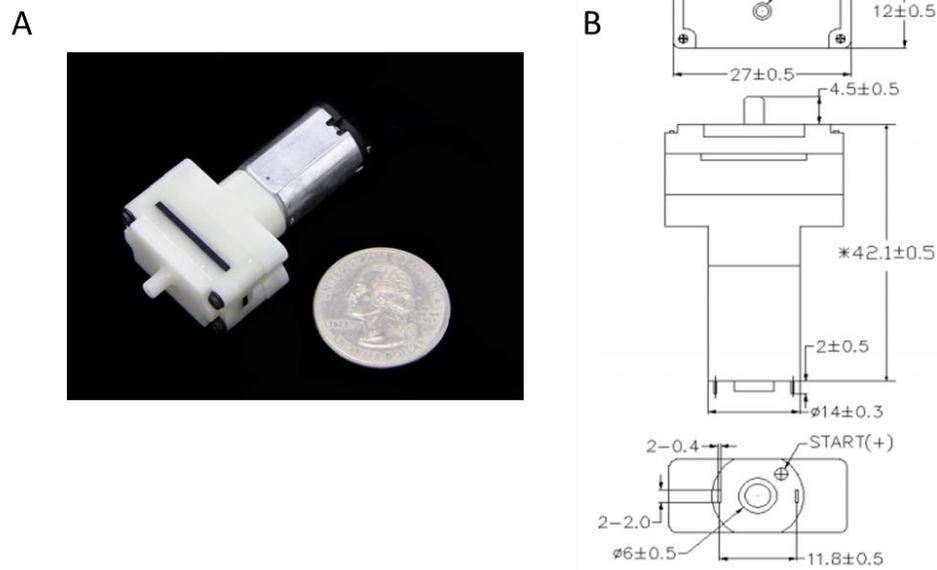


Figure V-6: Image (A) et dimensions (B) de la pompe choisie pour alimenter les cartes en pression.

Ses caractéristiques principales sont :

- Une alimentation de 3 V DC
- Une pression maximale de 500 mBar
- Faibles dimensions (42 X 27 X 12 mm)

(ii) Pilotage des pompes par l'Arduino

Le pilotage des pompes via l'Arduino nécessite des optocoupleurs (Panasonic, AQV252G). Un optocoupleur est un interrupteur qui permet de transmettre un signal d'un circuit électrique à un autre sans qu'il y ait de contact galvanique entre eux. La partie électronique de l'Arduino est donc séparée physiquement du circuit d'alimentation des micro-pompes.



Figure V-7: Image de l'optocoupleur AQV252G.

Le schéma électrique de l'optocoupleur est représenté en Figure V-8.

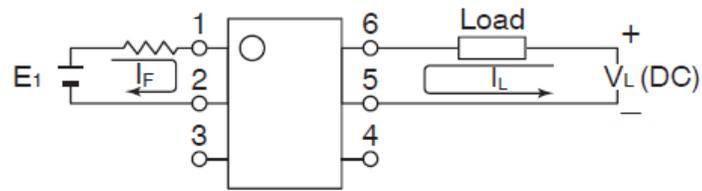


Figure V-8: Schéma électrique de l'optocoupleur AQV252G.

L'optocoupleur est piloté par l'Arduino à l'aide d'une sortie numérique. Une résistance de $430\ \Omega$ doit être ajoutée entre l'optocoupleur et la sortie de l'Arduino (Figure V-9).

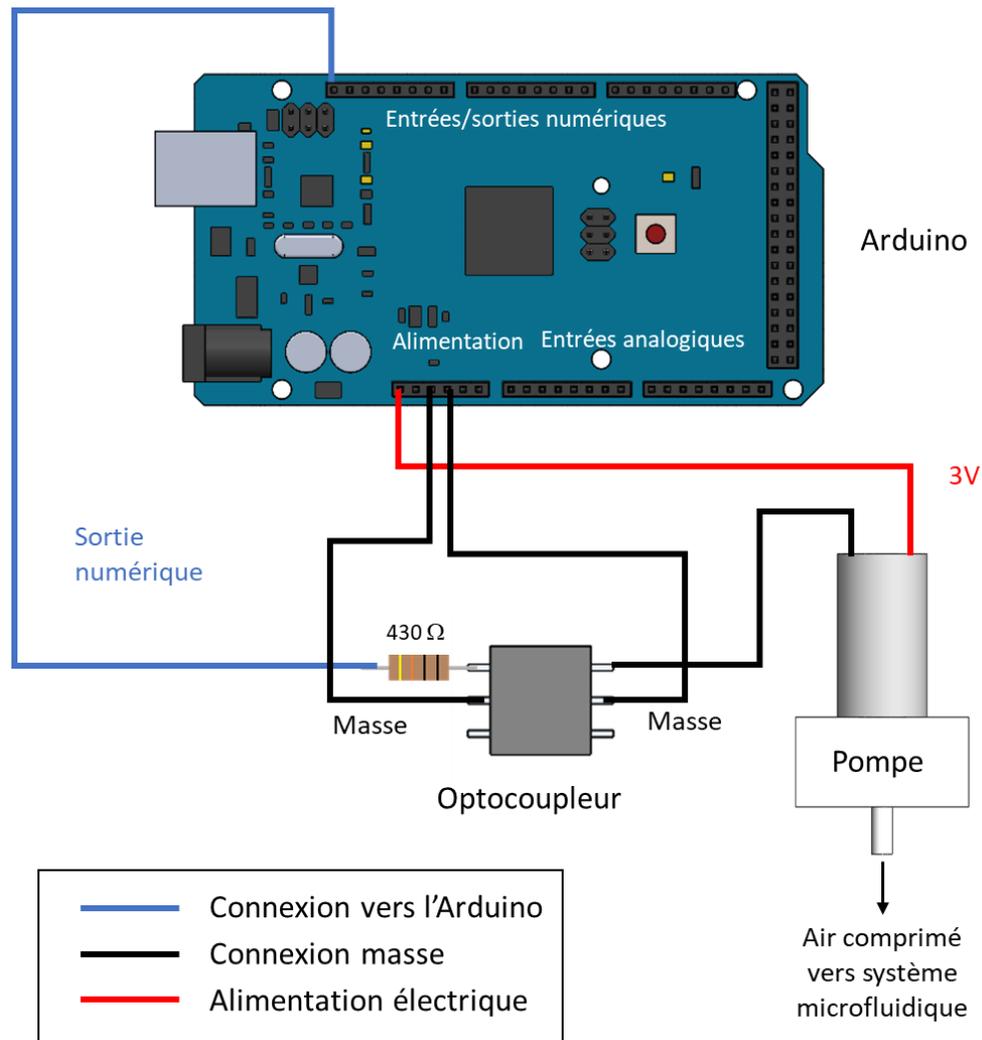


Figure V-9: Contrôle d'une pompe par l'Arduino.

La fonction `digitalWrite` permet de changer l'état de l'optocoupleur. La pompe démarre lorsque l'instruction `digitalWrite(Pin,HIGH)` est envoyée et elle s'arrête pour l'instruction `digitalWrite(Pin,LOW)`.

V.1.4. Régulation de la pression

(i) Capteur de pression

Pour rappel, dans le banc expérimental, la régulation de la pression s'effectuait à l'aide du contrôleur de pression MFCS (Fluigent). Le pilotage des cartes n'exigeant pas une très grande précision en pression, un système plus simple et miniaturisé peut être utilisé. Une tolérance de 50 mBar sera acceptée.

Afin de réguler la pression, chaque micro-pompe sera connectée à un capteur de pression. Le modèle utilisé est le 40PC015G1A (Honeywell) (Figure V-10) qui est un capteur de 15 PSI soit environ 1 bar. Ce capteur utilise un pont de Wheatstone et des jauges de déformation piezoresistives. Le capteur doit être alimenté en 5V et la mesure s'effectue par une entrée analogique de l'Arduino.



Figure V-10: Capteur de pression Honeywell.

Cette entrée est lue par la fonction *AnalogRead()* et peut lire des tensions comprises entre 0 et 5V qui seront converties en valeurs numériques comprises entre 0 et 1023. Pour mesurer la pression, il faut convertir la valeur numérique (N) donnée par la sortie analogique en tension (V). La tension est alors donnée par l'équation suivante :

$$V = N \times \left(\frac{5}{1024} \right) \quad (V.1)$$

La documentation du capteur indique que la sensibilité S du capteur est de 266,6 mV par PSI et la tension d'offset (V_{offset}) est de $0,5 \pm 0,04$ mV. La pression P en PSI est donc donnée par la formule suivante :

$$P(PSI) = \frac{V - V_{offset}}{S} \quad (V.2)$$

Enfin, pour convertir la pression en mBar, l'équation (V.3) doit être appliquée.

$$P(mBar) = P(psi) * 68.48 \quad (V.3)$$

(ii) Boucle de régulation de pression

Le programme à charger dans l'Arduino correspondant à la mesure de pression est donné en annexe 3. Pour réguler la pression dans le système, le principe est de démarrer la pompe jusqu'à la pression demandée et d'arrêter la pompe quand la pression est atteinte (Figure V-11).

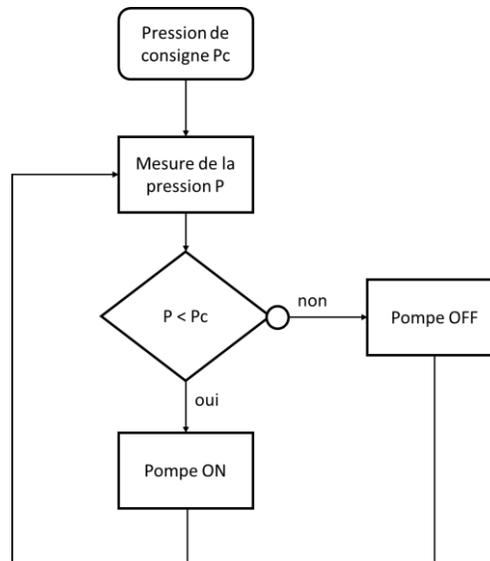


Figure V-11: Organigramme de programmation pour la régulation de pression.

Pour cela, le montage suivant est réalisé (Figure V-12).

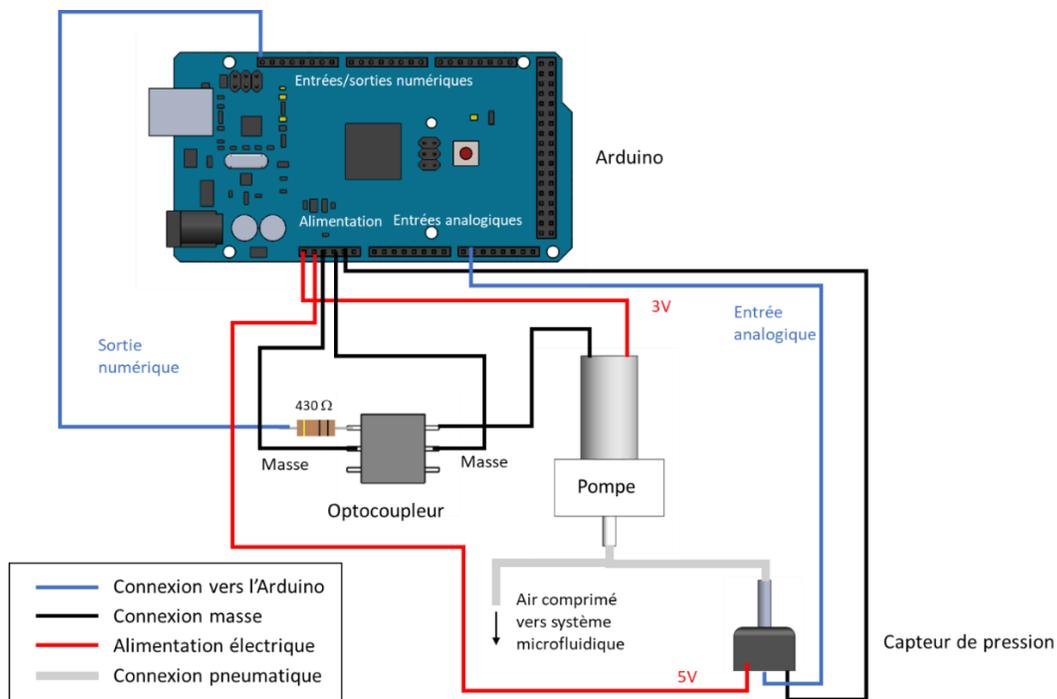


Figure V-12: Montage pour réguler la pression.

Le programme associé à ce montage est présenté en annexe 4.

V.1.5. Réseau pneumatique associé aux sources de pressions

Le réseau pneumatique d'une source de pression doit comporter un réservoir pour plusieurs raisons. Au démarrage des pompes, il faut un certain temps pour compresser l'air et atteindre la valeur

consigne imposée, ce temps sera désigné par le temps pneumatique. Par ailleurs, la mesure de la consigne s'effectue via l'électronique avec un temps de cycle limité par la programmation de l'Arduino, c'est le temps de cycle de mesure, qui sera désigné par le temps électronique.

Pour ne pas avoir un dépassement de consigne pendant la mise en pression du système, le temps pneumatique doit être plus grand que le temps électronique. Il est important de ne pas dépasser la consigne imposée car le circuit choisi est fermé donc il n'est pas possible de faire chuter la pression pour la réguler. Le choix de la micro-pompe ayant été effectué, c'est le dimensionnement du réservoir de compensation qui permettra de définir le temps pneumatique optimum. Par ailleurs, pendant le déroulement d'un protocole, chaque actionnement des chambres et des vannes de la carte fluidique génère un échappement d'air, il en résulte une baisse de pression dans le réseau pneumatique. Ces chutes de pression, si elles sont trop importantes, risquent de se répercuter sur l'ensemble de la carte et de perturber le déroulement du protocole. Le rôle du réservoir de compensation est aussi de limiter l'amplitude de la chute de pression liée aux échappements d'air à chaque changement d'état de la carte fluidique.

Un réservoir trop petit provoquerait donc un dépassement de la consigne imposée et un écroulement de la pression pneumatique à chaque actionnement des chambres fluidique alors qu'un réservoir trop grand imposerait une montée trop lente en pression et un encombrement trop important.

Pour déterminer le volume optimum, une démarche expérimentale est adoptée en utilisant des seringues qui permettent de tester facilement différents volumes. Le montage présenté en Figure V-13 est alors utilisé.

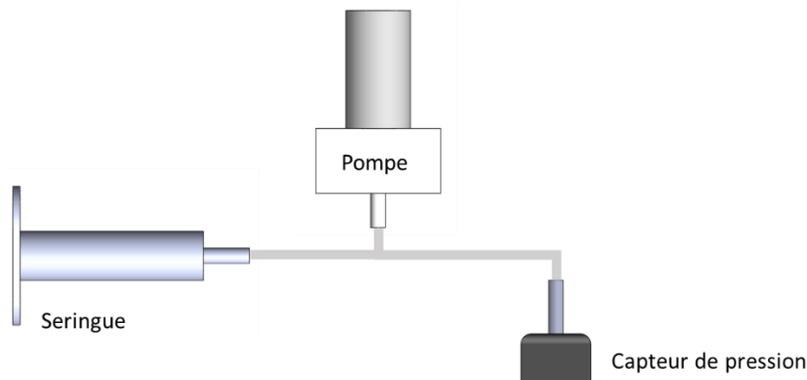


Figure V-13: Montage de la mesure de montée en pression pour différents volumes de seringues.

Pour tester différents volumes, une seringue de 20 mL est fixée sur un pousse-seringue pour bloquer le piston et est réglée à différents volumes (5, 10, 15 et 20 mL). La pression est alors mesurée en fonction du temps dès le démarrage de la pompe pour une consigne de 400 mBar. Les différentes courbes sont représentées en Figure V-14. Les oscillations visibles sur ces courbes peuvent être assimilées à la pompe à membrane qui injecte de l'air sous forme de pulses.

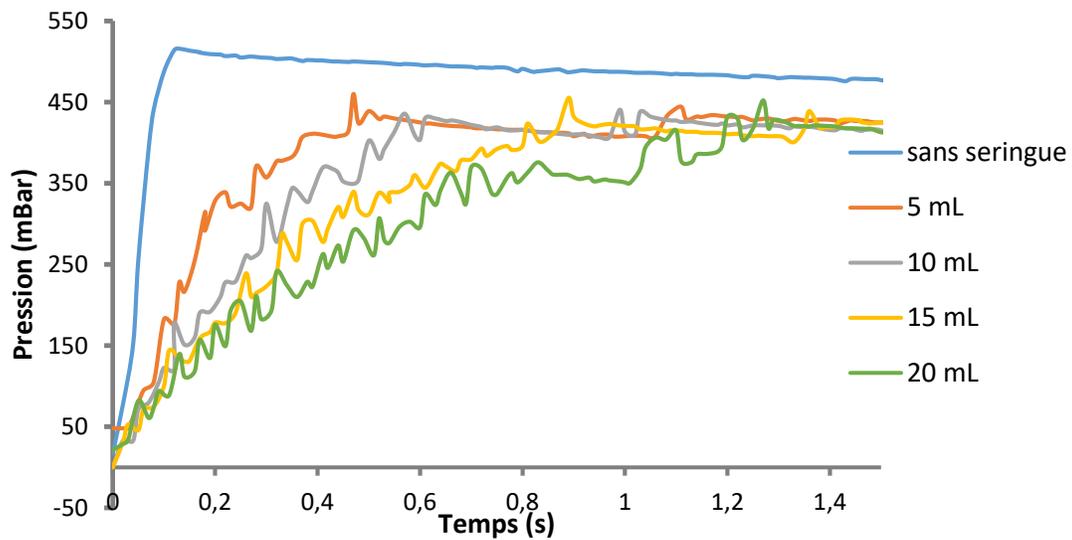


Figure V-14 : Mesure de la montée en pression en fonction du temps.

La courbe bleue, correspondant à la mesure de pression d'une pompe sans réservoir, présente une pente très élevée au démarrage et dépasse de 100 mBar la pression de consigne imposée (400 mBar) ce qui confirme la nécessité de ralentir la montée en pression.

Pour évaluer le volume minimum du réservoir à ajouter, il faut calculer la pression atteinte au bout d'un cycle de mesure avec l'Arduino pour chaque volume de seringue. Pour cela, les courbes peuvent être approximées par une exponentielle. En effet, une analogie peut être faite entre la montée en pression et la charge d'un condensateur d'un circuit RC où la pression est analogue à la tension, les pertes de charge sont analogues à la résistance R et le volume du réservoir est analogue à la capacité C du condensateur. L'équation de la montée en pression en fonction du temps est alors :

$$P = P_{max} (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (V.4)$$

Dans le cas du circuit RC, τ , la constante de temps est égale au produit RC. Pour calculer cette constante, une méthode consiste à calculer le temps correspondant à 63% de la valeur maximale (P_{max}). En utilisant l'équation (V.4) et en calculant la valeur de τ pour chaque expérience, les courbes pour chaque volume de seringue peuvent être approximées. Graphiquement, il est possible de vérifier que les courbes se superposent correctement (Figure V-15).

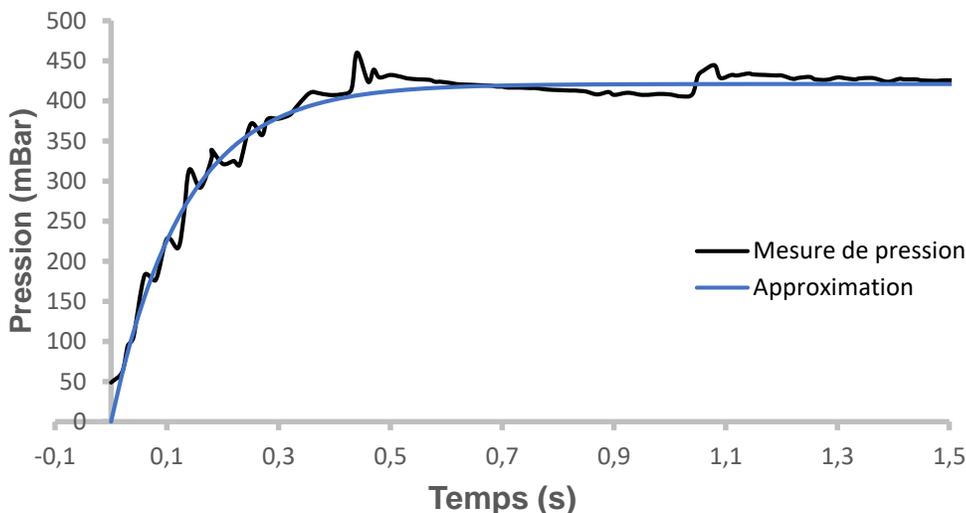


Figure V-15: Mesure de pression en fonction du temps pour un réservoir de 5 mL et courbe d'approximation.

Le temps de réponse de l'Arduino a été mesuré pour un cycle et correspond à environ 50 ms. A l'aide de l'équation (V.4), la pression atteinte au bout de 50 ms peut être calculée pour chaque volume de seringue (Tableau V-1).

Volume (mL)	P pour 1 cycle (mBar)	P pour 2 cycles (mBar)
0	448,9	485,7
5	134,4	225,9
10	86,0	154,5
15	60,9	113,0
20	44,6	84,4

Tableau V-1 : Pression mesurée au bout de 50 ms pour les différents volumes de seringues.

Pour rappel, les pressions souhaitées pour le système sont 150 mbar, 400 mBar et 500 mBar. La pompe nécessitant la montée en pression la plus faible et la plus de précision est celle associée à l'injection des liquides (150 mBar). D'après le Tableau V-1, il est préférable d'utiliser un réservoir de 10 mL pour atteindre précisément une valeur de 150 mbar au bout de 2 cycles. Pour les pompes devant délivrer des pressions de 400 mBar et de 500 mBar, des seringues de 5 mL sont suffisantes.

Concernant la mesure de la chute de pression, il faudra vérifier sur le montage final que lorsque la pompe est sollicitée (ouverture des électrovannes), la pression ne chute pas trop rapidement et que les sources de pression réagissent suffisamment vite pour compenser (voir section V.1.12(iv)).

V.1.6. Pilotage des électrovannes

Les électrovannes sélectionnées pour l'instrument sont identiques à celle utilisées dans le banc expérimental (référence SMC S070), (Chapitre II, section II.5.1). Elles sont alimentées en 24 V et fonctionnent pour des pressions inférieures à 5 Bars. Une carte électronique développée

précédemment dans le laboratoire est associée à chaque boîtier de 8 électrovannes (Figure V-16) et ne sera donc pas redéveloppée.

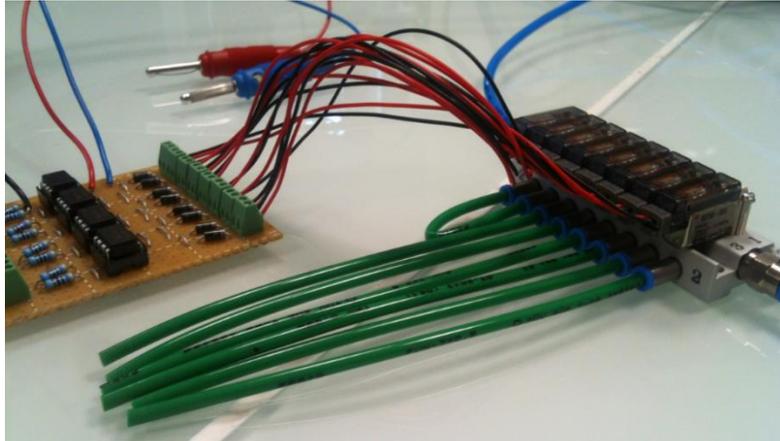


Figure V-16: Image du bloc d'électrovannes relié à sa carte électronique.

Chaque électrovanne est connectée à un optocoupleur pour être contrôlée via l'Arduino. Le schéma électronique des composants reliés à chaque électrovanne est représenté en Figure V-17.

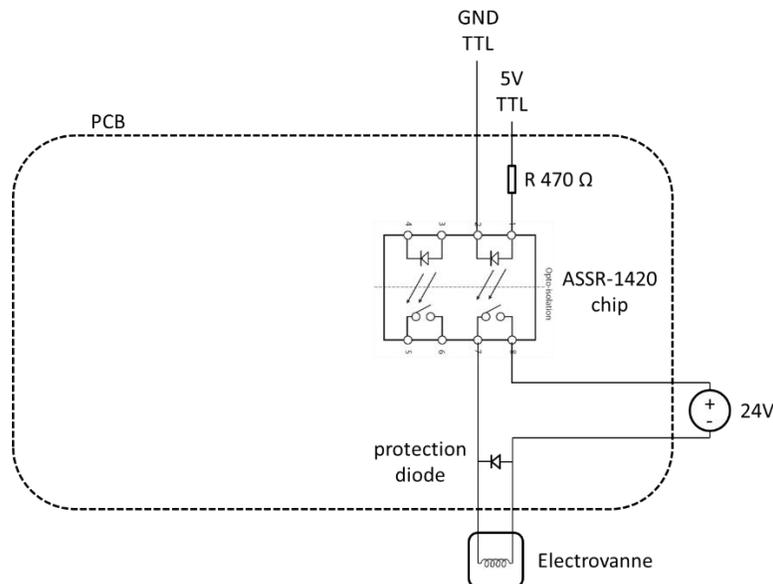


Figure V-17: Schéma électronique d'une électrovanne.

Le contrôle s'effectue par l'Arduino en envoyant via la commande : $digitalWrite(Pin, HIGH)$ ou $digitalWrite(Pin, LOW)$. Pour rappel, les deux boîtiers d'électrovannes permettent de délivrer alternativement la pression P_{CO}/P_{VO} ou la pression atmosphérique. Les électrovannes sont connectées de sorte que la pression atmosphérique soit délivrée lorsque les électrovannes ne sont pas actives, la commande correspondante est alors $digitalWrite(Pin, LOW)$. Pour délivrer la pression P_{CO}/P_{VO} , il faut alors envoyer la commande $digitalWrite(Pin, HIGH)$.

V.1.7. Pilotage de l'instrument via un écran tactile et premiers tests

L'instrument sera piloté via un écran tactile. Cet écran servira d'interface avec le microcontrôleur pour lui envoyer des instructions. L'écran tactile choisi est le Watterott mi0283qt-2 qui mesure 2.8 pouces (43.2 x 57.6mm). L'écran est programmé à l'aide de la librairie GraphicsLib.h [107].



Figure V-18: Image de l'écran tactile (Watterott mi0283qt-2).

A l'aide de l'écran, des instructions vont être envoyées aux électrovannes pour changer leur état. Ainsi, l'écran permettra d'effectuer les différentes étapes d'un protocole. Pour tester l'interface entre l'écran et les électrovannes, le montage suivant est réalisé (Figure V-19).

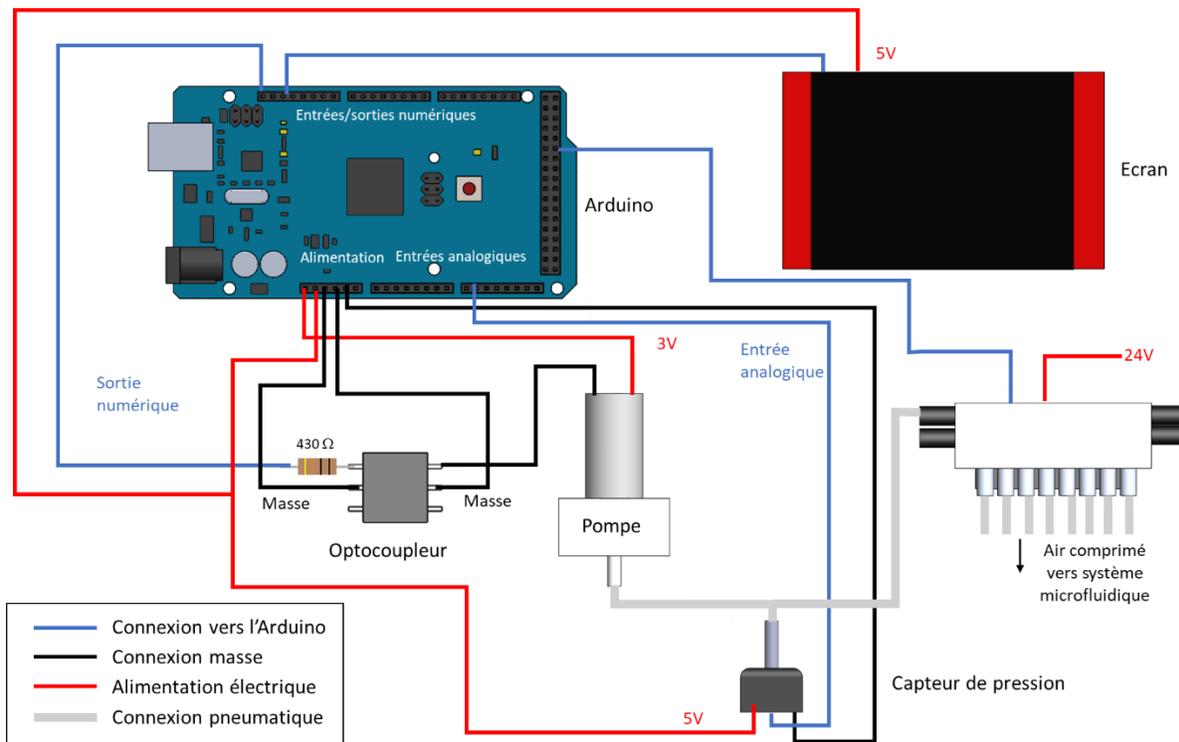


Figure V-19: Schéma du montage réalisé pour tester l'interface entre l'écran et les électrovannes.

Une image du schéma électrique réalisé à l'aide d'une plaque de prototypage est représentée en Figure V-20.

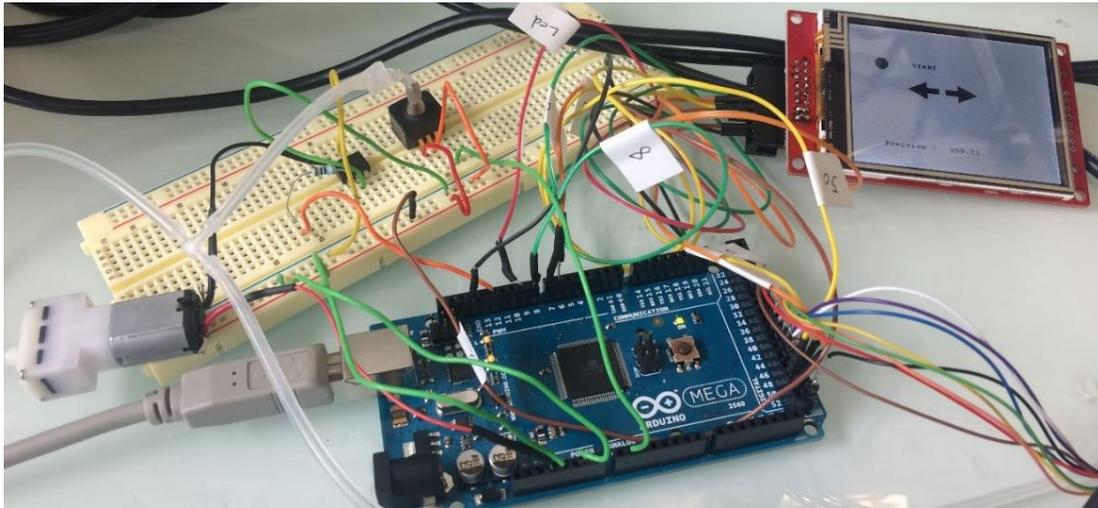


Figure V-20: Image du montage électrique.

Un premier programme simplifié est réalisé. Sur l'écran, deux flèches sont dessinées ainsi qu'un bouton « Start ». La pression mesurée est également affichée (Figure V-21).

Les flèches sont programmées pour déplacer un volume de liquide d'une chambre vers une autre. Par exemple, en appuyant sur la flèche de gauche, la chambre de gauche s'ouvre et la chambre de droite se ferme. Ce changement de configuration est obtenu en changeant l'état des électrovannes qui vont faire basculer la pression sous chaque chambre entre P_{C1} et P_{C0} . Le programme associé à cette expérience est détaillé en annexe 5.

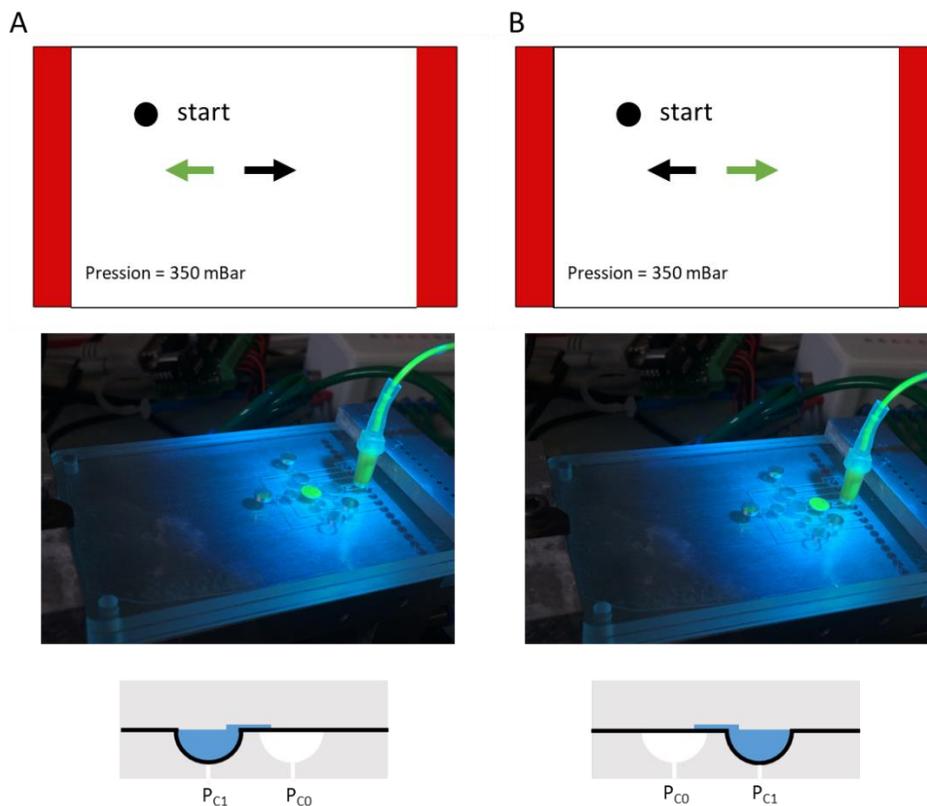


Figure V-21: Expérience de validation préliminaire : déplacement d'un volume de liquide d'une chambre vers une autre en utilisant l'écran tactile.

La prochaine étape est le montage complet avec les trois sources de pression avec un programme plus complexe.

V.1.8. Conception du circuit électronique

Pour intégrer les différents composants électroniques dans un instrument portable, un circuit électronique regroupant l'intégration des trois sources de pression et l'alimentation va être conçu. L'électronique associée aux électrovannes ne sera pas intégrée dans ce circuit puisqu'elle sera pas redéveloppée.

Les trois sources de pression nécessitent l'intégration de :

- Trois pompes
- Trois optocoupleurs
- Trois capteurs de pression

Ces composants électroniques vont être assemblés sur un même PCB. Les électrovannes sont achetées avec l'électronique associée et ne seront donc pas assemblées sur le PCB.

La Figure V-22 représente le schéma du circuit électronique à concevoir sur le PCB. Les pompes seront placées à l'extérieur du PCB. Chaque pompe est connectée pneumatiquement à un capteur

de pression et électriquement à un optocoupleur. Elles permettent de fournir les pressions P_L , P_{VO} et P_{CO} définies précédemment. Chaque optocoupleur est couplé à une sortie digitale de l'Arduino (N1, N2, N3). Les capteurs de pression sont connectés chacun à une entrée analogique (A1, A2, A3).

Pour gérer les alimentations, trois convertisseurs de tension (Tracopower, TSR 1-2433, TSR 1-24120, TSR 1-2450) sont nécessaires. A partir d'une tension de 24 V, ces convertisseurs permettent d'obtenir des tensions de 3,3V, 12V et 5V). La tension de 3,3V alimente les pompes, celle de 12V l'Arduino, et celle de 5V l'écran ainsi que les capteurs de pression. Les électrovannes sont alimentées directement en 24V.

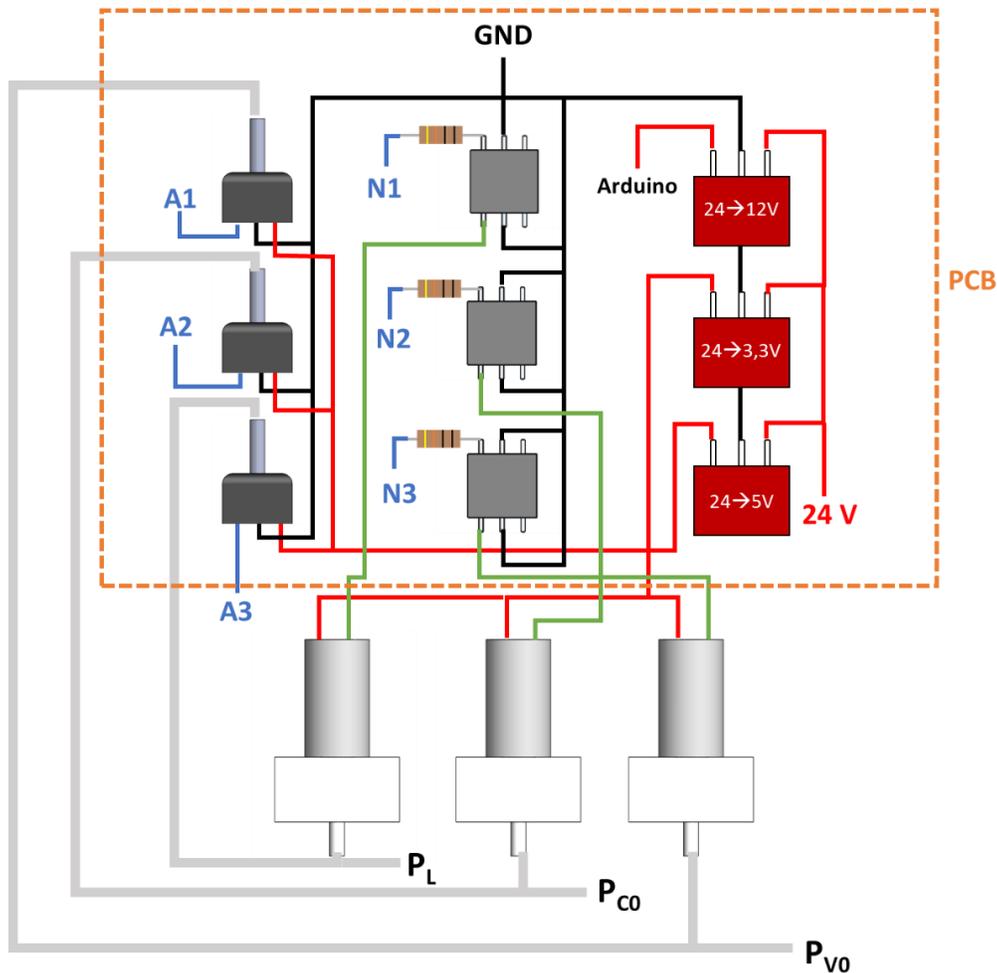


Figure V-22: Schéma du circuit électrique à concevoir sur le PCB.

Le schéma électrique est réalisé à l'aide du logiciel Kicad (Figure V-23). Il permet de visualiser les connexions électriques entre les différents composants et de réfléchir à leur emplacement.

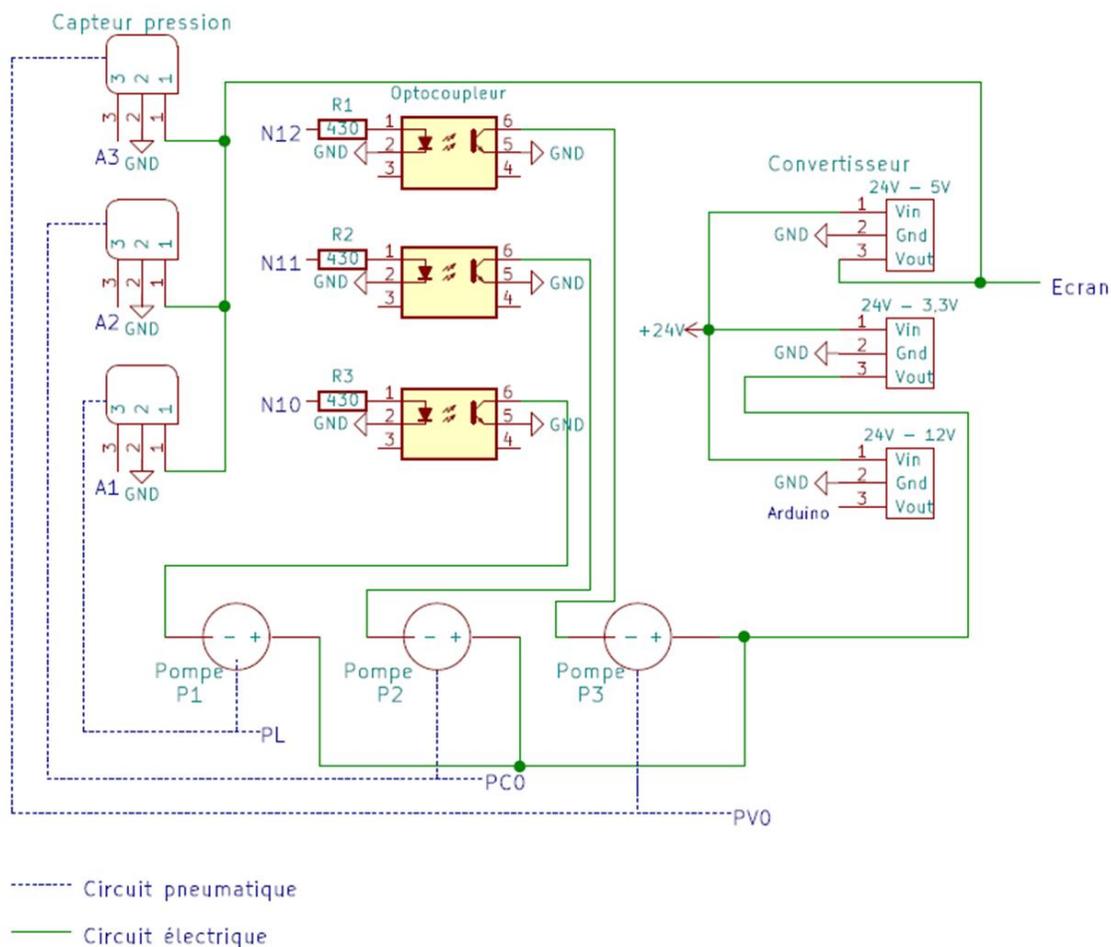


Figure V-23: Schéma électrique réalisé sur Kicad.

Le logiciel Kicad permet également de représenter les pistes entre les composants (Figure V-24). Au vu de la redondance des composants, il est intéressant de les placer sur des pistes verticales. Ainsi, il est plus simple de gérer les alimentations et les masses communes.

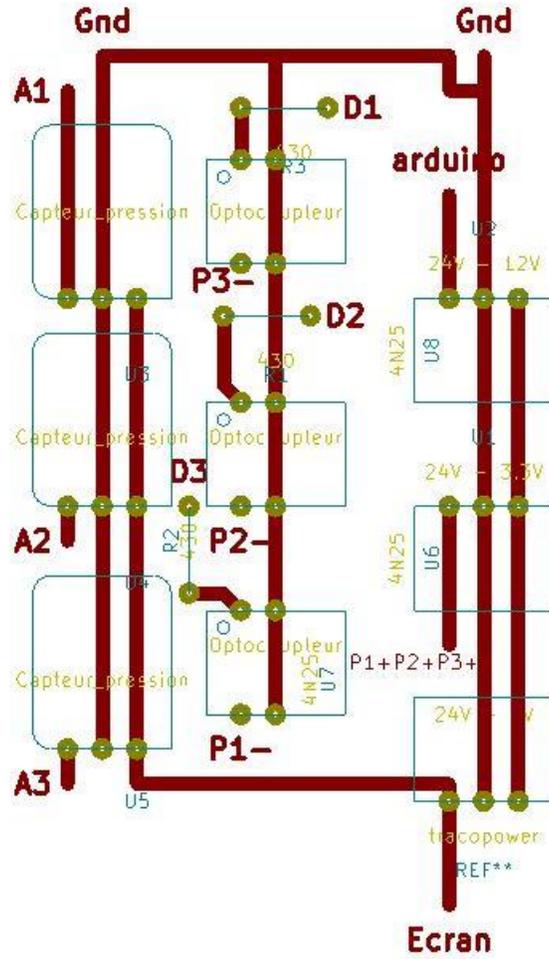


Figure V-24: Schéma sur circuit électrique sur le PCB.

Les composants vont être soudés sur une plaque comportant des pistes de cuivre verticales (Figure V-25).

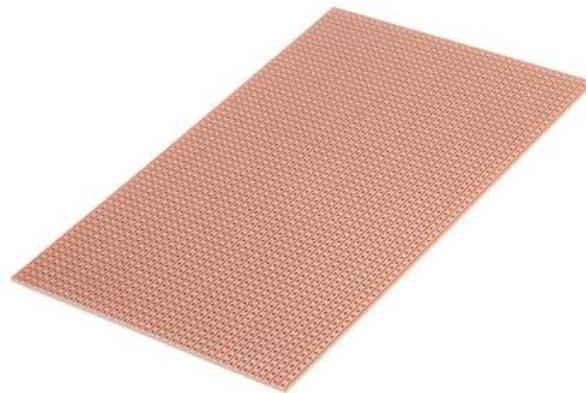


Figure V-25: Photo de la carte utilisée.

Certaines pistes ne doivent pas être continues. Pour cela, le schéma réalisé sur Kicad est exporté dans le format DXF. Ensuite, les découpes peuvent être ajoutées à l'aide du logiciel Draftsight (Figure V-26). Enfin, les pistes sont découpées à l'aide d'une machine d'usinage (Charly 4U) décrite dans le chapitre II.

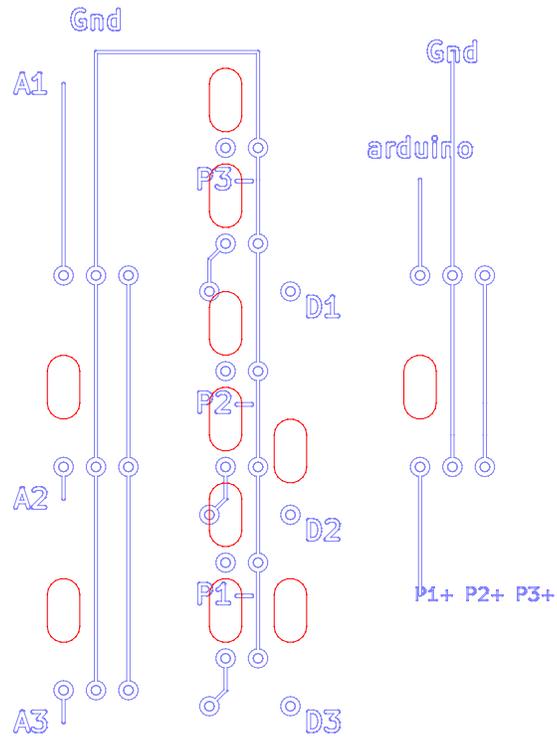


Figure V-26: Schéma DXF avec les pistes découpées (pastilles rouges).

V.1.9. Système final à intégrer

Le système final à intégrer dans un instrument portable est représenté en Figure V-27.

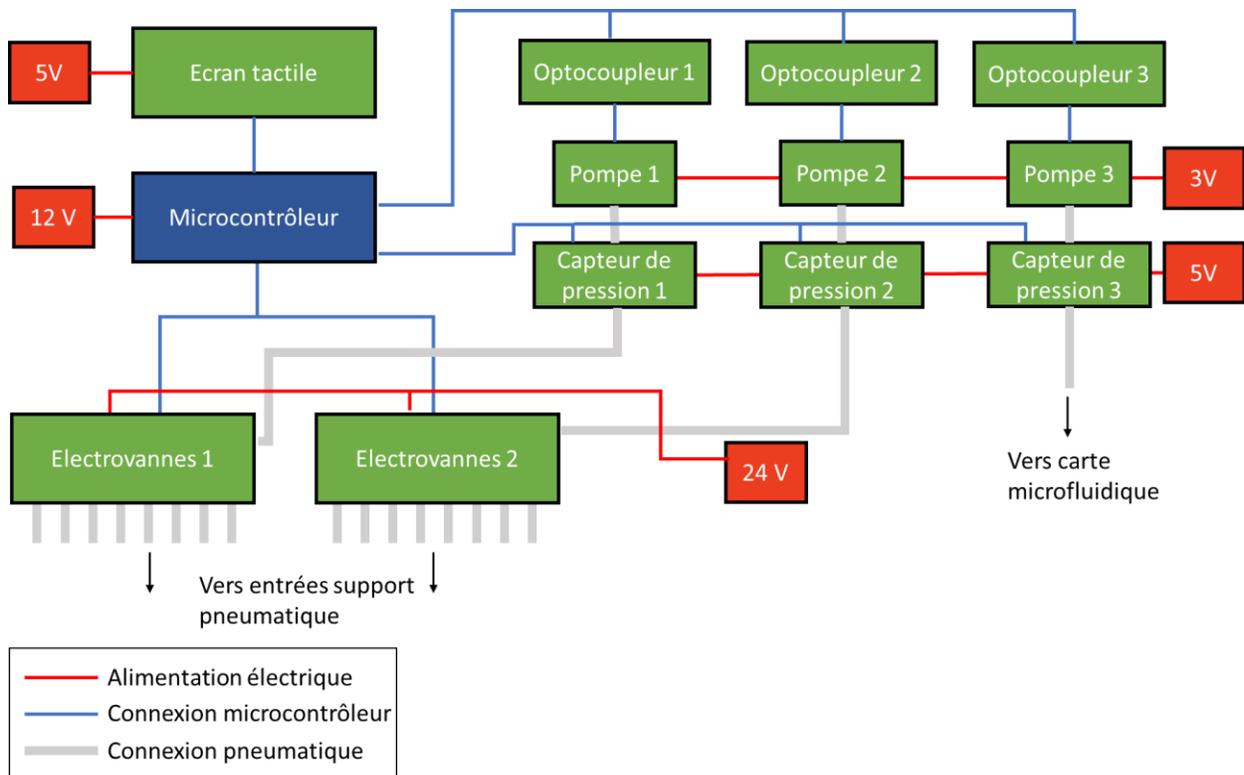


Figure V-27: Schéma du système final à intégrer.

Un boîtier va être conçu pour intégrer tous ces éléments.

V.1.10. Conception du boîtier

Le boîtier est conçu à l'aide du logiciel de CAO Solidworks. Les composants électroniques sont redessinés sur Solidworks afin de pouvoir définir les dimensions du boîtier et donc de l'instrument final (Figure V-28). Le boîtier va mesurer 24 cm en longueur, 10 cm en hauteur et 14 cm en largeur. Il comprend les composants décrits dans la Figure V-27 ainsi qu'un support de carte microfluidique. Ce boîtier va comporter trois niveaux.

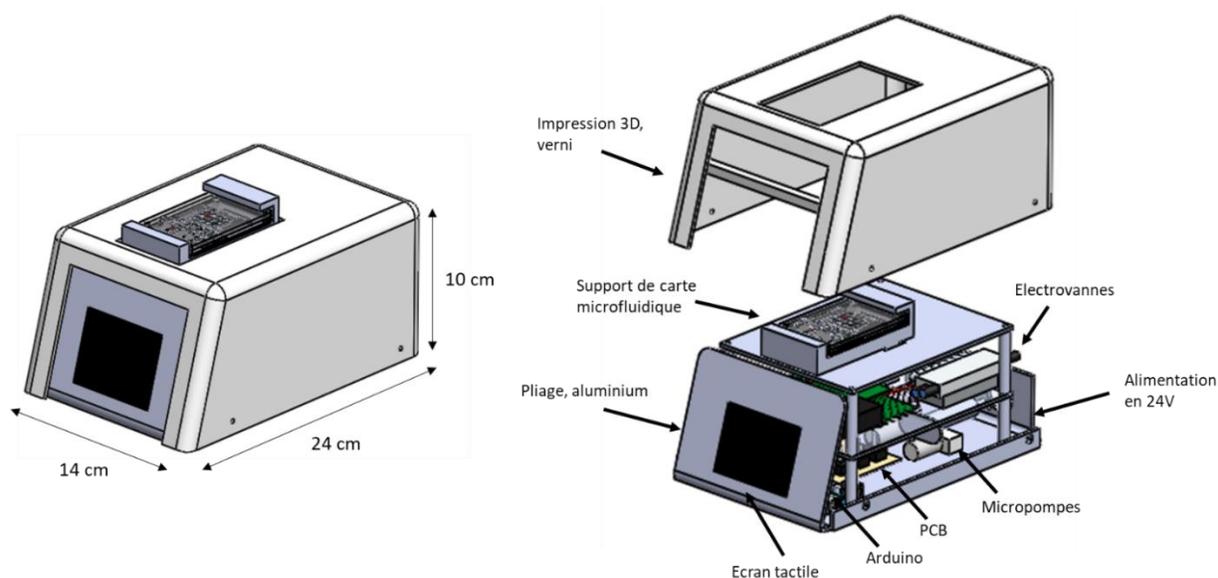


Figure V-28: Schéma du boîtier intégrant les composants électroniques nécessaires au pilotage de la carte microfluidique.

Deux matériaux seront utilisés pour concevoir ce boîtier : le capot blanc sera réalisé en impression 3D par la société Initial et le reste des pièces sera conçu en aluminium par la société Nominal concept. Au final, l'instrument va être alimenté en 24V et pourra être complètement autonome en ajoutant une batterie.

V.1.11. Assemblage de l'instrument

(i) Assemblage du premier niveau : électronique et sources de pression

Le premier niveau comprend trois pompes reliées chacune à un capteur de pression et à un optocoupleur, l'Arduino ainsi que les convertisseurs de tension pour convertir la tension d'entrée 24V en 5V, 3V et 12V. Pour rappel, la tension de 24V permet d'alimenter les électrovannes, la tension 5V est utilisée pour les capteurs de pression, la tension 3V alimente les pompes et la tension 12V, l'Arduino (Figure V-29).

Les trois pompes P1, P2, P3 sont reliées aux capteurs de pression C1, C2, C3. Les optocoupleurs connectés aux pompes P1, P2, P3 sont respectivement reliés aux sorties numériques 10, 11, 12. Les capteurs de pression sont respectivement reliés aux entrées analogiques A1, A2, A3.

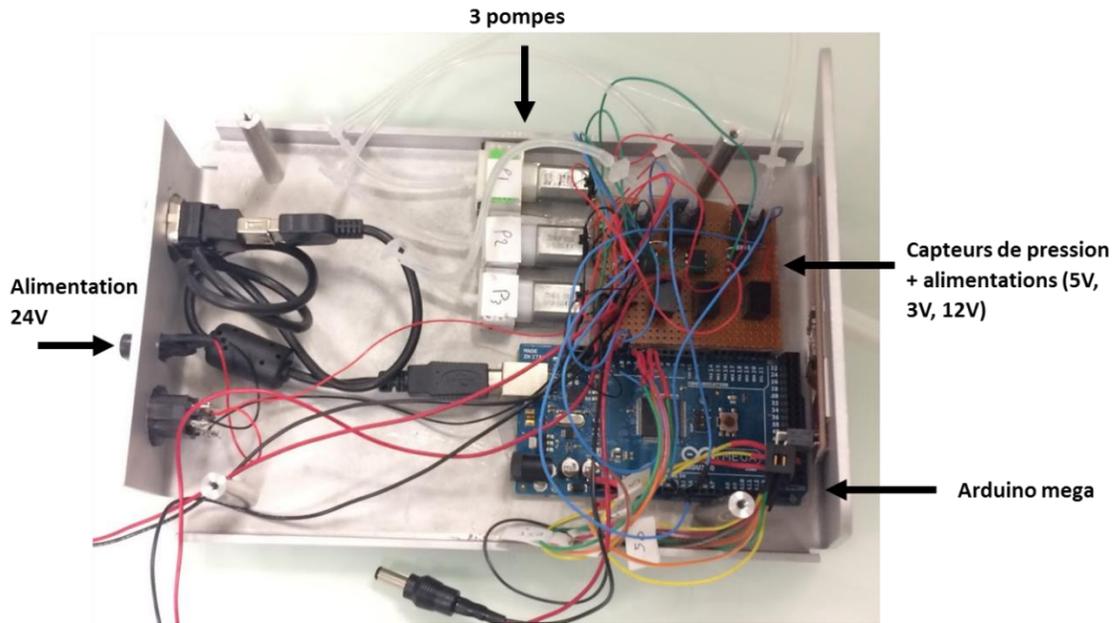


Figure V-29: Vue du dessus du premier niveau assemblé.

Un connecteur permet d'alimenter l'instrument en 24V. Un interrupteur (4685396, RS) est ajouté pour couper l'alimentation de l'instrument. Enfin, un connecteur USB (862-1573, RS) est intégré pour changer le programme de l'Arduino facilement sans démonter le boîtier.

Le premier niveau comporte également l'écran tactile qui est relié à l'Arduino pour le programmer (Figure V-30)

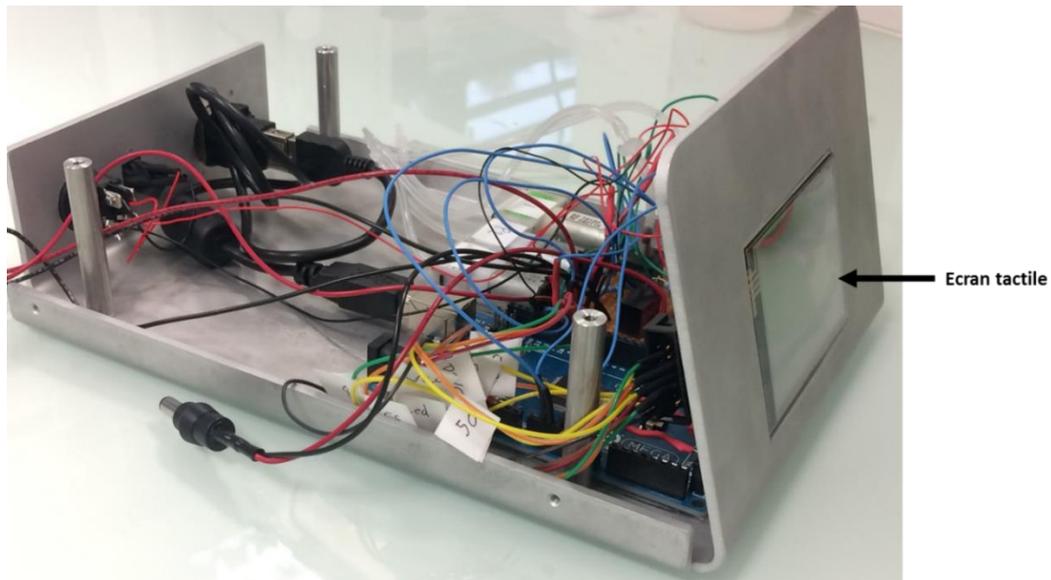


Figure V-30: Autre vue du premier niveau assemblé.

(ii) Assemblage du deuxième niveau : boîtier d'électrovannes

Le deuxième niveau comprend les électrovannes alimentées en 24V ainsi que l'électronique associée pour les piloter (optocoupleurs). Les entrées des électrovannes sont reliées aux différents tubes des pompes et sont pilotées à l'aide de l'Arduino. Les sorties des électrovannes sont ensuite reliées au support de carte microfluidique (Figure V-31).

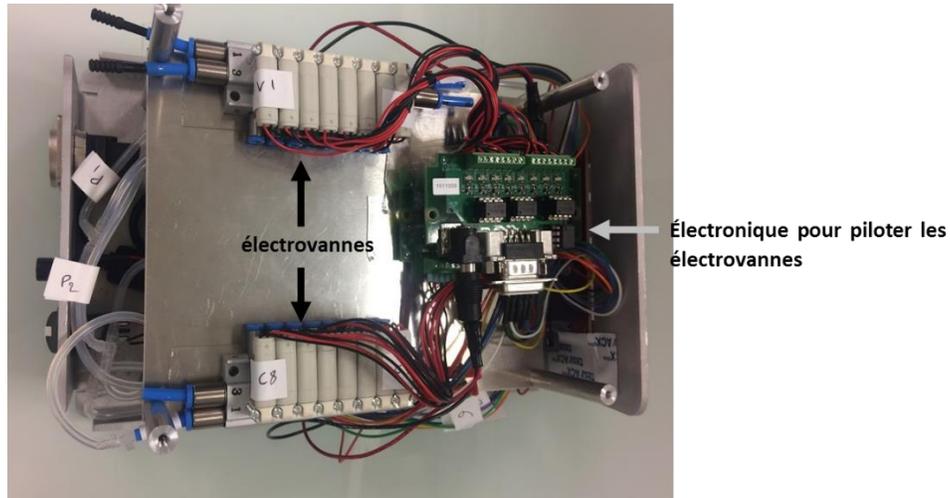


Figure V-31: Vue du dessus du deuxième niveau.

(iii) Vue d'ensemble des deux niveaux

La Figure V-32 représente une vue de profil du boîtier avec les deux niveaux assemblés. Les seringues connectées aux pompes pour ajouter un réservoir dans le réseau pneumatique sont collées sous le niveau 2 pour optimiser l'espace.

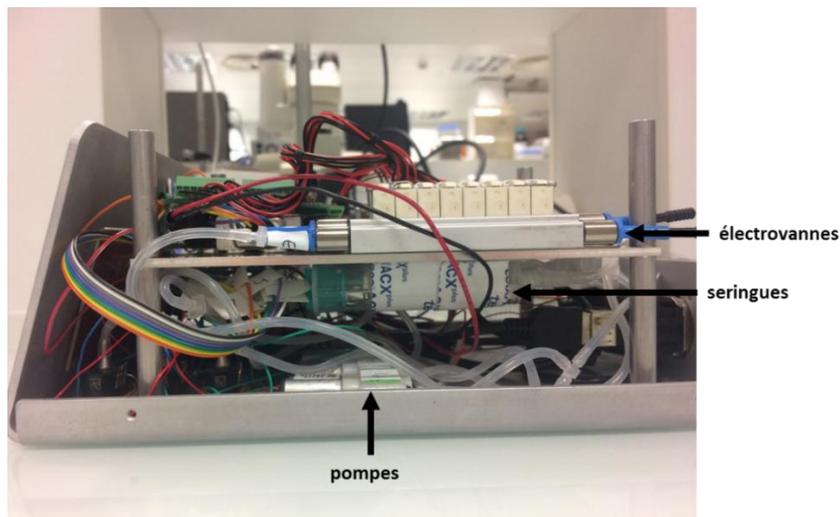


Figure V-32: Vue de profil du boîtier avec les deux niveaux assemblés.

(v) Vue de l'instrument fermé

La dernière étape est d'ajouter le capot pour refermer l'instrument (Figure V-35).

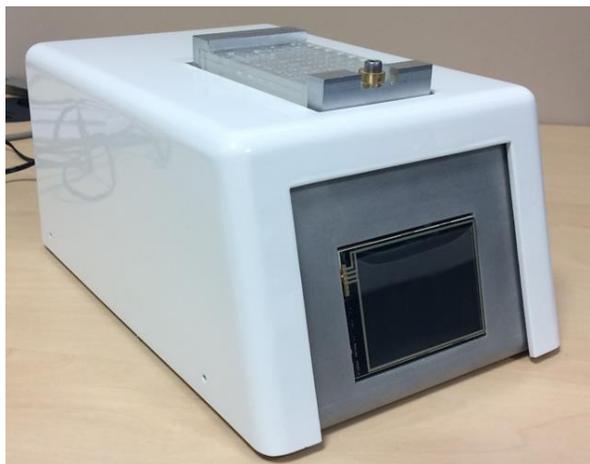


Figure V-35 : Vue de l'instrument fermé.

V.1.12. Première application : utilisation de cet instrument pour la fête de la science 2017

L'instrument a été conçu pour piloter des cartes complexes telles que les cartes de tests ELISA mais il a également été conçu pour être générique et piloter tout type de cartes compatibles avec le support de carte, les électrovannes et les pressions délivrées par les pompes. Il peut donc être utilisé pour d'autres types d'applications en adaptant le programme et la carte microfluidique associée.

Une première application pour cet instrument sera un démonstrateur pour illustrer le principe de la technique d'actionnement des chambres étirables. Ce démonstrateur pourra être utilisé lors de visites ou d'événements.

Une carte dédiée pour cette application va être présentée dans ce chapitre. Des contraintes sont à prendre en compte pour cette application. Il est nécessaire que l'utilisateur n'ait pas à gérer de liquides. Il faut donc que la carte soit pré-remplie, autonome et utilisable facilement par tout le monde. La carte doit également être actionnée de manière ludique, visuelle et pédagogique. Le premier événement visé est la fête de la science qui permettra de tester la robustesse de l'instrument et de la carte associée sur une période de plusieurs jours en situation réelle.

(i) Carte microfluidique développée

La carte développée pour le démonstrateur est une carte comportant une matrice de chambres ainsi que des chambres formant « CEA » (Figure V-36). Les chambres de la matrice mesurent 2,43 mm de rayon pour un volume de 30 μL et les chambres formant « CEA » mesurent 1,68 mm de rayon pour un volume de 10 μL .

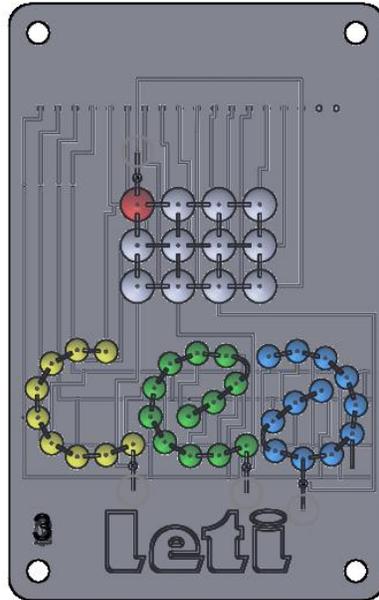


Figure V-36: Carte développée pour la fête de la science.

La matrice de chambres et chaque lettre possèdent une connectique Luer et une vanne pour le remplissage initial de la carte. Ensuite, des bouchons sont utilisés pour fermer la carte et pour piéger le liquide à l'intérieur.

(ii) Programmation de la carte

La programmation est représentée dans la Figure V-37.

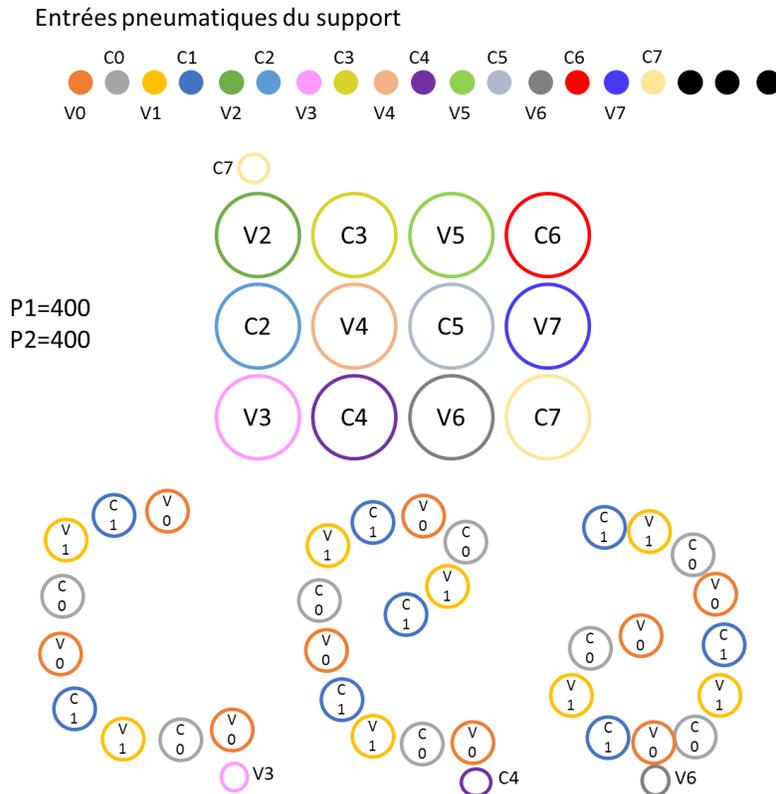


Figure V-37: Programmation de la carte de démonstration pour la fête de la science.

Quatre électrovannes sont dédiées au pilotage des lettres CEA. Plusieurs chambres d'une même lettre sont reliées ensemble et seront donc actionnées simultanément. Chaque chambre de la matrice est pilotée individuellement et nécessite donc 12 électrovannes. Les 16 électrovannes de l'instrument sont donc toutes utilisées. Les vannes d'entrée de la matrice et des lettres sont reliées à des chambres de la matrice car il n'y avait pas assez d'électrovannes pour tout dissocier.

Pour piloter cette carte, seules les sources P1 et P2, connectées chacune à un boîtier d'électrovannes, seront utilisées. La pression sera égale à 400 mBar pour les deux pompes car dans cette configuration, il n'est pas nécessaire d'avoir plusieurs pressions. Une seule pompe pourrait être utilisée mais l'instrument a été conçu avec trois pompes et une pompe différente connectée sur chaque boîtier d'électrovannes donc il sera utilisé dans cette configuration.

(iii) Pilotage de la carte avec l'écran

Le principe de cette carte est de transférer le liquide d'une chambre vers une autre dans la matrice. Pour cela, une chambre sera initialement remplie de liquide qui va se déplacer de chambre en chambre en changeant la pression à l'aide des électrovannes. Concernant le programme des lettres « CEA », initialement, les chambres seront toutes remplies puis à chaque étape une électrovanne différente parmi les 1, 2, 3, 4 (V0, C0, V1, C1) sera fermée pour vider certaines chambres.

La carte est pilotée à l'aide de l'écran tactile. L'écran comporte deux pages. La première page permet de remplir, d'initialiser ou de vider les chambres (Figure V-38). Une flèche permet de changer d'écran.

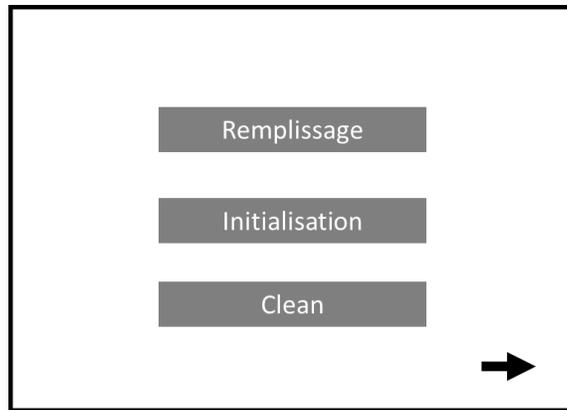


Figure V-38: Ecran de démarrage.

La page 2 comporte un bouton Start pour démarrer le programme associé aux lettres CEA et des flèches pour diriger le liquide dans la matrice (Figure V-39).

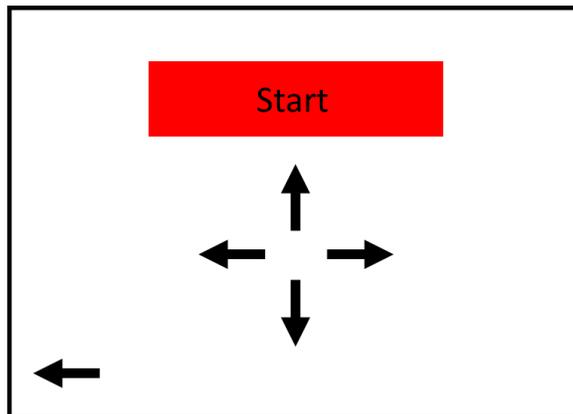


Figure V-39: Page 2 de l'écran tactile.

Initialement, le liquide correspondant au volume d'une chambre (30 μL) est réparti dans toutes les chambres car elles ne sont pas sous pression (Figure V-40).



Figure V-40: Carte et instrument développés pour la fête de la science sur l'instrument.

La phase d'initialisation consiste à fermer les chambres les unes après les autres en commençant par celle en bas à droite dans le but de drainer le fluide pas à pas. Au final, seule la chambre en haut à gauche est ouverte et remplie de liquide (Figure V-41).

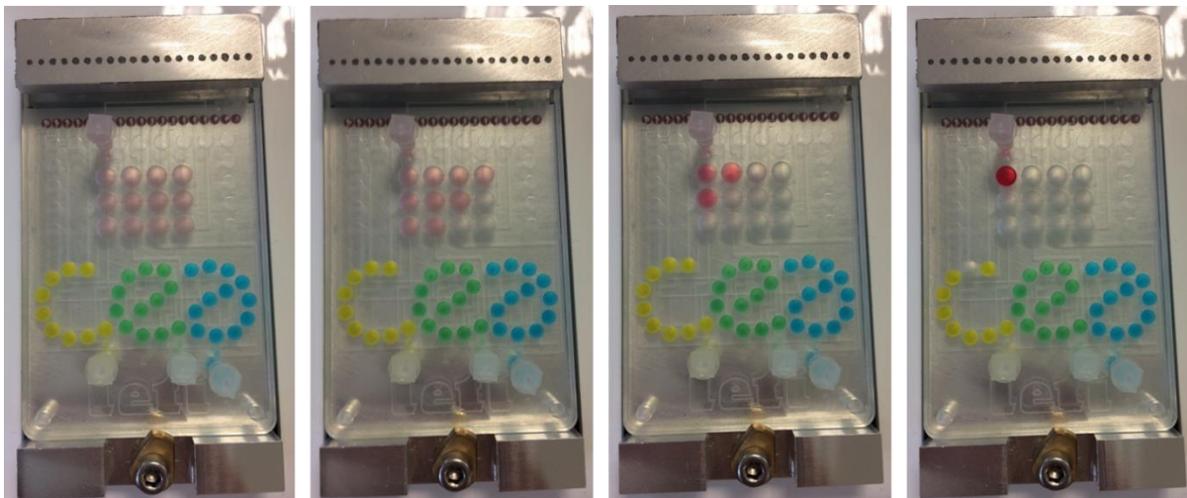


Figure V-41: Phase d'initialisation.

Après l'initialisation, l'utilisateur peut déplacer le liquide de chambre en chambre en utilisant les flèches de l'écran tactile (Figure V-42).

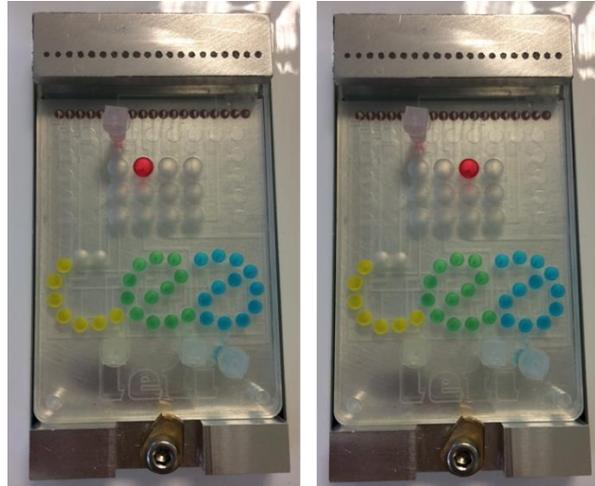


Figure V-42: Utilisation des flèches pour déplacer le liquide de chambre en chambre.

Un autre bouton « start » permet de démarrer une séquence d'actionnement sur les chambres des lettres « CEA ». Les chambres sont regroupées par 3 au niveau de la connexion pneumatique donc elles sont actionnées trois par trois (Figure V-43).

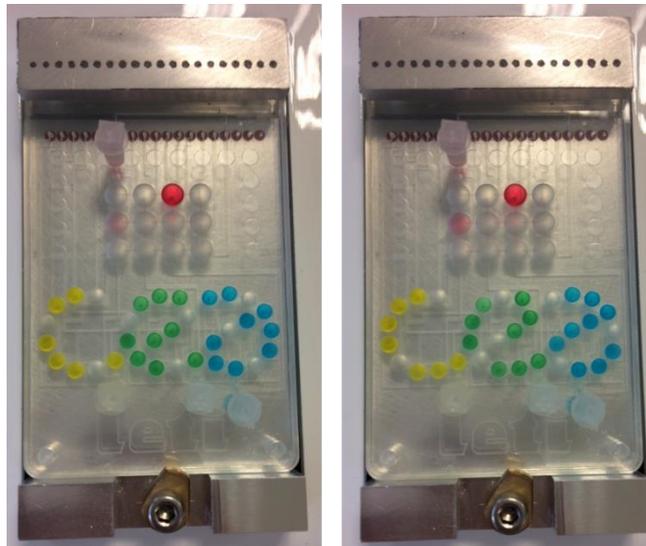


Figure V-43: Actionnement des lettres CEA.

(iv) Vérification du dimensionnement des réservoirs de compensation

Pour évaluer la chute de pression dans le système lors de la sollicitation des pompes, par exemple lors de l'ouverture des électrovannes, la pression à la sortie des sources de pression est mesurée en fonction du temps à l'aide d'un capteur de pression externe à l'instrument et pour une consigne de 400 mBar (Figure V-44).

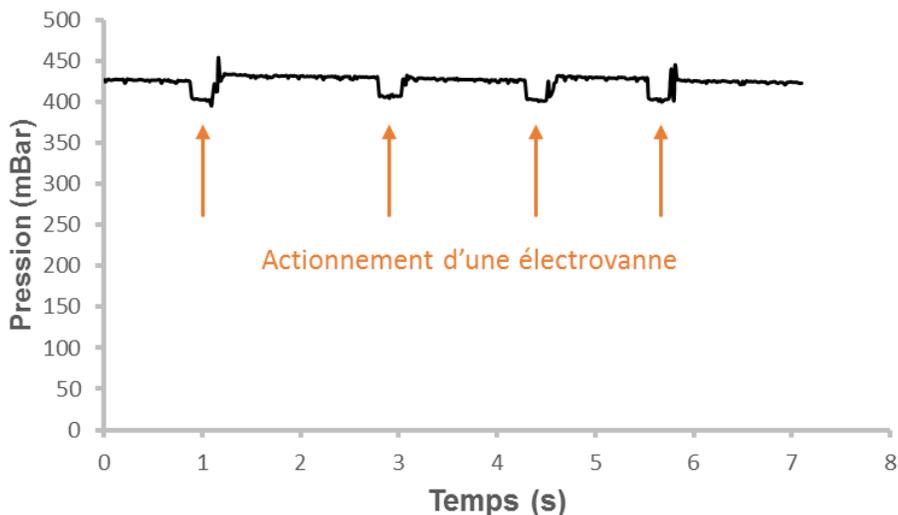


Figure V-44: Mesure de la chute de pression lors d'un changement d'état d'électrovannes.

Lorsque l'utilisateur appuie sur une flèche, une électrovanne s'ouvre et une autre se ferme. Il y a donc une chute de pression dans le système. Cette chute est d'environ 25 mBar et il faut environ 0,2 secondes pour que la pompe redémarre et que la pression atteigne sa valeur initiale. Ces valeurs sont acceptables et ne vont pas perturber le système.

V.1.13. Bilan et validation à la fête de la science

La démonstration lors de la fête de la science a permis de valider l'utilisation de l'instrument pendant trois jours (Figure V-45). Son utilisation a été appréciée et l'instrument est actuellement toujours fonctionnel et utilisé dans le laboratoire lors de visites pour illustrer la technique des chambres variables. Les cartes sont préremplies et peuvent être utilisées pendant plusieurs mois.

Cette première validation à l'aide d'une carte simple de démonstration a montré la capacité de l'instrument portable développé à piloter une carte microfluidique de manière fonctionnelle et autonome avec des sources de pression embarquées. Pour l'instant, il nécessite une alimentation en 24V mais une batterie pourrait être ajoutée afin de le rendre complètement autonome.

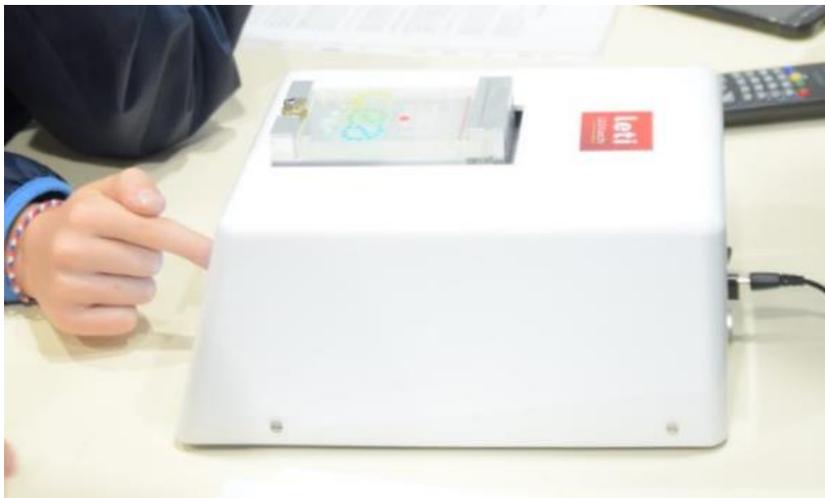


Figure V-45: Instrument à la fête de la science.

L'instrument est également compatible avec des cartes microfluidiques plus complexes. Ainsi, un deuxième exemple sera présenté dans la section V.2.2 en utilisant une méthode d'embarquement de réactif.

V.2. Intégration des réactifs

V.2.1. Description de la technique développée

Une problématique importante pour les tests de terrain est l'embarquement de réactifs. Pour le développement et la validation des cartes microfluidiques, une technique utilisant des seringues connectées a été utilisée. Cette technique permet de préparer rapidement une expérience, de pouvoir changer les seringues pour chaque expérience. Cependant, elle n'est pas adaptée aux applications de terrain car cela demande des manipulations à l'utilisateur (remplir les seringues, connecter les tubes). Il faut donc réfléchir à une autre technique pour embarquer les réactifs.



Figure V-46: Injection des réactifs à l'aide de seringues connectées sur le banc expérimental.

Dans le chapitre I, un état de l'art des solutions existantes a été présenté. Son analyse nous a démontré que les solutions proposées n'étaient pas satisfaisantes et compatibles avec la vision de notre système. Pour rappel, la solution recherchée doit répondre aux critères suivants :

- Utilisation simple (peu de manipulations de réactifs par l'utilisateur)
- Conservation longue durée
- Possibilité de stocker les réactifs séparément et en dehors de la carte
- Contrôle précis en pression de l'injection des réactifs

Pour répondre à ces critères, la solution choisie utilise une approche de type « LEGO® » c'est-à-dire sous forme de bloc (Figure V-47). Cette technique a fait l'objet d'un brevet.

Pour rappel, le stockage des liquides dans des blocs séparés permet de s'affranchir des contraintes sur les dates et les conditions de conservation des liquides, puisque chaque bloc contenant un liquide peut être stocké à une température et pendant une durée spécifique. De plus, la préparation du bloc réservoir est indépendante de la fabrication de la carte. Cela permet de fabriquer à grande échelle une carte unique pour une famille de tests et d'adapter cette carte à un test donné en utilisant les liquides associés.

Le bloc contenant le liquide est connecté à la carte à l'aide de connectiques mâle et femelle, par exemple des connectiques Luer. L'intérêt de ces connectiques est de relier les arrivées pneumatiques et fluidiques entre la carte et le bloc tout en assurant une bonne étanchéité. L'injection du liquide du bloc vers la carte peut ainsi être automatisée et contrôlée précisément en pression. De plus, cette solution évite l'utilisation de tubes ce qui limite les manipulations de l'utilisateur et réduit la partie consommable uniquement à la carte et aux blocs de réactifs.

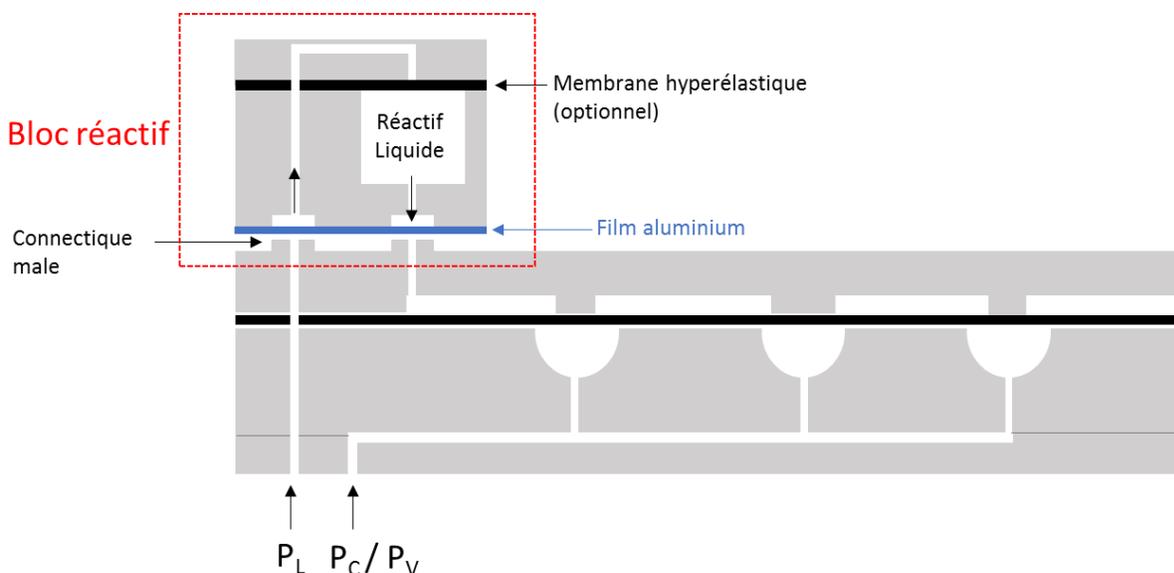


Figure V-47: Schéma de l'intégration d'un bloc de réactif sur la carte microfluidique.

Afin de conserver le liquide sur une longue durée, le bloc peut être fermé à l'aide d'un film protecteur comme un film d'aluminium. Ce film est percé au moment de la connexion entre le bloc et la carte. Cette caractéristique est apportée en intégrant les connectiques mâles sur la carte et les connectiques femelles sur le bloc.

Pour injecter de faibles volumes de liquides, une membrane hyperélastique peut être intégrée au bloc. La membrane évite l'injection éventuelle de bulles d'air dans le système. Dans le cas où il n'y aurait pas de contraintes sur le volume et le coût de réactif, le bloc peut contenir un volume plus important que nécessaire afin de ne pas injecter de bulles.

L'un des principaux avantages de cette technique est qu'elle requiert peu de manipulations de la part de l'utilisateur. Les réservoirs peuvent être fournis pré-remplis avec le liquide d'intérêt. Le film n'est pas retiré manuellement puisqu'il est percé au moment de l'assemblage. De plus, pour faciliter cette étape, certains blocs peuvent être fournis ensemble sur une barrette de façon à pouvoir connecter tous les blocs en une seule étape.

Un des points originaux est que l'assemblage permet d'assurer deux connexions simultanément : une connexion pneumatique et une connexion fluide. Ainsi, le liquide est pressurisé dans le bloc via la connexion pneumatique de la carte et donc par les sources de pression de l'instrument.

Les étapes suivantes décrivent le fonctionnement du bloc.

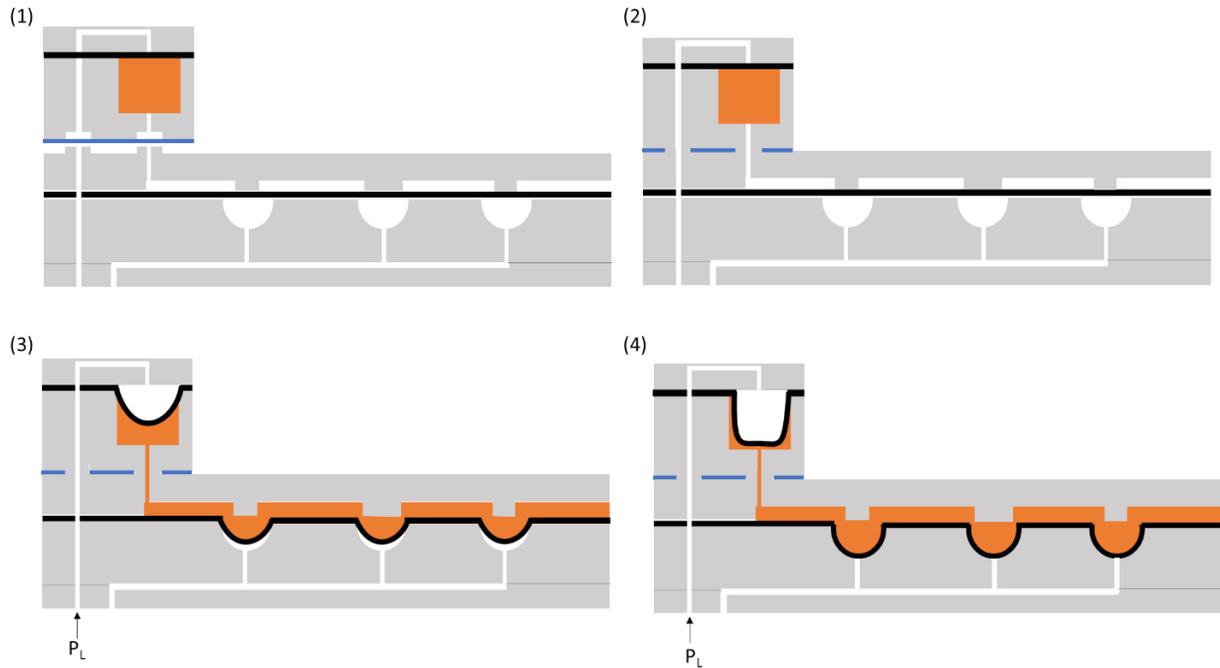


Figure V-48: Etapes de fonctionnement du bloc de réactif.

Initialement, le bloc est fermé avec un film (1). En connectant le bloc à la carte, le film se perce et les connexions fluidiques et pneumatiques entre le bloc et la carte sont assurées par les connectiques mâles de la carte et femelles du bloc (2). Lors de l'étape 3, le canal pneumatique est mis sous pression pour démarrer l'injection du fluide. La membrane élastique se déforme suite à l'augmentation de pression. L'étape 4 représente la fin de l'injection.

Pour favoriser le perçage du film au centre de la connectique femelle du bloc, en face du canal fluide du bloc, la forme de la connectique mâle peut être modifiée. Deux formes sont proposées en Figure V-49, pour lesquelles la connectique mâle de la carte présente une déformation, qui favorise le perçage au milieu de la connectique.

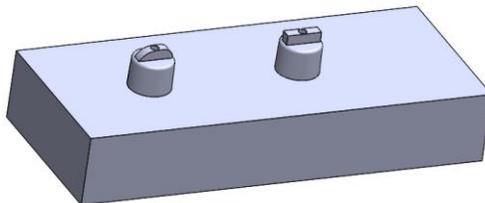


Figure V-49: Forme de Luer pour améliorer le perçage.

V.2.2. Validation : couplage de cette technique avec une gamme de dilution et utilisation de l'instrument pour piloter cette carte

Pour valider la technique d'embarquement de réactifs, la carte permettant d'effectuer la gamme de dilution pour le protocole enzymatique validé et présenté dans le chapitre III va être adaptée en intégrant les blocs.

La carte est présentée en Figure V-50. Elle comprend deux blocs indépendants pour chaque réactif représenté en jaune et bleu. Les dimensions des chambres sont les mêmes que la carte présentée dans le chapitre III.

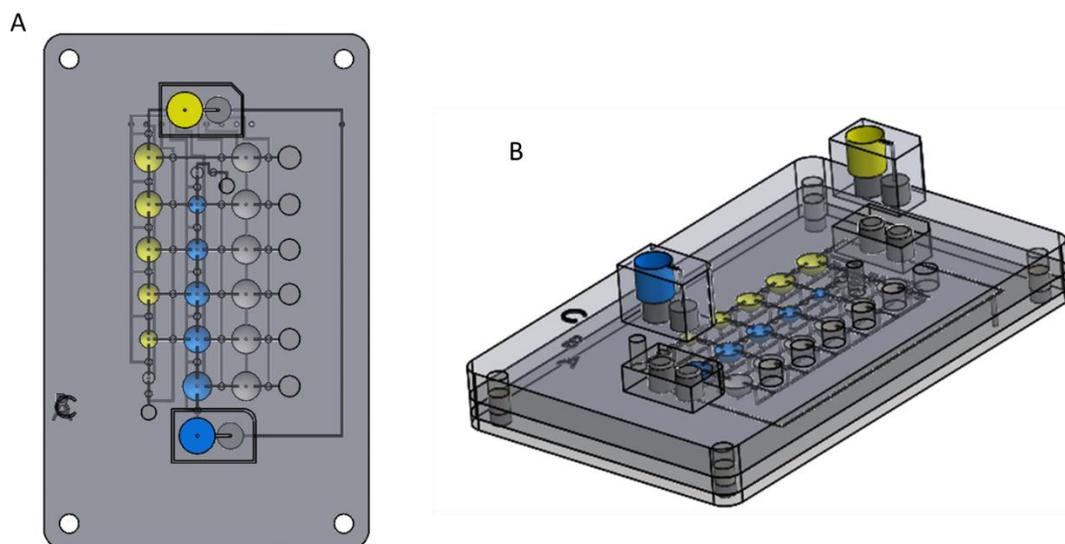


Figure V-50 : Carte de dilution intégrant les réactifs.

Les dimensions des réservoirs sont détaillées en Figure V-51. Ils mesurent 6 mm de rayon pour une hauteur de 5,7 mm ce qui correspond à un volume de 644 μL .

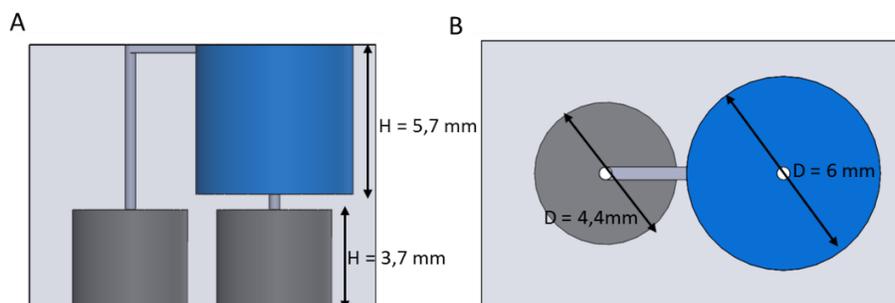


Figure V-51: Dimensions des blocs de réservoirs.

Les connectiques reprennent les règles de dessin de la norme des Luers, le diamètre est standard et mesure 4,4 mm. La hauteur est choisie arbitrairement et vaut ici 3,7 mm.

Pour piloter cette carte, le programme lié à l'instrument est modifié. Il faut ajouter une page qui permet à l'utilisateur de choisir soit le programme lié à la carte de démonstration réalisée pour la fête de la science soit le programme lié à la carte de dilution.

Pour rappel, deux grandes phases sont nécessaires à l'intégration de la gamme de dilution en carte : la phase de calibration des volumes et la phase de mélange. Les différentes étapes sont automatisées en programmant l'ouverture et la fermeture des électrovannes.

Pour s'assurer du bon remplissage des colonnes lors de l'étape de calibration, les réactifs sont injectés pendant 9 secondes. Ensuite, chaque étape de la phase de mélange est effectuée avec un intervalle d'une seconde. Ces étapes ont été détaillées précisément dans le chapitre III.

L'utilisation de l'instrument pour piloter cette carte est présentée en Figure V-52. La première étape consiste à assembler les blocs de réactifs sur la carte ((2) et (3)). La deuxième étape est de connecter la carte sur l'instrument ((4) et (5)). Pour simplifier cette étape, des aimants sont ajoutés dans le support de carte et la carte elle-même ce qui assure une étanchéité pneumatique sans visser manuellement.

Enfin, l'utilisateur doit allumer l'instrument, choisir le programme et lancer le protocole avec l'écran tactile ((5) et (6)).

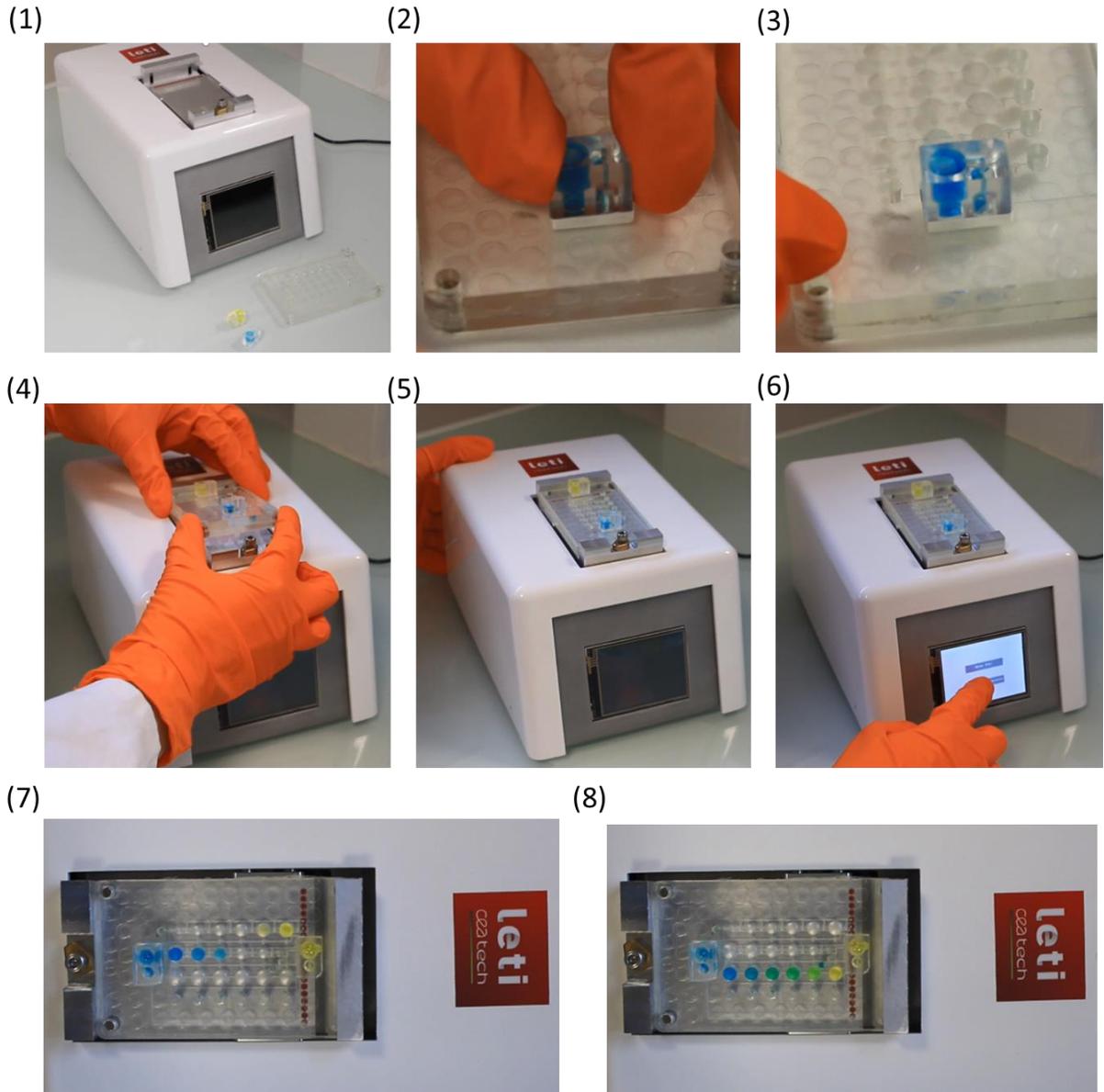


Figure V-52: Etapes d'utilisation de l'instrument pour piloter la carte « gamme de dilution ».

Les deux phases du protocole de dilution sont représentées en (7) et (8). Les images montrent que les chambres se remplissent correctement et qu'il n'y a pas de fuites au niveau des connectiques des blocs de réservoirs.

Cette première validation des blocs de réactifs montre donc leur efficacité à intégrer simplement des liquides dans une carte microfluidique. De plus, cette expérience montre la simplicité à adapter l'instrument à une nouvelle carte.

V.3. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, un démonstrateur dédié au pilotage des cartes microfluidiques précédemment développées a été présenté. Ce démonstrateur répond au cahier des charges défini : il est portable, intègre des sources de pression, est facilement programmable et adaptable pour tout type de carte. Le développement d'un tel instrument avec des sources de pression intégrées a été possible notamment grâce aux choix de la technique d'actionnement des fluides qui fonctionne à l'aide de faibles pressions. En effet, il est plus compliqué d'intégrer des pompes qui délivrent des pressions supérieures à 1 bar. De plus, cette technique ne nécessite pas une grande précision pour les pressions utilisées ce qui a permis d'intégrer une méthode simple pour réguler la pression. La validation progressive de chaque fonction (source de pression, régulation de pression, électrovannes et écran tactile) a permis en quelques mois de concevoir efficacement un démonstrateur. Son coût de fabrication est estimé à moins de 2000€ dont 1500€ de boîtier. Lors du passage en phase industrielle ce démonstrateur pourra donner lieu à un instrument dont le coût pourra être fortement réduit en utilisant des méthodes de fabrication en grande série.

Il a ensuite été utilisé pendant trois jours pour la fête de la science au CEA. Une carte dédiée a été développée et a permis d'expliquer de manière didactique le principe d'actionnement des chambres variables. Par la suite, cet instrument a été utilisé comme démonstrateur pour le laboratoire. A ce jour, aucun problème n'a été remarqué.

Une nouvelle technique d'embarquement de réactifs liquides a également été présentée. Cette technique est compatible avec l'instrument et présente de nombreux intérêts comme la suppression de tubes et de seringues. Une carte de gamme de dilution a été adaptée et validée avec l'instrument. Cette validation montre qu'il est donc possible d'utiliser le même instrument pour piloter différentes cartes microfluidiques en changeant simplement le programme de pilotage des électrovannes.

Enfin, ce type de bloc réservoir a été aussi étudié pour un autre projet du laboratoire. L'idée est de coupler plusieurs puces microfluidiques en série en utilisant des réservoirs tampons de quelques centaines de microlitres afin de transférer le fluide d'une puce à l'autre en utilisant un actionnement en pression d'une membrane élastique. Ce travail réalisé avec Eloïse Pariset actuellement en thèse dans le laboratoire a donné lieu à un article en cours de soumission (Figure V-53).

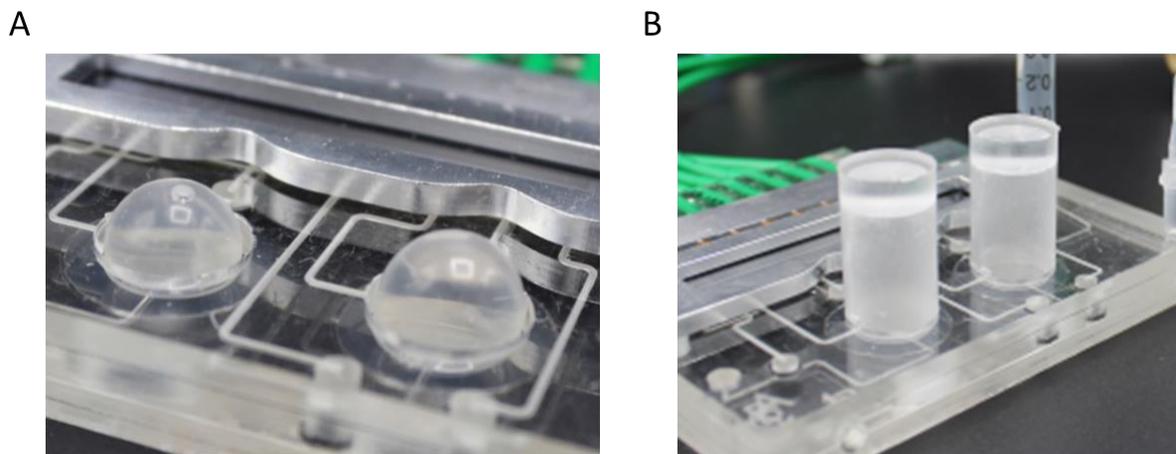


Figure V-53: Image de la membrane qui se remplit (A) et des blocs de réservoirs qui contiennent la membrane, thèse d'Eloise Pariset.

Pour finaliser le développement de l'instrument, il serait tout d'abord nécessaire d'intégrer toute l'électronique dans une seule carte afin de gagner de l'espace. Il faudrait également fiabiliser le système, le rendre plus robuste et le tropicaliser contre la poussière, l'humidité (indice IPxx élevé) pour l'utiliser dans tout type d'environnement. Sa forme pourra être également adaptée selon l'application et les besoins de portabilité, comme la mallette de détection proposée par Daktari Diagnostics (Figure V-54).



Figure V-54 : Exemple de système portable pour des applications de terrain (Daktari Diagnostics, [76]).

Ensuite, pour que l'instrument soit totalement portable et autonome, une batterie doit être ajoutée dans l'instrument. Pour réduire la consommation de l'instrument et la tension d'alimentation, des électrovannes alimentées avec une tension plus basse pourront être utilisées. En effet, celles qui ont été choisies sont compatibles avec des pressions de 5 bars alors que nous utilisons des pressions de l'ordre de 500 mBar. Enfin, pour effectuer la mesure d'absorbance à la fin du test ELISA, il faudrait ajouter un module de détection, c'est-à-dire une diode et une photodiode, et adapter le programme pour afficher la courbe de calibration et le résultat sur l'écran tactile.

La technique d'embarquement de réactifs développée nécessite également un travail d'optimisation. Il reste à optimiser la géométrie et la dimension par exemple des connecteurs Luers mâle et femelle afin d'obtenir une meilleure complémentarité pour faciliter l'assemblage et pour limiter les volumes morts dans la connectique. Ces connecteurs devront être adaptés au cas du protocole de test ELISA.

Une approche purement mécanique a été explorée dans le cadre du stage de projet de fin d'étude d'Arthur Vauquelin. Cette approche visait à remplacer toute l'électronique par un système mécanique pour rendre l'instrument complètement autonome en énergie. Une piste utilisant des aimants pour fabriquer une vanne 3/2 bistable a été explorée et fait l'objet d'un brevet qui est en cours de dépôt. Cette solution est intéressante mais n'est pas adaptée à un protocole complexe comme le test ELISA qui présente une centaine d'étapes. En revanche, cette vanne est parfaitement adaptée à des dispositifs simples en quelques étapes et pourra être intégrée à un dispositif de préparation d'échantillon développé dans le laboratoire.

Conclusion Générale

Actuellement, il existe une forte demande pour des dispositifs de tests de terrain dans de nombreux domaines tels que la santé, l'environnement, l'agroalimentaire ou le vétérinaire. En préambule de cette thèse, et afin de répondre de manière optimale à cette demande, les critères de conception envisageables pour de tels dispositifs ont été identifiés, en s'appuyant d'abord sur ceux établis par l'OMS, tout en les généralisant.

C'est ainsi qu'ont été sélectionnés de notre point de vue quatre critères essentiels auxquels ces dispositifs doivent répondre : un coût limité, une portabilité, des résultats quantitatifs, précis et reproductibles et une grande simplicité d'utilisation.

Il se trouve que les dispositifs que l'on peut repérer suite à un état de l'art approfondi, que ce soit du marché, ou des résultats des études en cours, ne répondent que partiellement aux critères souhaitables. En particulier, pour satisfaire les deux dernières contraintes simultanément, les dispositifs intègrent des protocoles biologiques modifiés et simplifiés. De plus, seule la mesure de l'échantillon est effectuée et une calibration complète à chaque mesure n'est pas intégrée. Or, effectuer une calibration est l'approche recommandée par les fabricants de kits biologiques afin d'obtenir des résultats quantitatifs et précis.

Nous avons donc choisi pour la thèse de développer une plateforme autonome et portable pour des applications ELISA constituant le test de référence, en intégrant la préparation d'une gamme de dilution pour obtenir une courbe de calibration pendant le test.

Une première phase du travail a consisté à développer une carte microfluidique pour l'intégration de ce protocole complexe avec une calibration. La difficulté a été de concevoir la carte en respectant le critère de l'actionnement par un dispositif portable. Pour cela, une technique innovante d'actionnement de fluides a été optimisée et couplée à une architecture en X-Y. L'utilisation de chambres étirables présente de nombreux avantages tels que la calibration d'une large gamme de volumes et l'actionnement à de faibles pressions. Cette technique est le cœur du système microfluidique et est la base du développement de l'instrument complet.

Avant d'aborder le test ELISA hétérogène, des protocoles simples ont été intégrés par niveau de complexité croissante : une gamme de dilution, un test enzymatique pour le glucose et un test ELISA en phase homogène pour le glucagon. Le système programmable a permis de trouver les bonnes séquences adaptées à chaque protocole. A travers ces différentes validations, la technologie des chambres étirables adaptée à des protocoles complexes a pu être développée et optimisée. Des règles de dimensionnement ont pu être définies et ont conduit à une consolidation de la technologie et à des cartes fonctionnelles avec un haut rendement. Par exemple, la carte ELISA homogène contient

Conclusion Générale

environ 80 vannes et 60 chambres qui fonctionnent parfaitement malgré la technique d'assemblage qui reste manuelle.

Ensuite, le test ELISA hétérogène a pu être étudié et intégré. L'ajout d'étapes de lavage et de l'amplification enzymatique a augmenté considérablement la difficulté du test. En effet, la moindre contamination ou fuite est amplifiée et fausse les résultats. Cependant, malgré ces difficultés, des premiers résultats encourageants ont pu être obtenus. Un test ELISA hétérogène avec une calibration intégrée a pu être réalisé dans une carte microfluidique pour la première fois dans notre laboratoire. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'intégration de protocoles complexes avec une étape d'auto calibration grâce au couplage de l'architecture X-Y et des chambres à volumes variables. D'autres applications nécessitant des dilutions avec une grande précision utilisent également ce nouveau principe.

Une deuxième phase du travail a été consacrée au développement d'un instrument pour l'actionnement des cartes microfluidiques. Grâce aux choix effectués pour l'architecture et la technique d'actionnement de fluides, l'instrument développé est portable et autonome et répond bien aux critères sélectionnés pour des applications de terrain.

Tout d'abord, pour limiter les coûts, nous avons fait le choix de concevoir un instrument générique fonctionnant pour différentes applications. De plus, nous utilisons des protocoles de kits commerciaux donc pour intégrer un nouveau protocole, il ne faut pas redévelopper de kits biologiques. Ensuite, concernant l'absence d'équipements extérieurs, nous avons réussi à intégrer les sources de pression pour utiliser cet instrument dans tout type d'environnement. Actuellement, l'instrument fonctionne avec une alimentation 24V mais il est envisageable d'intégrer une batterie pour s'affranchir de cette alimentation extérieure. La quantification du test est assurée par l'intégration d'une courbe de calibration. Cette technique est connue et permet de s'affranchir des conditions extérieures (stockage des réactifs, détection). Enfin, le dispositif est simple d'utilisation. Pour effectuer un protocole, il faut simplement assembler les réactifs contenus dans un ou plusieurs blocs puis connecter la carte et utiliser l'écran tactile pour effectuer le protocole automatiquement.

Cet instrument a été développé dans un but pédagogique pour illustrer la technique des chambres variables et pour démontrer que les cartes développées sont compatibles avec un système portable. De plus, cet instrument offre des perspectives dans de nombreuses applications pour le laboratoire. Il a été conçu pour des applications de type test ELISA mais le principe générique d'actionnement de fluides peut être appliqué à tout type de protocole exigeant l'automatisation de calibration de volumes ou de mélanges.

Pour terminer complètement le développement des cartes et de l'instrument, plusieurs pistes sont envisageables. Tout d'abord, un premier travail concernant le choix de matériaux peut améliorer les performances du test et également rendre industrialisable la fabrication des composants. Ensuite, l'architecture microfluidique pourra être optimisée afin de gagner en précision notamment au niveau

des volumes morts et de la présence de bulles. Pour finaliser l'instrumentation, une détection, par exemple colorimétrique, doit être intégrée pour obtenir automatiquement la mesure.

Enfin, pour effectuer un protocole complet à partir d'un échantillon brut, il faudrait intégrer une étape supplémentaire de préparation de l'échantillon tel qu'une extraction de plasma pour les tests sanguins. Il serait également intéressant de complexifier davantage la carte microfluidique avant d'envisager la possibilité d'effectuer des tests différents, c'est-à-dire tester différentes cibles simultanément sur une même carte. Pour cela, la taille des volumes pourrait être notamment diminuée et la détection adaptée au multiplexage.

Annexes

Annexe 1 : Test de la Troponine achetée sur Sigma

La troponine achetée sur Sigma doit être testée avec les réactifs et la plaque à puits fournis par le kit. Le protocole suivant est donc réalisé :

- Mettre 25 μL de chaque solution de troponine dans chaque puits
- Ajouter 100 μL d'enzymes
- Incubation de 15 min
- 3 lavages de 350 μL avec du wash buffer (préparé au frigo, porte). Bien retourner la plaque et tapoter sur un papier après chaque lavage
- Ajouter 100 μL de substrat
- Incubation de 15 min dans le noir
- Prélever 15 μL de chaque solution
- Lecture à 650 nm dans la plaque micropuits (384 puits)

Les résultats en Figure Annexe 1-1 montrent que la concentration en Troponine peut être mesurée à l'aide du kit fourni pour AMS Lab.

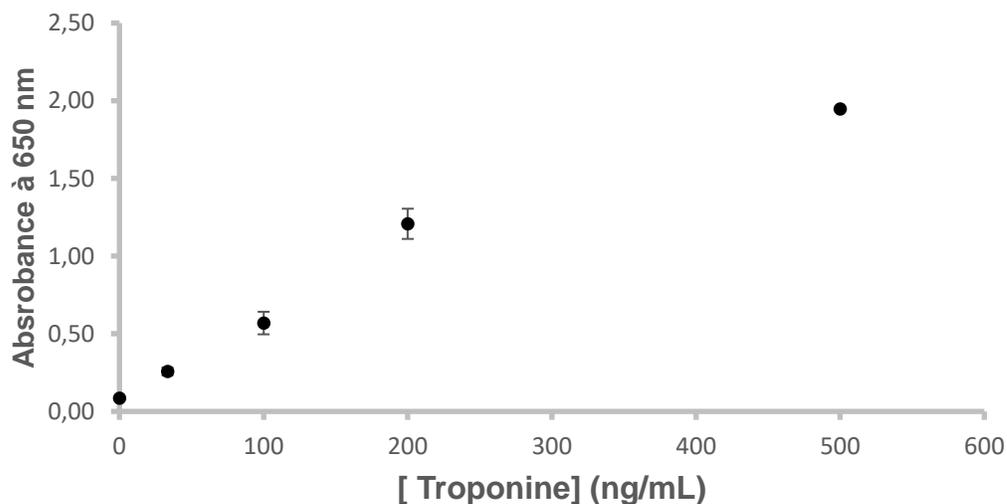


Figure Annexe 1-1 : Absorbance à 650 nm en fonction de la concentration en troponine (Troponine achetée en complément du kit).

Annexes

En revanche, à concentrations égales, il semble plus complexe de détecter la troponine de chez Sigma par rapport à la troponine fournie pour le kit. La Figure Annexe 1-2 montre que la troponine sigma n'est pas détectable à de faibles concentrations.

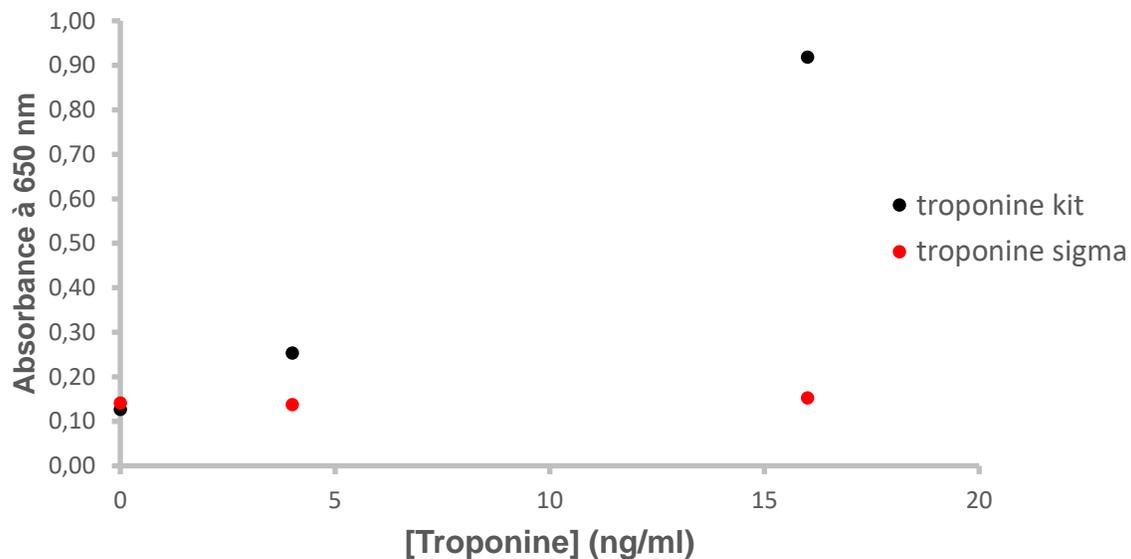


Figure Annexe 1-2 : Absorbance à 650 nm en fonction de la concentration en troponine - Comparaison des mesures d'absorbance pour la troponine Sigma et la troponine du kit.

Il faudra utiliser une concentration élevée en troponine pour effectuer notre preuve de concept.

Annexe 2 : Etapes de lavage dans les cartes en PMMA au format lame de verre

Pour valider les étapes de lavage, le protocole suivant est réalisé :

- Ajouter 20 μ L d'enzyme
- Incubation de 15 min
- Lavages : vider d'un coup sur un papier
- Laver chaque puits en faisant des allers retours avec la pipette
- Entre chaque lavage, retourner la plaque d'un coup et tapoter sur un papier
- Ajouter 15 min de TMB (substrat)
- Incubation de 15 min

Cette expérience est alors effectuée pour 3 et 5 lavages. Si le lavage est efficace, alors les puits ne doivent pas se colorer en bleu (témoin de la présence d'enzyme restante dans le puits). Les résultats sont représentés en Figure Annexe 2-1.

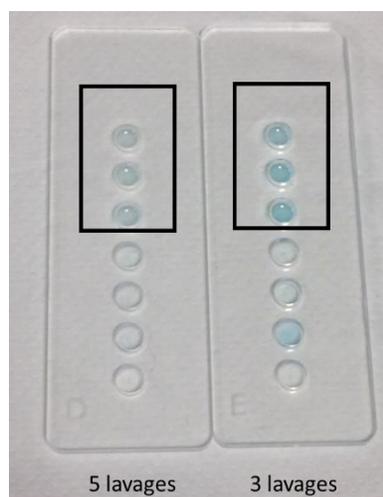


Figure Annexe 2-1 : Images représentant les puits après 3 et 5 lavages, expérience réalisée en triplicat.

Pour laver correctement les cartes en PMMA, 5 lavages sont nécessaires. En effet, après 3 lavages, le bruit de fond est encore important.

Annexe 3 : Programme du capteur de pression

```
#define ADC_HONEYWELL 1 // Arduino
analog pin

const float Null = 0.53; // Null
VDC; datasheet Page 32
const float Sensitivity = 266.6; //
Sensitivity mV/PSI; datasheet Page
32

void setup() {
  // put your setup code here, to
  run once:
  Serial.begin(9600);
}

void loop() {
  // put your main code here, to run
  repeatedly:
  Serial.print("P: ");
  Serial.print(getPressure());
  Serial.println("mbar g");
  delay(2000);
}

float getPressure(void) {
  float
  pressurePSI,pressureMBAR,pressureVDC
  ;
  int pressure;

  pressure =
  analogRead(ADC_HONEYWELL);
  pressureVDC = (float)pressure *
  0.0048828125; // (5/1024 =
  0.0048828125)
  pressureVDC = pressureVDC - Null;
  pressurePSI = pressureVDC /
  Sensitivity * 1000;
  pressureMBAR = pressurePSI *
  68.948;

  return pressureMBAR;
}
```

Annexe 4 : Programme de la régulation de la source de pression

```

#define ADC_HONEYWELL 1 // Arduino
analog pin

const float Null = 0.53; // Null
VDC; datasheet Page 32
const float Sensitivity = 266.6;
// Sensitivity mV/PSI; datasheet
Page 32

void setup() {
  // put your setup code here, to
  run once:
  Serial.begin(9600);

  pinMode(12, OUTPUT);
  digitalWrite(12,LOW);
}

void loop() {
  Serial.print("P: ");
  Serial.print(getPressure());
  Serial.println("mbar g");
  delay(2000);

  while (getPressure() < 500)
  {
    digitalWrite(12,HIGH);
    Serial.println("pompe on");

  }
  digitalWrite(12,LOW);
}

}

float getPressure(void) {
  float
  pressurePSI,pressureMBAR,pressureV
  DC;
  int pressure;

  pressure =
  analogRead(ADC_HONEYWELL);
  pressureVDC = (float)pressure *
  0.0048828125; // (5/1024 =
  0.0048828125)
  pressureVDC = pressureVDC -
  Null;
  pressurePSI = pressureVDC /
  Sensitivity * 1000;
  pressureMBAR = pressurePSI *
  68.948;

  return pressureMBAR;
}

```

Annexe 5 : Programme de pilotage des électrovannes via l'écran tactile

```

#include <EEPROM.h>
#include <Wire.h>
#include <SPI.h>
#include <digitalWriteFast.h>
#include <GraphicsLib.h>
#include <MI0283QT9.h>

#define ADC_HONEYWELL 1 // Arduino
analog pin

const float Null = 0.53; // Null
VDC; datasheet Page 32
const float Sensitivity = 266.6;
// Sensitivity mV/PSI; datasheet
Page 32

long temps;

MI0283QT9 lcd; //MI0283QT9
Adapter v1

void writeCalData(void)
{
  uint16_t i, addr=0;
  uint8_t *ptr;

  EEPROM.write(addr++, 0xAA);

  ptr = (uint8_t*)&lcd.tp_matrix;
  for(i=0; i < sizeof(CAL_MATRIX);
i++)
  {
    EEPROM.write(addr++, *ptr++);
  }
  return;
}

uint8_t readCalData(void)
{
  uint16_t i, addr=0;
  uint8_t *ptr;
  uint8_t c;

  c = EEPROM.read(addr++);
  if(c == 0xAA)
  {
    ptr =
(uint8_t*)&lcd.tp_matrix;

    for(i=0; i <
sizeof(CAL_MATRIX); i++)
    {
      *ptr++ =
EEPROM.read(addr++);
    }
    return 0;
  }
  return 1;
}

//choix des pins
int pin1=31;
int pin2=33;
int pin3=39;
int pin4=41;
int pin5=43;
int pin6=45;
int pin7=47;
int pin8=49;

boolean boucle=true;

int pression =400;

void setup()
{
  pinMode(pin1,OUTPUT);
  pinMode(pin2,OUTPUT);
  pinMode(pin3,OUTPUT);
  pinMode(pin4,OUTPUT);
  pinMode(pin5,OUTPUT);
  pinMode(pin6,OUTPUT);
  pinMode(pin7,OUTPUT);
  pinMode(pin8,OUTPUT);

  Serial.begin(9600);

  pinMode(12, OUTPUT);
  digitalWrite(12,LOW);

  temps = millis();

  //init display
  lcd.begin();

  //set touchpanel calibration
data

```

```

    lcd.touchRead();
    if(lcd.touchZ() ||
readCalData()) //calibration data
in EEPROM?
    {
        lcd.touchStartCal();
//calibrate touchpanel
        writeCalData(); //write data
to EEPROM
    }

//clear screen
cd.fillScreen(RGB(255,255,255));

//Start screen
lcd.led(100);
lcd.fillRect(100, 140, 175, 30,
RGB(255,0,0));
lcd.drawText(122, 150, "CEA",
RGB(255,255,255),RGB(255,0,0),2 );
lcd.drawText(200, 150, "Leti",
RGB(255,255,255),RGB(255,0,0), 2);

delay(1000);

//Draw main page
lcd.fillScreen(RGB(255,255,255));
delay(1000);

lcd.fillCircle(50,65, 10,
RGB(0,0,0));
lcd.drawText(100, 60, "START",
RGB(0,0,0), RGB(255,255,255),1);

// fleche droite
lcd.fillRect(150, 100, 30, 10,
RGB(0,0,0));
lcd.fillTriangle(170, 120, 170,
90, 200, 105, RGB(0,0,0));

// fleche gauche
lcd.fillRect(110, 100, 30, 10,
RGB(0,0,0));
lcd.fillTriangle(120, 120, 120,
90, 90, 105, RGB(0,0,0));

//Backlight LED
lcd.led(50); //backlight
0...100%
}

void loop()
{
    char tmp[128];

```

```

    lcd.touchRead();

    if(lcd.touchZ())
    {
        // sprintf(tmp, "X:%03i Y:%03i
P:%03i", lcd.touchX(),
lcd.touchY(), lcd.touchZ());
        //lcd.drawText(50, 2, tmp,
RGB(0,0,0), RGB(255,255,255), 1);

// bouton START
        if((lcd.touchX() > 40)&&
(lcd.touchX()<60))
        {
            if ((lcd.touchY() > 50)&&
(lcd.touchY()<80))
            {
                digitalWrite(pin2,LOW);
                digitalWrite(pin1,HIGH);

                delay (1000);

                digitalWrite(pin1,LOW);
                digitalWrite(pin2,HIGH);
                delay (1000);

                digitalWrite(pin2,LOW);
                digitalWrite(pin1,HIGH);

                delay (1000);

                digitalWrite(pin1,LOW);
                digitalWrite(pin2,HIGH);
            }
        }

// Fleche gauche
        if((lcd.touchX() > 90)&&
(lcd.touchX()<140))
        {
            if ((lcd.touchY() > 90)&&
(lcd.touchY()<120))
            {
                digitalWrite(pin1,HIGH);
                digitalWrite(pin2,LOW);
            }
        }

// Fleche droite
        if((lcd.touchX() > 150)&&
(lcd.touchX()<200))
        {
            if ((lcd.touchY() > 90)&&
(lcd.touchY()<120))

```

Annexes

```
        {
            digitalWrite(pin2,HIGH);
            digitalWrite(pin1,LOW);
        }
    }
}

while (getPressure()< pression)
{
    digitalWrite(12,HIGH);
    Serial.println("pompe on");
}

digitalWrite(12,LOW);
//affichage pression écran : ne
pas rafraichir tout le temps sinon
caractères fantôme

if((millis() - temps) > 2000) //
fonction pour rafraichir toutes
les 2 s pour éviter les caractères
fantômes
{
    lcd.setCursor(50,200);
    lcd.print( "Pression =");

    lcd.setCursor(150,200);
    lcd.print( getPressure());

temps = millis(); // on stocke la
nouvelle heure
}
}

// fonction pour mesurer la
pression
float getPressure(void)
{
    float
pressurePSI,pressureMBAR,pressureV
DC;
    int pressure;
pressure =
analogRead(ADC_HONEYWELL);
pressureVDC = (float)pressure *
0.0048828125; // (5/1024 =
0.0048828125)
pressureVDC = pressureVDC - Null;
pressurePSI = pressureVDC /
Sensitivity * 1000;
pressureMBAR = pressurePSI *
68.948;

    return pressureMBAR;
}
```

Bibliographie

- [1] P. W. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, *Molecular Biology of the Cell 5th Fifth Edition*. 2008.
- [2] T. Notomi *et al.*, “Loop-mediated isothermal amplification of DNA.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 12, p. E63, 2000.
- [3] I. A. Darwish, “Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.,” *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 217–35, 2006.
- [4] “Adaptive immune defenses: Antibodies.” [Online]. Available: <http://www.virology.ws/2009/07/22/adaptive-immune-defenses-antibodies/>.
- [5] K. P. Shyma, S. K. Gupta, A. Singh, S. S. Chaudhary, and J. Gupta, “Monoclonal Antibody Based Latex Agglutination Test for the Diagnosis of Trypanosomosis in Cattle Introduction,” *J. Adv. Vet.*, vol. 2, pp. 1–4, 2012.
- [6] “BLOOD TYPING.” [Online]. Available: https://www.biologycorner.com/anatomy/blood/notes_bloodtype.html.
- [7] “Immuno-PCR.” [Online]. Available: <https://www.innovabiosciences.com/resources/applications/immuno-pcr/>.
- [8] E. Engvall and P. Perlmann, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G,” *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871–874, 1971.
- [9] “ELISA.” [Online]. Available: <https://www.healthline.com/health/elisa>.
- [10] R. M. Lequin, “Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),” *Clin. Chem.*, vol. 51, no. 12, pp. 2415–2418, 2005.
- [11] a Voller, a Bartlett, and D. E. Bidwell, “Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 31, pp. 507–520, 1978.
- [12] “Types of ELISA.” [Online]. Available: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>.
- [13] “What are the differences between ELISA assay types?” [Online]. Available: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/april/what-are-the-differences-between-elisa-assay-types?/>.
- [14] “Alpha Technology.” [Online]. Available: <http://www.perkinelmer.com/category/alpha-reagents>.
- [15] “TR-FRET basics.” [Online]. Available: <https://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics>.
- [16] M. G. Guzman *et al.*, “Dengue: a continuing global threat,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, pp. S7–S16, 2010.
- [17] M. J. Wheeler, “Automated immunoassay,” *Ann Clin Biochem 2001*;; vol. 38, pp. 217–

- 229, 2001.
- [18] “Robot pipeteur de laboratoire.” [Online]. Available: <http://www.medicalexpo.fr/prod/gilson/product-80704-776035.html>.
- [19] G. Egger, “In Search of a Germ Theory Equivalent for Chronic Disease,” *Prev. Chronic Dis.*, vol. 9, no. 6, p. E95, 2012.
- [20] S. Nayak, N. R. Blumenfeld, T. Laksanasopin, and S. K. Sia, “Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 102–123, 2017.
- [21] S. Liu, Z. Zheng, and X. Li, “Advances in pesticide biosensors: Current status, challenges, and future perspectives,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 1, pp. 63–90, 2013.
- [22] S. Girotti, S. Ghini, E. Maiolini, L. Bolelli, and E. N. Ferri, “Trace analysis of pollutants by use of honeybees, immunoassays, and chemiluminescence detection,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 2–3, pp. 555–571, 2013.
- [23] J. a Higgins *et al.*, “A Field Investigation of Bacillus anthracis Contamination of U . S . Department of Agriculture and Other Washington , D . C . , Buildings during the Anthrax Attack of October 2001,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 593–599, 2003.
- [24] B. aérosol B. Instruments, “Balise aérosol, Bertin.” [Online]. Available: <https://www.bertin-instruments.fr/produits/controle-contamination-alpha-beta/bab-balise-aerosol/>.
- [25] L. Ferasin, S. J. Dodkin, A. Amodio, J. K. Murray, and K. Papasouliotis, “Evaluation of a portable lactate analyzer (Lactate Scout) in dogs,” *Vet. Clin. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 36–39, 2007.
- [26] “Plan antibiorésistance.” [Online]. Available: <http://agriculture.gouv.fr/plan-antibioresistance-ecoantibio-les-40-mesures-ecoantibio-2012-2017>.
- [27] “Grippe aviaire: 600 000 canards landais abattus de manière préventive.” [Online]. Available: https://www.francetvinfo.fr/sante/maladie/grippe-aviaire/grippe-aviaire-600-000-canards-landais-abattus-de-maniere-preventive_2067911.html.
- [28] “Glucagon assay kit.” [Online]. Available: <https://www.cisbio.com/drug-discovery/glucagon-assay-kit>.
- [29] “ELISA Test: History, Types and Kits.” [Online]. Available: <http://rapidtest.com/blog/elisa-test-history-types-and-elisa-kits/>.
- [30] L. Gervais, N. de Rooij, and E. Delamarche, “Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics,” *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 24, pp. H151–H176, 2011.
- [31] “Glucomètre.” [Online]. Available: <https://www.giromedical.com/blog/notre-comparatif-des-meilleurs-glucometres-de-2017/>.
- [32] M. Sajid, A. N. Kawde, and M. Daud, “Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 6, pp. 689–705, 2015.
- [33] T. Chard, “Pregnancy tests: a review.,” *Hum. Reprod.*, vol. 7, no. 5, pp. 701–10, 1992.
- [34] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Von Stetten, and R. Zengerle, “Microfluidic lab-on-a-

- chip platforms: Requirements, characteristics and applications,” *NATO Sci. Peace Secur. Ser. A Chem. Biol.*, no. 3, pp. 305–376, 2010.
- [35] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, and E. Carrilho, “Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [36] D. Gosselin *et al.*, “Low-cost embossed-paper micro-channels for spontaneous capillary flow,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 248, pp. 395–401, 2017.
- [37] L. Gervais and E. Delamarche, “Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 23, p. 3330, 2009.
- [38] M. I. Mohammed and M. P. Y. Desmulliez, “Autonomous capillary microfluidic system with embedded optics for improved troponin I cardiac biomarker detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 61, pp. 478–484, 2014.
- [39] M. I. Mohammed, E. Abraham, and M. P. Y. Desmulliez, “Rapid laser prototyping of valves for microfluidic autonomous systems,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 23, no. 3, 2013.
- [40] J. M. D. Machado, R. R. G. Soares, V. Chu, and J. P. Conde, “Multiplexed capillary microfluidic immunoassay with smartphone data acquisition for parallel mycotoxin detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 99, no. July 2017, pp. 40–46, 2018.
- [41] D. W. Kemper *et al.*, “Analytical evaluation of a new point of care system for measuring cardiac Troponin I,” *Clin. Biochem.*, vol. 50, no. 4–5, pp. 174–180, 2017.
- [42] D. M. Bruls *et al.*, “Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 24, p. 3504, 2009.
- [43] Z. Tak For Yu *et al.*, “Rapid, automated, parallel quantitative immunoassays using highly integrated microfluidics and AlphaLISA,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 11339, 2015.
- [44] E. C. Jensen, Y. Zeng, J. Kim, and R. A. Mathies, “Microvalve Enabled Digital Microfluidic Systems for High Performance Biochemical and Genetic Analysis,” *JALA Charlottesville, Va.*, vol. 15, no. 6, pp. 455–463, 2010.
- [45] C. Lee, “Multistep Synthesis of a Radiolabeled Imaging Probe Using Integrated Microfluidics,” *Science (80-.)*, vol. 1793, no. 2005, pp. 1793–1797, 2010.
- [46] K. Wang, R. Liang, H. Chen, S. Lu, S. Jia, and W. Wang, “A microfluidic immunoassay system on a centrifugal platform,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 251, pp. 242–249, 2017.
- [47] J. Park, V. Sunkara, T. H. Kim, H. Hwang, and Y. K. Cho, “Lab-on-a-disc for fully integrated multiplex immunoassays,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 5, pp. 2133–2140, 2012.
- [48] F. Stumpf *et al.*, “LabDisk with complete reagent prestorage for sample-to-answer nucleic acid based detection of respiratory pathogens verified with influenza A H3N2 virus,” *Lab Chip*, vol. 16, pp. 199–207, 2016.
- [49] L. Clime, D. Brassard, M. Geissler, and T. Veres, “Active pneumatic control of centrifugal microfluidic flows for lab-on-a-chip applications,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 11, pp. 2400–2411,

- 2015.
- [50] A. Chen, R. Wang, C. R. S. Bever, S. Xing, B. D. Hammock, and T. Pan, "Smartphone-interfaced lab-on-a-chip devices for field-deployable enzyme-linked immunosorbent assay," *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 6, p. 64101, 2014.
- [51] T. Laksanasopin *et al.*, "A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 273, p. 273re1-273re1, 2015.
- [52] T. W.-A. Guo, R. Patnaik, K. Kuhlmann, A. J. Rai, and S. K. Sia, "Smartphone dongle for simultaneous measurement of hemoglobin concentration and detection of HIV antibodies," *Lab Chip*, vol. 15, pp. 3514–3520, 2015.
- [53] B. Hu *et al.*, "An automated and portable microfluidic chemiluminescence immunoassay for quantitative detection of biomarkers," *Lab Chip*, vol. 17, no. 13, pp. 2225–2234, 2017.
- [54] X. Jiang, J. M. K. Ng, A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, and G. M. Whitesides, "A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 18, pp. 5294–5295, 2003.
- [55] F. Hou *et al.*, "Development of a microplate reader compatible microfluidic chip for ELISA," *Biomed. Microdevices*, vol. 14, no. 4, pp. 729–737, 2012.
- [56] J. Yang, Z. Chen, P. Ching, Q. Shi, and X. Li, "An integrated microfluidic platform for evaluating in vivo antimicrobial activity of natural compounds using a whole-animal infection model," *Lab Chip*, vol. 13, no. 17, pp. 3373–82, 2013.
- [57] Dertinger SKW, Chiu DT, Jeon NL, and *et al.*, "Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1240–1246, 2001.
- [58] Y. Fouillet, D. Jary, C. Chabrol, P. Claustre, and C. Peponnet, "Digital microfluidic design and optimization of classic and new fluidic functions for lab on a chip systems," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 4, no. 3, pp. 159–165, 2008.
- [59] D. Podder and K. Das, "Harmonic dilution gradient preparation for digital microfluidic biochip," *12th IEEE Int. Conf. Electron. Energy, Environ. Commun. Comput. Control (E3-C3), INDICON 2015*, pp. 1–6, 2016.
- [60] 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, no. 5463, pp. 113–116, 2000.
- [61] W.-B. Lee *et al.*, "A microfluidic device for antimicrobial susceptibility testing based on a broth dilution method," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, pp. 669–678, 2016.
- [62] D. E. Furst *et al.*, "A phase 2 dose-finding study of pegylated recombinant methionyl human soluble tumor necrosis factor type I in patients with rheumatoid arthritis," *J. Rheumatol.*, vol. 32, no. 12, pp. 2303–2310, 2005.
- [63] N. S. G. K. Devaraju and M. a. Unger, "Pressure driven digital logic in PDMS based microfluidic devices fabricated by multilayer soft lithography," *Lab Chip*, vol. 12, no. 22, p. 4809, 2012.
- [64] W. Zhang *et al.*, "PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics," *Lab Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3088–3094, 2009.

- [65] B. M. Paegel, W. H. Grover, A. M. Skelley, R. a. Mathies, and G. F. Joyce, "Microfluidic serial dilution circuit," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 21, pp. 7522–7527, 2006.
- [66] S. Ahrar, M. Hwang, P. N. Duncan, and E. E. Hui, "Microfluidic serial dilution ladder," *Analyst*, vol. 139, no. 1, pp. 187–190, 2014.
- [67] E. C. Jensen, B. P. Bhat, and R. a Mathies, "A digital microfluidic platform for the automation of quantitative biomolecular assays," *Lab Chip*, vol. 10, no. 6, pp. 685–91, 2010.
- [68] E. C. Jensen, A. M. Stockton, T. N. Chiesl, J. Kim, A. Bera, and R. a Mathies, "Digitally programmable microfluidic automaton for multiscale combinatorial mixing and sample processing," *Lab Chip*, vol. 13, no. 2, pp. 288–296, 2013.
- [69] D. Brassard, L. Clime, M. Mounier, and T. Veres, "Programmable Aliquots in Passive Microfluidic Devices Using a Centrifugal Platform With Active Pneumatic Pumping," *uTAS2016*, vol. di, no. c, 2016.
- [70] J. Fan, B. Li, S. Xing, and T. Pan, "Reconfigurable microfluidic dilution for high-throughput quantitative assays," *Lab Chip*, vol. 15, no. 12, pp. 2670–2679, 2015.
- [71] J. Fan, B. Li, and T. Pan, "Reconfigurable microfluidic dilution generation for quantitative assay," in *Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 2015, vol. 2015–Febru, no. February, pp. 543–546.
- [72] M. Hitzbleck and E. Delamarche, "Reagents in microfluidics: an 'in' and 'out' challenge," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 21, p. 8494, 2013.
- [73] "Lab-on-a-Chip Catalogue microfluidic ChipShop," 2013.
- [74] S. Smith, R. Sewart, H. Becker, P. Roux, and K. Land, "Blister pouches for effective reagent storage on microfluidic chips for blood cell counting," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 20, no. 12, pp. 1–14, 2016.
- [75] S. Smith *et al.*, "Microfluidic Cartridges for Automated, Point-of-Care Blood Cell Counting," *J. Lab. Autom.*, p. 2211068216677820, 2016.
- [76] "Thinxxs, Daktari Product." [Online]. Available: <http://www.thinxxs.com/?id=252>.
- [77] T. van Oordt, Y. Barb, J. Smetana, R. Zengerle, and F. von Stetten, "Miniature stick-packaging – an industrial technology for pre-storage and release of reagents in lab-on-a-chip systems," *Lab Chip*, vol. 13, no. 15, p. 2888, 2013.
- [78] D. Czurratis *et al.*, "Liquids on-chip: direct storage and release employing micro-perforated vapor barrier films," *Lab Chip*, vol. 15, pp. 2887–2895, 2015.
- [79] R. Charles and P. Pouteau, "DISPOSITIF DE CONNEXION D'UNE CARTE MICROFLUIDIQUE," WO2012136943, 2012.
- [80] Y. Zheng, W. Dai, and H. Wu, "A screw-actuated pneumatic valve for portable, disposable microfluidics," *Lab Chip*, vol. 9, no. 3, pp. 469–72, 2009.
- [81] R. Zengerle, A. Richter, and H. Sandmaier, "A micro membrane pump with electrostatic actuation," *Proc. IEEE Micro Electro Mech. Syst.*, pp. 19–24, 1992.
- [82] T. Thorsen, S. J. Maerkl, and S. R. Quake, "Microfluidic Large-Scale Integration," *Science*

- (80-), vol. 298, no. October, pp. 580–584, 2002.
- [83] C. H. Weng, K. Y. Lien, S. Y. Yang, and G. Bin Lee, “A suction-type, pneumatic microfluidic device for liquid transport and mixing,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 10, no. 2, pp. 301–310, 2011.
- [84] W. Zhang *et al.*, “PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics.,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 21, pp. 3088–94, 2009.
- [85] A. Zahra, R. Scipinotti, D. Caputo, A. Nascetti, and G. de Cesare, “Design and fabrication of microfluidics system integrated with temperature actuated microvalve,” *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 236, pp. 206–213, 2015.
- [86] P. H. Cazorla *et al.*, “A low voltage silicon micro-pump based on piezoelectric thin films,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 250, pp. 35–39, 2016.
- [87] A. R. Brunet, F. Labelle, P. Wong, and T. Gervais, “Article reconfigurable microfluidic magnetic valve arrays: Towards a radiotherapy-compatible spheroid culture platform for the combinatorial screening of cancer therapies,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 10, 2017.
- [88] J. C. Harper *et al.*, “Magnetic-adhesive based valves for microfluidic devices used in low-resource settings,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 21, pp. 4142–4151, 2016.
- [89] C. Parent, Y. Fouillet, N. Verplanck, and J. Achard, “Validation and Integration of an Effervescent Reaction for Fluid Actuation in a Microfluidic Platform,” in *20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 9-13 October, 2016, Dublin, Ireland*, 2016, pp. 956–957.
- [90] J. L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D. Y. Stevens, and P. Yager, “Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 20, p. 2659, 2010.
- [91] C. Y. Lee, C. L. Chang, Y. N. Wang, and L. M. Fu, “Microfluidic mixing: A review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 5, pp. 3263–3287, 2011.
- [92] P. Tikson, “Microfluidic serpentine mixing device made from 3D printed master.” [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=05ECRklOak4>.
- [93] R. DEN DULK and Y. FOUILLET, “DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE DE CONTRÔLE D’ÉCOULEMENT D’UN FLUIDE,” 2016.
- [94] Y. Fouillet, R. Den Dulk, O. Fuchs, F. Boizot, M. Menneteau, and F. Navarro, “Companion diagnostic test using digital microfluidics,” in *Nanotech 18*, pp. 3–6.
- [95] S. C. Terry, J. H. Herman, and J. B. Angell, “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer,” *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.
- [96] H. Becker and C. Gärtner, “Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 390, no. 1, pp. 89–111, 2008.
- [97] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. a Schueller, and G. M. Whitesides, “Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, 1998.

- [98] R. K. Jena and C. Y. Yue, "Cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochip applications: Ultraviolet surface grafting using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2012.
- [99] M. Wehner *et al.*, "An integrated design and fabrication strategy for entirely soft, autonomous robots," *Nature*, vol. 536, no. 7617, pp. 451–455, 2016.
- [100] F. Pineda, F. Bottausci, B. Icard, L. Malaquin, and Y. Fouillet, "Using electrofluidic devices as hyper-elastic strain sensors: Experimental and theoretical analysis," *Microelectron. Eng.*, vol. 144, pp. 27–31, 2015.
- [101] F. Pineda, F. Bottausci, L. Malaquin, and Y. Fouillet, "Integrating hyper elastic membranes in microfluidic devices for fluid storage and autonomous delivery," in *MicroTAS 2015 - 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2015.
- [102] R. Den Dulk, Y. Fouillet, O. Fuchs, and C. Parent, "Procédé et système de commande d'un dispositif microfluidique," DD 17054.
- [103] D. Bruen, C. Delaney, L. Florea, and D. Diamond, "Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 8, pp. 1–21, 2017.
- [104] F. Pineda, "Systèmes microfluidiques sur support souple et étirable," Université Grenoble Alpes, 2015.
- [105] C. Oberdanner *et al.*, "Implementation of HTRF® on Tecan's Infinite® M1000 premium quad4 monochromators™ multimode microplate reader More reasons to Talk to Tecan .," p. 84175.
- [106] M. O'Toole, H. Legault, R. Ramsey, T. a. Wynn, and M. T. Kasaian, "A novel and sensitive ELISA reveals that the soluble form of IL-13R- α 2 is not expressed in plasma of healthy or asthmatic subjects," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 38, no. 4. pp. 594–601, 2008.
- [107] "watterott/Arduino-Libs." [Online]. Available: <https://github.com/watterott/Arduino-Libs/blob/master/GraphicsLib/GraphicsLib.h>.

RESUME

Les microsystèmes intégrant des techniques microfluidiques offrent la possibilité de réaliser des analyses biologiques directement sur le site de prélèvement de l'échantillon. Ils ont pour objectifs notamment d'augmenter l'efficacité, la rapidité et l'accessibilité de ces tests. Pour développer efficacement un tel dispositif, un ensemble de critères doit être fixé tels que la limitation du coût, la portabilité, la simplicité d'utilisation et la précision des résultats. Un objectif de cette thèse est également de proposer un nouveau système portable permettant de répondre à un maximum d'applications. Pour cela, il convient d'intégrer et d'automatiser des protocoles biologiques complexes c'est-à-dire nécessitant l'ajout de plusieurs réactifs et des réactions en parallèle. A titre d'exemple, les tests ELISA sont abordés.

Pour répondre à cette problématique, une technique innovante utilisant un matériau hyperélastique est combinée à une architecture X-Y. Des chambres étirables, permettant de calibrer et de mélanger des volumes compris entre 1 μL et une centaine de μL , sont ainsi réalisées. Différents protocoles sont intégrés et validés par ordre de complexité croissante dans des cartes microfluidiques en commençant par une gamme de dilution qui est la première étape pour la calibration des protocoles biologiques, puis un test enzymatique et un test ELISA homogène, avant d'aborder le test ELISA hétérogène qui est le protocole visé.

Un démonstrateur permettant de piloter les cartes microfluidiques est ensuite présenté. Cette plateforme est générique et compatible avec les cartes microfluidiques développées. Enfin, pour automatiser complètement la mise en œuvre des protocoles, une nouvelle technique d'embarquement de réactifs liquide est proposée.

ABSTRACT

Microsystems utilizing microfluidic techniques offer the possibility to perform point-of-need biological analysis. An objective of these systems is to increase the efficiency, speed and accessibility of these analyses. In order to effectively develop this kind of device, a set of criteria must be established and adhered to. This set should address cost limitations, portability, user-friendliness, and accuracy of the results. Another objective is to propose a new portable system that has the capability to address as many applications as possible. To this end, complex biological assays with multiple steps and multiple reagents must be integrated and automated. ELISA is one such assay being considered.

To deal with this issue, an innovative technique employs a hyper-elastic material joined to an X-Y architecture. The resulting chambers are flexible, thus allowing for calibration and mixing on the range of 1 μL to hundreds of μL . Several protocols are integrated and validated in microfluidic chips in order of increasing complexity. To start, a range of dilutions is performed, which is then used to calibrate biological assay. Next, an enzymatic assay and a homogeneous ELISA are integrated. Finally, heterogeneous ELISA, which is the aimed assay, is achieved.

We present here a prototype to demonstrate the handling of the microfluidic chip. This platform is versatile and compatible with those that have been previously developed. Additionally, the introduction and integration of liquid reagents is proposed in order to completely automate the protocol.