HAL
open science

Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques

Olivier Lefebvre

To cite this version:

Olivier Lefebvre. Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS537 . tel-02426019

HAL Id: tel-02426019

https://theses.hal.science/tel-02426019v1

Submitted on 1 Jan 2020

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.

NNT : 2018SACLS537

Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°575:
electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat:
Electronique et Optoélectronique, Nano et Microtechnologies

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 10/12/2018, par

Olivier Lefebvre

Composition du Jury :

Laurent Malaquin Dr, Université Paul Sabatier (LAAS)	Rapporteur
Jean-François Manceau Pr, Université de Franche-Comté (Femto-St)	Rapporteur
Yong Chen Dr, Ecole Normale Supérieure (IPGG)	Examinateur
Olivier Français Pr, Université Paris-Est Marne-La-Vallée (ESIEE)	Président du jury
Josep Samitier Marti Pr, Université de Barcelone (IBEC)	Examinateur
Claire Smadja Pr, Université Paris-Sud (IGPS)	Examinateur
Mehdi Ammar Maître de conférences, Université Paris-Sud (C2N)	Directeur de thèse
Emile Martincic Maître de conférences, Université Paris-Sud (C2N)	Co-encadrant

Thèse de doctorat

ÉCOLE DOCTORALE
Physique et ingénierie : électrons, photons, sciences du vivant (EOBE)

Titre : Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques

Mots clés : Détection magnétique, ovalbumine, Nanoparticules magnétiques, simulation, microfabrication, microfluidique

Résumé : L'objectif de cette thèse est la fabrication d'un microdispositif magnétique pour la détection et la manipulation d'éléments biologiques à base de nanoparticules magnétiques en conditions microfluidiques. Il a pour but d'intégrer des fonctions de base de contrôle et détection magnétique, pour atteindre des mesures spécifiques, stables, rapides et reproductibles. En effet, la technique d'immunodosage couplée à des nanoparticules magnétiques, bien connue dans la littérature, nécessite un contrôle du déplacement de ces dernières pour les fonctionnaliser efficacement et créer un complexe biologique encapsulant une molécule cible (biomarqueur). Dans notre cas une molécule modèle pour le domaine de la biodéfense a été utilisée : l'ovalbumine. Pour contrôler le champ magnétique nécessaire pour la capture des complexes magnétiques, nous avons opté pour l'utilisation de microbobines intégrées aux dispositifs fluidiques et comparé cette technique originale avec d'autres plus conventionnelles. Pour détecter un complexe biologique, la fluorescence est largement utilisée en biologie, mais cette technique ne permet pas une intégration complète pour un dispositif autonome. Dans cette optique, nous proposons la détection des complexes à base de nanoparticules magnétiques en relevant la variation de l'inductance d'un microcircuit magnétique refermant une chambre microfluidique contenant ces complexes immunologiques. Le dimensionnement des microbobines de contrôle par simulation a permis de déterminer les paramètres permettant d'obtenir le champ magnétique le plus adapté au contrôle des complexes biologiques.

Dans le cas des microbobines utilisées pour la détection, des branches magnétiques micrométriques ont été insérées autour des microbobines pour créer un circuit de détection magnétique encore plus sensible. La réalisation de ces dispositifs a impliqué l'intégration de matériaux et de structures de nature fortement hétérogène, et leur assemblage a nécessité de résoudre de nombreux verrous technologiques. L'enjeu a été de déterminer l'ensemble des étapes successives et nécessaires pour un procédé de microfabrication fiable et reproductible. Pour montrer l'intérêt des dispositifs de capture des nanoparticules magnétiques, des tests immunologiques ont été réalisés tout d'abord en microtubes pour les comparer à ceux réalisés dans un circuit fluidique à l'aide d'aimant externe puis de microbobines intégrées. Dans ce dernier cas, une optimisation considérable a été validée en termes de réduction de temps d'incubation, de reproductibilité des mesures et de limites de détection équivalentes à l'état de l'art pour l'ovalbumine. Pour le dispositif de détection magnétique, des premières expériences de caractérisation électrique ainsi que des études en concentration de nanoparticules magnétiques ont été réalisées et comparées aux résultats obtenus par simulation. Pour la preuve de concept, un démonstrateur de détection de complexes magnétiques a été également finalisé validant la possibilité d'intégration du microcircuit magnétique dans un dispositif fluidique. Il a validé également l'obtention d'une gamme de sensibilité remarquable corrélée à la présence des complexes magnétiques. Ses caractéristiques ont été confrontées à celles obtenues par les simulations et discutées en tenant compte de toutes les étapes critiques du procédé de microfabrication.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Title : Development of a magnetic microdevice for the control and detection of immunological complexes based on magnetic nanoparticles

Keywords : Magnetic detection, ovalbumin, Magnetic nanoparticles, simulation, microfabrication, microfluidic

Abstract: The objective of this thesis is the fabrication of a magnetic microdevice for the manipulation and detection of biological elements based on magnetic nanoparticles under microfluidic conditions. The microdevice aims to integrate basic functions of control and magnetic detection, to obtain specific, stable, fast and reproducible measurements. Indeed, the immunoassay technique coupled to magnetic nanoparticles, which is well known in the literature, requires a control of the displacement of magnetic nanoparticles to effectively functionalize them and create a biological complex to encapsulate a target molecule (biomarker). In our case, a model molecule “ovalbumin” for biodefense application was used. To control the magnetic field which is necessary for the capture of magnetic complexes, we opted for the use of microcoils integrated in the fluidic devices and compared this original technique with more conventional ones. To detect a biological complex, fluorescence is widely used in biology, but this technique does not allow a complete integration for an autonomous device. In this context, we propose the detection of complexes based on magnetic nanoparticles by acquiring the variation of the inductance of a magnetic microcircuit close to a microfluidic chamber containing these immunological complexes. The design of the trapping microcoils by magnetic simulation made possible to determine the parameters allowing to define the most adapted magnetic field to the manipulation of the biological complexes.

In the case of microcoils used for detection, micrometric magnetic branches were inserted around the microcoils to create more sensitive magnetic sensing circuit. The realization of these devices involved the integration of materials and structures of highly heterogeneous nature, and their assembly has required to solve many technological bottlenecks. The challenge was to determine all the successive and necessary steps for a reliable and reproducible microfabrication process. To show the added value of magnetic nanoparticle capture devices, immunoassays were first performed in microtubes to compare with those made in a fluid circuit using an external magnet and integrated microcoils. In the latter case, considerable optimization has been validated in terms of reduction of incubation time, reproducibility of measurements and limit of detection comparable to the state of the art for ovalbumin. For the magnetic detection devices, first experiments of electrical characterization, as well as concentration studies of magnetic nanoparticles, were carried out and compared to the results obtained by simulation. For the proof of concept, a demonstrator of detection of magnetic complexes was also finalized by the integration of the magnetic microcircuit in a fluidic device. We also validated a remarkable range of sensitivity correlated with the presence of magnetic complexes. The obtained characteristics were compared to those extracted from the simulation and discussed taking into account all the critical steps of the microfabrication process.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l’Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF) devenu par la suite le Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N) lors de sa fusion avec le Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN).

Je tiens à remercier André DE LUSTRAC, directeur de l'IEF pour son accueil au laboratoire à mon arrivée. Je tiens également à remercier Giancarlo FAINI, directeur du C2N ainsi que toute la nouvelle équipe de direction du C2N.

Je remercie vivement mon directeur de thèse M. Mehdi Ammar, maître de conférences à l'Université Paris-Sud, ainsi que mes encadrants Mme Claire Smadja, professeure à l'Université Paris-Sud et M. Emile Martincic maître de conférences à l'Université Paris-Sud pour avoir dirigé et encadré mes travaux de thèse. Ces trois années de thèse m'ont permis d'apprendre énormément à votre contact et je les remercie pour la confiance et l'autonomie qu'ils m'ont été accordées.

J'exprime mes sincères remerciements à M. Yong Chen, directeur de recherche à l'Ecole Normale Supérieure pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie M. Laurent Malaquin, directeur de recherche à l'Université Paul Sabatier et M. Jean-François Manceau, professeur à l'Université de Franche-Comté pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je souhaite également remercier M. Olivier Français, professeur à l'Université Paris-Est Marne-La-Vallée, M. Josep Samitier, professeur à l'Université de Barcelone et Mme Claire Smadja, professeure à l'Université Paris-Sud d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je remercie M. Emile Martincic, maître de conférences à l'Université Paris-Sud d'avoir accepté d'assister à ma soutenance en qualité de membre invité.

Je remercie Alain Bosseboeuf, chercheur CNRS et responsable du département Micro Nano Bio et Microsystèmes de l'IEF pour m'avoir accueillie à mon arrivée au sein du département et m'avoir permis de découvrir le Japon grâce à l'école NAMIS. Je tiens également exprimer ma gratitude envers Pierre-Yves Joubert, professeur à l'Université Paris-Sud, directeur adjoint du C2N et responsable du département MicroSystèmes et NanoBiofluidique.

Je remercie bien sûr tous mes collègues du département pour m'avoir intégrer dans l'équipe avec gentillesse et bienveillance. J'ai toujours eu beaucoup de plaisir à discuter et travailler avec eux. Je pense surtout à Marion Woytasik pour son aide lors des expériences de la techno salle blanche; à Philippe Coste pour son aide lors de mes trois années de monitorat à l'IUT. A Fabien Parrain, Johan Moulin, Elie Lefeuvre, pour la bonne humeur qu'ils transmettent dans le département ainsi que Filippo Fabbri, Bernard Bartenlian, Elisabeth Dufour-Gergam, Jean-Michel Lourtioz, Hervé Matthias, Souhil Megherbi, Gilles Reno, Seonho Seok, Ming Zhang, Julien Rizzi et Sylvain Perrot. J'aimerais également remercier Gregory BARBILLON pour m'avoir fait découvrir le badminton et qui a suivi avec intérêt mes résultats de thèse.

Un grand merci à tous les doctorants et docteurs, stagiaires et apprenti de l'équipe : Adrien Piot, Sylvani Lemettre et Baptiste Rousset pour ces années en 174, Sarah Risquez et Thi Hong Nhung Dinh pour leurs conseils en salle blanche leur gentillesse, Claire Galland pour son toute son aide sur la partie bactérie, Bogdan Vysotskyi pour m'avoir accompagnée et motivée tout au long de ma thèse, mais aussi Jean-François Bryche, Jie Wei, Seiffeddine Maaroufi, Zhichao Shi, Hong Ha Cao, Gayathr Masilamany, Maité Do Vale, Mengze Wang, Jingbo Xu, Alexis Brennes, Rafael Corder-Alvarez, Ming

Wu, Thomas Sohier, Hadrien Philippe, Gwendoline Duchemin, Lucas Blanc, Clément Bessouet, Lucas Bonin, Giulia Rizzo, Gwennael Becan, Sylvie Bilent.

Je souhaite également remercier tous les autres membres de l'IEF et du C2N dont j'ai eu le plaisir de croiser dans les couloirs ou en salle blanche durant mes trois années de thèse. Je remercie entre autres le personnel de la Centrale de Technologie Universitaire (CTU) pour m'avoir formée sur les équipements de la salle blanche avec rigueur et méthode, pour votre disponibilité et pour votre un soutien technique quotidien. Abdelhanin Aassime, Fabien Bayle, Benoît Belier, David Bouville, Jean-René Coudevylle, Samson Edmond, Frédéric Hamouda, Etienne Herth, Nathalie Isac, François Maillard, Antoine Martin, Jean Luc Perossier, Marie-Paule Planté, Cédric Villebasse.

Je souhaite remercier toute l'équipe d'administration notamment Ophélie BOUZID, Isabelle DALAC, Alain CLEMENT, Ingrid FREY, Lydia PACTOLE, Sylvie LAMOUR, Maxime PROVENZIANO, Annie ROY, et Amanda TREPAGNY ainsi que l'ensemble du personnel du bureau d'étude mécanique Abdelkader BOULKRIT, Serge JACOB, Zouhire LAOUDIHI, Alexis POIZAT, et plus particulièrement Koro SOKHONA pour sa bonne humeur.

Je tiens à remercier mes parents Isabelle et Patrice, ma sœur Aurélie et mon frère Stéphane ainsi que ma belle-famille Christine, Éric, Anna et Andrea qui m'ont encouragée, soutenue et supportée durant ces trois années.

Enfin je remercie Alexandra pour tout ce qu'elle m'a apporté et m'apportera.

Table des matières

Introduction générale 7

Chapitre 1 Etat de l'art / Problématique 9

I - Les tests immunologiques et l'intérêt de l'utilisation des nanoparticules magnétiques 9

I - 1 - Les tests immunologiques ou immunodosages 9

I - 2 - L'utilisation de nanoparticules magnétiques dans les tests immunologiques 10

II - La microfluidique et les laboratoires sur puce 14

II - 1 - Définition de la microfluidique 14

II - 2 - L'apparition de la microfluidique et des laboratoires sur puce 14

II - 3 - Présentation des laboratoires sur puce 15

II - 4 - Les technologies de fabrication des laboratoires sur puce 15

II - 5 - Comparaison des laboratoires sur puce par rapport aux techniques traditionnelles 16

II - 6 - L'avenir des laboratoires sur puce 18

III - Balayage des techniques de contrôle de nanoparticules magnétiques 19

III - 1 - Les différents moyens de créer un champ magnétique 19

III - 2 - Le blocage et le transport de nanoparticules magnétiques 21

III - 3 - Le tri et la séparation des nanoparticules magnétiques 24

III - 4 - L'auto-assemblage et la structuration de nanoparticules magnétiques 25

IV - Présentation de la détection en immunodosage par fluorescence et par des capteurs magnétiques 27

IV - 1 - La détection en immunodosage par fluorescence 27

IV - 2 - Les techniques de détection magnétique pour des applications médicales 31

V - Etat de l'art des applications utilisant des complexes biologiques à base de nanoparticules magnétiques 42

V - 1 - La détection protéinique et génomique 42

V - 2 - La détection en biologie cellulaire 48

V - 3 - La détection en bactériologie 50

VI - Conclusion du chapitre 1 51

VII - Bibliographie 54

Chapitre 2 Conception et dimensionnement des microbobines en vue de leurs intégrations en laboratoire sur puce 61

I - Introduction 61

II - Force magnétique et force fluidique 62

II - 1 - L'étude d'un fluide par le nombre de Reynolds particulaire 62

II - 2 - Forces dans un fluide 63

III - Dimensionnement des microbobines 67

III - 1 - Champ magnétique crée par un fil 67

III - 2 - Conséquences sur les applications des microbobines 69

III - 3 - Synthèse 71

IV - Dimensionnement de la microbobine de capture 72

IV - 1 - Méthodologie de simulation 72

IV - 2 - Résultats de simulation pour une microbobine simple 73
IV - 3 - Microbobine avec une couche de matériau magnétique doux 76
IV - 1 - Etude par simulation d'une microbobine avec une couche de matériau magnétique doux ……77
IV - 2 - Conclusion du dimensionnement des microbobines de capture..... 80
V - Optimisation des performances de la détection magnétique : matériau magnétique..... 81
V - 1 - Introduction 81
V - 2 - Présentation du dispositif 81
V - 3 - Eléments de dimensionnement du dispositif magnétique 82
V - 4 - Etude du champ magnétique et du facteur de mérite de puissance après l'insertion d'un circuit magnétique 85
V - 5 - Application à la détection de nanoparticules magnétiques..... 91
VI - Conclusion du chapitre 2……100
VII - Bibliographie……101
Chapitre 3 Procédés de fabrication d'un dispositif fluidique intégrant des microbobines de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques 103
I - Introduction……103
II - Etat de l'art de la microfabrication des dispositifs fluidiques intégrant des composants pour le contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques et la détection magnétique 104
II - 1 - La fabrication de dispositifs fluidiques..... 104
II - 2 - La fabrication de systèmes de contrôle et de manipulation de nanoparticules magnétiques ……107
II - 3 - La fabrication de systèmes de détection de nanoparticules magnétiques..... 109
II - 4 - Conclusion de l'état de l'art de la microfabrication des dispositifs de capture et de détection magnétique ……110
III - Procédé de fabrication des microcanaux fluidiques..... 111
III - 1 - Réalisation des moules en résine..... 111
III - 2 - Réalisation des canaux en PolydiméthylSiloxane..... 114
III - 3 - Collage entre le capot en PDMS et un substrat recouvert de PDMS 116
IV - Procédé de fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques ……119
IV - 1 - Procédé global de fabrication 119
IV - 2 - Finalisation du dispositif de contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques125
V - Procédé de fabrication du dispositif de détection magnétique 128
V - 1 - Procédé global de fabrication 128
V - 2 - Croissance sur trois niveaux des microbobines de détection 130
V - 3 - L'utilisation de polyimide en tant que couche isolante structurable..... 132
V - 4 - Croissance de FeNi par dépôt électrolytique 138
V - 5 - Fabrication des plots en FeNi..... 148
V - 6 - Croissance et méthode de transfert des branches de FeNi 150
V - 7 - Finalisation du dispositif de détection 159
VI - Conclusion du chapitre 3……163
VII - Bibliographie……164

Chapitre 4 Etude et caractérisation des dispositifs de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques 167

I - Introduction.....167

II - Présentation du projet de la thèse : Analyse MultiModale pour la Biodéfense (AMMIB) ... 169

III - Etude préliminaire dans les circuits fluidiques.....171

III - 1 - Rappel du principe d'immunodosage 171

III - 2 - Protection des canaux microfluidiques par traitement de surface..... 177

III - 3 - Etude des dispositifs de capture en utilisant les nanoparticules magnétiques 185

IV - Immunodosage dans les dispositifs microfluidiques..... 195

IV - 1 - Développement d'un immunodosage en conditions microfluidiques : application à la détection d'Ovalbumine. 195

IV - 2 - Comparaison des immunodosages en microtube et en conditions fluidiques en utilisant un aimant permanent 197

IV - 3 - Comparaison des immunodosages en utilisant des microbobines centimétriques et millimétriques 199

IV - 4 - Discussion des résultats obtenus du contrôle des nanoparticules magnétiques 204

V - Application à la capture de bactéries « E. Coli » 205

V - 1 - Réalisation du complexe « bactérie – nanoparticules magnétiques »..... 205

V - 2 - Étude du complexe « bactérie – nanoparticules » 208

VI - Étude des dispositifs microfluidiques de détection des nanoparticules magnétiques 214

VI - 1 - Rappel du contexte de la conception d'un circuit magnétique pour la détection de nanoparticules magnétiques 214

VI - 2 - Présentation de la plateforme microfluidique de test pour la caractérisation des dispositifs de détection magnétique..... 216

VI - 3 - Caractérisation de la résistivité des dispositifs de détection magnétique..... 217

VI - 4 - Caractérisation des dispositifs de détection magnétique par variation d'inductance..... 220

VII - Conclusion du chapitre 4.....228

VIII - Références.....229

Conclusion générale 231

Glossaire

AC :	Alternating Current
AFP :	Alpha-FoetoProtein
AM :	Atomic Magnetometer
AMMIB :	Analyse MultiModale pour la Biodéfense
AMR :	Anisotropic MagnetoResistance
AND :	Acide DésoxyriboNucléique
ANR :	Agence Nationale de la Recherche
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messager
BLBVB :	Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant
BSA :	Bovin Serum Albumin
C2N :	Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies
CEA :	CarcinoEmbryonic ANtigen
CNT :	Carbon NanoTubes
COC :	Cyclic Olefin Copolymer
CTC :	Circulatig Tumor Cell
DC :	Direct Current
DGA :	Direction Générale de l'Armement
DMPMS :	Dimethyl-MethylPhenylMethoxy Siloxane
E. Coli :	Escherichia Coli
EDC :	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carboxyl
EDX :	Energy Dispersive X-ray spectrometry
PHE:	Effet Hall planaire
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FFF :	Field Flux Fraction
FITC :	Fluorescein IsoThioCyanate
GFP :	Green Fluorescent Protein
GMI :	Giant MagnetoImpedance
GMR :	Giant MagnetoResistance
IBE :	Ion Beam Etching
IC :	Integrated Circuited
ICP :	Inductively Coupled Plasma
IgG :	Immunoglobuline G
IGPS :	Institut Galien Paris-Sud

IL-5 :	Interleukine 5
ILV :	Institut Lavoisier de Versailles
ITODYS :	Interfaces Traitements Organisation et Dynamique des Systèmes
L.D.D. :	Limite De Détection
MbB :	Microbobines avec une Base de permalloy
MbBP :	Microbobines avec une Base et un Plot de permalloy
MbBPB :	Microbobines avec une Base, un Plot et des Branches de permalloy
Mbs :	Microbobines seules
MEMS :	Micro-Electro-Mechanical Systems
MES :	acide 2-(N-Morpholino)EthanoSulfonique
MMIC :	Monolithic Microwave Integrated Circuit
MOEMS :	Micro-Opto-Electro-Mechanical Systems
NHS :	N-HydroSulfosuccinimide
NPM :	NanoParticules Magnétiques
PCB :	Printed Circuit Board
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDMS :	PolyDimethylSiloxane
PECVD :	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEO :	PolyEthylen Oxyde
pH :	Potentiel d'Hydrogène
PM :	Particules magnétiques
PMMA :	PolyMethylMethAcrylate
PSA :	Prostate Specific Antigen
PTH :	ParaThyroidiebbe Hormone
RF :	Radio Fréquance
RIE :	Reactive Ion Etching
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RMS :	Roughness Mean Square
SPIONs :	SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
SQUID :	Supraconducting QUantum Interference Device
TMR :	Tunnel MagnetoResistance
U.V. :	Ultra-Violet
UFC :	Unités Formant Colonies
µRMN	Résonance Magnétique Nucléaire miniaturisée
µTAS:	Micro total analysis system

Introduction générale

L'évolution des techniques de microfabrication a permis aux MEMS(Micro-Electro-Mechanical Systems) de devenir des systèmes multifonctionnels clés capables d'appréhender l'environnement physique. Les MEMS actuels intègrent une multitude de fonctions au sein d'une même puce, notamment des fonctions de mesure, actionnement et de contrôle, voire de calcul. La réalisation de ces systèmes implique l'intégration de matériaux (magnétiques, piézoélectriques, polymères, III-V, CNT, nanomatériaux) et de structures (composants optiques, mécaniques, acoustiques, fluidiques, électromagnétiques, optoélectronique) de nature fortement hétérogène. De nombreux verrous technologiques limitent l'assemblage de ces éléments. Le but de la recherche d'aujourd'hui est de débloquer ces verrous en développant de nouveaux procédés pour obtenir des systèmes toujours plus performants. L'objectif de cette thèse est de réaliser le démonstrateur d'un microcapteur intégré ayant pour but la détection d'éléments biologiques.

Les biocapteurs sont constitués d'un élément de reconnaissance biologique, ou l'un de ses dérivés à un élément transducteur (Wa *et al*. 2012). De manière simple, une réponse biologique doit être détectée et convertie d'une manière ou d'une autre en un signal électrique.

Depuis quelques années, l'utilisation de nanoparticules magnétiques (NPM) fonctionnalisées, suite à une immobilisation magnétique, a ouvert la voie à l'utilisation des méthodes d'immunodosages dans les laboratoires sur puce. Dans la littérature, l'utilisation combinée des dispositifs fluidiques et des NPM a permis d'atteindre une sensibilité plus élevée pour la détection d'éléments biologiques (Ramadan et al. 2004; Lacharme et al. 2009).

Pour contrôler un champ magnétique et capturer des NPM l'une des techniques les plus répandues est l'utilisation de microbobines. Le plus souvent, les microbobines sont planaires (Miao et al. 2014; Pawinanto et al. 2014; Kakri-Bouchet & Zahraoui 2017; Pancharoen et al. 2015; Yunas et al. 2015) et quelques auteurs ont amélioré la capture par l'adjonction de matériaux magnétiques, le plus souvent avec une couche mince de matériaux magnétiques(Zhi et al. 2014; Hosseini et al. 2017; Zhu et al. 2018) ou un plot (Ramadan et al. 2006).

Pour détecter un immunocomplexe utilisant des NPM la méthode la plus utilisée est la fluorescence. Cette technique est facile à prendre en main et permet des analyses quantitatives. En revanche, cette méthode nécessite un microscope à fluorescence, qui est un instrument difficilement intégrable. Une autre méthode consiste à venir détecter la présence de NPM, plusieurs techniques peuvent être utilisées : SQUIDS, fluxgates, GMI, GMR, microbobines. Dans l'objectif de réaliser un dispositif entièrement intégré, l'utilisation des microbobines est l'une des pistes les plus intéressantes. Le paramètre que nous avons utilisé pour détecter la présence de NPM est l'inductance. En effet, la présence de nanoparticules perturbe le champ magnétique des microbobines et donc fait varier l'inductance de ces dernières.

L'objectif idéal pour les deux types de microbobines (capture et détection) serait d'obtenir un circuit magnétique quasiment fermé, ne présentant qu'un faible entrefer. Si ces dispositifs sont courants dans le monde macroscopique (transformateurs ou inductances d'alimentation à découpage notamment), leur intégration en petite taille dans une géométrie quasiment planaire est très difficile. Il n'existe que sept réalisations de transformateurs ou d'inductances avec un noyau magnétique fermé dans la littérature (Sirotkin et al. 2014; Kim et al. 2015; Anthony et al. 2016; Ã et al. 2007; Woytasik et al. 2006; Yoon et al. 1998; Wang et al. 2005) et aucune réalisation comportant également un circuit

microfluidique. L'intérêt d'un tel circuit magnétique « 3D » est très grand, puisqu'il pourrait fortement réduire le courant nécessaire à la capture et donc l'échauffement de la puce lors de la capture. De plus, il pourrait également fortement augmenter la capacité de détection des microbobines ainsi fabriquées.

Ce travail de thèse a été mené dans le cadre du projet ANR AMMIB 2014-2018 (Analyse MultiModale Intégré pour la Biodéfense). Quatre partenaires se sont regroupés pour proposer ce projet : l'Institut Galien Paris Sud (IGPS), l'Institut Lavoisier de Versailles (ILV), le laboratoire Interfaces Traitements Organisation et DYnamique des Systèmes (ITODYS) et le Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N). L'objectif du projet était de proposer un dispositif intégré pour la détection de bactéries avec deux types de détection : magnétique et optique.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans cette thèse portent sur le développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques. L'originalité de cette thèse réside dans la fabrication d'un dispositif fluidique comprenant une microbobine entourée d'un circuit magnétique pour la détection de NPM.

Le chapitre 1 présente l'état de l'art des laboratoires sur puce, en présentant tout d'abord les tests immunologiques et l'intérêt d'ajouter des NPM dans ces tests. Les différentes techniques de fabrication de dispositifs fluidiques et les avantages et inconvénients des laboratoires sur puce sont exposés. Enfin les différentes techniques de contrôle de NPM et les méthodes de détection des complexes biologiques créés sont présentées.

Le chapitre 2 est consacré à la simulation et au dimensionnement des microbobines de contrôle et de détection magnétique. Grâce au logiciel ANSYS de simulation d'éléments finis, l'ensemble des paramètres des microbobines peuvent être simulés. Les paramètres de base sont d'abord étudiés tels que le nombre de spires, la largeur et l'épaisseur des spires, etc. L'ensemble des simulations permettent de dimensionner les microbobines de capture pour obtenir le champ magnétique le plus adapté pour le contrôle de NPM. Puis l'insertion de matériau magnétique est abordée pour le contrôle de NPM et en particulier dans le cas de la détection magnétique. Le dimensionnement du circuit de détection (microbobine et circuit magnétique) est réalisé en faisant varier l'ensemble des paramètres par simulation. Pour déterminer les paramètres optimaux pour la détection de NPM, le calcul de la variation d'inductance ΔLest modélisé.

Le chapitre 3 est dédié à la fabrication des dispositifs de contrôle et de détection magnétique en salle blanche. Leur conception repose sur une fabrication sur plusieurs niveaux avec différents matériaux et procédés tels que le dépôt électrolytique de cuivre et de fer-nickel, la pulvérisation cathodique de titane et de cuivre, etc. L'enjeu de ce chapitre est de proposer un procédé fiable et reproductible pour la fabrication de dispositifs de contrôle et de détection magnétique. Cette démarche passe par l'identification et la résolution de nombreux verrous technologiques, tels que la croissance de fer-nickel de plusieurs dizaines de microns ou l'alignement des différents niveaux.

Le chapitre 4 est focalisé sur la caractérisation et l'utilisation des dispositifs fabriqués en salle blanche. La première étape est de démontrer la possibilité de manipuler des NPM dans les circuits fluidiques. Puis des tests immunologiques sont réalisés tout d'abord en microtubes puis dans un circuit fluidique à l'aide d'aimants externes puis de microbobines intégrés. En parallèle, des études préliminaires sont réalisées pour la capture de bactérie E. Coli, à l'aide d'un dispositif fluidique et un aimant non-intégré. Enfin les premières expériences de caractérisation des dispositifs de détection de NPM sont exposées avec une discussion des différents paramètres ayant une influence sur la sensibilité de détection.

Chapitre 1

Etat de l'art / Problématique

I - Les tests immunologiques et l'intérêt de l'utilisation des nanoparticules magnétiques

I - 1 - Les tests immunologiques ou immunodosages

I- 1 - a - Le début de l'immunodosage

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. La nature des anticorps et de leur liaison avec les antigènes étant bien caractérisée, cette réaction est devenue un outil performant d'exploration et de quantification. Yalow et Berson réalisèrent, en 1960, le premier dosage immunologique de l'insuline humaine dans le plasma (Yalow & Berson 1960). En 1975, les travaux de Köhler et Milstein ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux (MAb), produits par un seul clone de lymphocytes (Köhler & Milstein 1975), dont l'utilisation améliore notablement la spécificité et la sensibilité des techniques. Cette découverte a permis la possibilité de fabriquer des anticorps monoclonaux, parfaitement homogènes et de spécificité donnée, pouvant être produits en grande quantité. Les progrès de l'immunologie ont permis d'obtenir des anticorps polyclonaux de bonne qualité, dirigés aussi bien contre des petites molécules que contre des molécules de masse moléculaire élevée. Pour pouvoir suivre, à l'échelle macroscopique, ces associations antigène-anticorps, un troisième élément est utilisé : le traceur. Celui-ci résulte de la modification de l'anticorps ou de l'antigène par ajout d'un marqueur. Pendant longtemps, seuls les marqueurs radioactifs ont été utilisés, dont la qualité essentielle est liée à leurs propriétés d'émission non modifiées par l'environnement physicochimique, et à la sensibilité de la détection. Cependant, l'utilisation de la radioactivité présente un inconvénient majeur puisqu'elle est dangereuse et donc restreinte aux seuls laboratoires agréés pour la manipulation de radioéléments. Des développements méthodologiques importants ont permis de remplacer les éléments radioactifs par des enzymes. Ainsi, des dosages immunoenzymatiques (ELISA) ont été développés par Engvall et Perlmann en 1971 (Engvall et al. 1971). Aujourd'hui, les marqueurs enzymatiques et les marqueurs luminescents ont pris une réelle importance en pratique courante et ont supplanté les traceurs radioactifs. D'autres approches sont développées en complément des immunodosages comme les marqueurs fluorescents ou encore l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

I- 1 - b - Le principe de l'immunodosage

Un test immunologique est un test biochimique qui mesure la concentration d'une molécule cible dans une solution, principalement grâce à l'utilisation d'anticorps. Il existe différent types d'immunodosages. Ils peuvent être réalisés en mélangeant simplement les réactifs et l'échantillon puis en réalisant une mesure physique. Ces tests sont appelés dosages immunologiques homogènes. Ils peuvent aussi être réalisés par étapes en ajoutant des réactifs qui sont ensuite éliminés (ou séparés) plus tard. Ces tests par étapes multiples sont appelés dosages immunologiques hétérogènes.

Les tests immunologiques reposent sur la capacité d'un anticorps à reconnaître et à se lier de façon spécifique à une molécule cible. En immunologie, la molécule cible liée par un anticorps est appelée antigène. Dans certains cas, un test immunologique en solution peut utiliser un antigène pour détecter la présence d'anticorps qui reconnaissent l'antigène.

En plus de la liaison d'un anticorps à son antigène, l'autre caractéristique majeure de tous les tests immunologiques est de présenter un moyen de produire un signal mesurable en réponse à la liaison. La plupart des tests immunologiques impliquent ainsi une liaison chimique anticorps-antigène associée à un marqueur détectable. Un grand nombre de marqueurs existent et ils permettent une détection par différentes techniques : optique, chimique, électriques etc.(Blake & Gould 1984)

Les méthodes d'immunodosage peuvent être regroupées en méthodes quantitatives et qualitatives. Les méthodes qualitatives consistent à fixer un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt puis à révéler sa présence. Les méthodes quantitatives permettent de quantifier cette présence.

I - 2 - L'utilisation de nanoparticules magnétiques dans les tests immunologiques

L'utilisation de particules magnétiques pour des applications dans les biotechnologies, l'industrie pharmaceutique ou la médecine est devenue de plus en plus fréquente (Tamanaha et al. 2008; Gao 2014; Jamshaid et al. 2016). Les particules magnétiques ont vu le jour il y a déjà une vingtaine d'années et connaissent aujourd'hui un essor particulier, intimement lié aux objectifs de miniaturisation des analyses. Leur taille, allant du nanométrique au micrométrique, et la possibilité de les manier à l'aide d'un simple champ magnétique, en font un outil bien adapté à la manipulation de molécules biologiques. De nombreuses sociétés (Dynal, Ademtech,…) fournissent une large variété de microbilles à la surface desquelles il est possible de greffer spécifiquement toutes sortes de molécules d'intérêt. Dans le cas d'une manipulation "macroscopique" de ces particules, le protocole général d'utilisation se résume à l'enchainement de plusieurs cycles d'incubation (greffage et/ou dé-greffage de molécules), de rinçage et de séparation. La manipulation de ces particules grâce à un simple champ magnétique (aimant permanent ou électroaimant) confère donc à cette approche de réels avantages en termes de temps, d'équipements et de coût.

Une nanoparticule est définie comme un objet ayant une dimension inférieure au micromètre. Une nanoparticule magnétique peut générer ou subir un champ magnétique. Il existe plusieurs types de nanoparticules magnétiques : nanoparticule avec une structure cœur-écorce, le cœur présentant les propriétés magnétiques et l'écorce protégeant le cœur ou qui permet à l'aide de ligand d'adapter la nanoparticule magnétique aux besoins des utilisateurs, ou nanoparticule ayant une structure avec une inclusion de nanoparticule magnétique dans la matrice polymère (Figure 1.1).

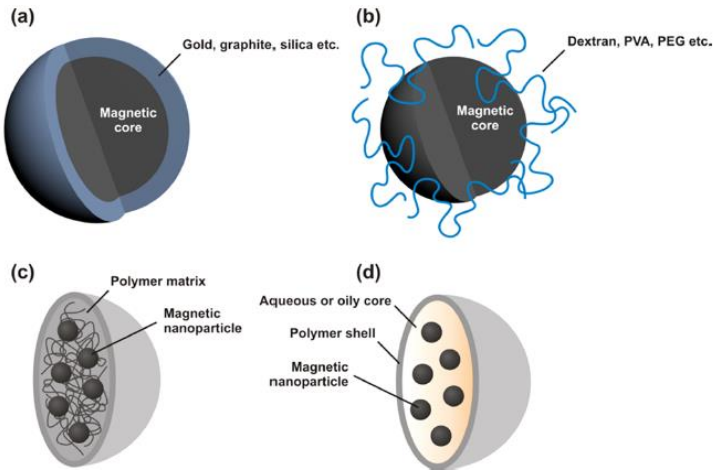


Figure 1.1 : Les différentes structures des nanoparticules magnétiques(Reddy et al. 2012).

Dans le cadre de la réalisation d'immunodosages, l'usage de nanoparticules magnétiques nécessite un greffage en surface des premiers éléments du complexe biologique visé. Il est nécessaire d'utiliser des nanoparticules magnétiques présentant des fonctions (amine, carboxyle, …) permettant ce greffage.

Les anticorps spécifiques sont immobilisés sur la surface des nanoparticules magnétiques et permettent de « capturer » les cellules / protéines / virus cibles. Ensuite, ces nanoparticules magnétiques peuvent être séparées dans la solution en utilisant une force magnétique (généralement un aimant) ou venir compléter un immunodosage sur phase solide c'est-à-dire reconnaitre un anticorps lié de manière covalente à une surface.

I- 2 - b - Introduction de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées

Dans les applications actuelles, les particules utilisées peuvent être classées en deux types principaux : non magnétique (billes de silice et de polymère) et magnétique / superparamagnétique (oxyde de fer - Fe_2O_3 ou Fe_3O_4, alliage ou terres rares - NbFeB ou SmCo). La majorité de ces particules sont superparamagnétiques, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas de rémanence magnétique, c'est à dire que le champ interne est nul en l'absence de champ magnétique externe, ce qui limite les phénomènes d'agrégation. La taille de ces particules peut jouer un rôle important. Elles de l'ordre de quelques nanomètres à quelques micromètres (pour ces dernières, l'appellation nanoparticules est un abus de langage).

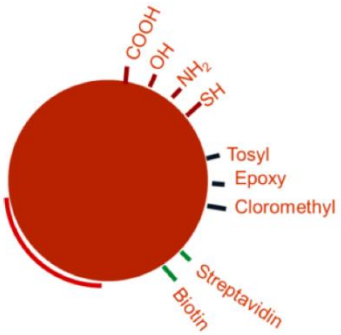


Figure 1.2 : Les différents types de fonctionnalisation de surface.

La surface des particules peut également être fonctionnalisée : on peut y greffer des groupes fonctionnels spécifiques correspondant aux objectifs des processus d'analyse (Dave & Gao 2009; Sant & Wang 2011). Quelques méthodes et techniques de fonctionnalisation sont présentées en Figure 1.2.

Il existe de nombreux types de nanoparticules superparamagnétiques commercialisées pour de nombreuses applications (Sant & Wang 2011). Dans notre étude, nous utilisons des nanoparticules magnétiques carboxyliques commerciales de 200 nm, 300 nm et 500 nm de diamètre (Carboxyl-Adembeads, fournies par Ademtech). Ces particules sont des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques uniformes, la Figure 1.3 montre la structure de la coque des carboxyl-Adembeads.

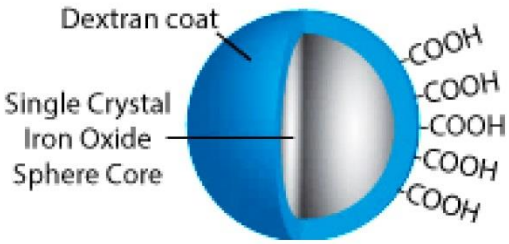


Figure 1.3 : Schéma de la structure des nanoparticules magnétiques Ademtech.

Les différentes caractéristiques physiques des nanoparticules magnétiques Ademtech utilisées dans ces travaux sont présentées dans le Tableau 1.1.

Diamètre	200 nm (CV max 20%)	300 nm (CV max 20%)	500 nm (CV max 25%)
Densité	2,0 g / cm³	2,0 g / cm³	2,0 g/cm³
Magnétisation à saturation	env. 40 emu / g	env. 40 emu / g	env. 40 emu / g
Surface spécifique	15 m² / g	15 m² / g	5 m²/g
Teneur en oxyde de fer	env. 70%	env. 70%	env. 70%
Densité COOH	> 350 µmol / g	> 350 µmol / g	> 275 µmol/g
Teneur en solide	30 mg / ml (3%)	30 mg / ml (3%)	50 mg/ml (5%)

Tableau 1.1 : Présentation des caractéristiques des nanoparticules magnétiques de 200, 300 et 500 nm de diamètre (Ademtech).

I- 2 - c - Propriétés magnétiques des matériaux composant les noyaux des nanoparticules magnétiques

Généralement, les matériaux super-paramagnétiques sont préférés pour fabriquer les noyaux des nanoparticules magnétiques. Ce matériau adopte deux comportements que l'on retrouve dans le paramagnétisme et le ferromagnétisme et qui sont respectivement :

- l'absence d'aimantation lorsque le champ magnétique externe est supprimé.
- les niveaux relativement élevés d'aimantation atteints sous l'influence d'un champ magnétique faible.

D'autres propriétés des nanoparticules magnétiques sont leur temps de relaxation court dans lequel la magnétisation devient quasiment nulle après l'effet d'un champ magnétique externe (les valeurs typiques sont d'environ 10^{-9}-10^{-10}s). Sous un champ magnétique externe alternatif, leur moment magnétique est rapidement réorienté. Une comparaison des propriétés magnétiques entre

les matériaux ferromagnétiques et superparamagnétiques est montrée sur la Figure 1.4, il est observable en particulier que les nanoparticules superparamagnétiques ne montrent aucune aimantation rémanente (Mr).

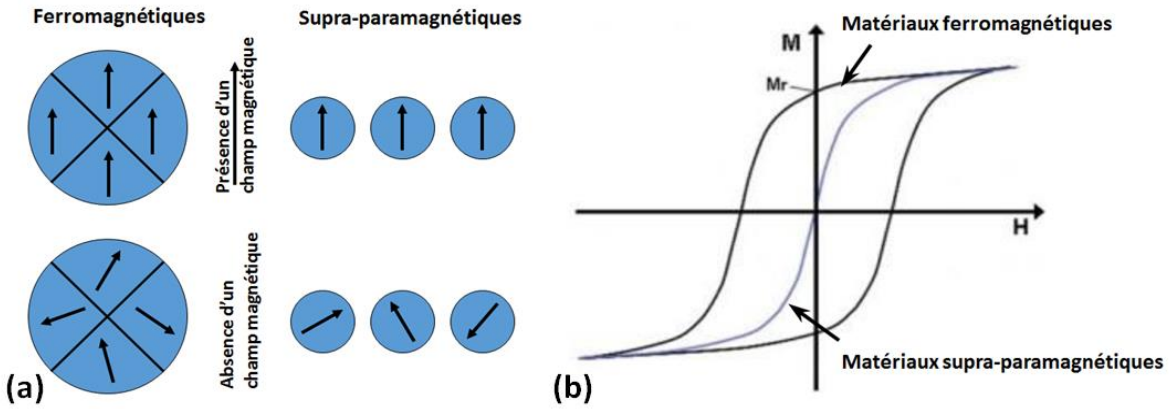


Figure 1.4 : (a) Les moments magnétiques des nanoparticules ferromagnétiques et superparamagnétiques sous un champ magnétique externe / pas de champ magnétique ; (b) Courbes d'aimantation typiques des particules ferromagnétiques (ligne noire) et superparamagnétiques (ligne bleue).

II - La microfluidique et les laboratoires sur puce

II - 1 - Définition de la microfluidique

La microfluidique est la science qui traite des écoulements de liquides dans des canaux de taille micrométrique. Il suffit qu'une dimension du canal soit de l'ordre du micromètre ou de la dizaine de micromètres pour qu'un système appartienne à la microfluidique. Deux aspects complémentaires sont importants dans la microfluidique :

- La science qui est l'étude du comportement des fluides dans des microcanaux,
- La technologie qui correspond à la fabrication de dispositifs microfluidiques.

II - 2 - L'apparition de la microfluidique et des laboratoires sur puce

L'apparition de la microfluidique a été possible par l'avancée des technologies silicium développées pour miniaturiser les transistors et fabriquer les microprocesseurs. Ces techniques ont été adaptées pour la réalisation des microcanaux.

Les premiers transistors ont été développés dans les années 50. A partir des années 60, la recherche spatiale a permis le financement et le développement de la miniaturisation des calculateurs permettant de partir dans l'espace. Ces avancées, qui ont pu être réalisées grâce au développement de technologies comme la photolithographie, ont permis la miniaturisation et l'intégration de milliers de transistors sur des substrats de silicium. Ces recherches ont permis la fabrication des premiers circuits intégrés et avec eux, des premiers microprocesseurs.

Au cours des années 80, l'utilisation des procédés de gravure du silicium développés pour l'industrie microélectronique a permis de fabriquer les premiers dispositifs contenant des micro-éléments mobiles intégrés sur un substrat de silicium. Ces nouveaux types de dispositifs appelés MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) ont donné naissance à des applications industrielles (capteurs de pression, accéléromètres, vannes de contrôle microfluidiques …).

Dans les années 90, de nombreuses recherches ont été menées pour appliquer les microsystèmes aux domaines de la biologie, de la chimie et du biomédical. Ces applications nécessitant de contrôler des mouvements de liquides dans des microcanaux ont considérablement contribué au développement de la microfluidique.

En parallèle des avancées microfluidiques, beaucoup de recherches ont été effectuées sur la miniaturisation des opérations biochimiques telles que la PCR, l'électrophorèse, les puces à ADN, l'étape de prétraitement, la lyse cellulaire, etc. Finalement, les chercheurs ont commencé à intégrer toutes les étapes nécessaires de la collection de l'échantillon à l'analyse finale sur la même puce, exprimant ainsi le potentiel réel des technologies de laboratoires sur puce. Ces types de dispositifs de laboratoires sur puce qui permettent aux chercheurs d'effectuer toutes les opérations de collecte de l'échantillon à analyser est généralement appelé en anglais Micro Total Analysis System (µTAS).

A cette époque, la majorité des dispositifs microfluidiques étaient encore fabriqués en silicium ou en verre et nécessitaient de ce fait les lourdes infrastructures de l'industrie microélectronique. A partir des années 2000, les technologies basées sur le moulage de micro-canaux dans des polymères comme le PDMS ont connu un fort développement. La réduction des coûts et du temps de fabrication des dispositifs a permis à un grand nombre de laboratoires de mener des recherches en microfluidique.

II - 3 - Présentation des laboratoires sur puce

Un laboratoire sur puce est un dispositif miniaturisé qui intègre au sein d'une simple puce une à plusieurs analyses (le séquençage ADN ou bien la détection d'agents biochimiques) qui sont communément réalisées en laboratoire. La miniaturisation d'opérations biochimiques communément effectuées en laboratoire possède de nombreux avantages comme la réduction des coûts, la parallélisation des expériences, l'ergonomie, la vitesse du diagnostic et sa sensibilité.

Les technologies microfluidiques utilisées dans les dispositifs de laboratoires sur puce permettent la fabrication de nombreux microcanaux, chacun mesurant quelques micromètres (ou dizaine de micromètres), sur une seule puce de taille réduite. Les microcanaux permettent la manipulation de fluides dans de faibles quantités (jusqu'au picolitre), ainsi que la réalisation de réactions biochimiques dans de très petits volumes. Pour devenir des systèmes complétement intégrés, ils requièrent également l'intégration de pompes, d'électrodes, de vannes, de générateurs de champs électriques et de l'électronique de contrôle et de traitement.

Le but d'un laboratoire sur puce est d'intégrer sur une seule puce un nombre maximal de réactions biochimiques. Ainsi, de nombreux diagnostics pourront être à partir d'une seule goutte de sang afin d'obtenir un diagnostic précis et rapide des maladies potentielles.

Beaucoup de recherches ont été et sont menées sur les laboratoires sur puce :

- mesure des coefficients de diffusion moléculaire (Kamholz et al. 2001);
- pH (Atwe et al. 2014), coefficients de liaison chimique (Kamholz et al. 1999),
- cinétique de la réaction enzymatique (Duffy et al. 1999),
- électrophorèse capillaire (Kameoka et al. 2001),
- immunodosage (Otieno et al. 2014),
- cytométrie en flux (Piyasena & Graves, S 2014),
- injection de protéines pour analyse par spectrométrie de masse (Figeys et al. 1998),
- amplification PCR (Geng & Mathies 2015),
- analyse ADN (Yang et al. 2014),
- analyse cellulaire (Iv et al. 2015),
- formation de gradient chimique (Dertinger et al. 2001),
- diagnostics cliniques (Otieno et al. 2014; Kim et al. 2015).

II - 4 - Les technologies de fabrication des laboratoires sur puce

II- 4 - a - Laboratoire sur puce en Silicium

Le premier laboratoire sur puce a été réalisé en silicium : les microtechnologies sont fondées sur le travail du silicium. Les laboratoires sur puces en sont un produit dérivé. Aujourd'hui, le silicium n'est que peu utilisé pour les laboratoires sur puce, principalement pour trois raisons :

- Le coût des procédés sur silicium est relativement élevé,
- Il n'est pas optiquement transparent (sauf pour le rayonnement infrarouge)
- La cohabitation des technologies de microfabrication sur silicium (notamment MEMS ou CMOS) avec les procédés et matériaux de la microfluidique ne va pas de soi.

II- 4 - b - Laboratoire sur puce en PDMS

Les laboratoires de recherche utilisent fréquemment le PDMS pour le prototypage des laboratoires sur puce. Le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane) est un élastomère transparent et flexible. Le PDMS est très largement utilisé car il est très facile et peu coûteux à la fabrication. Bien qu'il soit amplement utilisé pour le prototypage des laboratoires sur puce, le PDMS montre d'importantes limitations à la production industrielle. En effet, ce matériau est sujet au vieillissement, il est perméable à l'eau, il est flexible et demande un temps de fabrication (réticulation) plus long (que le PMMA par exemple).

II- 4 - c -Laboratoire sur puce en Thermopolymères (PMMA, PS...)

Les polymères thermoplastiques sont abondamment utilisés par les chercheurs pour fabriquer des laboratoires sur puce. Même s'ils piègent plus facilement les éléments biologiques et sont plus chers à implémenter que le PDMS, les thermoplastiques sont de bons candidats à la fabrication de laboratoires sur puce. En effet, ils peuvent être transparents, compatibles avec la lithographie de taille micrométrique et plus inertes chimiquement que le PDMS pour différents solvants.

II- 4 - d - Laboratoire sur puce en Verre

Le verre est un excellent candidat pour l'industrialisation des laboratoires sur puce car il présente des propriétés remarquables : il est transparent, compatible avec les dispositifs de taille micrométrique, chimiquement inerte, avec un vaste rayon de surfaces de traitements chimiques et une intégration d'électrodes reproductibles. Du point de vue de la recherche, la fabrication de laboratoires sur puce en verre nécessite l'accès à des salles blanches et une adaptation des procédés de microfabrication sur les technologies du verre.

II- 4 - e - Laboratoire sur puce en Papier

Les systèmes de laboratoires sur puce basés sur les technologies en papier pourraient avoir de fortes incidences sur les applications qui exigent des coûts très bas. Les laboratoires sur puce en papier utilisent généralement les forces de capillarité pour la circulation des fluides et des réactifs colorés. Ils n'utilisent donc pas de véritable microcanal. Ils peuvent être produits par des techniques d'imprimerie et sont donc très bien adaptés à une production de masse.

II - 5 - Comparaison des laboratoires sur puce par rapport aux techniques traditionnelles

Pour montrer l'intérêt des laboratoires sur puce il est intéressant de la comparer aux techniques plus traditionnelles.

II- 5 - a - Les différents avantages des laboratoires sur puce

Bas coût : L'intégration permet de réaliser de nombreux tests sur la même puce, réduisant le coût de chaque analyse individuelle.

Haute parallélisation : Grâce à sa capacité à intégrer des microcanaux, la technologie des laboratoires sur puce permet à de nombreuses analyses d'être réalisées simultanément sur la même

puce. Cela permet de cibler des maladies à partir d'un seul échantillon et d'obtenir une réponse plus rapide et efficace de la part du personnel soignant.

Simplicité d'utilisation et compacité : Les laboratoires sur puce permettent l'intégration d'un grand nombre d'opérations à l'intérieur d'un petit volume. A terme, une puce de seulement quelques centimètres carrés associée à un ordinateur permettra de faire des analyses comparables à celles réalisées dans des laboratoires d'analyses entiers. Les diagnostics utilisant les laboratoires sur puce nécessiteront beaucoup moins de manipulations non automatisées et dans la plupart des cas, ils pourront être réalisés sur place.

Réduction des erreurs humaines / Accroissement de la reproductibilité : Le diagnostic réalisé en utilisant un laboratoire sur puce diminuera le risque d'erreur humaine en comparaison avec les procédés d'analyse classiques réalisés en laboratoires.

Temps de réponse et diagnostic plus rapide : A l'échelle micrométrique, la diffusion de produits chimiques, la commutation de flux et la diffusion de chaleur est plus rapide. On peut changer la température en quelques centaines de millisecondes (ce qui permet, par exemple une amplification ADN plus rapide en utilisant la PCR) ou le mélange de produits chimiques par diffusion en secondes (pour permettre des réactions biochimiques plus rapides par exemple).

Faible volume des échantillons : Parce que les systèmes de laboratoires sur puce nécessitent seulement une petite quantité de solution pour chaque analyse, cette technologie diminue le coût des analyses en réduisant l'utilisation de réactifs chimiques. De plus, les quantités de sang nécessaires, par exemple, sont également réduites.

Automatisation : les équipements de laboratoires sur puce sont amenés à être utilisés dans des environnements extérieurs pour la surveillance, par exemple, de l'air et de l'eau en continu sans nécessité d'une intervention humaine.

II- 5 - b - Les faiblesses des laboratoires sur puce

Industrialisation : La plupart des technologies de laboratoires sur puce ne sont pas encore prêtes à être industrialisées.

Rapport signal/bruit : Pour certaines utilisations, la miniaturisation accentue le rapport signal/bruit et par conséquent, les laboratoires sur puce fournissent des résultats moins précis que les techniques conventionnelles.

Les laboratoires sur puce requièrent des systèmes périphériques pour fonctionner : Même si les systèmes de laboratoires sur puce peuvent être petits et puissants, ils nécessitent un équipement spécifique comme des systèmes de contrôle des flux ou électroniques pour être en mesure de fonctionner correctement. Cs équipements externes augmentent la taille finale et le coût du système. Par comparaison, le packaging des circuits intégrés représente de 40 à 70% du coût final.

II - 6 - L'avenir des laboratoires sur puce

Il serait long d'énumérer toutes les recherches actuelles en cours sur les laboratoires sur puce. La recherche contemporaine sur les laboratoires sur puce se focalise sur trois aspects principaux :

- L'industrialisation des technologies de laboratoires sur puce pour les préparer à la commercialisation. Cela inclut l'adaptation des processus de fabrication, le dimensionnement des surfaces de traitement spécifiques, les systèmes de contrôle des flux, etc.
- L'augmentation du nombre maximum d'opérations biologiques aptes à être intégrées dans la même puce et l'augmentation dans la parallélisation pour réaliser la détection de centaines de pathogènes dans la même « capsule » microfluidique.
- La recherche fondamentale sur certaines technologies à fort potentiel d'impact comme la lecture ADN à travers de nanopores, ce qui nécessite davantage d'études avant de pouvoir être utilisable.

III - Balayage des techniques de contrôle de nanoparticules magnétiques

Pour la manipulation dans les canaux microfluidiques, deux approches peuvent être prises :

(i) des aimants permanents classiques ou des électroaimants sont placés à l'extérieur de la micropuce,

(ii) des aimants permanents ou des électro-aimants sont incorporés dans la micropuce.

L'approche (i) présente l'avantage évident de facilité de fabrication et de faible coût. L'approche (ii) permet un contrôle spatial beaucoup plus étroit de la distribution du champ et permet également souvent une plus grande proximité de l'aimant au microcanal.

III - 1 - Les différents moyens de créer un champ magnétique

III- 1 - a - L'utilisation d'aimants conventionnels

Les aimants permanents utilisés dans les applications microfluidiques sont généralement de petits aimants en Néodyme-Fer-Bore (NdFeB) présentant des densités de flux magnétique allant jusqu'à 500 mT en surface.

Ces aimants permettent la manipulation de particules magnétiques ou de cellules à l'intérieur d'un microcanal même lorsque l'aimant est placé à plusieurs millimètres du canal. Selon l'application, des aimants de tailles et formes diverses sont requis. Par exemple pour le pompage magnétohydrodynamique, toute la zone du canal doit être soumise à un champ magnétique homogène, c'est-à-dire que les aimants utilisés ont des dimensions comparables à celles du canal (Homsy et al. 2005). Pour que des particules magnétiques forment un bouchon dans le canal, des aimants placés à quelques millimètres du canal ont été utilisés (Furdui & Harrison 2004). La rotation du matériau magnétique à l'intérieur d'un microcanal peut être réalisée par un aimant externe rotatif par exemple avec une plaque d'agitation conventionnelle (Yuen et al. 2003; Lu et al. 2002; Grzybowski & Campbell 2004).

Les électro-aimants présentent souvent des noyaux de matériaux magnétiques concentrateurs de flux de formes coniques afin d'obtenir des champs magnétiques et des gradients élevés (Rida & Gijs 2004; Barbic 2002; Joung et al. 2012). Bien qu'ils puissent être allumés et éteints et que leur champ puisse être modulé, les électro-aimants restent difficiles à utiliser. Un petit électroaimant avec une intensité de champ comparable à celle d'un petit aimant NdFeB requiert un courant généralement impossible à injecter pour cause d'échauffement bien trop élevé. Même en ayant pour objectif un champ magnétique bien plus faible, le chauffage par effet Joule est un problème pour l'intégration dans un dispositif à défaut de l'être pour l'électro-aimant lui-même.

III- 1 - b - L'utilisation d'aimants microfabriqués

L'intégration d'aimants microfabriqués dans des dispositifs microfluidiques implique un nombre considérable d'étapes de fabrication, et un coût élevé. D'un autre côté, de petits aimants intégrés permettent un contrôle très précis du champ magnétique. Lorsqu'ils sont positionnés à proximité du microcanal, les exigences de résistance du champ sont également réduites.

Les techniques de fabrication des électro-aimants ressemblent à celles employées pour la fabrication de puces microfluidiques. Les couches métalliques sont obtenues soit par dépôt électrolytique, soit par pulvérisation cathodique (Inglis 2004), par galvanoplastie (Ryu et al. 2004), par évaporation (Gradients et al. 2004) ou par dépôt en phase vapeur (Ramadan et al. 2004). La lithographie et les résines photosensibles sont utilisées pour la structuration en combinaison avec des techniques de gravure et de lift-off.

Les substrats sont principalement en silicium (Rida et al. 2014; Lee et al. 2001; Sorli et al. 2004), ou en verre (Massin et al. 2003; Wensink et al. 2005; Walton et al. 2003; Choi et al. 2001).

Dans de nombreux cas, une couche d'accroche est nécessaire pour obtenir une bonne adhérence entre le métal désiré et le substrat. L'isolation électrique entre le substrat et les motifs déposés peut être réalisée par enduction avec du polyimide (Gradients et al. 2004) ou en déposant une couche d'oxyde de silicium (Gradients et al. 2004; Lee et al. 2001; Sorli et al. 2004).

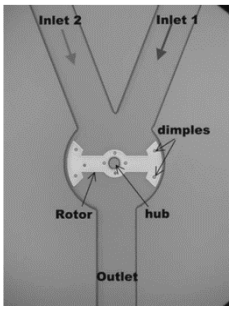


Figure 1.5 : Mélange magnétique avec un rotor en Permalloy© (longueur 400 mm) commandé par un agitateur classique(Ryu et al. 2004).

Les matériaux ferromagnétiques doux tels que le Permalloy©(Ryu et al. 2004; Choi et al. 2001; Choi et al. 2000) ou le nickel (Inglis 2004) utilisés avec les aimants permanents peuvent être utilisés comme noyaux pour les électro-aimants.

Les électro-aimants les plus simples sont planaires. Ils se composent d'un fil conducteur électrique et peuvent être fabriqués facilement en déposant un matériau tel que le cuivre (Rida et al. 2014; Massin et al. 2003), l'or (Gradients et al. 2004; Walton et al. 2003; Deng et al. 2001; Lee et al. 2004) ou l'aluminium (Ramadan et al. 2004; Wensink et al. 2005).

Lors de la conception d'un électroaimant, certains paramètres doivent être étudiés : l'échauffement par effet Joule, l'isolation des conducteurs électriques et la connexion à l'alimentation externe.

Des aimants plus complexes avec un noyau et un fil enroulé autour d'eux, nécessitent des étapes de fabrication supplémentaires, souvent avec des couches sacrificielles (Walton et al. 2003; Ahn & Allen 1996). Choi et Ahn ont été des pionniers dans ce domaine. Afin de piéger les particules magnétiques dans le flux, plusieurs structures d'électro-aimants intégrés en méandre Permalloy© doublé d'un méandre de cuivre (Choi et al. 2000)ou d'une structure de bobine de cuivre en spirale (Choi et al. 2001) avec cœur magnétique de FeNi semi-encapsulé.

Une autre approche pour obtenir un contrôle précis et de forts gradients dans un microcanal est de créer des structures de matériau magnétique doux à proximité du microcanal et de les magnétiser avec un aimant externe (Deng et al. 2001; Mirowski et al. 2005). Par exemple, Deng et al. ont réalisés des piliers en nickel fabriqués au bas d'un canal PDMS (Deng et al. 2002) et Inglis et al. ont fabriqué

des bandes de nickel étroites à motifs sur le fond d'une microchambre (Inglis 2004). Ces structures ont ensuite été magnétisées avec des aimants externes NdFeB.

L'utilisation d'aimants permet de concevoir des procédures ou des protocoles de manipulation, qui sont à la base des applications des nanoparticules magnétiques dans les laboratoires sur puce. La Figure 1.6 montre des schémas représentant des manipulations de base de nanoparticules magnétiques dans des systèmes microfluidiques :

- Lors de la séparation (Figure 1.6.a), les nanoparticules magnétiques sont retenues d'un flux en focalisant un champ magnétique sur le canal en utilisant des électro-aimants, des bobines ou des aimants permanents.
- Le transport magnétique (Figure 1.6.b) est plus difficile, car il nécessite des forces magnétiques plus importantes et à longue portée pour déplacer les nanoparticules magnétiques dans le liquide, sans avoir besoin d'un écoulement microfluidique.
- L'utilisation de nanoparticules magnétiques comme éléments pour la détection est représentée sur la Figure 1.6.c. Ici, les nanoparticules magnétiques sont liées à la surface du microcanal, et un capteur de champ magnétique surveille le champ magnétique. Lorsque la particule arrive dans la zone de détection un changement d'induction est observé.
- Une propriété particulièrement intéressante des nanoparticules magnétiques est qu'elles peuvent être suspendues magnétiquement dans un canal microfluidique en adaptant des forces magnétiques. Lorsque des champs magnétiques locaux sont appliqués alternativement, une agitation dynamique des nanoparticules magnétiques est possible. Cette agitation peut être utilisée pour mélanger les motifs d'écoulement essentiellement laminaires dans un canal microfluidique (Figure 1.6.d).

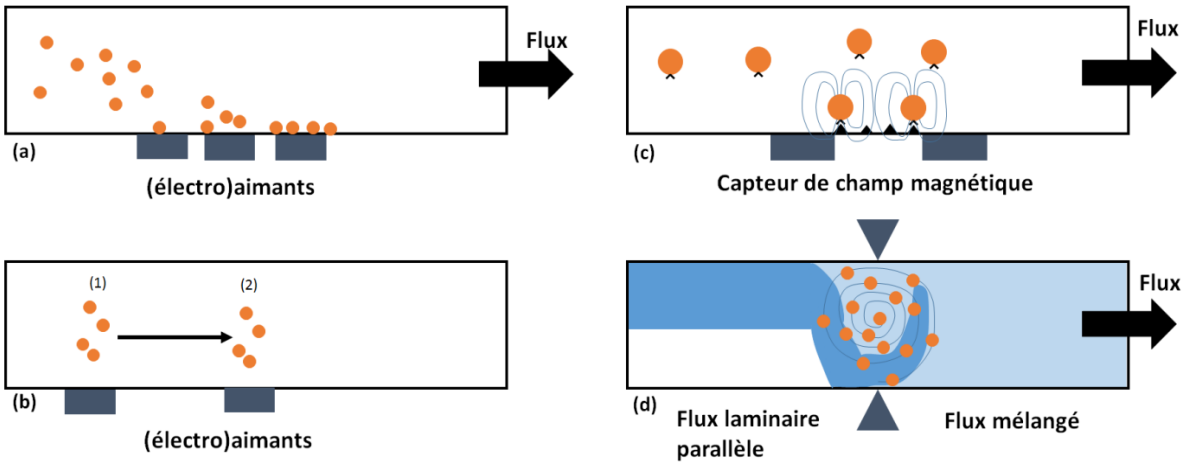


Figure 1.6 : Schémas représentant des manipulations de base de nanoparticules magnétiques dans des systèmes microfluidiques. (a) séparation ; (b) transport magnétique ; (c) détection ; (d) agitation.

III - 2 - Le blocage et le transport de nanoparticules magnétiques

Les particules magnétiques peuvent être transportées en les attirant d'un électroaimant à l'autre. Dans un premier exemple, un agglomérat de particules de 2,8 µm a été déplacé le long d'un capillaire par une commutation consécutive de plusieurs électroaimants coniques externes (Joung et al. 2012).

Le même principe a été utilisé à plus petite échelle pour transporter les particules le long des méandres d'un fil d'or (Deng et al. 2001). Ici, les maxima du champ magnétique local ont été obtenus en combinant le champ magnétique des spires avec un champ magnétique uniforme présent en arrière-plan. Un bouchon de particules de 4,5 µm a été formé en suspension dans la zone de 200 µm x 200 µm d'un méandre et a été déplacé le long par commutation entre les fils.

A plus grande échelle, le transport de billes magnétiques (1 µm) sur une distance de 40 mm a été rapporté en utilisant des électro-aimants se chevauchant, chacun de 3,5 mm de diamètre (Rida et al. 2014), Figure 1.7. Un autre exemple est fourni par (Gradients et al. 2004) : un bourrelet unique (2 mm) a été piégé à l'endroit du gradient de champ le plus élevé, c'est-à-dire au bord d'un élément à cliquet. En alternant le courant entre les fils à 0,1 Hz, le cordon a été tiré d'un élément à cliquet à l'autre à une vitesse de 20 mm.s^{-1}. Il est important de considérer lors de l'utilisation d'électro-aimant l'échauffement dû aux pertes par effet Joule. Plus le courant sera élevé, permettant une attraction pus forte, plus l'échauffement des spires sera élevé.

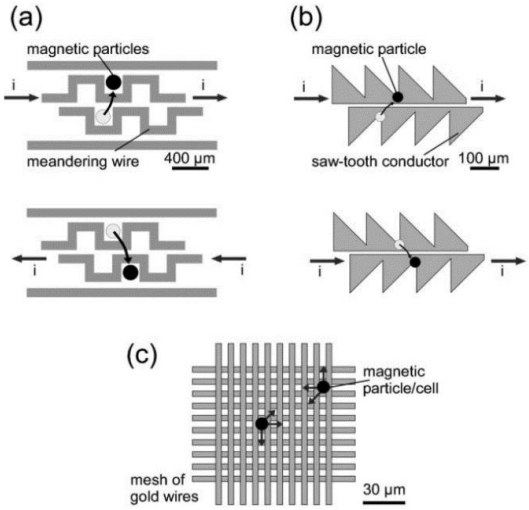


Figure 1.7 : Les particules magnétiques peuvent être transportées avec des champs électromagnétiques variant dans le temps. Ceci peut être réalisé (a) le long d'une piste de fils d'or en méandre, 28 (b) le long d'un fil d'or en dents de scie et (c) le long d'un treillis métallique en or (Rida et al. 2014).

Dans (Del Giudice et al. 2015), les auteurs réalisent un dispositif microfluidique modulable ayant pour but la déviation de billes magnétiques d'un flux présentant des impuretés ou des contaminations. Les billes magnétiques sont déviées à l'aide d'un aimant cubique, qui est positionné de façon à avoir ses lignes de champ seulement présentes dans une des branches (voir Figure 1.8). Les auteurs ont cherché à obtenir un alignement des particules, qui est un point important pour réaliser une déviation efficace. Ils ont ainsi pu tester deux milieux : un milieu newtonien et un milieu non newtonien[1]. Dans un milieu newtonien en absence d'aimant, les particules se déplacent d'une façon désordonnée en suivant le courant principal (vers le bas) avec des vitesses différentes (Figure 1.8.a). En présence de l'aimant, certaines nanoparticules suivent le champ magnétique et se déplacent vers le haut et d'autres suivent le courant et vont vers le bas (Figure 1.8.b). Dans le cas du milieu non-newtonien et

[1] Fluide non newtonien : liquide dont la viscosité ne dépend ni de sa vitesse de cisaillement, ni du temps pendant lequel le liquide est cisaillé

Fluide newtonien : fluide dont la loi contrainte – vitesse de déformation est linéaire

sans aimant, les particules suivent le courant principal d'une façon ordonnée (sur la même ligne) et à vitesse constante, Figure 1.8.c. En introduisant l'aimant, toutes les particules suivent le champ magnétique et toujours d'une façon ordonnée. Il est donc plus facile et plus avantageux d'utiliser un liquide non newtonien afin de manipuler des particules magnétiques. Notons que les laboratoires sur puce utilisant des fluides non newtoniens sont absents de la littérature.

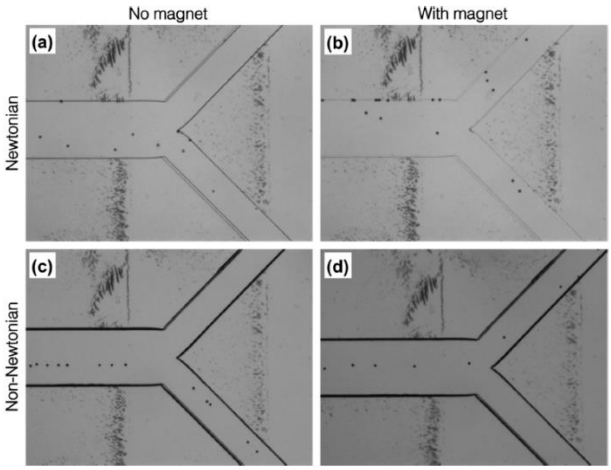


Figure 1.8 : Vue de dessus de la bifurcation avec un flux de particule en suspension. Quatre paramètres expérimentaux sont considérés : les particules sont en suspension dans (a) 60% w/w GWS sans aimant (De = Mnp = 0); (b) 60% w/w GWS avec un aimant permanent (De = 0, Mnp = 0,5); (c) 0,5% w/w PAM sans aimant (De = 0,24, Mnp = 0); (d) 0,5% w/w PAM avec un aimant permanent (De = 0,24, Mnp = 0,.21).(Del Giudice et al. 2015).

Dans (Karle et al. 2010) les auteurs démontrent la manipulation de nanoparticules magnétiques à l'aide d'un aimant rotatif permettant leur transfert entre différents fluides. L'extraction continue d'une biomolécule (ADN) à partir de la lyse d'une culture de bactérie est réalisée. Ce procédé nécessite trois étapes : le lien entre l'ADN cible et les particules superparamagnétiques, le nettoyage des impuretés et des molécules indésirables et l'élution de l'ADN des particules magnétiques. Une micro-puce présentant trois canaux avec trois solutions séparées permettant les différentes étapes (Figure 1.9) a été réalisée.

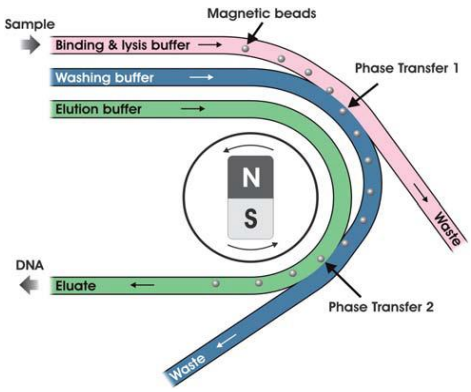


Figure 1.9 : Vue schématique de la structure microfluidique pour l'extraction continue de l'ADN. La direction de la rotation de l'aimant central permanent est opposée à la direction du flux de la solution tampon.(Karle et al. 2010).

Le mouvement des particules magnétiques est assuré par un aimant rotatif. Le champ magnétique présente ainsi deux phases, une phase forte et une phase faible. Lors de la phase forte, les particules

magnétiques sont attirées vers le « centre » du dispositif et peuvent traverser l'interface entre les fluides. Lors de la phase faible, les nanoparticules suivent le courant du fluide. L'adhérence des particules sur les parois des canaux est donc évitée.

III - 3 - Le tri et la séparation des nanoparticules magnétiques

Les séparations magnétiques à gradient élevé sont couramment effectuées dans des tubes ou des capillaires pour la séparation de particules magnétiques ou de cellules (Zborowski et al. 1992; Zborowski et al. 2002; Safarık & Safarıkova 1999).

Le fractionnement du flux de champ (FFF pour Field Flux Fraction)(Latham et al. 2005; Gascoyne et al. 2002; Fuh & Chen 1999) est une méthode dans lesquelles plusieurs forces, telles que la gravité, les gradients thermiques, les champs électriques ou magnétiques sont combinés.

A l'échelle microfluidique, les réseaux de canaux en forme de H peuvent être utilisés pour la séparation magnétique. Dans un exemple, des électro-aimants A et B (220 mT) sont positionnés à chaque extrémité du canal de connexion (Ostergaard et al. 1999). Des particules magnétiques (2,8 µm) sont maintenues dans cette branche dans l'un des canaux parallèles avec l'électro-aimant adjacent à ce canal, c'est-à-dire l'électro-aimant A, allumé.

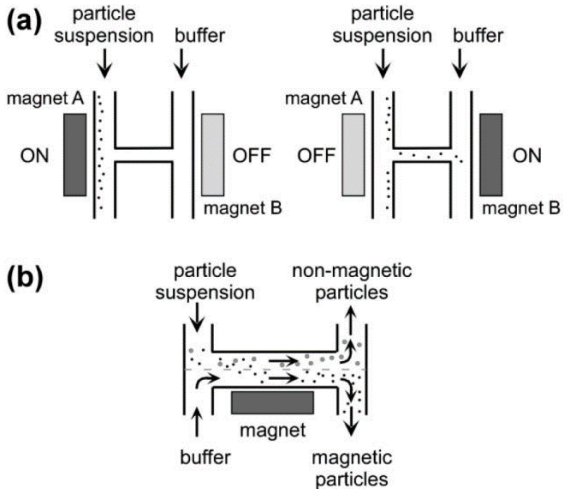


Figure 1.10 : Principe des séparateurs en forme de H : (a) pour l'isolement des particules dans des flux séparés et (b) pour une séparation continue des flux (Ostergaard et al. 1999).

Lorsque l'aimant A est coupé et que l'aimant adjacent au canal parallèle opposé (aimant B) est allumé, des particules au niveau de la jonction de canal sont entraînées dans le canal voisin. Un autre dispositif en forme de H avec deux canaux d'entrée se fondant dans un canal plus large et se divisant en deux canaux de sortie a également été suggéré pour la séparation des particules magnétiques (Ramsey 2001) (Figure 1.10.b). Un flux d'échantillon avec des particules est introduit dans l'une des entrées, la solution tampon à travers l'autre entrée. Sans force magnétique, les deux flux ne se mélangent pas à travers les canaux de sortie correspondants. L'application d'un gradient de champ magnétique sur le canal central entraîne des particules magnétiques hors de leur flux d'origine dans la solution tampon.

Une méthode de flux continu capable de séparer les particules magnétiques et non magnétiques ainsi que de trier par tailles les particules magnétiques a été appelée magnétophorèse à écoulement libre sur puce (Pamme & Manz 2004). Un écoulement laminaire est généré sur une chambre de

séparation plane par un certain nombre de canaux d'entrée et de sortie (Figure 1.11.a). Un champ magnétique perpendiculaire à la direction de l'écoulement est appliqué par un ensemble d'aimants NdFeB, résultant en un gradient de champ sur la chambre de séparation. Les particules non magnétiques quittent la chambre en face de l'entrée de l'échantillon. Les particules magnétiques sont entraînées dans le champ magnétique et quittent la chambre par l'un des autres canaux de sortie (Figure 1.11.b). Cette déviation dépend de la susceptibilité magnétique et de la taille des particules.

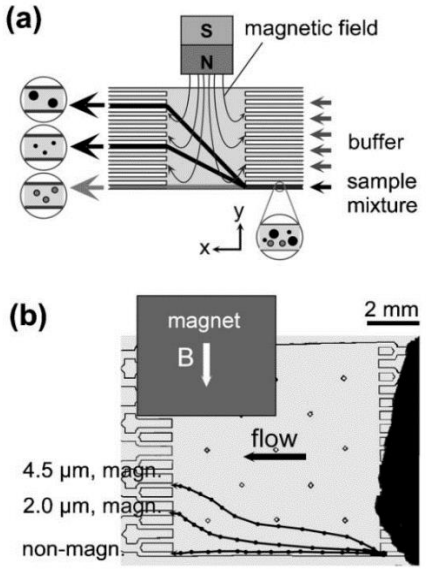


Figure 1.11 : Principe des séparateurs en forme de H : (a) pour l'isolation des particules en flux séparés et (b) pour la séparation continue des flux (Ramsey 2001).

III - 4 - L'auto-assemblage et la structuration de nanoparticules magnétiques

Le terme d'auto-assemblage a souvent été utilisé pour décrire la formation de bouchons ou de chaînes de particules magnétiques dans des microcanaux. L'auto-assemblage dynamique a été utilisé pour décrire le comportement des particules magnétiques dans des champs magnétiques variables dans le temps ou en rotation. Ici, l'accent est mis sur l'étude des phénomènes de base de l'assemblage de particules magnétiques et sur le contrôle de l'assemblage dans des caractéristiques et des motifs spécifiques.

Un champ magnétique modulé a été utilisé pour former des particules et des cellules diamagnétiques sur une surface (Kimura et al. 2005; Kimura et al. 2004). Le champ modulé a été obtenu par un empilement alternant des feuilles de fer et d'aluminium, chaque couche est de 300 µm d'épaisseur et est placée dans un champ magnétique homogène de 1 T. En raison des différentes susceptibilités magnétiques, les lignes de champ sont plus denses dans les couches de fer. Par conséquent, la densité de flux est plus forte au-dessus du fer et plus faible au-dessus des couches d'aluminium. Lorsqu'une suspension contenant des particules de polymère magnétique (des matériaux diamagnétiques ont été utilisés pour cette expérience) est placée au-dessus de ce modulateur, les particules s'accumulent au-dessus des couches de fer, sous la forme de lignes de 300 µm de large. Lorsque du chlorure de manganèse est ajouté au tampon, la susceptibilité magnétique du tampon a été augmentée et, par conséquent, la force présente sur les particules de polystyrène

augmente. Les particules se déplacent dans la zone au-dessus des couches de fer et d'aluminium. Le même principe a également été appliqué à des cellules biologiques (Kimura et al. 2005).

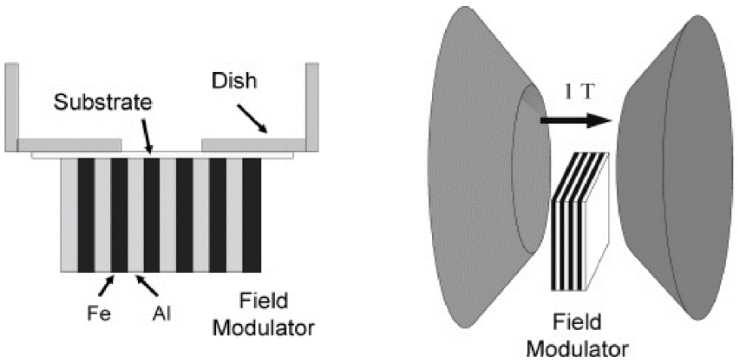


Figure 1.12 : Diagramme schématique montrant la configuration d'une capsule en plastique spécialement préparée avec un film mince de substrat dans le fond, placé en contact étroit avec le modulateur de champ (à gauche). La position du modulateur par rapport à la direction du champ est montrée (à droite).

IV -Présentation de la détection en immunodosage par fluorescence et par des capteurs magnétiques

La détection d'un événement biologique dans un laboratoire sur puce est une partie importante et inséparable de toute analyse biochimique. De nombreuses investigations sont dédiées au développement de systèmes de détection utilisés avec les laboratoires sur puce. Bien que la majorité des approches soient basées sur la microscopie fluorescente (Kuswandi et al. 2018), d'autres techniques telles que la spectrométrie de masse, la chimiluminescence, les systèmes électrochimiques et la détection magnétique ont également été utilisées. Une autre façon de classer les laboratoires sur puce est selon leur mode de détection. On en distingue deux :

1. La détection hors ligne, c'est-à-dire en dehors du laboratoire sur puce,
2. La détection en ligne, c'est-à-dire intégré dans le laboratoire sur puce (Malic et al. 2010). Alors que le mode hors ligne convient aux utilisations en laboratoire, les systèmes en ligne sont indispensables pour les appareils embarqués et portables pour les applications de suivi médical.

Dans cette thèse nous nous focaliserons sur les deux types de détection que nous avons utilisées pour les présents travaux : la détection en fluorescence des immunodosages et la détection magnétique.

IV - 1 - La détection en immunodosage par fluorescence

IV- 1 - a - Principe de la détection par fluorescence

La détection de nanoparticules magnétiques par fluorescence est très utilisée car c'est l'une des techniques les plus faciles à mettre en place (Yang et al. 2009; Liu et al. 2008; Huang & Lin 2006; Sista et al. 2008; Norian et al. 2014). De plus, les résultats sont facilement observables et il existe de nombreux logiciels de traitement de données.

Le principe de la microscopie à fluorescence repose sur l'utilisation de substances fluorescentes pour observer et étudier des matériaux et des solutions (environ 15% des composés naturels ont une fluorescence naturelle). La fluorescence est un phénomène d'émission de lumière isotrope que certains composés acquièrent lorsqu'ils sont soumis à l'énergie d'un rayonnement. La longueur d'onde d'émission du composé est caractéristique et elle est différente de celle d'excitation.

Les molécules qui ont la capacité d'émettre de la lumière, suite à une excitation, sont appelées des fluorochromes. Les propriétés d'absorption et d'émission d'un fluorochrome sont dictées par ses électrons π. Une description des niveaux énergétiques d'une molécule fluorescente est donnée par le diagramme de Jablonski (Figure 1.13.a). Ce modèle simplifié se compose de trois niveaux d'énergie : l'état fondamental S_0 et les états excités S_1 et T_1. S_0 et S_1 sont appelés des états "singulets" et T_1 un état "triplet". Ces appellations sont issues de la physique quantique et représentent la multiplicité de spins.

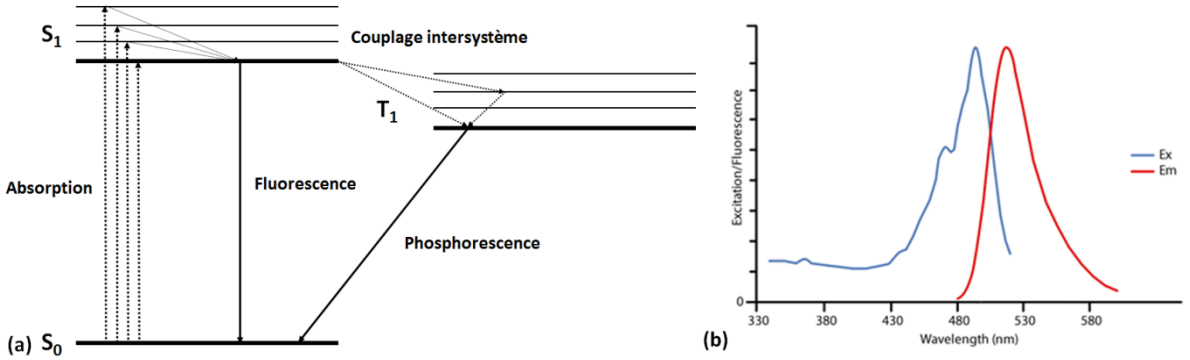


Figure 1.13 : (a) Diagramme de Jablonski simplifié avec S_0 et S_1 états "singulets" et T_1 état "triplet", (b) Spectre d'absorption (Ex) et d'émission (Em) de l'isothiocyanate de fluorescéine (https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/conjugate-selection/fitc).

Le cycle d'absorption-émission peut alors être décrit sur ce diagramme (Figure 1.13.a) par l'absorption de photons suivant la transition S_0 vers S_1. Ce phénomène est suivi de l'émission spontanée de photons par désexcitation vers l'état fondamental S_1. Au cours de ce cycle, une petite partie de l'énergie est inévitablement perdue via des relaxations vibrationnelles. Ainsi, l'énergie du photon émis est toujours plus faible que l'énergie du photon absorbé. Ceci engendre un déplacement vers le rouge du spectre d'émission, c'est-à-dire vers des longueurs d'ondes supérieures à celles du spectre d'absorption (Figure 1.13.b).

IV- 1 - b - L'utilisation de boîtes quantiques en fluorescence

Les luminophores inorganiques, comme les nanocristaux semi-conducteurs, présentent des propriétés intéressantes pour les expériences qui nécessitent de long temps d'exposition. Les boîtes quantiques, appelées également Quantum Dots (QD), sont des cristaux de forme sphérique et de dimensions nanométriques (5-10 nm). Ils sont très souvent composés de deux parties : un cœur constitué d'un premier matériau semi-conducteur, protégé par une fine coquille d'un second matériau semi-conducteur. En plus de leur grande résistance au photoblanchiment[2], ils possèdent un très large spectre d'absorption, permettant l'excitation à différentes longueurs d'ondes. Le spectre d'émission est quant à lui très étroit Figure 1.14. Les QD posent cependant certains problèmes pour les applications dans les systèmes vivants, du fait des matériaux les constituant : leur toxicité limite leur utilisation dans les cellules vivantes. Ce problème peut être contourné en fonctionnalisant la surface des Quantum Dots avec des ligands. Cependant, cette opération augmente considérablement leur taille jusqu'à environ20 nm, compromettant ainsi certaines applications.

[2] Le photoblanchiment est la perte de fluorescence d'une molécule.

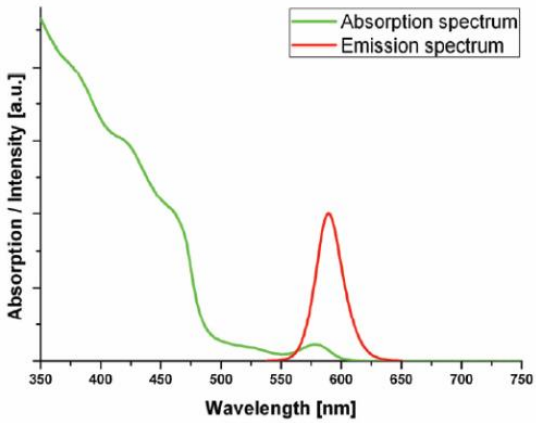


Figure 1.14 : Exemple d'un spectre d'absorption et d'émission d'une boîte quantique (CANdots® Series A Plus (590nm emission) https://www.azoquantum.com/Article.aspx?ArticleID=25).

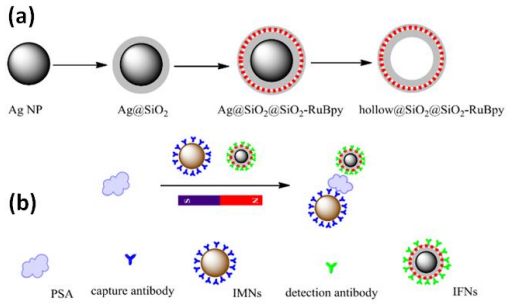


Figure 1.15 : (a) Schéma de synthèse de Ag @ SiO2 @ SiO2-RuBpy et de @ SiO2 @ SiO2-RuBpy creux. (b) Illustration schématique de la construction de la détection de PSA avec les nanosphères immunomagnétiques et les nanoparticules immunofluorescentes(Xu et al. 2017).

L'utilisation des boîtes quantiques dans le cadre des immunodosages avec contrôle magnétique implique d'utiliser des boîtes quantiques avec des NPM. Une autre façon plus intéressante est d'utiliser des boîtes quantiques ayant un cœur magnétique.

Dans la littérature, Xu et al. ont développé une méthode cherchant à dépister des concentration faibles de la PSA (l'antigène prostatique spécifique) qui est un marqueur spécifique du cancer de la prostate (Xu et al. 2017). Les auteurs ont fabriqué avec succès des nanoparticules fluorescentes composées d'un cœur-enveloppe Ag@SiO2@SiO2-RuBpy (Figure 1.15). Elles fournissent une amélioration de photoluminescence (jusqu'à 3 fois) lorsque la distance de séparation entre la surface du noyau d'argent et le centre de la troisième couche de silice est d'environ 10 nm. Une stratégie hautement sensible, spécifique et fiable pour la détection de la PSA basée sur la séparation de fluorescence et la séparation magnétique à métal amélioré a été réalisée. Les résultats montrent qu'il existe une bonne relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la concentration de PSA (0,1-100 ng / mL), que cette méthode est facile à utiliser et permet de gagner du temps. Son application réussie au sérum humain a validé son potentiel dans le test pour des échantillons complexes réels, ce qui pourrait être important pour le diagnostic de la tumeur basée sur la détection des marqueurs tumoraux.

Certaines contraintes, notamment la toxicité des matériaux utilisés pour les boîtes quantiques sont favorables aux solutions traditionnelles comme les fluorochromes.

IV- 1 - c - L'utilisation de fluorochromes dans les immunodosages

Les fluorochromes sont très largement utilisés dans les études d'immunodosage car ils peuvent être facilement couplés à un anticorps. Chaque fluorochrome peut être caractérisé par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres. L'un de leurs avantages est la très grande variété des fluorochrome disponibles. Parmi les fluorochromes les plus connus on peut citer la fluorescéine et la rhodamine qui sont des molécules de synthèse. Les fluorochromes peuvent être aussi des molécules naturelles. Les plus connues sont la protéine GFP (*green fluorescent protein*) extraite de la méduse *Aequora victoria* et la protéine DsRed extraite du corail *Discosoma*.

Yu et al. ont réalisé une détection par fluorescence d'immunoessais de biomarqueurs pour le cancer (CEA, Carcino-Embryonic Antigen et AFP, Alpha-FoetoProtein) (Yu et al. 2013). Les auteurs ont utilisé un dispositif microfluidique avec un champ magnétique contrôlable et des particules superparamagnétiques. Un motif de nickel a été réalisé afin de générer un fort gradient de champ magnétique et d'accroitre la force magnétique présente sur les particules superparamagnétiques. Ceci permet un meilleur contrôle des particules dans les canaux, Figure 1.16 haut. La détection des complexes réalisés est effectuée à l'aide de boîtes quantiques et de FITC (Fluorescein isothiocyanate). La détection par fluorescence est réalisée en excitant les boîtes quantiques et les FITC à l'aide d'une lumière bleue, l'émission des boîtes quantiques se fait dans le rouge et celle des FITC se fait dans le vert. Les auteurs ont pu réaliser une double détection des biomarqueurs CEA et AFP et ont atteint une limite de détection très basse (3,5 ng/mL et 3,9 ng/mL respectivement).

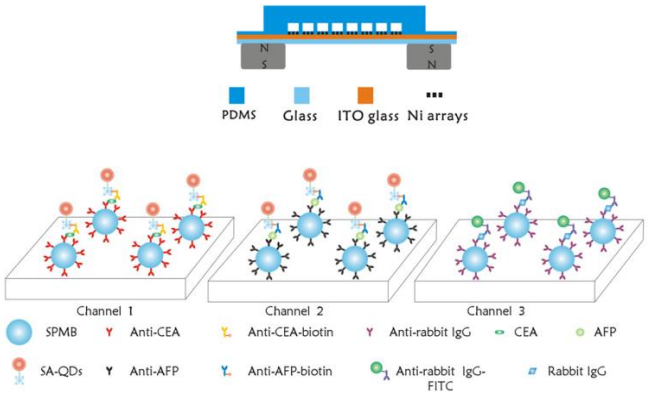


Figure 1.16 : Schéma de la puce intégrée MFCM (haut). Schéma de principe de la détection multiplexée simultanée dans la puce MFCM (bas).(Yu et al. 2013).

Le choix des fluorochromes utilisés dépend des applications voulues et des filtres disponibles sur les microscopes à fluorescence. De nombreux sites recensent les fluorochromes (par exemple, le site http://www.bdbiosciences.com/eu/s/spectrumviewer en recense plus de 150) ce qui permet de comparer les fluorochromes en présentant leurs spectres d'absorption et d'émission en fonction des filtres choisis (Figure 1.17). Ces choix peuvent devenir très importants si l'un des buts est de réaliser des détections de plusieurs marqueurs en même temps.

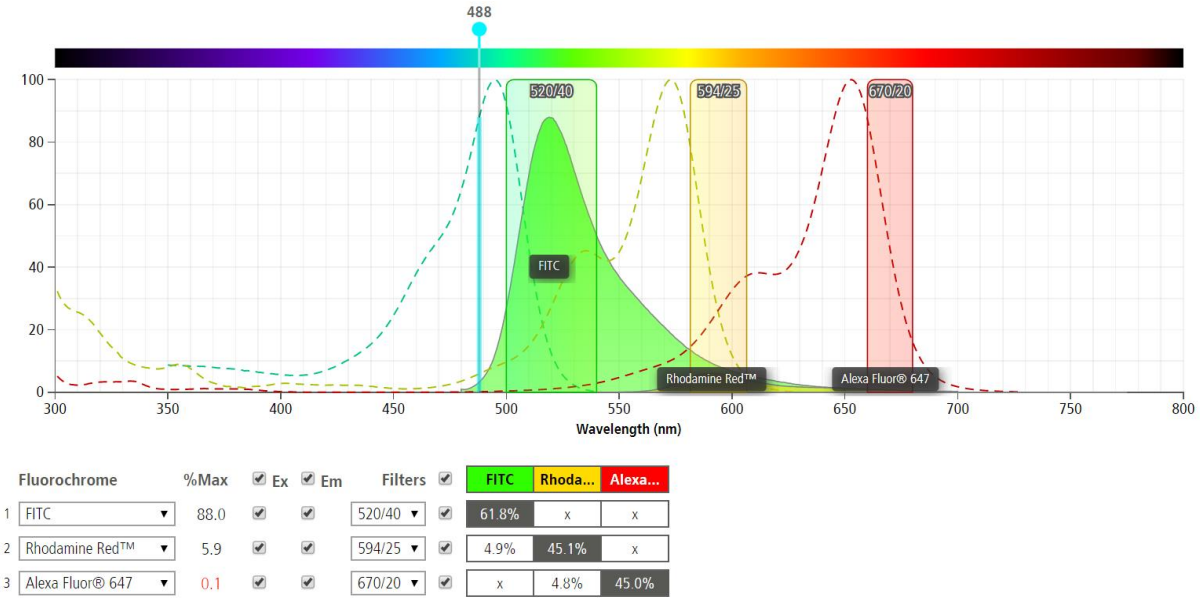


Figure 1.17 : Spectre d'absorption et d'émission des Fluorochromes FITC, Rhodamine Red™ et Alexa Fluor®647 (http://www.bdbiosciences.com/eu/s/spectrumviewer).

IV - 2 - Les techniques de détection magnétique pour des applications médicales

Dans les exemples de la partie précédente, les particules magnétiques ont été observées en utilisant la microscopie à fluorescence. Cependant, les propriétés magnétiques des NPM utilisées dans les immunodosages pourraient également être utilisées pour réaliser des capteurs magnétiques.

Les capteurs magnétiques sont des dispositifs qui permettent de mesurer le champ magnétique. L'élément sensible, appelé parfois selon le contexte, « transducteur », permet de convertir le champ magnétique en grandeur électrique (tension ou courant généralement).

IV- 2 - a - La miniaturisation de la résonance magnétique nucléaire (µRMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un puissant phénomène magnétique qui peut être utilisé pour identifier, visualiser et détecter des molécules. Contrairement à un capteur de surface tel que GMR, la RMN et le SQUID sont capables de mesurer un volume entier de l'échantillon (Lee et al. 2015; Issadore et al. 2014; Koh & Josephson 2009). La RMN dans le cadre de la détection des NPM est basée sur la variation de la relaxation du spin nucléaire induite par le champ magnétique des NPM : plus le taux de relaxation transverse est élevé, plus la concentration de NPM est élevée.

Avec l'amélioration de l'électronique obtenue grâce à l'utilisation de puces de circuit intégré (IC) et de bobines de détection de taille micrométrique, il est maintenant possible d'avoir des dispositifs de RMN portables et miniaturisés. La RMN miniaturisée (µRMN) fournit des diagnostics très sensibles et peut être intégrée à des systèmes microfluidiques (Danieli et al. 2010; Zalesskiy et al. 2013).. L'application de µRMN dans les interrupteurs de relaxation magnétique est passée de la détection moléculaire au diagnostic clinique. La détection moléculaire inclut les cellules entières, les protéines,

l'ADN / ARNm, les métabolites, les médicaments, les virus et les bactéries (Xie & Jon 2012; Ghazani et al. 2014; Chung et al. 2011).

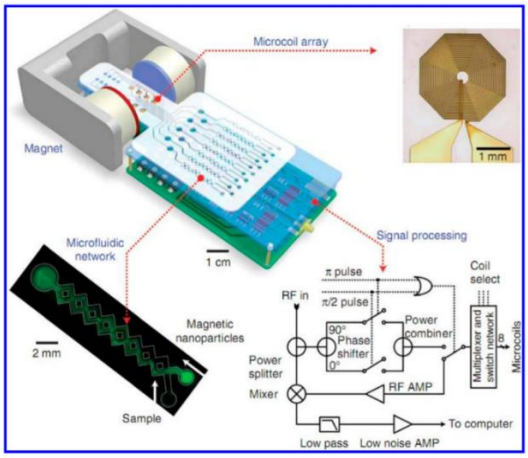


Figure 1.18 : Exemple d'un système de diagnostic par résonance magnétique pour les applications médicales (Zalesskiy et al. 2013).

Par exemple, la Figure 1.18 illustre un test de magnéto-ADN basé sur µRMN qui a été utilisé pour la détection et le phénotypage de bactéries (Chung et al. 2013). Dans des études cliniques, µRMN a été utilisé avec succès pour quantifier et caractériser des cellules tumorales pulmonaires dans des échantillons de sang primaire et pour surveiller le traitement du glioblastome à partir d'échantillons de sang de patients (Zalesskiy et al. 2013; Ghazani et al. 2014).

La miniaturisation de la RMN apporte des possibilités très intéressantes pour l'intégration de cette technique dans des dispositifs fluidiques. Il est toutefois nécessaire pour ces µRMN d'utiliser des aimants externes en supplément des microbobines intégrés. Il reste donc certaines étapes à franchir avant d'obtenir un système µRMN complétement intégré au dispositif.

IV- 2 - b - Dispositif d'interférence quantique supraconducteur (SQUID)

Le SQUID (Supraconducting QUantum Interference Device) a longtemps été reconnu comme le magnétomètre le plus sensible, en particulier pour les applications à basse fréquence (Drung et al. 2007; Oy & Ilmoniemi 1989). Le dispositif est basé sur des boucles supraconductrices contenant des jonctions Josephson. Le courant induit dans l'anneau SQUID par un flux magnétique externe entraîne une variation de tension à travers la jonction, ce qui génère un signal de sortie de la tension amplifiée. Les biocapteurs à base de SQUID sont classés en capteurs de type relaxation, de type à rémanence et de susceptibilité (Ge et al. 2009).

Dans les premières études, le SQUID a été utilisé pour détecter la contamination ferromagnétique dans les poumons et d'autres organes du corps humain (Cohen 2016). La plupart des méthodes de détection à base de particules magnétiques sont basées sur la mesure de la variation du champ magnétique produit ou dévié par les particules magnétiques. Dans le cas du capteur de relaxation, les particules magnétiques liées se relâchent (temps de relaxation de Néel ~ 1 s pour les particules γ-Fe_2O_3 de 10 nm de diamètre) à un rythme plus lent que les particules magnétiques non liées (relaxation brownienne de ~ 50 µs pour les particules de diamètre hydrodynamique 50 nm) (Chemla et al. 2000).

Les immunoessais basés sur la relaxation de Néel utilisent le courant continu (DC) du SQUID. Par exemple, le groupe de Clarke (Chemla et al. 2000; Berkeley 2002)a utilisé un capteur SQUID amélioré par un gradiomètre magnétique pour détecter les liposomes marqués FLAG par immunodosage.

Figure 1.19 : Présentation d'un magnétomètre à SQUID (https://iscr.univ-rennes1.fr/prts/magnetometre-a-squid-mpms).

Les immunodosages utilisant SQUID peuvent être étudiés en enregistrant la réponse magnétique après la coupure du champ magnétique (Titz et al. 1999). Ce type de plate-forme magnétorelaxométrique permet également des études cinétiques de réactions anticorps-antigène dans des échantillons de sang total Anderson et al. 2009). Les immunodosages en phase liquide pertinents utilisent la relaxation brownienne des NPM marquées pour détecter la biotine et distinguer les NPM liées et non liées sans nécessiter d'étape de lavage (Bhuiya et al. 2012).

Malgré le potentiel très intéressant en termes de détection magnétique, le refroidissement à azote ou hélium liquide limite fortement son intégration et rend très hypothétique son utilisation dans un capteur miniaturisé.

IV- 2 - c - Magnétomètre atomique (AM)

Les magnétomètres atomiques ont été récemment développés comme une technique très sensible pour mesurer les champs magnétiques. Ils présentent un grand avantage par rapport aux SQUID : la cryogénie n'est pas nécessaire.

Le principe du magnétomètre atomique est de mesurer les effets magnéto-optiques d'atomes polarisés en spin interagissant avec un faisceau laser sondant dans un champ magnétique (Budker & Romalis 2008). Dans les mesures des magnétomètres atomiques, un laser à pompe est généralement utilisé pour polariser un métal alcalin (K, Rb ou Cs) dans la phase vapeur. La précession ultérieure des atomes polarisés dans le champ magnétique est détectée par la rotation optique d'un laser à sonde, qui peut être le même laser que le laser à pompe. Plusieurs configurations différentes de magnétomètres atomiques ont été développées (Yao & Xu 2014; Kominis et al. 2003; Maser et al. 2011).

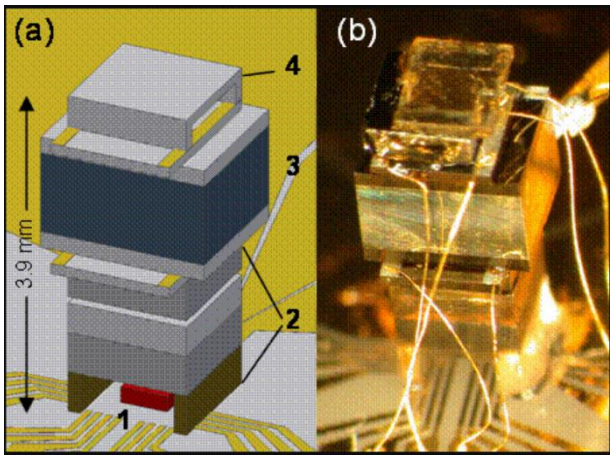


Figure 1.20 : (a) Schéma d'un magnétomètre atomique et (b) sa réalisation (John Kitching, NIST).

Les magnétomètres atomiques ont été utilisés pour détecter les particules magnétiques. Par exemple, un magnétomètre atomique a été conçu pour détecter une seule particule de cobalt de 2 µm dans un écoulement continu (Maser et al. 2011).

Les magnétomètres atomiques peuvent réaliser des mesures à la température physiologique; cette mesure est appropriée pour étudier des échantillons biologiques en utilisant un immunodosage (Garcia et al. 2010). De plus, les magnétomètres atomiques peuvent être développés comme un relaxomètre magnétique pour détecter des échantillons médicaux tels que des NPM ciblées et des cellules cancéreuses ciblées (Johnson et al. 2012).

Bien que les magnétomètres atomiques apportent des solutions par rapport aux SQUID, il est toutefois difficile de réaliser leur intégration complète dans des dispositifs car l'environnement nécessaire (notamment le laser) reste de grandes dimensions.

IV- 2 - d - Les capteurs à Magnétorésistance à effet Tunnel (TMR)

Le développement des couches minces s'accompagne de nouvelles manières d'exploiter les magnétorésistances, comme la découverte de l'effet TMR (Tunnel MagnetoResistance qui dérive directement de la mécanique quantique. L'effet TMR se produit dans un empilement de couches minces : deux couches ferromagnétiques sont disposées de part et d'autre d'une couche isolante, alimentées en courant par des contacts électriques.

En fonction de l'orientation des spins des électrons dans les couches ferromagnétiques de part et d'autre de la couche isolante, la probabilité qu'un électron traverse cette couche est différente (forte quand les spins sont alignés, faibles quand ils sont de sens opposé). Cette orientation des spins dépend de l'aimantation dans les couches ferromagnétiques. L'aimantation d'une des deux couches est généralement « fixée », tandis que l'autre peut varier en fonction du champ magnétique. La résistance est plus faible quand l'aimantation dans les deux couches est parallèle. L'ordre de grandeur de la sensibilité des capteurs TMR les rend très prometteurs (Shen et al. 2008).

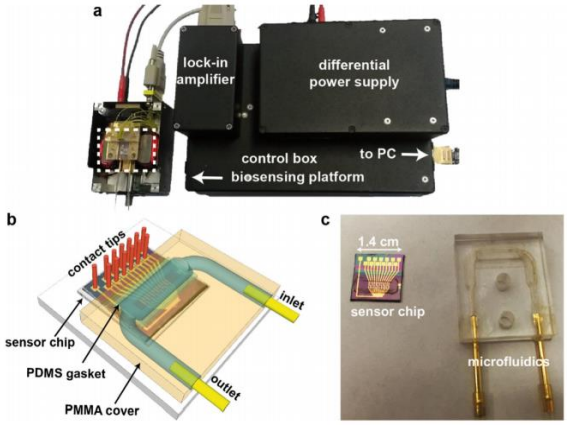


Figure 1.21 : (a) Photographie du capteur TMR (b) Schéma du réseau de capteurs intégré dans l'appareil microfluidique (c) Photographie de la puce du capteur et de la cellule microfluidique(Sharma et al. 2017).

Des capteurs TMR ont été utilisés pour détecter de petites quantités de particules magnétiques d'oxyde de fer dans l'environnement lymphatique complexe avec une bonne résolution spatiale (nm) (Cousins et al. 2015). De plus, un système portable a été intégré à un appareil microfluidique en tant que plate-forme de laboratoire sur puce pour détecter l'ADN pathogène en dessous de la sensibilité de la gamme nM (Sharma et al. 2017).

Les capteurs TMR commencent à être intégrés à la microfluidique afin de former des biopuces performantes.

IV- 2 - e - Les capteurs à Magnétorésistance Géante (GMR)

L'effet GMR (Giant MagnetoResistance) apparaît dans les empilements de couches minces : par exemple, une couche de matériau conducteur (non magnétique) entre deux couches de matériau ferromagnétique.

En l'absence de champ magnétique appliqué (dans le plan de l'empilement), le couplage entre les deux couches résulte en une orientation antiparallèle de l'aimantation. L'application d'un champ permet l'alignement de l'aimantation , dans le même sens dans les deux couches (suivant la direction du champ), ce qui favorise la mobilité des électrons à l'intérieur de la structure. Les phénomènes d'orientation antiparallèle encouragent la diffusion des électrons dont le spin n'est pas parallèle à l'aimantation dans la couche, ce qui augmente la résistivité. La variation de la résistance est donc contrôlée par la variation du champ, ce qui en fait un capteur de champ magnétique. L'allure de la réponse est similaire à ce qu'on obtient avec un AMR (Anisotropic MagnetoResistance), à la différence près que les variations sont beaucoup plus grandes (entre 10 % et 50 % pour un GMR, contre quelques % pour un AMR). De la même manière, la parité de la réponse nécessite la mise en œuvre de techniques de linéarisation et de suppression d'offset.

Depuis sa découverte dans les années 1980, l'effet GMR a été largement utilisé dans les têtes de lecture des disques durs (Weissleder et al. 2005). Plus récemment, la GMR a trouvé une utilisation en tant que capteur magnétique à base de magnétorésistance. Parmi les différents types de méthodes de détection, la valve de spin offre une sensibilité plus élevée avec un design de l'ordre du micron (Graham et al. 2005; Liang et al. 2017; Qiu et al. 2017). Un capteur GMR à valve de spin est constitué d'une structure magnétique avec des couches ferromagnétiques et non magnétiques alternées. L'effet de magnétorésistance est provoqué par le couplage spin-orbite entre les électrons de conduction

traversant les différentes couches (Lee et al. 2015; Issadore et al. 2014; Freitas et al. 2012; Hall et al. 2013).

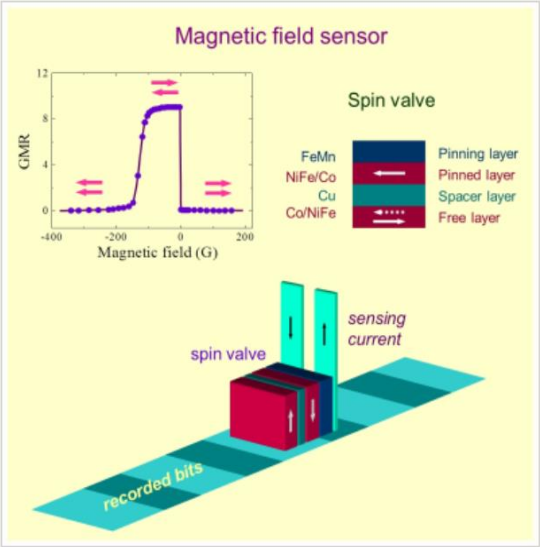


Figure 1.22 : Schéma de principe d'un GMR à valve de spin (https://unlcms.unl.edu/cas/physics/tsymbal/reference/giant_magnetoresistance/application_%20of_gmr.shtml).

Les capteurs GMR peuvent être utilisés pour des immunodosages d'une manière liée aux dosages immuno-enzymatiques (ELISA). Dans l'approche d'immunodosage de type ELISA, la préparation des échantillons comprend l'immobilisation d'une cible biologique sur la surface du capteur et l'ajout de particules magnétiques pour la détection (Koh & Josephson 2009; Yao & Xu 2014). Lorsque les NPM marquées par un ligand interagissent avec les récepteurs liés au capteur, le champ dipolaire magnétique externe provenant de l'étiquette magnétique provoque la modification de la magnétorésistance. Le capteur GMR détecte alors ce petit signal magnétique (Li et al. 2003).

Les capteurs GMR de type à valve à spin sont devenus populaires en tant que biopuces en raison de leur meilleure linéarité pour la quantification (Qiu et al. 2017). Le réglage fin des architectures des réseaux de capteurs a été signalé comme améliorant la limite de détection; une approche consiste à ajuster les dimensions de la matrice de capteurs pour la détection de particules magnétiques individuelles (Liang et al. 2017). Une autre approche consiste à utiliser des particules antiferromagnétiques synthétiques, qui sont typiquement fabriquées sous la forme de doubles couches de $Co_{90}Fe_{10}$ séparées par une couche d'espacement non magnétique de Ruthenium (Ru) avec une rémanence magnétique presque nulle et un moment magnétique élevé.

Le capteur GMR à valve de spin hybride a fourni une détection parallèle massive avec un réseau de puce à 256 capteurs CMOS de technologie 0,18 µm. Ce modèle de biocapteur permet de surveiller la cinétique en temps réel dans un réseau de protéines et de détecter des biomarqueurs du cancer de l'ovaire avec une sensibilité de 10 fM (Hall et al. 2013). En faisant varier l'architecture, un réseau de 64 capteurs en tant qu'architecture de circuit a permis des temps de lecture plus courts avec une limite de détection atteignant 5 fM de protéines (Hall et al. 2010).

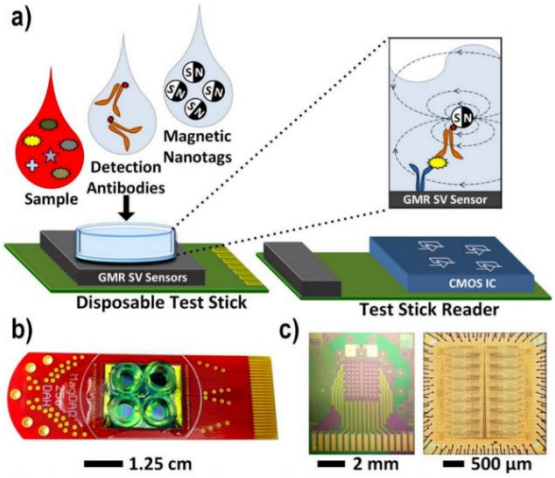


Figure 1.23 : (a) Illustration du système complet à l'aide d'un bâtonnet de test jetable et d'un lecteur contenant la puce CMOS personnalisée. Photographie(b) du bâtonnet de test jetable, (c) de la matrice de capteur GMR SV et circuit intégré CMOS(Hall et al. 2013).

IV- 2 - f - Les capteurs utilisant l'effet Hall

L'effet Hall est présent dans les conducteurs mais il est plus prononcé dans les semi-conducteurs, du fait qu'il est inversement proportionnel à la densité de porteurs de charges. Les capteurs de Hall sont donc réalisés en semi -conducteurs, dans des échantillons longs dans lesquels on injecte un courant. En présence d'un champ magnétique, les porteurs de charges subissent la force de Lorentz et sont déviés au cours d'un régime transitoire, mais l'apparition de charges surfaciques au sommet et à la base de l'échantillon vient créer un champ électrique et engendrer une force s'opposant exactement à celle de Lorentz. La différence de potentiel, appelée tension de Hall, qui apparait ainsi entre les faces de l'échantillon se trouve être proportionnelle au courant injecté et au champ magnétique, qu'elle permet donc de mesurer. De nombreux capteurs de courant continu utilisent des éléments de Hall montés dans l'entrefer d'un noyau magnétique, lequel a pour principaux mérites d'accroitre la sensibilité de la mesure, de le protéger de l'influence des champs extérieurs et de diminuer celle de la position du conducteur parcouru par le courant à mesurer. Cependant, en raison de l'entrefer du noyau, les capteurs ne sont pas totalement affranchis de ces influences indésirables. En outre, les capteurs de Hall pâtissent de forts offsets qui peuvent être causés par la rémanence du noyau magnétique, et seuls quelques composants disposent d'un circuit de démagnétisation leur permettant de se réinitialiser lorsqu'ils ont été exposés à un fort champ magnétique.

Afin d'obtenir de bonnes caractéristiques de linéarité, mais aussi de les affranchir des dérives en température inhérentes aux matériaux semi-conducteurs, les capteurs de Hall sont souvent associés à une boucle de rétroaction. Cette dernière annule le champ magnétique présent dans le noyau grâce à un bobinage de compensation. Ces capteurs peuvent ainsi offrir des erreurs de l'ordre de 0,02 % et des coefficients de sensibilité à la température de l'ordre de 50 ppm K^{-1}. Cependant leur principal point faible reste la stabilité limitée au point zéro, ce qui est liée à l'offset. La dérive ainsi engendrée pour un capteur 50 A atteint typiquement 600 mA dans l'intervalle 0-70°C, ce qui est 20 fois supérieur aux performances des capteurs fluxgates (voir plus bas).

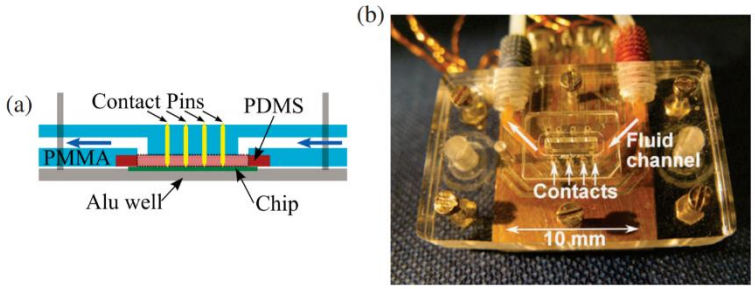


Figure 1.24 : (a) Schéma de la coupe transversale du système fluidique utilisant l'effet Hall. (b) Système fluidique assemblé avec indications des broches de contact électriques à ressort et du circuit de fluide.(Hall et al. 2014).

Des capteurs à effet Hall planaire (PHE) ont été utilisés pour détecter des particules magnétiques de taille micro et nanométrique dans la biodétection (Ejsing et al. 2005). L'effet Hall planaire est un capteur planaire à Permalloy© à polarisation basé sur l'effet de magnétorésistance anisotrope des matériaux ferromagnétiques. Les capteurs PHE sont capables de détecter des NPM fonctionnalisés par la streptavidine (Ejsing et al. 2005).

Des capteurs PHE miniaturisés ont été intégrés à des systèmes microfluidiques et développés sous forme de magnétorelaxomètres à température ambiante pour détecter la relaxation dynamique brownienne (Hall et al. 2014; Dalslet et al. 2011).

Les qualités des capteurs à effet Hall font qu'ils peuvent être facilement retrouvés dans le commerce (Directindustry, Farnell…).

IV- 2 - g - Les capteurs Fluxgates

Les capteurs Fluxgates (portes de flux) mesurent à la fois des signaux DC et des signaux AC basse fréquence. Utilisés en tant que capteurs de champ magnétique, ils permettent de mesurer des champs d'amplitude allant jusqu'à 1 mT environ, avec une excellente précision (de l'ordre de 100 pT) et une erreur de linéarité de 10 ppm.

Leur principe repose sur l'utilisation d'un noyau ferromagnétique doux dont on vient moduler la perméabilité au moyen d'un flux magnétique périodique créé par un bobinage d'excitation. L'intensité du courant induisant le flux d'excitation est choisie suffisamment grande pour amener (périodiquement) l'aimantation du noyau magnétique à saturation. A ce flux se superpose celui du champ que l'on souhaite mesurer (supposé continu ou lentement variable par rapport au premier) et dont l'effet est de dissymétriser la saturation. Le flux total est capté par un second bobinage à la sortie duquel apparait une tension égale à la dérivée du flux magnétique (loi de Lenz) qui se présente, compte tenu de l'excitation appliquée, sous forme d'impulsions dont le rapport cyclique dépend du champ à mesurer. En pratique c'est via le second harmonique du signal de sortie que se fait la mesure. Afin d'en maximiser la sensibilité, le matériau magnétique doit présenter un cycle d'hystérésis carré. Les fluxgates ont aussi l'avantage de permettre des mesures DC et AC jusqu'à environ 1 kHz. Mais, grâce à un fonctionnement à flux nul (boucle fermée) on peut également en faire des capteurs de courant ayant une large dynamique des mesures (jusqu'à 1000 A).

Le magnétomètre fluxgate a été couramment utilisé pour détecter les changements dans les champs magnétiques pour diverses disciplines telles que l'archéologie et les études pétrolières (Cullity & Graham n.d.). Pour détecter les particules magnétiques, le capteur de fluxgate a été développé comme une technique de magnétorelaxométrie (Ludwig et al. 2005). Comparé à un relaxomètre de

type SQUID, un capteur de fluxgate offre une détection de la température ambiante et des champs magnétiques absolus.

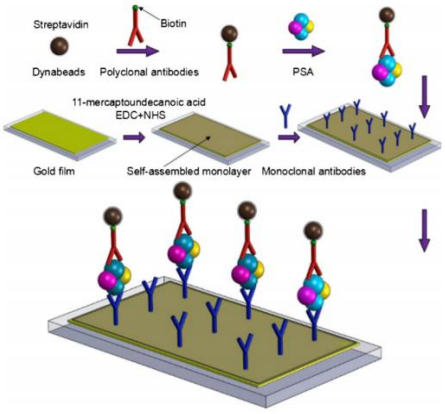


Figure 1.25 : Illustration schématique d'un immunodosage de type sandwich utilisant des Dynabeads pour la détection de PSA (Sun et al. 2016).

Sun et al. ont présenté un dispositif à base de micro-fluxgate à noyau magnétique rectangulaire pour la détermination de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) parades dynabeads (Sun et al. 2016). Un dosage immunologique de type sandwich a été utilisé dans lequel la PSA est capturée par une monocouche d'anticorps auto-assemblée sur un film d'or modifié. L'anticorps secondaire est greffé sur des Dynabeads. En appliquant des champs magnétiques à courant continu dans la plage de 460 à 700 µT, la PSA peut être détecté avec une limite de détection de 0,1 ng mL^{-1}. Cette détection à base de micro fluxgate offre les avantages de la miniaturisation, de la manipulation simple et pratique, de la réutilisation et de la stabilité.

IV- 2 - h - Les capteurs utilisant la MagnétoImpédance Géante (GMI)

L'effet GMI (Giant MagnetoImpedance) désigne la variation importante des parties réelle et imaginaire de l'impédance d'un matériau ferromagnétique quand il est soumis à un champ magnétique extérieur. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois en 1936 par E. P. Harrison et al. dans les fils en alliage fer-nickel à haute perméabilité (Harrison et al. 1936).

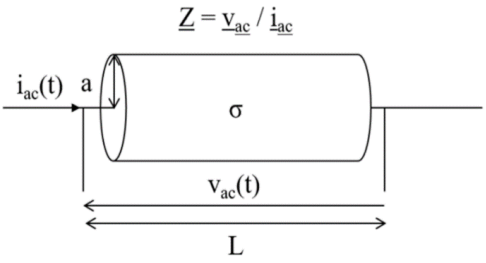


Figure 1.26 : Schéma d'un conducteur électrique d'impédance complexe L excité par le courant alternatif i_{ac}.

Selon l'application visée, les capteurs GMI peuvent être favorisés par un ou plusieurs avantages par rapport à leurs concurrents, ou au moins ils peuvent leur être complémentaire. Par exemple, par rapport aux technologies GMR et effet Hall, le capteur GMI peut typiquement présenter une sensibilité supérieure (Phan & Peng 2008). La bande passante de la GMI est large ; elle s'étend du continu jusqu'à plusieurs MHz, voire plusieurs dizaines de MHz. L'élément sensible GMI peut avoir une taille assez

réduite (aussi faible que quelques dizaines de micromètres de côté et quelques millimètres de longueur). Cette taille réduite est aussi un atout pour la miniaturisation (Phan & Peng 2008). Ces avantages, associés à un coût peu élevé, à une faible consommation et à un faible encombrement (notamment par rapport à la technologie Fluxgate) (Phan & Peng 2008)laissent à penser que ces dispositifs ont un avenir et une place certaine dans la réalisation de capteurs magnétiques pour la mesure de différentes grandeurs physiques par mesure de champ. Par ailleurs, les capteurs GMI présentent aussi une bonne stabilité thermique de l'élément sensible (Kurlyandskaya et al. 2001), (Honkura 2002). En particulier, les fils amorphes à base de cobalt ont une bonne stabilité thermique sur une large plage de température comprise entre -40 °C et 85 °C, ce qui permet aux capteurs GMI d'effectuer des mesures fiables à température ambiante (Honkura 2002).

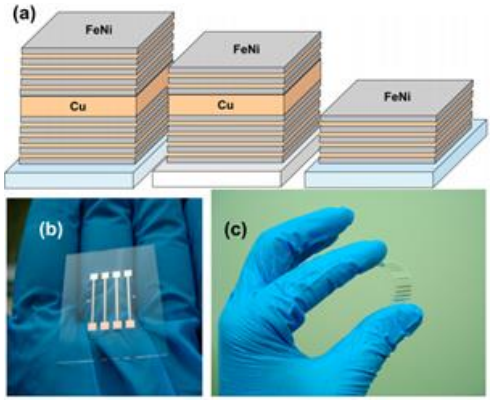


Figure 1.27 : (a) Description schématique des structures multicouches GMI. Vue générale de GMI-sensible éléments déposés sur des substrats (b) en verre et(c) en polymère souple (Chlenova et al. 2017).

Les structures à couche mince à base de Permalloy© sont d'excellents matériaux pour les applications de capteurs. Chlenova et al. ont étudié les dépendances de la température des propriétés magnétiques et de la magnétoimpédance géante (GMI) pour des structures multicouches à base de $Fe_{19}Ni_{81}$ obtenues par la technique de pulvérisation ionique au plasma(Chlenova et al. 2017). L'intervalle de température sélectionné de 25°C à 50°C correspond à la plage de température de fonctionnalité de nombreux dispositifs, y compris les biocapteurs magnétiques. Une structure multicouche $(Cu / FeNi)_5/Cu/(Cu / FeNi)_5$ avec une anisotropie magnétique transversale bien définie a montré une augmentation du ratio GMI pour l'impédance totale et sa partie réelle avec la température augmentée. Le maximum du GMI du rapport d'impédance total $\Delta Z / Z = 56\%$ a été observé à une fréquence de 80 MHz, avec une sensibilité de 18% / Oe, et le GMI maximum de la partie réelle $\Delta R / R = 170\%$ à une fréquence de 10 MHz, avec une sensibilité de 46% / Oe. Comme la magnétisation et la résistance électrique du courant continu varient très peu avec la température, le mécanisme le plus probable de l'augmentation inattendue de la sensibilité du GMI est le mécanisme de relaxation des contraintes associé à l'anisotropie magnétoélastique.

La détection magnétique utilisant l'effet de MagnétoImpédance Géante présente des propriétés très intéressantes dans le cas où le capteur est couplé à des couches en FeNi. Les propriétés que Chlenova et al. ont démontrées expérimentalement peuvent être adaptées pour réaliser la détection de l'impédance en ajoutant un circuit magnétique pour augmenter sa variation.

Un biocapteur GMI pourrait potentiellement détecter non seulement des biomolécules liées à des marqueurs magnétiques, mais également la liaison des biomolécules sans marqueur [Kurlyandskaya

et al. 2007, Kurlyandskaya et al. 2009), via des modifications de morphologie de surface ou d'anisotropie causées par leur présence.

	Fréquence (Hz)	Type de matériau	Amplitude du champ (T)	Gamme de Sensibilité
SQUID	DC - 10^{9}	Film mince	10^{-15} - 10^{-2}	pM
AM	DC - 10^{2}	Massif	10^{-15} - 10^{-9}	nM
TMR	DC – 10^{8}	Film mince	10^{-9} - 10^{-3}	nM
GMR	DC – 10^{8}	Film mince	10^{-9} - 10^{-3}	fM
Effet Hall	DC - 10^{5}	Film mince	10^{-5}- 1	pM
Fluxgates	DC – 10^{3}	Massif	10^{-10} - 10^{-3}	nM
GMI	DC – 10^{4}	Massif	10^{-9} - 10^{-3}	nM

Tableau 1.2 : Récapitulatif des techniques de détection magnétiques et leurs gammes de sensibilité obtenues par immunodosages

V - Etat de l'art des applications utilisant des complexes biologiques à base de nanoparticules magnétiques

L'utilisation des nanoparticules magnétiques dans les laboratoires sur puce ont permis de développer de nombreuses applications. Pour le séquençage ADN et ARN, les laboratoires sur puce ont permis d'ouvrir de nouvelles opportunités. Pour l'exemple du génome humain, les premiers projets de séquençage ont pris des années et ont nécessité le travail de nombreux chercheurs. En intégrant une matrice de sondes d'ADN dans un laboratoire sur puce, il a été possible de séquencer des génomes bien plus rapidement. Toutes les opérations biomoléculaires réalisées en laboratoires sur puce montrent un potentiel important pour la détection ultra rapide de bactéries et de virus, mais aussi pour l'identification de biomarqueurs de maladies (ADN et ARN). De plus, les laboratoires sur puce offrent d'énormes possibilités pour les immunodosages, qui montrent un gain de temps important par rapport aux technologies macroscopiques. Dans le domaine de la séparation moléculaire aussi, les laboratoires sur puce révèlent une séparation plus efficace que les systèmes conventionnels.

V - 1 - La détection protéinique et génomique

Pour l'amplification et la détection de l'ADN et/ou de l'ARN, les laboratoires sur puce présentent des bénéfices conséquents en termes de vitesse de détection tout en maintenant une sensibilité égale. L'amplification ADN à l'aide de la PCR repose sur les cycles thermiques. La capacité de réaliser des changements thermiques à grande vitesse à l'échelle microscopique explique que les laboratoires sur puce soient devenus le moyen le plus rapide de faire de la PCR.

Dans les travaux de Fan et al. (1999), la réutilisation des NPM (2.8 µm) pour la capture d'ADN à l'aide d'une sonde a été démontrée. Les auteurs ont pour cela chauffé le milieu à 87°C permettant la libération de la sonde et la réutilisation des NPM jusqu'à 12 fois.

Jiang & Harrison 2000 montre, l'isolement de l'ARNm de l'ARN total avec des rendements de capture de 50% en utilisant un bouchon de particules magnétiques dans un canal microfluidique. Pour réaliser leurs expériences les NPM (2.8 µm) ont été capturées à une vitesse de 4,8 µm s^{-1}

Dans les travaux de (Kwakye & Baeumner 2003) une capture spécifique de l'ARN du virus de la dengue dans une micropuce polymère a également été rapportée. Pour obtenir ce résultat les auteurs ont utilisés un petit aimant permanent (250 mT) placé près du microcanal, la vitesse de blocage des NPM était de 3 µm s^{-1}.

Des colonnes de particules magnétiques ont été utilisées comme matrice de tamisage pour la séparation de l'ADN en tant qu'alternative aux gels ou aux nanocolonnes fabriquées complexe. Le groupe de Viovy a étudié cette approche (Minc et al. 2004; Doyle et al. 2002) en assemblant des particules magnétiques (0,5 ou 1 µm) dans des colonnes à l'intérieur d'un microcanal en utilisant un champ magnétique homogène (10 mT). Une distance inter-colonnes homogène a été observée, qui pourrait également être ajustée en changeant la concentration de particules ou la densité de flux magnétique. Un mélange de molécules d'ADN a été pompé à travers le canal par un flux électroosmotique et les molécules d'ADN se sont enchevêtrées avec les colonnes. Plus la molécule d'ADN était longue, plus elle était retardée par la colonne, de sorte que des brins d'ADN de longueurs différentes pouvaient être séparés les uns des autres.

Une analyse d'un mélange d'ADN de masses moléculaires différentes a été réalisée par électrophorèse microfluidique à l'aide de ces colonnes magnétiques auto-assemblées (Doyle et al. 2002). Les résultats obtenus montrent que la chaine d'ADN la plus longue présente un temps de migration plus élevé. Ainsi, il est possible de séparer des brins d'ADN assez long en routine par électrophorèse "microfluidique".

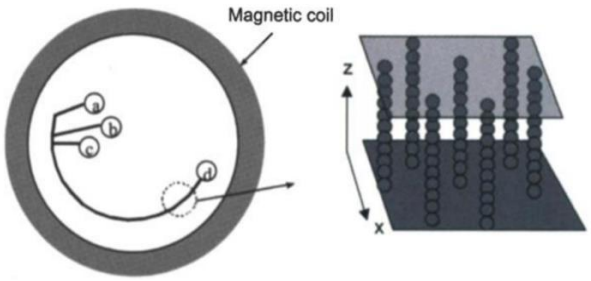


Figure 1.28 : (Gauche) Schéma de la bobine magnétique et du microcanal (Droite) Structures colonnaires formées par une suspension de particules superparamagnétiques (Doyle et al. 2002).

Une instrumentation d'électrophorèse capillaire commerciale en combinaison avec des aimants externes a été utilisée pour des essais sur des particules magnétiques (Rashkovetsky et al. 1997). Des dynabeads (2,8 mm) ont été revêtues d'anticorps et arrêtées en écoulement avec un aimant de cobalt pour former un bouchon. Plusieurs dosages enzymatiques et isolements d'anticorps ont été effectués sur le bouchon de 2-3 mm de long. Hayes et al. ont effectué des immunodosages à l'intérieur des capillaires et des puces en verre (Hayes et al. 2001). Les particules magnétiques recouvertes d'un anticorps approprié ont été piégées avec un aimant NdFeB (240 mT). L'échantillon contenant l'antigène a parcouru le canal, à environ 1 mm s^{-1}, pour permettre la liaison anticorps-antigène. Les temps de réaction rapides obtenus (quelques minutes) et le petit volume de réaction (µl) permettant une détection de haute sensibilité ont été mis en évidence. Des dosages de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et de l'interleukine-5 (IL-5) ont également été mis en évidence. Choi, Ahn et ses collaborateurs ont réalisés un dosage immunologique enzymatique en détectant le produit de la réaction avec un capteur électrochimique intégré positionné au sommet du canal au-dessus de l'aimant (Choi et al. 2002). L'immunodosage de type sandwich était basé sur des Dynabeads de 2,8 mm revêtues d'un anticorps. Ceux-ci ont été piégés, ont réagi avec la solution d'antigène et ensuite avec un anticorps secondaire, qui a été marqué avec une enzyme. Les auteurs soulignent le temps de réaction rapide de 20 minutes pour toute la procédure de dosage et de faibles volumes d'échantillons de quelques ml.

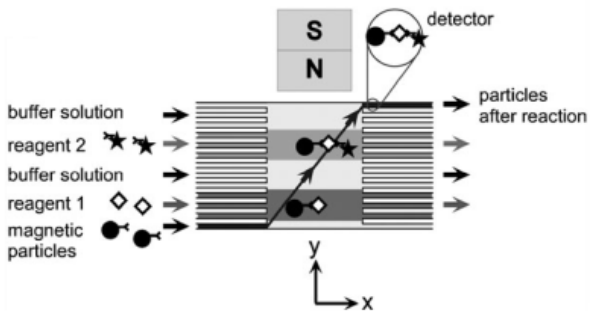


Figure 1.29 : Les particules magnétiques sont tirées de façon continue à travers des courants de réactifs. Un immuno-sandwich y est décrit et la même méthode peut être appliquée pour n'importe quel processus chimique(Peyman et al., 2008).

Peyman et al. ont présenté une plateforme microfluidique polyvalente qui permet de réaliser plusieurs étapes biochimiques sous un flux continu (Peyman,et al., 2008). Le dispositif consiste en une chambre où la réaction se passe et où différents fluides se côtoient de façon à former quatre ou cinq lignes distinctes (Figure 1.29). Les particules magnétiques sont prétraitées afin d'en activer la surface et d'ajouter des anticorps avant de les mettre sous flux. Elles sont ensuite injectées dans la chambre réactionnelle. Grâce à un aimant placé au-dessus de la chambre les particules vont subir un champ magnétique qui va les déplacer à travers les différents fluides. Les différentes étapes de bioconjugaison vont se dérouler avec la reconnaissance du biomarqueur dans un premier temps, puis un rinçage afin d'éliminer tous les biomarqueurs non reconnus. Dans un second temps, un second anticorps avec un marqueur fluorescent va reconnaître le complexe déjà formé, puis un rinçage est réalisé afin d'observer seulement le complexe lors de la détection. Les auteurs ont donc démontré la possibilité de réaliser un immunoessai dans une chambre sous flux.

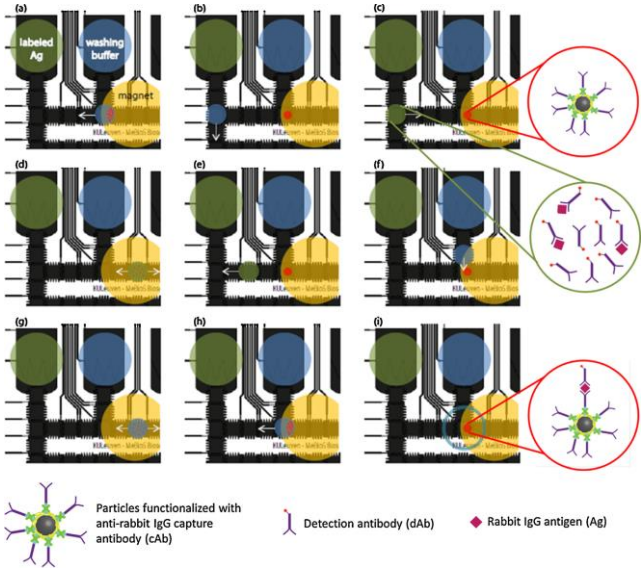


Figure 1.30 : Schéma du principe de l'immunoessai sur une plateforme "lab-on-chip". Les gouttelettes sont déposées manuellement sur les réservoirs de la plateforme, une contenant une solution d'antigènes et une avec une solution tampon. (Vergauwe et al. 2014).

Vergauwe et al. présentent un protocole permettant l'extraction de particules magnétiques présentes dans des gouttes individuelles(Vergauwe et al. 2014). Le dispositif comporte un aimant fixé créant continuellement un champ magnétique pour réaliser cette extraction. L'extraction des gouttes se fait à l'aide des forces de capillarité, d'électromouillage et magnétique. Ce protocole permet des

rinçages rapides et efficaces qui ont été démontrés sur des immunoessais. Ils apportent ainsi des nanoparticules magnétiques déjà fonctionnalisées et greffées avec des anticorps IgG anti-lapin. Une fois ces dernières capturées par l'aimant et séparées de la goutte, une goutte contenant une solution d'antigène de lapin et d'anticorps de détection est ajoutée. Lorsque la solution arrive au niveau des particules, un temps d'incubation est réalisé afin de former des complexes particules-anticorps, antigène, anticorps de détection. Ensuite trois rinçages sont effectués à l'aide de la solution tampon, ce qui permet d'obtenir seulement les complexes formés avec les particules magnétiques (Figure 1.30). Les auteurs ont montré la réalisation d'immunoessais en bloquant les particules magnétiques et comprenant une étape de rinçage rapide et efficace.

L'utilisation d'immunodosage en phase solide dans un système microfluidique présente de nombreux avantages par rapport aux dosages traditionnels. En effet, ces dosages doivent permettre une réduction des coûts, un impact moindre sur l'environnement, une simplification d'utilisation par l'intégration de toutes les étapes du procédé de dosage, une mobilité autorisant une utilisation sur le terrain, une vitesse d'exécution élevée, et une capacité de détection simultanée de différentes substances. Bien sûr, ces dispositifs miniaturisés présentent également des inconvénients par rapport aux systèmes conventionnels, comme une difficulté d'industrialisation ou la nécessité parfois d'ajouter des équipements externes augmentant la taille globale du dispositif de détection ainsi que son coût. Le but de l'immunodosage en phase solide est de réaliser ce dernier avec une attache covalente à la surface du capteur (généralement par fonctionnalisation de surface).

Dans (Saraheimo et al., 2013), les auteurs utilisent le FRET résolu en temps pour la détection d'anticorps, en phase liquide, mais et en phase solide (Figure 1.31). Les auteurs comparent un dosage homogène en phase liquide avec un dosage hétérogène en phase solide réalisé sur une microplaque pour un volume d'au moins 40 µL. Il est donc difficile de donner une conclusion à cette étude. En phase liquide un immunodosage homogène sera être plus facilement réalisé car le contrôle des éléments lors des étapes n'est pas nécessaire. On en comprend l'utilité du contrôle des NPM pour la réalisation d'immunodosage hétérogène en phase liquide (par exemple en microfluidique). Tandis qu'en phase solide, il est plus simple de réaliser un immunodosage hétérogène permettant un rinçage de la zone de formation du complexe biologique.

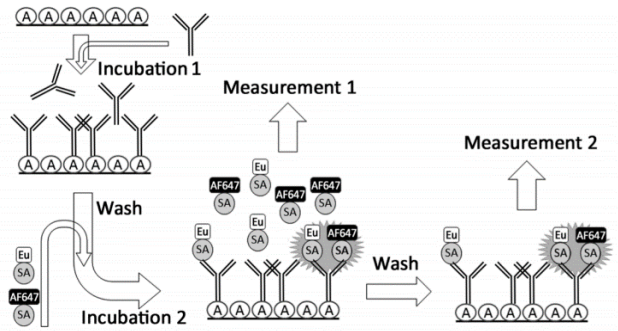


Figure 1.31 : Dosage en phase solide en deux étapes. Dans la première étape l'anticorps se lie à un puits recouvert de protéine A. Dans la deuxième étape, un mélange antigénique équimolaire a été ajouté. Le signal a été mesuré directement après addition de l'antigène (mesure 1) et après remplacement du mélange d'antigène par du TBS (mesure 2). (Saraheimo et al. 2013)

Dans le cas de la microfluidie de goutte, chacune, d'un diamètre allant de 1 à 100 microns, sert de microréacteur indépendant d'un volume de seulement 1 picolitre à 1 nanolitre. Le volume de chaque test est donc réduit jusqu'à 1 million de fois par rapport à des méthodes conventionnelles.

Dans (Pamula et al., 2008), les auteurs utilisent un protocole de dosage immunologique avec des gouttelettes comprenant des billes magnétiques. Ils ont étudié quatre opérations clés sur les gouttelettes contenant des billes magnétiques, à savoir l'attraction des billes magnétiques, l'efficacité du lavage, la rétention des billes magnétiques et la remise en suspension des billes magnétiques. Ils ont lors de leurs études numériques intégré les opérations de base de la manipulation de gouttelettes : la distribution, le transport, le mélange et le fractionnement. Ils ont pu démontrer la manipulation de billes magnétiques sur une puce microfluidique de gouttes numérique afin de réaliser des immunoessais hétérogènes. Différents paramètres affectant l'immobilisation de billes magnétiques ont été identifiés et optimisés : la solution tampon, la force d'attraction, la tension interfaciale. Ils ont pu démontrer pour la première fois la réalisation d'un immunodosage sandwich hétérogène utilisant des billes magnétiques sur une plate-forme microfluidique numérique à base de gouttelettes.

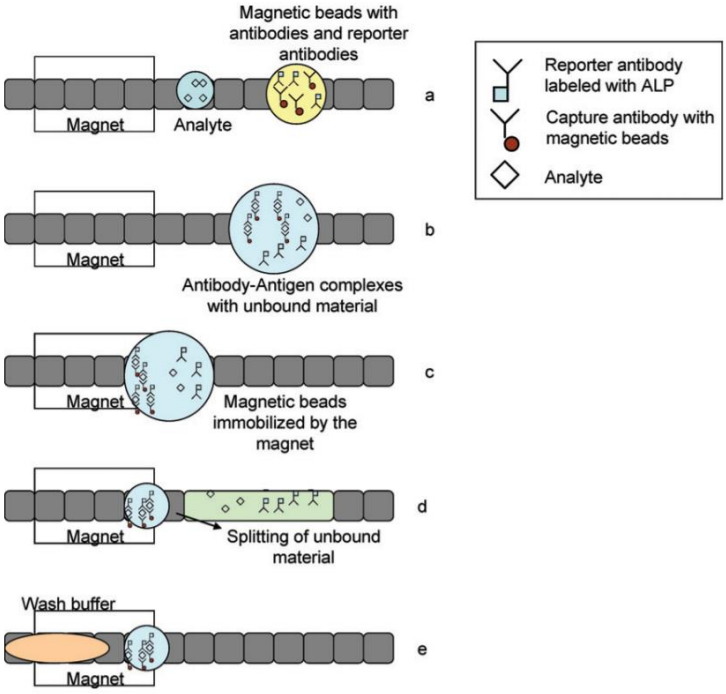


Figure 1.32 : Protocole pour le dosage immunologique hétérogène sur une plate-forme microfluidique numérique, (a) distribution des réactifs, (b) incubation, (c) immobilisation de billes magnétiques, (d) élimination du surnageant et lavage, (e) ajout de tampon de lavage frais.

Une méthode récente de détection protéinique consiste à utiliser les lits fluidisés. Ils se forment lorsque les particules sont suspendues dans un régime dynamique en régime permanent sous un équilibre de traînée visqueuse et une autre force de contrepoids (généralement la gravité).

Cette configuration fournit une agitation efficace et améliore le transfert de chaleur et de masse entre les phases solide et liquide par rapport à un lit à garnissage. Les lits fluidisés sont une stratégie intéressante pour améliorer la cinétique des processus liquide-solide en microfluidique, mais leur mise en œuvre était jusqu'à récemment entravée par la faiblesse des forces de gravitation à l'échelle microscopique.

Pour résoudre cette faiblesse, le concept de lits fluidisés magnétiques a été développé (Malaquin et al. 2013). Dans cette approche, les billes superparamagnétiques sont confinées dans un dispositif microfluidique par l'utilisation d'un aimant permanent. L'équilibre entre les forces magnétiques et de traînée qui leur sont appliquées a été optimisé afin de compenser l'intensité de la décroissance du champ magnétique (Figure 1.33). La conception du dispositif microfluidique a également été personnalisée pour assurer la stabilité du lit tout en assurant une recirculation uniforme et constante des billes. Les performances de ce microréacteur intégré ont été étudiées pour la capture et la pré-concentration de biomarqueurs.

Les auteurs ont montré que leur nouvelle micro-colonne dynamique microfluidique associe une densité élevée de particules magnétiques pour une capacité élevée, une agitation hydrodynamique active, une cinétique accrue et un débit élevé avec une contre-pression réduite. Les lits fluidisés miniaturisés semblent être efficaces pour l'immunocapture et la pré-concentration des analytes à partir des volumes d'échantillons initiaux compris entre 1 mL et des extraits à l'échelle, voire nL. Autres applications, par exemple microréacteurs sont également à portée de main. Comparés aux lits garnis, ces lits fluidisés nécessitent une pression de fonctionnement faible, ils ne sont pas sujets à l'encrassement (car les grandes particules non affines sont entraînées par le flux) et peuvent être régénérés facilement par simple chasse. Ils trouveront ainsi de nombreuses applications, soit en mode de détection directe, soit en tant que module de pré-conditionnement d'échantillons devant d'autres composants microfluidiques (Malaquin et al., 2013 & 2017).

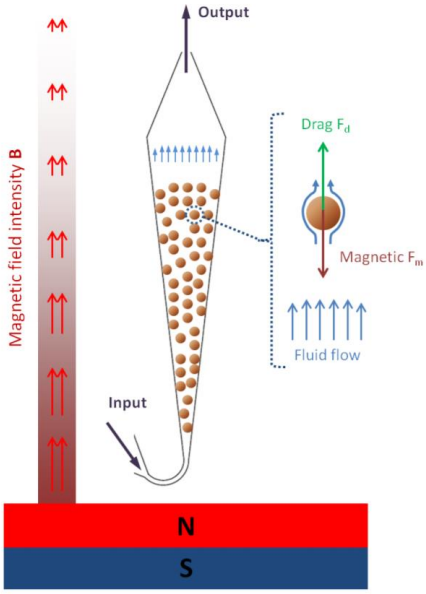


Figure 1.33 : Principe de fonctionnement du lit fluidisé microfluidique: les billes sont en équilibre à l'intérieur de la chambre en raison de l'équilibre entre la traînée et les forces magnétiques (Malaquin et al., 2013).

V - 2 - La détection en biologie cellulaire

Puisque l'on peut réaliser des microcanaux de la même taille que les cellules, la recherche en laboratoire sur puce a très tôt focalisé son attention sur la biologie cellulaire. Les laboratoires sur puce possèdent la capacité de contrôler les cellules à l'échelle d'une cellule unique tout en traitant une grande quantité de cellules en quelques secondes. A l'échelle microscopique la commutation de flux peut être extrêmement rapide et descendre à seulement quelques dizaines de millisecondes. En utilisant des détecteurs optiques, on peut détecter et isoler une cellule donnée (comme une cellule cancéreuse rendue fluorescente à l'aide d'anticorps) avec une capacité de traitement accélérée. Il existe plusieurs autres applications pour les laboratoires sur puce en biologie cellulaire, dont le micro patch-clamp, le contrôle de la différenciation des cellules souches, la cytométrie de flux et le tri des cellules.

Les cellules magnétiquement marquées ont été étudiées seulement récemment. Les cellules Jurkat ont été isolées du sang avec des particules magnétiques revêtues d'anti-CD3 (1 à 2 µm de diamètre) (Furdui et al. 2003). Le sang et les particules ont été mélangés hors puce puis les particules ont été piégées dans le microcanal à des vitesses comprises entre 0,14 et 1,4 $\mu m.s^{-1}$. Le taux de capture était d'environ 50% à partir d'un échantillon de 2 ml. Dans un autre dispositif, des cellules T de faible abondance ont été isolées du sang total (Furdui & Harrison 2004). Un petit aimant NdFeB a été utilisé pour capturer des Dynabeads revêtues d'anti-CD3. Par la suite, le sang total a été pompé à travers le lit de particules à 190 mm s^{-1}. Les meilleurs taux de capture ont été obtenus dans un dispositif à 8 canaux parallèles, mais les rendements n'ont pas dépassé 37%. L'optimisation était un compromis entre un lit de particules suffisamment dense et les contraintes de cisaillement élevées qui poussaient finalement les particules magnétiques hors du piège. Un microdispositif plus complexe pour la capture cellulaire sur puce et la PCR combinée à la détection d'ADN a été utilisé pour l'analyse de E. Coli (Liu et al. 2004). Les cellules bactériennes contenues dans un échantillon de sang ont été fixées à des Dynabeads de 2,8 µm pendant une étape d'incubation de 20 min. Ensuite, le mélange a été pompé dans le microdispositif et les cellules de E. coli magnétiques ont été capturées et isolées de l'échantillon de sang avec un aimant externe. Cela a été suivi par la PCR sur puce et la détection de l'ADN.

Une autre manière d'utiliser les nanoparticules magnétiques est la séparation des cellules tumorales (Chang & Savran 2015) d'un mélange de plusieurs cellules. Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont rares dans le sang des personnes atteintes d'un cancer (1-100 CTC par mL de sang comparé à 5.10^9 cellules rouges par mL de sang) et leur détection permet d'avoir un indicateur métastasique. De plus une fois séparées, une étude de leur génome et des gènes mutés peut être réalisée. Les auteurs ont réalisé un système qui intègre une micro-puce et un circuit fluidique en parallèle afin d'obtenir un grand flux immuno-magnétique ainsi qu'une séparation en fonction de la taille pour détecter les cellules rares. Leur dispositif permet de capturer les CTC à l'aide de particules magnétiques ayant des anticorps de reconnaissance contre les CTC, d'appliquer un flux suffisant pour éliminer les cellules non visées, bloquer les CTC ayant des particules magnétiques au-dessus d'une aire avec des micro-ouvertures en présence d'un champ magnétique, les particules magnétiques qui ne sont pas sur une cellule cancéreuse peuvent passer à travers les micro-ouvertures permettant ainsi de séparer les CTC de tout autre composant.

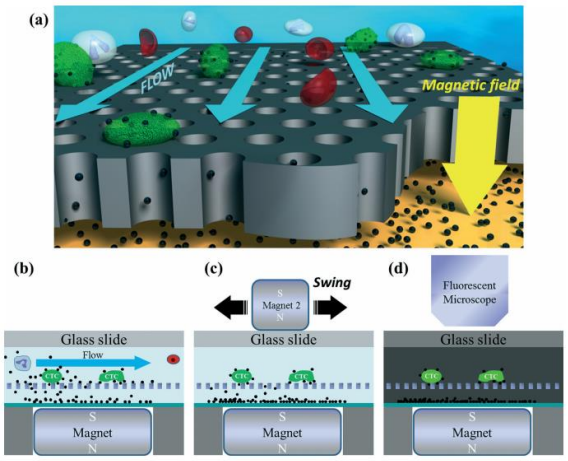


Figure 1.34 : Schéma de la stratégie de détection de la puce à micro-ouverture pour la détection de CTC, et illustration de la coupe transversale de la chambre fluidique (b) capture des CTCs et des billes dans le flux, (c) placement d'un second aimant sur le haut de la chambre pour guider les billes seules à travers les micro-ouvertures, et (d) l'identification et l'énumération des CTCs par microscopie à fluorescence(Chang & Savran 2015).

Cao et al. ont présenté une puce multiplex miniature pour la détection in situ de cellules cancéreuses(Cao et al. 2012). Une nouvelle stratégie de biocapteur de transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) basé sur l'oxyde de graphène, c'est-à-dire le complexe aptamère / oxyde de graphène marqué au colorant, a été mise en place. La mesure de l'intensité de fluorescence et les analyses d'images ont démontré que cette méthode de biodétection microfluidique présentait des réponses de fluorescence rapides, sélectives et sensibles aux quantités de cellules cancéreuses cibles, les cellules CCRF-CEM. Sept différents échantillons de cellules cancéreuses peuvent être mesurés en même temps dans une telle puce microfluidique. La réponse linéaire pour les cellules CCRF-CEM cibles dans une gamme de concentration de $2{,}5.10^{1}$ à $2{,}5.10^{4}$ cellules mL^{-1} a été obtenue, avec une limite de détection d'environ 25 cellules mL^{-1}, qui est environ dix fois inférieure à celle des biocapteurs normaux. Cette nouvelle puce microfluidique biosensible par fluorescence fournit une approche rapide, visible et à haut débit pour le diagnostic précoce du cancer avec une sensibilité et une spécificité élevées.

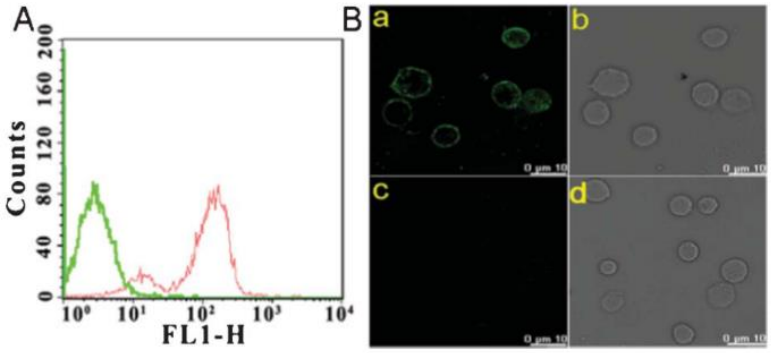


Figure 1.35 : Liaison sélective des aptamères aux cellules CCRF-CEM. (A) Essais de cytométrie de flux des cellules CCRF-CEM après incubation avec FAM-Sgc8 (ligne rouge) et FAM-TD05 (ligne verte, comme sonde témoin). (B) les images de fluorescence confocale (a, c) et de transmission (b, d) des cellules CCRF-CEM incubées avec GO / FAM-Sgc8 (a, b) et GO / FAM-TD05 (c, d), respectivement(Cao et al. 2012).

V - 3 - La détection en bactériologie

La détection de bactéries est un sujet important de nos jours (Agrawal et al. 2014). En effet l'étude de bactéries dangereuses est considéré comme un point important dans la lutte contre l'empoisonnement de l'alimentation (Cho & Irudayaraj 2013; Jiang et al. 2011) et dans d'autres domaines comme la biodéfense ou l'agriculture(Vidal et al. 2016; Ding et al. 2016; Schrittwieser et al. 2016).

Les nanoparticules magnétiques individuelles ont été examinées lors de la capture et de l'isolement spécifique de bactéries. Dans ce contexte, les nanoparticules d'oxyde de fer ont d'abord été chimiquement modifiées avec une enveloppe réactive spécifique en introduisant des composés fonctionnalisés communément utilisés tels que l'acide carboxylique, les amines ou les thiols (Dugas et al. 2015). Ensuite, l'anticorps sélectionné (par exemple anti-bactéries) a été greffé chimiquement sur les nanoparticules magnétiques. Ces nanoparticules sensibles ont ensuite été mélangées avec des bactéries contenant l'échantillon dans des conditions de tampon données (c'est-à-dire pH, salinité). Les bactéries reconnues ont alors été facilement extraites à l'aide d'un champ magnétique permanent, alors que les nanoparticules magnétiques individuelles étaient moins sensibles au champ appliqué, et par conséquent restaient dans le surnageant. Les bactéries extraites ainsi obtenues peuvent être utilisées pour extraire l'acide nucléique après l'étape de croissance des bactéries (Veyret et al. 2005). Récemment, des bactéries Salmonelles dans le lait ont été capturées par des nanoparticules magnétiques conjuguées à des anticorps (MNP) et séparées des échantillons d'analyte par l'application d'un champ magnétique externe (Joo et al. 2012). Les complexes MNP-Salmonelle ont été redispersés dans une solution tampon suivie de leur exposition à des nanocristaux de TiO_2 (TN) immobilisés par des anticorps, qui absorbent la lumière UV. Le test a montré une sensibilité élevée vis-à-vis de faibles concentrations de bactéries Salmonelles comme le montre la Figure 1.36. La limite de détection de la Salmonelle dans le lait s'est avérée être supérieure à 100 ufc / mL.

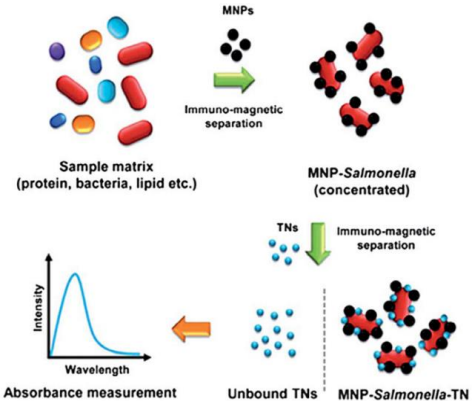


Figure 1.36 : Illustration schématique pour la détection des bactéries pathogènes dans le lait à l'aide de nanoparticules magnétiques et de nanosondes optiques(Joo et al. 2012).

Nous avons vu dans cette partie que l'utilisation de NPM pour la détection d'éléments biologiques, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire ou de bactéries, est un sujet largement étudié. Le but de ces recherches est de créer ou améliorer des méthodes pour détecter des éléments cibles dans des quantités infimes. Les recherches s'orientent de plus en plus vers l'utilisation de dispositifs miniaturisés impliquant un circuit fluidique.

VI -Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons exploré les différentes possibilités pour réaliser un capteur biologique utilisant des nanoparticules magnétiques. Tout d'abord nous avons vu l'intérêt d'utiliser des nanoparticules magnétiques dans les tests immunologiques. Leur taille, allant du nanométrique au micrométrique, et la possibilité de les manier à l'aide d'un simple champ magnétique, en font un outil bien adapté à la manipulation de molécules biologiques. Dans le cas d'une manipulation "macroscopique" de ces particules, le protocole général d'utilisation se résume à l'enchainement de plusieurs cycles d'incubation (greffage et/ou dé-greffage de molécules), de rinçage et de séparation. La manipulation de ces particules grâce à un simple champ magnétique (aimant permanent ou électroaimant) confère donc à cette approche de réels avantages en termes de temps, d'équipements et de coût.

Nous nous sommes ensuite penchés sur la microfluidique et les apports qu'elle peut présenter par rapport aux techniques traditionnelles pour la détection d'éléments biologiques. Parmi les avantages nous retrouvons la réduction des coûts, la simplicité d'utilisation, un diagnostic plus rapide, les échantillons ne sont nécessaire qu'en faible volume. Bien sûr ces avantages sont contrebalancés par certaines faiblesses telles qu'un rapport signal sur bruit qui peut être plus important, et la plupart des laboratoires sur puce ne sont pas encore adaptés pour l'industrialisation. Malgré ces faiblesses, l'utilisation de la microfluidique représente un énorme avantage pour les capteurs biologiques.

Pour utiliser les nanoparticules magnétiques dans un immunodosage il est nécessaire de les manipuler pour pouvoir les fonctionnaliser et réaliser un greffage d'éléments biologiques. Pour contrôler les nanoparticules magnétiques, un champ magnétique doit être créé. Pour cela les deux moyens les plus simples sont l'utilisation d'aimants permanents et de microbobines. Les aimants permanents sont très simples d'utilisation car externes aux dispositifs et permettent d'obtenir un champ magnétique puissant. Pour autant, ils ne sont pas intégrables dans un dispositif et ils n'offrent pas de contrôle sur le champ magnétique. Les microbobines sont pour leur part intégrables et ont une plus grande flexibilité de conception. En contrôlant l'intensité du courant, le champ magnétique peut être contrôlé. Elles présentent donc un grand intérêt dans la fabrication de dispositifs intégrés.

La détection d'un immunodosage utilisant des nanoparticules peut se faire de plusieurs façons. La technique de détection optique la plus employée de par sa facilité d'utilisation est la fluorescence. Dans cette technique le choix des fluorochromes est important et permet selon le but recherché d'obtenir des limites de détection très basses. L'un des défauts de cette technique est qu'elle est difficilement intégrable dans des dispositifs, ce qui oblige à se tourner vers d'autres techniques. L'utilisation de NPM dans nos immunodosages nous a dirigés vers le choix de la détection magnétique. Parmi les techniques permettant une détection magnétique, on retrouve la résonance magnétique nucléaire miniaturisée, les dispositifs d'interférence quantique supraconducteur, les magnétomètres atomiques, les capteurs utilisant la TMR et la GMR, ceux à effet Hall, les fluxgates et les capteurs utilisant la GMI. Chacune de ces techniques présente des avantages et des faiblesses. Pour réaliser un capteur magnétique intégré, contenu de la maîtrise de fabrication des microbobines dans le département Microsystème et NanoBioFluidique, nous nous sommes orientés vers la détection de la variation de l'inductance du champ magnétique en utilisant un circuit magnétique entourant des microbobines.

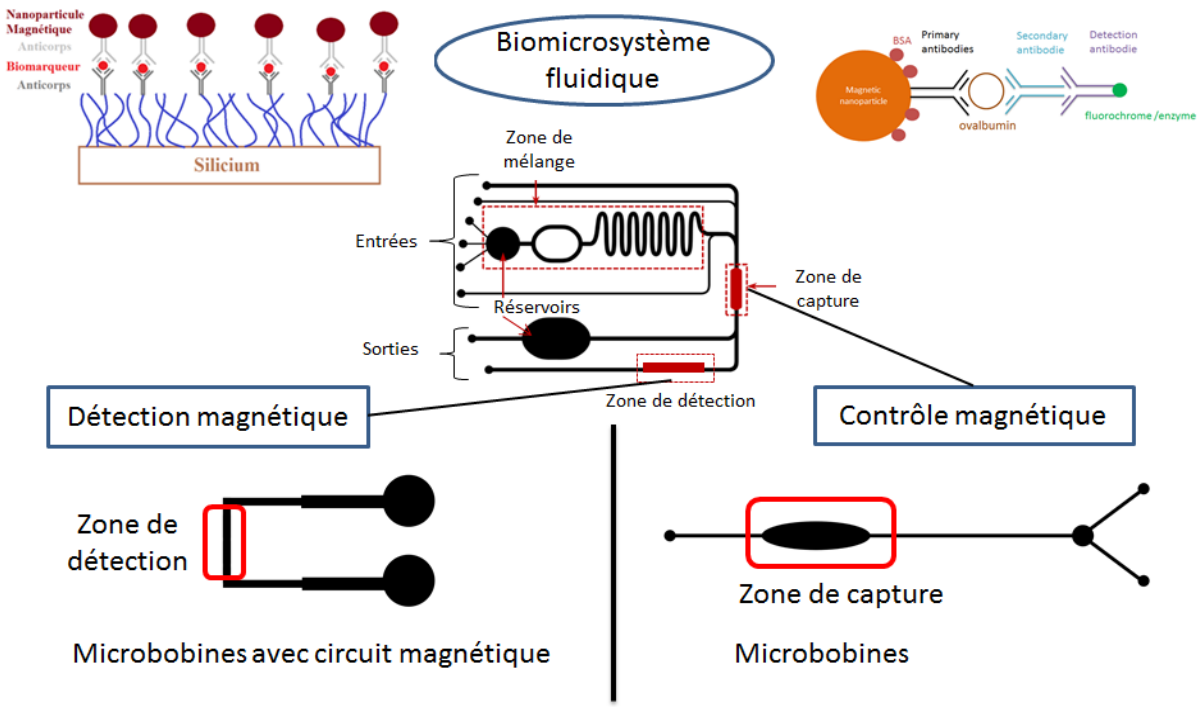


Figure 1.37 : Présentation de la stratégie de réalisation du biomicrosystème fluidique comprenant les fonctions de contrôle et de détection magnétique.

Par conséquent, après une présentation de l'état de l'art nous sommes en mesures de situer la problématique de la thèse qui consiste en la réalisation d'un biomicrosystème fluidique combinant deux fonctions magnétiques pour un contrôle des immunocomplexes à base de NPM et une détection sensible et spécifique de bactéries. Afin d'optimiser ces deux fonctions magnétiques nous avons décidé de les étudier et de les réaliser séparément avant de les intégrer dans le même biomicrosystème fluidique final (Figure 1.37). La première fonction consiste à contrôler magnétiquement les NPM pour les pré-concentrer dans une zone précise (zone de capture). Cette capture permettra de réaliser efficacement des immunocomplexes que nous détecterons par fluorescence (Figure 1.37droite). La deuxième fonction représente la détection magnétique qui sera réalisée dans une zone délocalisée (zone de détection) par rapport à la zone de pré-concentration des NPM. L'objectif final est de fonctionnaliser la surface de la zone de détection, afin de greffer et stabiliser spatialement les immunocomplexes magnétiques, ce qui permettra une optimisation de la détection des NPM (Figure 1.37gauche).

Le chapitre 2 aborde dans un premier temps, le dimensionnement du dispositif de contrôle magnétique afin d'obtenir le champ magnétique le plus intense et homogène possible pour la pré-concentration des NPM et d'accroitre la spécificité des immunodosages. Dans un second temps, le dimensionnement du dispositif de détection magnétique (microbobines et circuit magnétique) pour optimiser sa sensibilité de détection d'immunocomplexes à base de NPM sera exposé.

Le chapitre 3 présente les étapes de microfabrication des dispositifs de contrôle de NPM et de détection magnétique tout en respectant les paramètres définis par la modélisation, et en ayant pour objectif d'établir des procédés maitrisés et répétables.

Dans la première partie du chapitre 4, le contrôle du déplacement des NPM à l'aide du dispositif magnétique, va permettre de mieux maitriser la formation des immunocomplexes dédié à la capture de l'ovalbumine (molécule référence pour la biodéfense). Le procédé d'immunodosage va être optimisé pour obtenir la meilleure sensibilité de détection de l'ovalbumine par fluorescence. Différentes méthodes d'immunodosage sont étudiées : en microtube et dans un circuit microfluidique utilisant un aimant ou des microbobines, afin de déterminer celle garantissant la meilleure limite de détection. Les résultats de la capture de bactéries par des NPM seront ensuite présentés avec une optimisation du protocole de préparation du complexe « bactérie-NPM ».

Dans la deuxième partie du chapitre 4, le dispositif de détection magnétique sera caractérisé par la détection de NPM dans un circuit fluidique et permettra d'évaluer l'intérêt de reboucler le circuit de détection par des branches magnétiques. Les résultats expérimentaux seront confrontés à ceux obtenus par modélisation.

VII - Bibliographie

Ã, A.P.A. et al., 2007. Magnetic response of thermally blocked magnetic nanoparticles in a pulsed magnetic field. , 311, pp.166–170.

Ã, D.E. et al., 2009. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Specific binding of magnetic nanoparticle probes to platelets in whole blood detected by magnetorelaxometry. , 321, pp.1617–1620.

Agrawal, S., Paknikar, K. & Bodas, D., 2014. Development of immunosensor using magnetic nanoparticles and circular microchannels in PDMS. *Microelectronic Engineering*, 115, pp.66–69.

Ahn, C.H. & Allen, M.G., 1996. Magnetic Particle Separator. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 5(3), pp.151–158.

Atwe, A., Gupta, A. & Kant, R., 2014. A novel microfluidic switch for pH control using Chitosan based hydrogels. *Mycrosystem Technology*.

Barbic, M., 2002. Magnetic wires in MEMS and bio-medical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 249, pp.357–367.

Barbic, M. & Elbidweihy, H., 2017. Effect of magnetic nanoparticle shape on flux amplification in inductive coil magnetic resonance detection. , (November). Available at: http://dx.doi.org/10.1063/1.4962451.

Berkeley, L., 2002. Magnetic Gradiometer Based on a High-Transition Temperature Superconducting Quantum Interference Device for Improved Sensitivity of a Biosensor.

Bhuiya, A.K. et al., 2012. Characterization of Magnetic Markers and Sensors for Liquid-Phase Immunoassays Using Brownian Relaxation. , 48(11), pp.2838–2841.

Blake, C. & Gould, B.J., 1984. Use of Enzymes in lmmunoassay Techniques. *Analyst*, 109(May).

Budker, D. & Romalis, M., 2008. Optical Magnetometry. , pp.1–11.

Cao, L. et al., 2012. Visual and high-throughput detection of cancer cells using a graphene oxide- based FRET aptasensing microfluidic chip. *Lab on a Chip*, pp.4864–4869.

Carregal-romero, S. et al., 2013. Multiplexed Sensing and Imaging with Colloidal Nano- and Microparticles. *Analytical Chemistry*, (February).

Chang, C.-L. & Savran, C.A., 2015. Circulating tumor cell detection using a parallel flow micro-aperture chip system. *Lab on a Chip*, 15, pp.1677–1688.

Chemla, Y.R. et al., 2000. Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay.

Cheon, J. & Lee, J., 2008. Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Accounts of chemical research*, 41(12).

Cho, I. & Irudayaraj, J., 2013. In-situ immuno-gold nanoparticle network ELISA biosensors for pathogen detection pathogen detection. *International Journal of Food Microbiology*, 164, pp.70–75.

Choi, J. et al., 2000. A new magnetic bead-based, filterless bio-separator with planar electromagnet surfaces for integrated bio-detection systems. *Sensors and Actuators B*, pp.34–39.

Choi, J. et al., 2002. An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities. *Lab on a Chip*, pp.27–30.

Choi, J.W., Liakopoulos, T.M. & Ahn, C.H., 2001. An on-chip magnetic bead separator using spiral electromagnets with semi-encapsulated permalloy. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), pp.409–416.

Chung, H.J. et al., 2013. detection and phenotyping of bacteria. *Nature Nanotechnology*, (May), pp.1–7. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2013.70.

Chung, H.J. et al., 2011. Ubiquitous Detection of Gram-Positive Bacteria with Bioorthogonal Magneto fl uorescent Nanoparticles. *ACS Nano*, (11), pp.8834–8841.

Chung, J. et al., 2015. Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fl uorescent nanoparticles on an opto fl uidic platform. *Biosensors and Bioelectronic*, 67, pp.303–308. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.039.

Cohen, D., 2016. Ferromagnetic Contamination in the Lungs and Other Organs of the Human Body Author (s): David Cohen Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/1736913 JSTOR is a not-for-profit service tha. , 180(4087), pp.745–748.

Cousins, A. et al., 2015. Novel Handheld Magnetometer Probe Based on Magnetic Tunnelling Junction Sensors for Intraoperative Sentinel Lymph Node Identification. *Nature Publishing Group*, (February), pp.1–10. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/srep10842.

Cullity, B.D. & Graham, C.D., Intoduction to magnetic materials

Dalslet, B.T. et al., 2011. Bead magnetorelaxometry with an on-chip magnetoresistive sensor. *Lab on a Chip*, pp.296–302.

Danieli, E. et al., 2010. Small Magnets for Portable NMR Spectrometers **. *Angewandte Chemie*, (Figure 2), pp.4133–4135.

Dave, S.R. & Gao, X., 2009. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection , imaging , and drug delivery : a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, (December), pp.583–609.

Deng, T. et al., 2001. Manipulation of magnetic microbeads in suspension using micromagnetic systems fabricated with soft lithography. *Applied Physics Letters*, 78.

Deng, T., Prentiss, M. & Whitesides, G.M., 2002. Fabrication of magnetic microfiltration systems using soft lithography. *Applied Physics Letters*, 80(3), pp.461–463.

Dertinger, S.K.W. et al., 2001. Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks. *Analytical Chemistry*, 73(6), pp.1240–1246.

Ding, Y. et al., 2016. Magnetic-bead-based sub-femtomolar immunoassay using resonant Raman scattering signals of ZnS nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp.5013–5019. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9601-1.

Donolato, B.M. et al., 2010. On-Chip Manipulation of Protein-Coated Magnetic Beads via Domain-Wall Conduits. , pp.2706–2710.

Doyle, P.S. et al., 2002. Self-Assembled Magnetic Matrices for DNA Separation Chips. *Science*, (April).

Drung, D. et al., 2007. Highly sensitive and easy-to-use SQUID sensors. *IEEE*, 17.

Dubois, P. et al., 2006. Ionic Liquid Droplet as e-Microreactor devices usually based on continuous-flow in microchan-. *Analytical Chemistry*, 78(14), pp.4909–4917.

Duffy, D.C. et al., 1999. Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems : Characterization and Multiple Enzymatic Assays. *Analytical Chemistry*, 71(20), pp.4669–4678.

Dugas, V., Elaissari, A. & Chevalier, Y., 2015. *Recognition Receptors in Biosensors Recognition Receptors in Biosensors For full color versions of select images ,* Springer, ed.,

Ejsing, L. et al., 2005. Magnetic microbead detection using the planar Hall effect. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, pp.677–684.

Engvall, E., Jonsson, K. & Perlmann, P., 1971. Antiserum , immunoglobulin fraction , and specific antibodies Iodinated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 251, pp.427–434.

Fan, Z.H. et al., 1999. Dynamic DNA Hybridization on a Chip Using Paramagnetic Beads. *Analytical Chemistry*, 71(21), pp.4851–4859.

Feng, X. et al., 2014. Advences in coupling microfluidic chips to mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2000.

Figeys, D. et al., 1998. An Integrated Microfluidics-Tandem Mass Spectrometry System for Automated Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 70(18), pp.3728–3734.

Freitas, P.P. et al., 2012. Spintronic platforms for biomedical applications. *Lab on a Chip*, pp.546–557.

Frey, N.A. et al., 2009. Magnetic nanoparticles : synthesis , functionalization , and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chemical Society Reviews*, (May), pp.2532–2542.

Fu, A. et al., 2009. Protein-Functionalized Synthetic Antiferromagnetic Nanoparticles for Biomolecule Detection and Magnetic Manipulation **. *Angewandte Chemie*, pp.1620–1624.

Fu, H. et al., 2018. A full-automated magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for rapid detection of cortisol in milk. *Analytica Chimica Acta*. Available at: https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.015.

Fuh, C.B. & Chen, S.Y., 1999. Magnetic split-flow thin fractionation of magnetically susceptible particles. *Journal of Chromatography A*, 857, pp.193–204.

Furdui, V.I. & Harrison, D.J., 2004. Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems. *Miniaturisation for chemistry, biologu & bioengeneering*, 26.

Furdui, V.I., Kariuki, J.K. & Harrison, D.J., 2003. Microfabricated electrolysis pump system for isolating rare cells in blood. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13.

Gao, Y., 2014. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications : From Diagnosis to Treatment to Regeneration Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications : From Diagnosis to Treatment to Regeneration.

Garcia, N.C. et al., 2010. Optical atomic magnetometer at body temperature for magnetic particle imaging and nuclear magnetic resonance. , 35(5), pp.661–663.

Gascoyne, P.R.C. et al., 2002. Magnetophoretic-dielectrophoretic field-flox fractionation. *Micro Total Analysis Systems*, (January), pp.0–3.

Gaster, R.S. et al., 2011. Quantification of protein interactions and solution transport using high-density GMR sensor arrays. *Nature Nanotechnology*, 6(5), pp.314–320. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.45.

Ge, S., Shi, X. & Jr, J.R.B., 2009. Development of a remanence measurement- based SQUID system with in-depth resolution for nanoparticle imaging Development of a remanence measurement-based SQUID system with in-depth resolution for nanoparticle imaging.

Geng, T. & Mathies, R.A., 2015. Genetics Minimizing inhibition of PCR-STR typing using digital agarose droplet microfluidics. *Forensic Science International: Genetics*, 14, pp.203–209. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.007.

Ghazani, A.A. et al., 2014. Molecular characterization of scant lung tumor cells using iron-oxide nanoparticles and micro-nuclear magnetic resonance. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(3), pp.661–668. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.008.

Del Giudice, F. et al., 2015. Magnetophoresis 'meets' viscoelasticity: deterministic separation of magnetic particles in a modular microfluidic device. *Lab Chip*, 15, pp.1912–1922. Available at: http://xlink.rsc.org/?DOI=C5LC00106D.

Gradients, M.F., Wirix-speetjens, R. & Boeck, J. De, 2004. On-Chip Magnetic Particle Transport by Alternating. *IEEE Transaction on magnetics*, 40(4), pp.1944–1946.

Graham, D.L. et al., 2005. Magnetic field-assisted DNA hybridisation and simultaneous detection using micron-sized spin-valve sensors and magnetic nanoparticles. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 107, pp.936–944.

Grzybowski, B.A. & Campbell, C.J., 2004. Complexity and dynamic self-assembly. *Chemical Engineering Science*, 59, pp.1667–1676.

Hall, D.A. et al., 2013. A 256 Pixel Magnetoresistive Biosensor Microarray in 0.18 µm CMOS. *IEEE Journal of solid-state circuits*, 48(5), pp.1290–1301.

Hall, D.A. et al., 2010. Biosensors and Bioelectronics GMR biosensor arrays : A system perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9), pp.2051–2057. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.01.038.

Hall, P. et al., 2014. Chip-Based Measurements of Brownian Relaxation of Magnetic Beads Using a Chip-Based Measurements of Brownian Relaxation of Magnetic Beads Using a Planar Hall Effect Magnetic Field Sensor. *AIP Conference Proceedings*, (May).

Hayes, M.A. et al., 2001. Flow-Based Microimmunoassay. *Analytical Chemistry*, 73(24), pp.5896–5902.

He, N. & Li, Z., 2017. Simultaneous detection of multiple viruses based on chemiluminescence and magnetic separation. *Biomaterials Science*, 5(1).

Homsy, A. et al., 2005. A high current density DC magnetohydrodynamic (MHD) micropump. *Lab on a Chip*, pp.466–471.

Huang, Y.C.G.L.F. & Lin, Y.C.J., 2006. Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics. *Biomed Microdevices*, pp.215–225.

Inglis, D.W., 2004. Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation. *Applied Physics Letters*, 85(21), pp.5093–5095.

Issadore, D. et al., 2014. Magnetic sensing technology for molecular analyses. *Lab on a Chip*, pp.2385–2397.

Iv, C.W.S., Reyes, D. & López, G.P., 2015. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a Chip*, pp.1230–1249.

Jamshaid, T. et al., 2016. Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 79(December), pp.344–362. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.022.

Janz, S. et al., 2013. Photonic wire biosensor microarray chip and instrumentation with application to serotyping of Escherichia coli isolates. *Optics Express*, 21(4), pp.3243–3245.

Jiang, G. & Harrison, D.J., 2000. mRNA isolation in a microfluidic device for eventual integration of cDNA library construction. *The Analyst Communication*.

Jiang, X. et al., 2011. Evaluation of different micro / nanobeads used as amplifiers in QCM immunosensor for more sensitive detection of E . coli O157 : H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 29(1), pp.23–28. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.059.

Johnson, C. et al., 2012. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Magnetic relaxometry with an atomic magnetometer and SQUID sensors on targeted cancer cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(17), pp.2613–2619. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2012.03.015.

Joo, J. et al., 2012. A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes. *Analyst*, 137(16), pp.0–4.

Joung, J. et al., 2012. Micropumps Based on Alternating High-Gradient Magnetic Fields. *IEEE Transaction on magnetics*, 36(4), pp.2012–2014.

Jun, Y., Lee, J. & Cheon, J., 2008. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High- Performance Magnetic Resonance Imaging Angewandte. *Angewandte Chemie*, pp.5122–5135.

Kameoka, J. et al., 2001. A Polymeric Microfluidic Chip for CE / MS Determination of Small Molecules. *Analytical Chemistry*, 73(9), pp.1935–1941.

Kamholz, A.E. et al., 1999. Quantitative Analysis of Molecular Interaction in a Microfluidic Channel : The T-Sensor. *Analytical Chemistry*, 71(23), pp.5340–5347.

Kamholz, A.E., Schilling, E.A. & Yager, P., 2001. Optical Measurement of Transverse Molecular Diffusion in a Microchannel. *Biophysical Journal*, 80(4), pp.1967–1972. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76166-8.

Karle, M. et al., 2010. Continuous microfluidic DNA extraction using phase-transfer magnetophoresis. *Lab on a chip*, 10(23), pp.3284–3290.

Kim, A.J. et al., 2015. Magnetic bead droplet immunoassay of oligomer amyloid β for the diagnosis of Alzheimer ' s disease using micro-pillars to enhance the stability of the oil – water interface. *Biosensors and Bioelectronic*, 67, pp.724–732. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.042.

Kimura, T. et al., 2005. Micropatterning of Cells Using Modulated Magnetic Fields. *Langmuir*, (Ii), pp.830–832.

Kimura, T., Yamato, M. & Nara, A., 2004. Particle Trapping and Undulation of a Liquid Surface Using a Microscopically Modulated Magnetic Field. *Langmuir*, pp.572–574.

Koh, I. & Josephson, L., 2009. Magnetic Nanoparticle Sensors. *Sensors*, pp.8130–8145.

Köhler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*.

Kominis, I.K. et al., 2003. A subfemtotesla multichannel atomic magnetometer. *Nature*, 422(April).

Krause, H. et al., 2007. Magnetic particle detection by frequency mixing for immunoassay applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311, pp.436–444.

Kriz, K., Gehrke, J. & Kriz, D., 1998. Advancements toward magneto immunoassays. , 13, pp.817–823.

Kuswandi, B., Huskens, J. & Verboom, W., 2018. Optical sensing systems for microfluidic devices : A review Author ' s personal copy Optical sensing systems for microfluidic devices : A review. *Analytica chimica acta*, (January).

Kwakye, S. & Baeumner, A., 2003. Sylvia Kwakye · Antje Baeumner A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition. *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp.1062–1068.

Latham, A.H. et al., 2005. Capillary Magnetic Field Flow Fractionation and Analysis of Magnetic Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 77(15), pp.5055–5062.

Lee, C.S. et al., 2001. Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 3308, pp.10–13.

Lee, H. et al., 2004. Controlled Assembly of Magnetic Nanoparticles from Magnetotactic Bacteria Using Microelectromagnets Arrays. *Nano Letters*, pp.4–7.

Lee, H. et al., 2015. Recent Developments in Magnetic Diagnostic Systems. *Chemical Reviews*.

Li, G. et al., 2003. Detection of single micron-sized magnetic bead and magnetic nanoparticles using spin valve sensors for biological applications Detection of single micron-sized magnetic bead and magnetic nanoparticles using spin valve sensors for biological applications. *Journal of Applied Physics*, (May), pp.10–13.

Li, Y. et al., 2010. Nanomagnetic Competition Assay for Low-Abundance Protein Biomarker Quantification in Unprocessed Human Sera. *JACS*, (9), pp.4388–4392.

Liang, Y. et al., 2017. Ultrasensitive Magnetic Nanoparticle Detector for Biosensor Applications. *Sensors*, pp.1–10.

Lin, F. et al., 2014. A novel microfluidic chip electrophoresis strategy for simultaneous, label-free, multi-protein detection based on a graphene energy transfer biosensor. *Analyst*, pp.2890–2895.

Liong, M. et al., 2008. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano*, 2(5), pp.889–896.

Liu, R.H. et al., 2004. Self-Contained , Fully Integrated Biochip for Sample Preparation , Polymerase Chain Reaction Amplification , and DNA Microarray Detection. *Analytical Chemistry*, 76(7), pp.1824–1831.

Liu, Y. et al., 2008. DNA ligation of ultramicro volume using an EWOD microfluidic system with coplanar electrodes. *Journal of Micromechanics and Microengineering*.

Lu, L., Ryu, K.S. & Liu, C., 2002. A Magnetic Microstirrer and Array for Microfluidic Mixing. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 11(5), pp.462–469.

Ludwig, F., Heim, E. & Ma, S., 2005. Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets. , 293, pp.690–695.

Mahmoudi, M. et al., 2011. Magnetic Resonance Imaging Tracking of Stem Cells in Vivo Using Iron Oxide Nanoparticles as a Tool for the Advancement of Clinical Regenerative Medicine. *Chemical Reviews*, pp.253–280.

Malic, L., Brassard, D. & Tabrizian, M., 2010. Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LOC devices. *Lab on a Chip*, pp.418–431.

Maser, D. et al., 2011. Detection of a single cobalt microparticle with a microfabricated atomic magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, pp.4–6.

Massin, C. et al., 2003. Planar microcoil-based microfluidic NMR probes. *Journal of Magnetic Resonance*, 164, pp.242–255.

Minc, N. et al., 2004. Quantitative Microfluidic Separation of DNA in Self-Assembled Magnetic Matrixes. *Analytical Chemistry*, 76(13), pp.3770–3776.

Mirowski, E. et al., 2005. Manipulation and sorting of magnetic particles by a magnetic force microscope on a microfluidic magnetic trap platform. *Applied Physics Letters*, pp.5–7.

Nahrendorf, M. et al., 2008. Nanoparticle PET-CT Imaging of Macrophages in Inflammatory Atherosclerosis. , pp.379–387.

Nikitin, P.I., Vetoshko, P.M. & Ksenevich, T.I., 2007. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection. , 311, pp.445–449.

Norian, H. et al., 2014. An integrated CMOS quantitative-polymeras-chain-reaction lab-on-chip for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip*, pp.4076–4084.

Osterfeld, S.J. et al., 2008. Multiplex protein assays based on real-time magnetic nanotag sensing. *PNAS*.

Ostergaard, S. et al., 1999. A novel approach to the automation of clinical chemistry by controlled manipulation of magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194, pp.156–162.

Otieno, B.A. et al., 2014. On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive micro fl uidic immunoassays of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronic*, 53, pp.268–274. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.054.

Oy, E. & Ilmoniemi, R.J., 1989. SQUID Magnetometers for Low-Frequency Applications. , (July 2015).

Palma, R. De et al., 2007. Magnetic Bead Sensing Platform for the Detection of Proteins. *Analytical Chemistry*, 79(22), pp.8669–8677.

Pamme, N. & Manz, A., 2004. On-Chip Free-Flow Magnetophoresis: Continuous Flow Separation of Magnetic Particles and Agglomerates. *Analytical Chemistry*, 76(24), pp.7250–7256.

Payet, B. et al., 1998. Influence of particle size distribution on the initial susceptibility of magnetic fluids in the Brown relaxation range. , 186, pp.168–174.

Pellicer-guridi, R. et al., 2017. Towards ultimate low frequency air- core magnetometer sensitivity. , (April), pp.1–12.

Peng, H., Strohsahl, M. & Miller, B.L., 2012. Microfluidic nanoplasmonic-enabled device for multiplex DNA detection. *Lab on a Chip*, (C), pp.1089–1093.

Peyman, S. a, Iles, A. & Pamme, N., 2008. Rapid on-chip multi-step (bio)chemical procedures in continuous flow--manoeuvring particles through co-laminar reagent streams. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (10), pp.1220–2. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309423.

Piyasena, M.E. & Graves, S, W., 2014. The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab on a Chip*, pp.1044–1059.

Qiao, R., Yang, C. & Gao, M., 2009. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles : from preparations to in vivo MRI applications †. *Journal of materials Chemistry*.

Qiu, W. et al., 2017. Physical Spin-Valve based magnetoresistive nanoparticle detector for applications in biosensing. *Sensors & Actuators: A. Physical*, 265, pp.174–180. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.sna.2017.08.018.

Ramadan, Q. et al., 2004. On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 281, pp.150–172.

Ramsey, J.M., 2001. *Micro Total Analysis Systems 2001*, MICRO TOTAL ANALYSIS SYSTEMS.

Rashkovetsky, L.G. et al., 1997. Automated microanalysis using magnetic beads with commercial capillary electrophoretic instrumentation. *Journal of Chromatography A*, 781, pp.197–204.

Reddy, L.H. et al., 2012. Magnetic Nanoparticles : Design and Characterization , Toxicity and Biocompatibility , Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, 112, pp.5818–5878.

Rida, A. et al., 2014. Long-range transport of magnetic microbeads using simple planar coils placed in a uniform magnetostatic field Long-range transport of magnetic microbeads using simple planar coils placed in a uniform magnetostatic field. *Applied Physics Letters*, 2396(2003), pp.10–13.

Rida, A. & Gijs, M.A.M., 2004. Manipulation of Self-Assembled Structures of Magnetic Beads for Microfluidic Mixing and Assaying. *Analytical Chemistry*, 76(21), pp.6239–6246.

Ryu, K.S. et al., 2004. Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Miniaturisation for chemistry, biology & bioengeneering*, pp.608–613.

Safarık, I. & Safarıkova, M., 1999. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 722, pp.33–53.

Sant, S. & Wang, B., 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS): Development , surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, (January 2018).

Schrittwieser, S. et al., 2016. Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels. *Sensors*, 16(6).

Sharma, P.P. et al., 2017. Sensors and Actuators B : Chemical Integrated platform for detecting pathogenic DNA via magnetic tunneling junction-based biosensors. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 242, pp.280–287. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.051.

Shen, W. et al., 2008. Detection of DNA labeled with magnetic nanoparticles using MgO-based magnetic tunnel junction sensors. *Journal of Applied Physics*, pp.7–9.

Sista, R. et al., 2008. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab on a Chip*, 8(12), p.2091. Available at: http://xlink.rsc.org/?DOI=b814922d.

Sorli, B. et al., 2004. Micro-spectrometer for NMR : analysis of small quantities in vitro. *Measurement Science and Technology Micro-spectrometer*.

Srinivasan, V., Pamula, V.K. & Fair, R.B., 2004. Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection. *Analytica Chimica Acta*, 507(December 2003), pp.145–150.

Sun, C., Lee, J.S.H. & Zhang, M., 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.1252–1265.

Tamanaha, C.R. et al., 2008. Magnetic labeling, detection, and system integration. *Biosensors and Bioelectronic*, 24.

Titz, È. et al., 1999. A SQUID measurement system for immunoassays, 6(99), pp.577–583.

Veiseh, O., Gunn, J.W. & Zhang, M., 2010. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), pp.284–304. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002.

Vergauwe, N. et al., 2014. A highly efficient extraction protocol for magnetic particles on a digital microfluidic chip. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 196, pp.282–291. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400514000938%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.076.

Veyret, R. et al., 2005. Amino-containing magnetic nanoemulsions : elaboration and nucleic acid extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 295, pp.155–163.

Vidal, J.C. et al., 2016. Rapid determination of recent cocaine use with magnetic particles-based enzyme immunoassays in serum , saliva , and urine fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, pp.54–61. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.004.

Walton, J.H. et al., 2003. A Micromachined Double-Tuned NMR Microprobe. *Analytical Chemistry*, 75(19), pp.5030–5036.

Weissleder, R. et al., 2005. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature biotechnology*, 23(11).

Wensink, H. et al., 2005. Measuring reaction kinetics in a lab-on-a-chip by microcoil NMR. *The royal Society of Chemistry*, pp.280–284.

Xie, J. & Jon, S., 2012. Magnetic Nanoparticle-Based Theranostics. *Theranostics*, 2(1), pp.122–124.

Xu, D. et al., 2017. Metal-enhanced fluorescent dye-doped silica nanoparticles and magnetic separation_ A sensitive platform for one-step fluorescence detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronic*, 87(July 2016), pp.881–887. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.034.

Yalow, B.R.S. & Berson, S.A., 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The journal of clinical investigation*, 39, pp.1157–1175.

Yang, A.H.J. et al., 2014. Polymorphisms Using Microfluidic Electrochemical DNA Melting Curves. *Angewandte Chemie*, pp.3163–3167.

Yang, H. et al., 2009. A World-to-Chip Interface for Digital Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(3), pp.1061–1067.

Yao, L. & Xu, S., 2014. Detection of magnetic nanomaterials in molecular imaging and diagnosis applications. *Nanotechnology Reviews*, 3(3), pp.247–268.

Yao, L. & Xu, S., 2009. Long-Range, High-Resolution Magnetic Imaging of Nanoparticles**. , pp.5679–5682.

Yu, X. et al., 2013. On-chip dual detection of cancer biomarkers directly in serum based on self-assembled magnetic bead patterns and quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, pp.129–136.

Yuen, P.K. et al., 2003. Microfluidic devices for fluidic circulation and mixing improve hybridization signal intensity on DNA arrays. *Lab on a Chip*, (9731), pp.46–50.

Zalesskiy, S.S. et al., 2013. Miniaturization of NMR Systems : Desktop Spectrometers , Microcoil Spectroscopy , and “ NMR on a Chip ” for Chemistry , Biochemistry , and Industry. *Chemical Reviews*.

Zborowski, M. et al., 2002. Separation based on magnetophoretic mobility. *Separation Science and Technology*, (June 2013), pp.37–41.

Zborowski, M., Malchesky, P.S. & Hall, S., 1992. Quantitative separation of bacteria in saline solution using lanthanide Er(II1) and a magnetic field. *Journal of General Microbiology*, (138), pp.63–68.

Chapitre 2

Conception et dimensionnement des microbobines en vue de leur intégration dans un laboratoire sur puce

---

I - Introduction

Durant ce chapitre nous présentons et discutons le travail de simulation autour des différentes microbobines que nous souhaitons développer. Les microbobines offrent de nombreux avantages : (i) leur dimensionnement est possible, (ii) elles sont intégrables, (iii) elles peuvent être actionnées par un courant.

Un point important à surveiller lors de l'utilisation des microbobines de capture, est la température du canal microfluidique. En injectant un courant dans une microbobine, la puissance dissipée par effet Joule entraîne une augmentation de la température du fluide présent dans le canal. Il faut donc dès la conception des microbobines avoir pour objectif de garder la température entre 30 et 40°C, ce qui correspond à des températures biocompatibles.

Les microbobines de détection perçoivent le changement du champ magnétique lors de la présence de nanoparticules magnétiques (NPM). L'inductance de la (micro)bobine et sa variation indiquent la présence et la quantité de NPM. La littérature présente de nombreux exemples sans ou avec adjonction de matériau magnétique (Kriz, Gehrke, & Kriz, 1998). La conception et le dimensionnement des matériaux magnétiques utilisés doivent être étudiés. Dans de nombreux cas (Beyzavi & Nguyen, 2008; Carrasco, Soto, Maganto, & Moro, 2001; Fulcrand et al., 2011), un logiciel de simulation est utilisé dans le but de dimensionner des dispositifs expérimentaux.

Le logiciel de simulation d'élément fini ANSYS® v12.1 a été utilisé pour le présent travail. Le champ magnétique généré par les microbobines est calculé et extrait pour différentes directions le long des microbobines. Ces simulations nous permettent d'obtenir une estimation de la force magnétique exercée sur les NPM. Les paramètres donnant les meilleures conditions de capture et de détection peuvent alors être déterminés. Ces paramètres, confrontés aux limites expérimentales permettent de définir le dispositif qui sera fabriqué.

II - Force magnétique et force fluidique

Afin de comprendre comment les particules magnétiques peuvent être manipulées et contrôlées par un champ magnétique dans un dispositif fluidique, les forces (fluidiques, magnétiques etc.) agissant sur les particules magnétiques doivent être étudiées. Les forces et calculs de la littérature (Hejazian, Li, & Nguyen, 2015; Larimi, Ramiar, & Ranjbar, 2014) sont présentés ici. Tout d'abord, les forces agissant sur une particule dans un fluide sont présentées et une analyse de la pertinence de la prise en compte de ces forces est menée.

II - 1 - L'étude d'un fluide par le nombre de Reynolds particulaire

Dans un fluide, le paramètre sans dimension $\mathrm{R_{ep}}$est le nombre de Reynolds particulaire :

$$\mathrm{Re_p} = \rho \mathrm{LU} \frac{\mathrm{dp}}{\mu} \qquad \textbf{(2-1)}$$

où $\mathrm{d}p$ et U respectivement la dimension caractéristique de la particule et la vitesse relative entre particule et fluide. La valeur du nombre de Reynolds permet de distinguer quatre régimes principaux : le régime de Stokes, le régime laminaire, le régime transitoire, le régime turbulent.

L'écoulement de Stokes correspond aux très faibles valeurs du Reynolds (inférieures à 1). Dans ce cas, les forces d'inertie liées aux vitesses sont négligeables : les forces visqueuses et les forces de pression s'équilibrent. Cette gamme de valeurs correspond au domaine de la microfluidique. Pour des valeurs plus élevées, les forces d'inertie entrent en jeu : c'est le domaine de la dynamique des fluides.

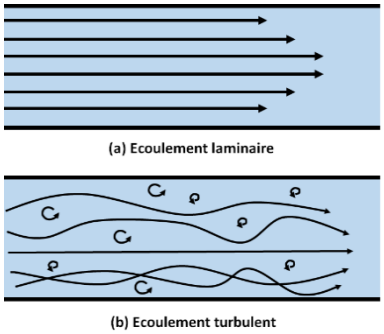


Figure 2.1 : Représentation schématique des écoulements en fonction du nombre de Reynolds (a) Ecoulement laminaire (Reynolds faible) (b) Ecoulement turbulent (Reynolds élevé).

La Figure 2.1 illustre deux cas d'écoulements. On observe un écoulement laminaire (Figure 2.1.a) avec des lignes de courant bien identifiées. Dans ce type d'écoulement l'effet de la viscosité s'atténue à mesure que l'on s'éloigne des parois, les vitesses du fluide tendant à s'homogénéiser. Il est alors souvent commode de considérer que l'approximation du fluide parfait (non visqueux) est suffisante hors d'une zone proche d'une paroi, appelée couche limite. Cette dernière concentre les effets visqueux qui peuvent y être modélisés sous une forme simplifiée.

Avec l'augmentation du nombre de Reynolds, il se produit une transition qui fait apparaître des instabilités dues à l'amplification des perturbations. La valeur du nombre de Reynolds de transition et la nature des instabilités dépendent essentiellement du type d'écoulement considéré.

Pour des valeurs du nombre de Reynolds plus élevées, les instabilités augmentent au point de donner naissance à un phénomène chaotique dans lequel il est difficile de voir une organisation : c'est la turbulence (Figure 2.1.b). Lorsque le flux est turbulent, il est très difficile de prévoir les interactions et le comportement des forces dans le fluide. Il est donc important de choisir pour nos applications un

flux laminaire pour pouvoir connaitre le déplacement des éléments présents dans le fluide. Le flux est alors connu en fonction de la position dans le canal et le comportement des particules (NPM, bactéries …) peut alors être modélisé.

II - 2 - Forces dans un fluide

Lorsque la particule magnétique (non-déformable) est plongée dans un liquide, elle subit plusieurs forces. Ces différentes forces (Figure 2.2) sont à l'origine du déplacement des particules magnétiques(Hejazian et al., 2015). On peut écrire, d'après la seconde loi de Newton :

$$\boldsymbol{m_p \frac{du_p}{dt} = F_{mp} + F_{gravity} + F_{dragg} + F_{\text{Portance}} + F_{Brownian} + F_{pp}} \qquad \textbf{(2-2)}$$

Avec m_p la masse des particules — u_p la vitesse de la particule

F_{mp} la force magnétique — $F_{gravity}$ la force de gravité

F_{dragg} la force de drag — $F_{Portance}$ la force de portance

$F_{Brownian}$ la force Brownienne — F_{pp} la force d'interaction entre particules

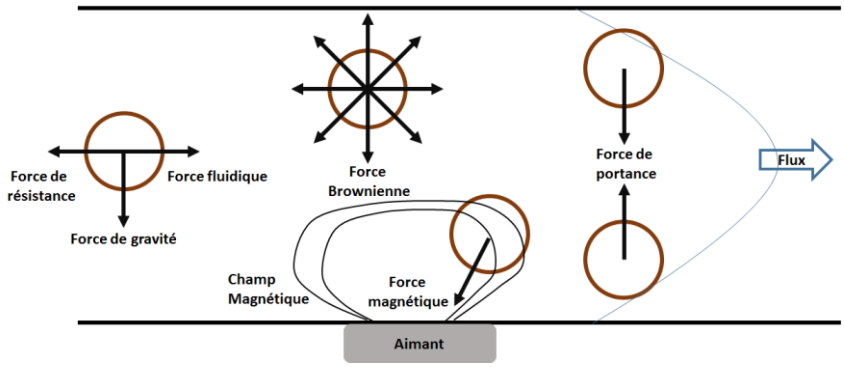


Figure 2.2 : Les différentes forces présentes et leurs direction et sens.

Chacune de ces forces dépend des paramètres du système. Elles sont détaillées à la suite.

II- 2 - b - Force magnétique exercée sur une particule

Quand une particule magnétique est localisée dans un champ magnétique $\vec{H}$, elle acquiert un moment magnétique aligné dans la direction du champ :

$$\overrightarrow{\boldsymbol{M_p}} = (\mu - \mathbf{1})\vec{\boldsymbol{H}} \qquad \textbf{(2-3)}$$

Avec $\mu = 1 + \chi$ la perméabilité magnétique, χ la susceptibilité magnétique et $\overrightarrow{\boldsymbol{M_p}}$ le moment magnétique par unité de volume. La force magnétique exercée sur la particule peut s'écrire :

$$\boldsymbol{F_{mp} = (\vec{m}.\nabla).\vec{B}} \qquad \textbf{(2-4)}$$

Avec $\vec{m}$ le moment magnétique de la particule.

Quand les particules magnétiques sont en suspension dans un fluide de perméabilité $\boldsymbol{\mu_f}$, la relation entre $\vec{B}$ et $\vec{H}$ est :

$$\boldsymbol{\vec{B} = \mu_f \vec{H}} \qquad \textbf{(2-5)}$$

La force magnétique agissant sur des particules magnétiques (de volume V_p) peut être écrite comme :

$$\overrightarrow{\boldsymbol{F_{mp}}} = \boldsymbol{\mu_f V_p} \frac{3(\chi_p - \chi_f)}{[(\chi_p - \chi_f) + 3(\chi_f + 1)]} (\vec{H}.\nabla)\vec{H} \qquad \textbf{(2-6)}$$

D'après l'équation **(2-6)** les particules magnétiques subissent une force attractive dans le cas $\chi_p > \chi_f$. Inversement, elles subiront une force répulsive dans le cas $\chi_p < \chi_f$.

Le mouvement d'une particule magnétique sous des forces magnétiques est typiquement induit par deux types d'interactions : l'interaction entre les particules et le gradient du champ magnétique et l'interaction entre particules. Les forces inter-particules sont à l'origine de l'agrégation des NPM. En termes de capture, un agrégat de NPM représente une masse magnétique plus importante, et donc une capture plus facile.

Pour une particule magnétique placée dans un champ magnétique, les spins des électrons tendent à s'aligner. Les particules magnétiques se comportent alors comme des petits aimants permanents. Le moment magnétique $\vec{m}$ est le vecteur qui représente les propriétés magnétiques d'une source magnétique, que cette source soit un champ extérieur, un courant circulaire ou un aimant permanent. Le moment magnétique d'une nanoparticule s'écrit :

$$\vec{m} = V\mu_0\vec{M} = V\mu_0\chi\overrightarrow{H(T)} \qquad \textbf{(2-10)}$$

Où V est le volume de la particule et $\vec{M}$ est l'aimantation.

Quand la particule arrive dans un champ magnétique, elle subit la force magnétique :

$$\vec{F}_m = \frac{1}{\mu_0}\nabla(m.\vec{B}) \approx \frac{1}{\mu_{0(m.\nabla)\vec{B}}} \qquad \textbf{(2-11)}$$

Dans le cas de particules sphériques et de taille nanométrique[3], le moment magnétique ne varie pas à l'intérieur de la nanoparticule($(\nabla.\vec{m}) = 0$).

En utilisant l'équation **(2-10)**, l'équation **(2-11)** devient :

$$\vec{F}_m = \frac{V\chi}{\mu_0} \times \left(\overrightarrow{B \times \nabla}\right)\vec{B} = \frac{V\chi}{\mu_0}.\left|\vec{B}\right| \times \overrightarrow{grad}(\vec{B}) \qquad \textbf{(2-12)}$$

Où χ est la susceptibilité magnétique de la particule.

Ecrite en coordonnées cartésiennes, la force magnétique est :

$$\vec{F}_m = \frac{\frac{4}{3}.\pi.r^3.\chi}{\mu_0}\begin{bmatrix} B_x\frac{\delta\vec{B}}{\delta x} & B_x\frac{\delta\vec{B}}{\delta y} & B_x\frac{\delta\vec{B}}{\delta z} \\ B_y\frac{\delta\vec{B}}{\delta x} & B_y\frac{\delta\vec{B}}{\delta y} & B_y\frac{\delta\vec{B}}{\delta z} \\ B_z\frac{\delta\vec{B}}{\delta x} & B_z\frac{\delta\vec{B}}{\delta y} & B_z\frac{\delta\vec{B}}{\delta z} \end{bmatrix} \qquad \textbf{(2-13)}$$

Tous les termes de la matrice montrent que la force magnétique provient du produit de l'amplitude $\left|\vec{B}\right|$ par le gradient du champ magnétique $\overrightarrow{grad}(\vec{B})$. Pour obtenir une force magnétique puissante dans un espace de dimensions données, le gradient et l'amplitude du champ magnétique doivent être maximisés.

II- 2 - c -Force de gravité

La force gravitationnelle peut être exprimée :

$$F_g = -m_b g \qquad (2\text{-}14)$$

Avec g l'accélération due à la gravité et m_p la masse flottante

La « masse flottante » représente la masse effective de la particule magnétique en prenant en compte la densité moyenne de la particule ρ_p et du fluide ρ_f l'entourant.

$$m_b = V_p(\rho_p - \rho_f) \qquad (2\text{-}15)$$

[3] C'est le cas de toute sphère plongée dans un champ uniforme. Pour des sphères de tailles nanométriques, un champ uniforme dans un espace plus grand que la sphère/particule est obtenu plus facilement.

V_p le volume de la particule ρ_p, ρ_f les densités de la particule et du fluide

La force de gravité est donc proportionnelle au volume de la particule et à la différence de densité entre la particule et le fluide. Par exemple pour une particule magnétique (Ademtech©) de 300 nm de diamètre et de densité de 2 g/cm^3, la force de gravité est de 0,001 pN. C'est la force responsable de la sédimentation des particules dans un liquide au repos. Elle est très faible devant la force magnétique exercée par un aimant permanent (1 pN pour un aimant de 500 mT) mais de l'ordre de grandeur de celle générée par une microbobine simple (0,1 pN pour 50 mT).

II- 2 - d - Force de résistance au fluide

Dans le cas d'une particule suspendue dans un fluide en mouvement, en condition de faible nombre de Reynolds (écoulement laminaire), la force de résistance au fluide est estimée par la loi de Stokes et la vitesse relative :

$$\boldsymbol{F_f = 3\pi\eta d_c(u_f - u_p)} \quad \textbf{(2-16)}$$

Avec u_f et u_p les vitesses du fluide et des particules, d_c le diamètre apparent de la particule, η la viscosité du fluide.

Le diamètre apparent de la particule dépend de la taille de la particule magnétique mais également de la taille des éléments biologiques greffés : si la taille du complexe biologique est cent fois plus importante que celle de la particule, la force de résistance est multipliée par cent.

II- 2 - e - Force de Portance

Les particules sphériques subissent une force hydrodynamique de portance. Elle est le résultat de la composante de la vitesse qui est perpendiculaire aux lignes de courant primaire. Il existe deux types de force de portance sur une particule selon la position de la particule. La première est due aux cisaillements de vitesse du fluide, c'est-à-dire due à la variation de la vitesse du fluide dans le canal :

$$\boldsymbol{F_{L,s} = \frac{\pi}{8}\rho_f \omega u d_p^3} \quad \textbf{(2-17)}$$

La deuxième est celle à la limite de la paroi du canal :

$$\boldsymbol{F_{L,b} = 9,22(\frac{9}{4}\frac{U^2}{h^2})\rho_f d_p^4} \quad \textbf{(2-18)}$$

Avec ρ_f la densité du fluide d_p le diamètre de la particule

ω la vorticité du flux U la vitesse moyenne d'une particule

h la hauteur du canal

La force de portance est proportionnelle à la vitesse du flux et à la taille de la particule par rapport à la hauteur du canal. Dans le cas de grands nombres de Reynolds (>>1), la force de portance est dominante et peut être utilisée pour une séparation latérale des particules. Dans le cas de faibles nombres de Reynolds, la force de résistance devient plus significative. Il est nécessaire d'avoir une grande vitesse et des particules de grand diamètre pour que l'amplitude de la force de portance soit comparable à la force magnétique.

II- 2 - f - Force Brownienne

Les collisions aléatoires des molécules du fluide avec les particules suspendues entrainent un mouvement aléatoire appelé mouvement Brownien. La force Brownienne peut s'écrire :

$$\boldsymbol{F_B = \varsigma\sqrt{\frac{6\pi k_B T d_p}{\Delta t}}} \quad \textbf{(2-19)}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann T la température absolue

d_p le diamètre de la particule Δt amplitude du pas de temps caractéristique

ς Nombre de Gauss

Le mouvement Brownien affecte le mouvement des particules dans le cas où ces dernières ont un diamètre plus faible que le diamètre seuil estimé par la relation : $|F|d_p \leq k_B T$, $|F|$ étant l'amplitude de la force totale agissant sur la particule.

II- 2 - g - Bilan des forces en présence

D'autres forces, telles que la force de Van der Waals, la force thermophorétique, les interactions magnétique et électrostatique entre particules agissent également mais ont ici été négligées : elles ne peuvent être mises à profit dans le dispositif étudié ici. Le Tableau 2.3 récapitule l'ensemble des forces présentes dans un dispositif fluidique et magnétique.

Forces	Formules	Commentaires	Valeurs estimées (N)
Force magnétique	$\vec{F}_m = \frac{V\chi}{\mu_0} \times (\overrightarrow{B \times \nabla})\vec{B}$	Pour maximiser la force, l'amplitude **et** le gradient doivent être maximisés.	10^{-14} ... 10^{-12}
Force de gravité	$F_g = -V_p(\rho_p - \rho_f)\, g$	Elle est responsable de la sédimentation.	10^{-16}... 10^{-14}
Force de résistance	$F_f = 3\pi\eta d_c(u_f - u_p)$	Elle varie en fonction du complexe. Lors d'immunodosage, elle augmente avec l'ajout des éléments biologiques.	10^{-18}... 10^{-16}
Force de portance	$F_{L,s} = \frac{\pi}{8}\rho_f \omega u d_p^3$	Elle devient comparable à la force magnétique si la vitesse est grande et le diamètre de la particule (ou du complexe biologique) important.	10^{-21}... 10^{-18}
Force Brownienne	$F_B = \varsigma\sqrt{\frac{6\pi k_B T d_p}{\Delta t}}$	Elle intervient dans le cas où les particules ont un diamètre plus faible que le diamètre seuil estimé par la relation : $\lvert F\rvert d_p \leq k_B T$.	
Force du fluide	$m_p \frac{du_p}{dt}$	Elle est reliée à l'énergie cinétique du fluide injecté.	10^{-13}... 10^{-11}

Tableau 2.3 : Récapitulatif des forces présentes dans un canal microfluidique en présence d'un champ magnétique (B de quelques centaines de mT) et de particules magnétiques

En étudiant les différentes forces et en réalisant un calcul approché de leurs valeurs dans nos conditions de travail, il a été possible d'estimer leurs impacts sur les NPM dans le dispositif fluidique. L'observation de la dernière colonne du Tableau 2.3, permet d'établir que la valeur de la force magnétique est plusieurs décades supérieures aux autres forces. Il est donc possible d'en considérer la majorité comme négligeable pour des temps courts dans le dispositif fluidique visé. Pour notre cas d'étude, nous pouvons nous limiter à étudier uniquement la force magnétique et la force du fluide qui donne sa vitesse à la particule.

III - Dimensionnement des microbobines

La présence de NPM dans l'environnement d'une microbobine modifie la distribution du champ magnétique. Il est ainsi possible de profiter de ce champ magnétique, soit pour attirer les NPM, soit pour détecter leur présence. La position des NPM par rapport à la bobine et la conception de la bobine ont une influence sur l'interaction NPM-bobine. Les paragraphes suivants font des rappels rapides des principes de conception des µbobines. Seuls les principaux points sont rappelés ici. On en trouvera une version plus étendue dans Hong Ha (2016).

III - 1 - Champ magnétique crée par un fil

Un fil rectiligne infini crée un champ magnétique que l'on peut calculer analytiquement en profitant des symétries. Un courant I est injecté dans le fil ce qui entraine l'apparition d'un champ magnétique $\vec{H}$. L'intensité de la force et la direction de $\vec{H}$ dépendent de la distance (r) entre le courant (fil conducteur) et le point d'étude P (Figure 2.3.a). Dans le cas de plusieurs fils rectilignes infinis, le champ magnétique au point P peut-être calculé comme la somme de la contribution de $d\vec{H}$ sur de petites portions (dl) du fil conducteur.

La loi de Biot et Savart donne l'expression de la contribution du champ magnétique $d\vec{H}$ (ou champ élémentaire) pour une portion de fil en fonction de I, r et dl, et avec $\vec{r}$ vecteur unitaire perpendiculaire au fil et dirigé vers le point d'étude :

$$\boldsymbol{d\vec{H} = \frac{1}{4\pi}\frac{I d\vec{l}\times\vec{r}}{r^2}} \qquad \textbf{(2-20)}$$

Un fil infini produit à une distance r, un champ magnétique d'amplitude :

$$\boldsymbol{H = \frac{I}{2\pi r}} \qquad \textbf{(2-21)}$$

En pratique, un fil est rarement infini.

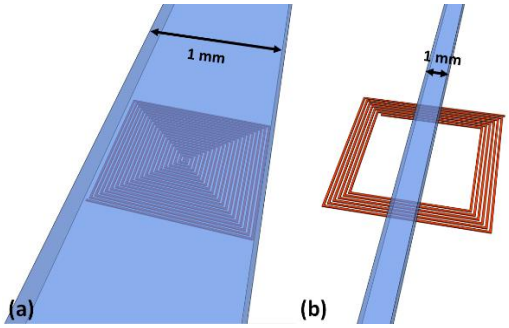


Figure 2.3 : (a) Schéma d'un canal de même largeur que la microbobine, (b) Schéma d'un canal de largeur plus faible que la microbobine. Le canal peut se situer au centre de la microbobine ou sur l'un des côtés entrainant une répartition différente du champ magnétique dans le canal.

Pour notre application, il est courant de concevoir des microbobines de dimensions similaires ou inférieures à la largeur du microcanal (Figure 2.3.a). Dans ce cas, les conducteurs ne peuvent pas être considérés comme infinis. Un autre cas est celui décrit à la Figure 2.3.b où le canal est plus petit que la (micro)bobine. Dans ce cas, la position du canal par rapport à la bobine entraîne des conséquences en termes répartition et de gradient du champ magnétique, et donc de force appliquée sur des nanoparticules circulant dans le canal.

Le champ élémentaire $\mathrm{d}\vec{\mathrm{H}}$ produit par une section $\mathrm{d}x$ de fil en un point situé à une certaine distance du fil est donné par :

$$dH = \frac{1}{4\pi}\frac{I\cos\theta d\theta}{r^2} \quad \textbf{(2-22)}$$

Le fil conducteur non infini produit un champ magnétique d'amplitude :

$$H = \frac{I}{2\pi h}\sin\theta_0 \quad \textbf{(2-23)}$$

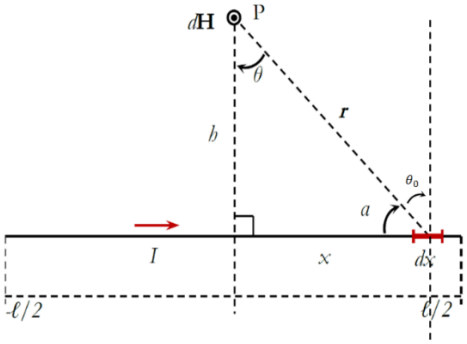


Figure 2.4 : Champ magnétique $\vec{H}$ induit par un courant passant par un fil de longueur l .

θ_0 étant l'angle formé par les droites reliant le point d'intérêt avec l'extrémité du fil et la perpendiculaire au fil passant par le point d'intérêt :

$$\theta_0 = \tan^{-1}(\frac{l}{2h}) \quad \textbf{(2-24)}$$

Dans le cas de NPM circulant dans un microcanal à proximité d'un fil de longueur non infinie (Figure 2.3.a), le champ magnétique vu par les NPM peut être significativement différent en fonction de la distance au fil (c'est-à-dire de la hauteur du microcanal). Les formules **(2-22)** et **(2-24)** diffèrent par la présence du « $\sin\theta_0$ ». Si le fil est court, le champ magnétique créé par ce segment de fil sera plus faible que ce qu'une estimation « infinie » (Figure 2.3.b) permettrait d'attendre. La Figure 2.5 montre l'effet de la longueur du fil sur le champ effectivement créé. On constate que dès lors que la longueur du fil est plus grande que 5 fois la hauteur (h) du microcanal, le champ magnétique ne diffère pas sensiblement de celui qui serait créé par un fil rectiligne infini. Selon les contraintes d'espace disponible sur la puce microfluidique, il sera donc parfois pertinent de concevoir des bobines (au moins 5 fois) plus grandes que le la hauteur du microcanal, ces dimensions assurant un champ d'intensité relativement importante dans toute la hauteur du canal.

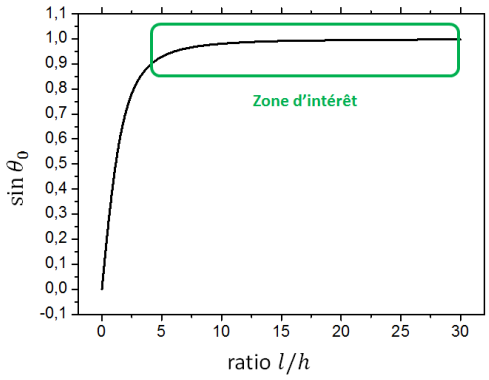


Figure 2.5 : L'effet du ratio l/h en fonction de $\sin\theta_0$ avec $\theta_0 = \tan^{-1}(\frac{l}{2h})$).

Dans le cas où la microbobine comporte plusieurs spires, le champ magnétique est la somme vectorielle des champs magnétiques créés par chaque fil conducteur.

Si le nombre de conducteurs est grand ou si les formes étudiées ne sont pas rectilignes, le calcul devient alors complexe. Par exemple, pour des microbobines rondes ou carrées, le gradient présente un pic aux abords des angles ou un gradient relativement homogène en amplitude respectivement. Il est alors difficile de prédire la force, intuitivement ou par un calcul analytique, et il est souvent plus rapide d'employer des logiciels de calcul, notamment par éléments finis.

III - 2 - Conséquences sur les applications des microbobines

De nombreux auteurs ont proposé des réalisations de bobines intégrées pour la capture ou la mesure de NPM ou pour le chauffage. Cette partie détaille quelques exemples de la littérature.

III- 2 - a - Microbobines de capture de nanoparticules magnétiques

Des microbobines de capture ont été proposées par de nombreux auteurs. Le plus souvent, les microbobines sont planaires(Kakri-Bouchet & Zahraoui, 2017; Miao, Dai, Huang, Ding, & Zhao, 2014; Pancharoen, Zhu, Beeby, Maeguchi, & Masuda, 2015; Pawinanto, Yunas, Said, & Noor, 2014; Yunas, Majlis, & Bais, 2015) et quelques auteurs ont amélioré la capture par l'adjonction de matériaux magnétiques, le plus souvent avec une couche fine (Hosseini, Philpott, & Soleymani, 2017; Zhi, Shinshi, Saito, & Kato, 2014; Zhu, Cheng, Chen, & Ding, 2018) ou un plot (Ramadan, Samper, Poenar, & Yu, 2006b).

En l'absence de matériau magnétique, Ramadan et al. (2004a) ont mené une étude étendue portant sur de nombreuses formes de µbobines planaires. Ces auteurs ont notamment proposé trois différents designs (Figure 2.6.a : conducteurs rectilignes disposés en méandres. b : mailles disposées en méandres et c. en rosace). Ces différentes géométries ont été étudiées par éléments finis puis réalisées et le champ magnétique produit a été mesuré.

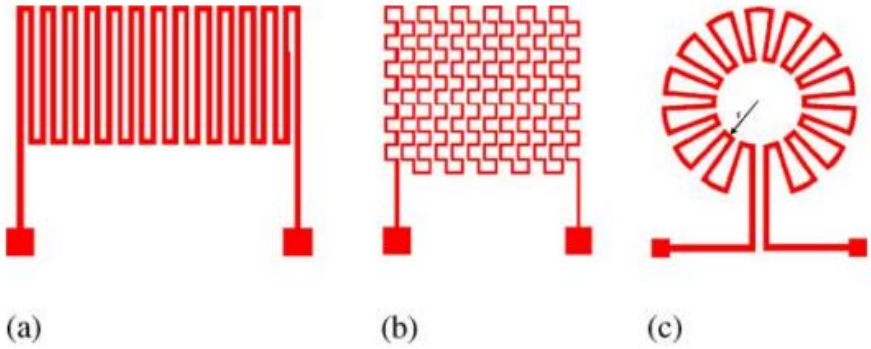


Figure 2.6 : Schéma des différentes microbobines de capture (Ramadan, Samper, Poenar, & Yu, 2004b).

La première ligne du Tableau 2.3 montre que l'intensité de la force d'attraction dépend à la fois de l'intensité du champ et de sa variation. On peut alors expliciter l'effet recherché pour la capture des NPM. Les « bobines » de la Figure 2.6 sont conçues pour maximiser la variation du champ magnétique, mais sans profiter d'un effet cumulatif de plusieurs conducteurs parallèles parcourus par le même courant. La « bobine » de la Figure 2.6.a alterne un conducteur aller et un conducteur retour. La « bobine » de la Figure 2.6.b augmente encore les variations spatiales par des changements constants de direction du courant mais n'ajoute pas non plus d'effet cumulatif. Cet effet cumulatif est très

brièvement évoqué pour des bobines rondes dans la suite de l'article. L'effet cumulatif sur l'amplitude du module de l'induction est d'un à deux ordres de grandeurs (10^{-6} à 10^{-5} T pour les conducteurs de la Figure 2.6 contre 10^{-4} T pour la bobine à spires concentriques). L'article constate les faibles performances en termes de capture pour les microstructures non bobinées.

Dans un deuxième article, la même équipe (Ramadan et al., 2006b) utilise des bobines de formes diverses formées de plusieurs conducteurs parcourus par un courant de même sens en utilisant un matériau magnétique. Le champ magnétique obtenu est de l'ordre de quelques dixièmes de T, mais chute à quelques dizaines de mT pour des distances au plot magnétique de quelques dizaines de µm, c'est-à-dire dans la zone du canal microfluidique placé sur la microbobine où sont situées les NPM à attirer.

Ainsi, les microbobines intégrées ont des facultés de capture modérées et doivent nécessairement présenter une structure bobinée pour produire une induction propre à l'attraction de NPM. L'ingénierie du laboratoire sur puce consiste donc dans ces cas à dimensionner les microcanaux pour garder un flux suffisamment faible pour attirer, malgré tout, les NPM.

III- 2 - b - Contrôle de la température et microbobines

Le courant injecté dans les bobines est de 100mA pour Ramadan et al. (2004b), ce qui a pour conséquence un échauffement des bobines (conducteurs de 10µm de largeur, de 2 à 10 µm d'épaisseur), c'est-à-dire une densité de courant de 1000 à 5000 A/mm^2 et une énergie dissipée de 1,7 à 8,5 W/mm^3 de cuivre.

L'échauffement prévisible des fluides et des espèces transportées a conduit certaines équipes à imaginer des solutions de refroidissement de la puce, telles que des modules Peltier par définition non intégrés (Benali Khoudja, M.Hafez, 2014; Ying et al., 2016) ou des canaux de refroidissement autour du circuit microfluidique (Koo et al., 2011; Snr & Temperature, 1992; Webb, 2012). L'étude de la température reste cependant assez rare dans la littérature.

Dans (Chen & Hsu, 2013), des microbobines en technologie MMIC (Monolithic Microwave Integrated Circuit) sont employées pour réaliser un « chauffage ».

Chen et Al. présentent un ensemble de microbobines multicouches qui ont un rôle d'actionneur et de « radiateur ». Une vitesse de chauffage de 19,7 °C/s et de refroidissement de 11,8 °C/s est atteinte, ce qui permet la dénaturation lors de la PCR, obtenue à 95°C. La partie actionneur permet de générer un champ magnétique local qui regroupe les particules magnétiques au centre de la microbobine. Cet usage n'est bien sûr pas possible dans le cas où on souhaite préserver les espèces biologiques présentes.

III- 2 - c - Microbobines de détection

Les microbobines intégrées peuvent également être employées pour détecter une quantité de NPM. Dans Baglio et al. (2007), les auteurs présentent la conception et la fabrication de dispositifs inductifs intégrés destinés à des applications de biodétection. Le principe de détection est basé sur les changements d'inductance de la bobine dus à la présence de particules magnétiques dans la zone active du dispositif. Pour la simulation, un modèle d'éléments finis a été développé en utilisant le logiciel d'éléments finis ANSYS©. Pour augmenter la sensibilité du dispositif à la présence des particules magnétiques, une couche magnétique a été déposée localement sur la face arrière du substrat au niveau des bobines (Figure 2.7). L'analyse de ces dispositifs a montré leur capacité à

détecter une quantité minimale de 110 particules magnétiques (2.6 µm) fixées sur une surface active de 0,8 mm^2, ce qui donne une estimation de la limite de détection des dispositifs d'environ 4×10^{-14} M. Ceci montre le potentiel des dispositifs proposés pour la détection de très haute sensibilité de molécules biologiques.

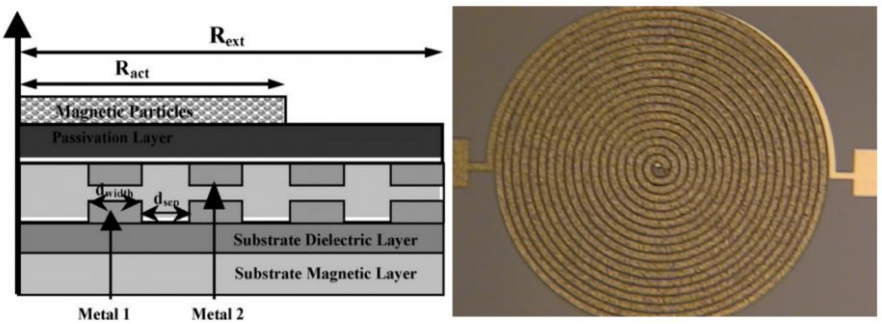


Figure 2.7 : (Gauche) Schéma de principe des microbobines à deux niveaux (Martinez, 2004) ; (droite) Image au microscope d'une microbobine deux niveaux fabriqué par Baglio et al.

Les auteurs ont donc présenté l'utilité d'une couche magnétique pour augmenter la sensibilité d'un dispositif de détection de NPM. Il est donc intéressant pour nous de partir de ce constat pour chercher à réaliser un circuit magnétique « complet » permettant de repousser les limites technologiques de la capture et la détection de NPM.

III - 3 - Synthèse

L'intensité de la force d'attraction dépend à la fois de l'intensité du champ magnétique et de sa variation. On doit donc maximiser la variation spatiale du champ magnétique ou rechercher un effet cumulatif de plusieurs conducteurs parallèles parcourus par le même courant, voire cumuler les deux effets. Les microbobines intégrées, électro-aimants commandables, ont des facultés de capture modérées par rapport aux aimants permanents. Il est donc nécessaire de dimensionner les microcanaux pour maintenir un flux suffisamment faible pour que la force d'attraction des NPM soit plus grande que la force fluidique.

L'insertion d'une couche magnétique permet d'amplifier et de canaliser les lignes de champ. Dans le cas de la détection magnétique, elle permet d'augmenter la sensibilité du dispositif. Les formes données aux matériaux magnétiques dans la littérature restent rudimentaires, du fait de la difficulté technologique de réalisation. La voie technologique d'amélioration du circuit magnétique est donc pertinente pour améliorer la détection des NPM.

IV -Dimensionnement de la microbobine de capture

La littérature a consacré les microbobines formées de conducteurs concentriques. Les présents travaux développent et complètent des simulations de microbobines de capture réalisées par Hong Ha (2016). Ses travaux ont introduit une méthodologie de simulation 2D, l'étude du champ magnétique et le facteur de mérite qui résume l'aptitude d'une bobine à engendrer un champ magnétique donné. Pour cette thèse, les simulations ont été à nouveau réalisées et étendues à l'analyse de la force, ainsi qu'à l'étude d'une nouvelle géométrie de bobines quasi-3D.-

IV - 1 - Méthodologie de simulation

La littérature montre que l'effet cumulatif d'enroulement est plus bénéfique que l'augmentation du gradient par alternance du sens du courant dans les conducteurs. Ce constat porte la conséquence que l'étude du champ magnétique réduite à une coupe longitudinale de la microbobine apportera la majorité des informations pertinentes pour le dimensionnement.

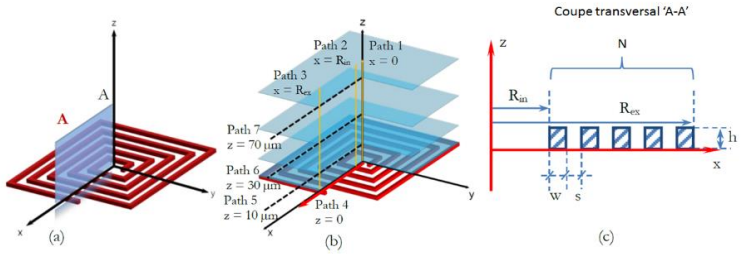


Figure 2.8 : Modèle de simulation : (a) Modèle de la microbobine ; (b) Calcul aux différentes positions présentes dans la simulation ; (c) Coupe transversale 'A-A' de la microbobine avec le détail des paramètres : w = largeur du cuivre, s = distance entre deux spires de cuivre, R_{in} et R_{ex} = rayon interne et externe de la microbobine (Hong Ha, 2016).

Le logiciel de simulation d'éléments finis ANSYS© a été utilisé pour calculer le champ magnétique généré par les microbobines. Pour des raisons de symétrie, seule la moitié de la coupe longitudinale est représentée. Comme dans les références (Ramadan, Samper, Poenar, & Yu, 2006a; Ramadan et al., 2004b, Hong Ha 2016), les grandeurs étudiées ont été extraites le long de quelques lignes, parallèles ou perpendiculaires au plan de la bobine. Ces lignes ont été choisies pour être représentatives de l'ensemble du volume du microcanal.

Paramètres utilisés	Valeurs
w (largeur du cuivre)	Variable
s (séparation entre deux spires)	10 µm
h (épaisseur du cuivre)	15 µm
N (nombre de spires)	Variable
Rex (rayon extérieur)	500, 750, 100 µm
J (Densité de courant)	Constant à 1.10^9 A/m²

Tableau 2.4 : Présentations des différents paramètres modifiés lors des simulations.

La Figure 2.8, montre la vue d'une microbobine simulée (coupe d'un plan x-z). Les positions des différentes lignes de calcul du champ magnétique sont présentées dans la Figure 2.8.b. Les lignes de 1 à 3, le long de l'axe z, sont définies pour différentes abscisses : le centre de la microbobine (x=0), le

rayon interne (x=Rin) et le rayon externe (Rex). Les lignes de 4 à 7, le long de l'axe x, sont définies pour différentes ordonnées : z=0, 10, 30, 70 µm.

IV - 2 - Résultats de simulation pour une microbobine simple

IV- 2 - a - Considérations générales sur le champ magnétique

Une carte de l'induction (ou densité de flux) magnétique calculée autour d'une microbobine est présentée Figure 2.9. Différentes lignes numérotées sont représentées. La microbobine représentée a pour paramètres : Rex = 500 µm, N = 20 spires, w = 10 µm, s = 10 µm et h = 15 µm.

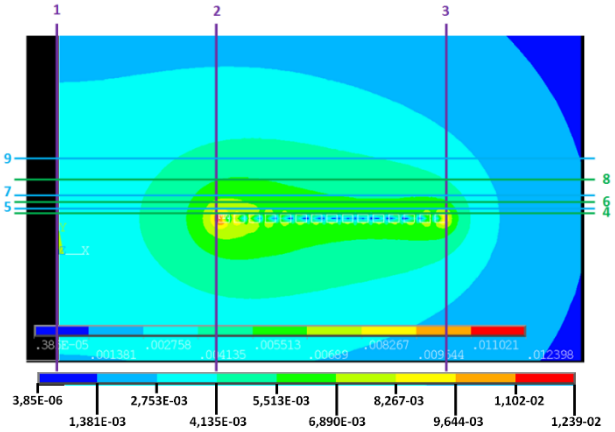


Figure 2.9 : Simulation de la densité du flux magnétique (B) pour une microbobine de paramètres R_{ex} = *500 µm, N = 20, w = 10 µm, h = 15 µm.*

Ces constats confirment graphiquement et qualitativement les conclusions de la littérature. L'intensité du champ magnétique est représentée par la carte de couleurs. Le changement rapide de couleurs traduit un fort gradient du champ magnétique. Cette carte représente donc le fait que la capacité de capture est plus importante aux abords de la surface de la microbobine (Beyzavi & Nguyen, 2008). La conclusion en termes de procédé de fabrication provient du fait que les microbobines ne peuvent pas être en contact direct avec le fluide du microcanal : la couche de protection des microbobines doit donc être la plus fine possible.

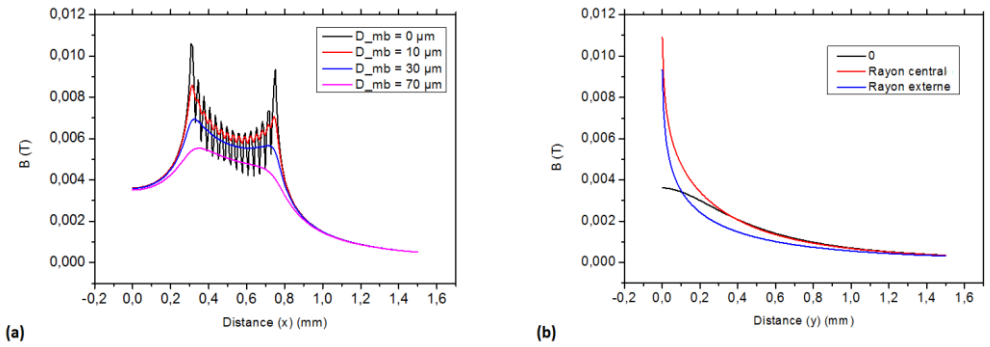


Figure 2.10 : Profil du champ magnétique (B) pour les microbobines pour (a) les lignes parallèles (lignes 4-9 Figure 2.9) et (b) perpendiculaires (lignes 1-3 Figure 2.9). D_mb = 0 µm représente la ligne 4, D_mb = 10 µm la ligne 5, D_mb = 30 µm la ligne 7 et D_mb = 70 µm la ligne 9.

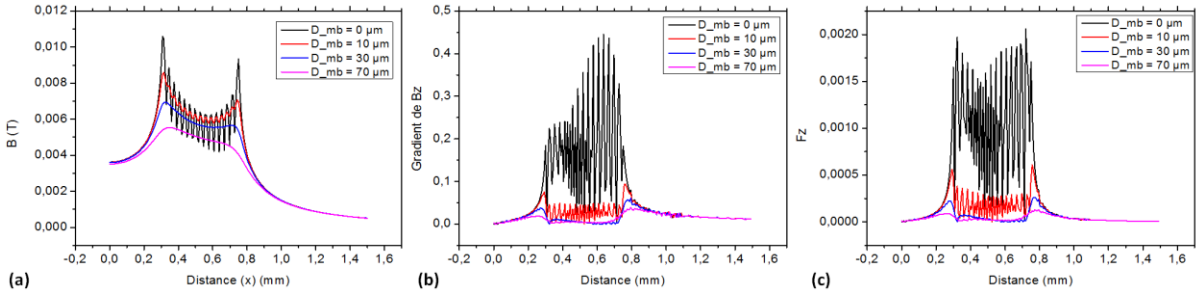


Figure 2.11(a) Forme générale du module B selon z, (b) gradient du module B selon z et (c) Produit de l'amplitude de B par son gradient selon z pour des microbobines ayant le même diamètre mais des nombres de spires différents

La valeur du module de l'induction magnétique a été extraite le long des lignes numérotées et le constat de la rapide diminution de l'induction magnétique avec l'éloignement de la microbobine est quantifié à la Figure 2.10.

La Figure 2.10.b montre que l'induction diminue de moitié dès que la distance à la surface de la bobine est de 200 µm. La Figure 2.101.a montré que le gradient du champ magnétique est fort (oscillations de la courbe) à la surface de la bobine mais que cet effet disparaît dès que la distance à la bobine est de plus de 10 µm. L'attraction maximale pour des distances est alors obtenue sur les bords intérieur et extérieur de la bobine. La distribution du module de B reste sensiblement la même quelle que soit la géométrie simulée. La Figure 2.101.bmontre que le gradient du champ magnétique$\nabla\vec{B}$, est très important au niveau des microbobines et devient quasiment nulle après 10 µm. En regardant le produit du champ magnétique par son gradient, on obtient l'allure de la force magnétique (Figure 2.101.c) et on observe une diminution très importante dès qu'on s'éloigne de la microbobine.

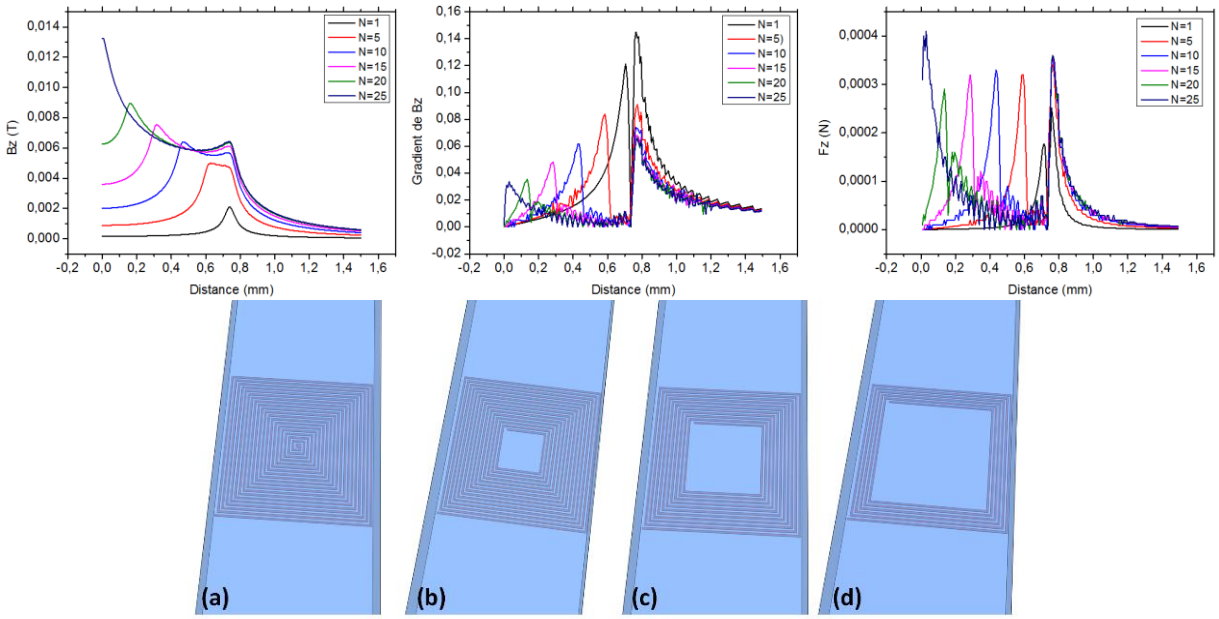


Figure 2.12 : (Haut) (Gauche) Forme générale du module B selon z (ligne 7 Figure 2.10), (Milieu) gradient du module B selon z et (Droite) Produit de l'amplitude de B par son gradient selon z pour des microbobines ayant le même diamètre mais des nombres de spires différents (Bas) Augmentation du nombre de spires de l'extérieur vers le centre N = (a) 20, (b) 15, (c) 10, (d) 5.

Un autre résultat est que l'augmentation du nombre de spires pour des dimensions données entraîne une augmentation de la valeur moyenne de B (Figure 2.12). Quelle que soit la configuration, le piégeage se produit de préférence à la surface des enroulements de la bobine. Le blocage des NPM se réalise principalement sur les bords de la bobine ou sur toute sa surface, en fonction de l'homogénéité du champ magnétique.

IV- 2 - b - Largeur des spires et distance interspires

En fixant la distance des rayons interne et externe de la microbobine, il est possible de réaliser une variation du nombre de spires, de l'espace entre les spires et de la largeur des spires. Les limites de la technologie de microfabrication des microbobines sont déterminées, entre autres, par les limites de résolutions de la lithographie en résine épaisse. Ces limites donnent un espace minimum entre les spires de quelque µm. Un espace de 10 µm a été choisi, ce qui correspond à une limite basse acceptable. Le taux de remplissage est donné par le ratio largeur de cuivre sur la distance entre 2 spires (*r=w/w+sp*).

A pertes volumiques constantes, Bmax est proportionnel à la quantité de cuivre (10 spires de 10 µm de large produisent approximativement le même champ magnétique que 5 spires de 20 µm). Des spires de largeur 10 µm permettent un taux de remplissage r=50%, des spires larges de 30 µm permettent r=75%. L'intensité du champ magnétique produit est approximativement augmentée de 3/2 pour ce dernier cas. La conséquence est qu'il serait légitime de proposer une bobine d'une seule spire, le taux de remplissage étant alors proche de 100% et le champ magnétique maximal. Cependant, lorsqu'un anneau conducteur a une largeur élevée, le courant ne se répartit pas uniformément dans la section du conducteur et la densité de courant n'est pas constante dans la section. Il en résulte une augmentation de la puissance dissipée.

Le nombre optimal de spires est donc donné par un compromis entre la maximisation du taux de remplissage et du maintien d'une largeur de cuivre faible devant le rayon des spires.

IV- 2 - c - Puissance consommée et facteur de mérite

La puissance perdue par effet Joule dans une microbobine est définie par :

$$\boldsymbol{P = R.I^2 = V_{Cu}\rho_{Cu}J^2} \qquad \textbf{(2-25)}$$

Où I est le courant passant au travers des spires, J est la densité de courant, ρ_{Cu} est la résistivité du cuivre et V_{Cu} est le volume total de cuivre.

Pour étudier la relation entre le champ magnétique et la puissance consommée, le facteur de mérite de puissance M_p peut être étudié.

$$\boldsymbol{M_p = \frac{B_{max}}{P}} \qquad \textbf{(2-26)}$$

Il permet de quantifier l'aptitude des microbobines à produire un champ magnétique pour une puissance donnée.

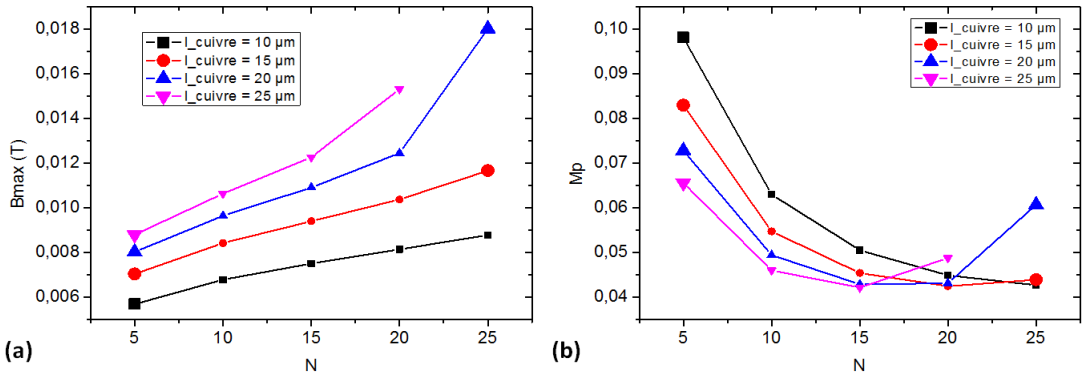


Figure 2.13 : Facteur de mérite de puissance en fonction du nombre de spires pour différentes largeurs de cuivre. Les points ajoutés par rapport à la thèse de Ha CAO sont en surépaisseur.

La courbe de Mp (Figure 2.13.a) indique que les différentes configurations de microbobines produisent un champ magnétique plus intense si l'espace central est rempli avec du cuivre. Un taux de remplissage supérieur (des spires plus larges) est également un facteur favorable à la création du champ magnétique. Pour un nombre de spires élevé permettant de remplir la surface, le facteur de mérite passe de 0,04 pour des conducteurs fins à 0,06 pour des conducteurs plus larges. Ainsi, pour une puissance Joule donnée, le champ magnétique est 1,5 fois plus intense, et la force d'attraction des NPM peut être doublée.

Nous confirmons et étendons également ici un des résultats de la thèse de Ha : le facteur de mérite en puissance des microbobines est maximal aux extrêmes des courbes, c'est-à-dire que des microbobines de capture doivent avoir soit très peu de spires, soit avoir une configuration qui remplit la surface occupée de spires. On voit ici également que pour très peu de spires, on obtient un facteur de mérite plus grand, mais une intensité de champ magnétique plus faible (Figure 2.13) et *a priori* une force plus faible (Figure 2.12.haut-droite).

Ces résultats nous conduisent à préférer des microbobines avec autant de spires qu'il est possible, des conducteurs dont la largeur est plus large que l'espace interspires, afin de maximiser en premier lieu la force d'attraction des nanoparticules, et de minimiser la puissance dissipée à puissance donnée.

IV - 3 - Microbobine avec une couche de matériau magnétique doux

IV- 3 - a - Choix du Permalloy© comme matériau magnétique

Le choix du matériau magnétique s'est rapidement porté vers le FeNi et en particulier vers le Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$. En effet, il fait partie de la famille des matériaux ferromagnétiques doux qui ont des propriétés intéressantes pour la caractérisation de microcapteurs magnétiques.

- Les domaines se modifient sous l'effet d'un champ magnétique, ce qui entraîne l'apparition d'une aimantation induite parallèle au champ magnétique (susceptibilité magnétique positive et élevée).
- La susceptibilité magnétique décroît avec la température car l'agitation thermique augmente. Cette propriété va entraîner un point important lors des discussions des étapes de fabrication. La température des échantillons doit être la plus faible possible lors des différentes étapes.
- Lorsque le champ magnétique est supprimé, il existe une aimantation rémanente. Cette dernière disparaîtra si un nouveau champ est appliqué.

D'autre part, le Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ a déjà été étudié dans le département MicroSystèmes et NanoBiofluidique, dans la fabrication de « fines » couches comparées aux épaisseurs que nous cherchons à atteindre. Ceci constitue le point de départ dans nos études de croissance en FeNi pour de grandes épaisseurs. Dans la littérature il est facile de trouver des études sur le dépôt de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ en fines couches par pulvérisation (Lee, Toney, & Mauri, 2000), ou par dépôt électrolytique (Johan, Iman, & Marion, 2015). L'étude et la caractérisation de dépôt de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ en couches épaisses sont plus rarement réalisées, d'où l'intérêt de notre développement technologique.

IV - 1 - Etude par simulation d'une microbobine avec une couche de matériau magnétique doux

On sait que les matériaux magnétiques permettent d'amplifier l'induction magnétique (B) obtenue pour un champ magnétique (H) donné par un facteur égal à la perméabilité relative (µr) du matériau. Certains auteurs ont mis à profit cette propriété pour améliorer la capture ou la détection (Baglio et al., 2007). Ce paragraphe présente les résultats de microbobines de même conception qu'au paragraphe précédent, sous lesquelles on a préalablement inséré une couche de matériau magnétique (Fe_xNi_y, le Permalloy©$Fe_{20}Ni_{80}$ dans le cas des présents travaux).

Une carte de l'induction (ou densité de flux) magnétique calculée autour d'une microbobine et d'une épaisseur de Permalloy© est présentée Figure 2.14. La Figure 2.14.b, permet d'observer que les lignes de champ sont bien canalisées par le Permalloy©, ce qui a pour conséquence de concentrer les lignes de champ au niveau des bobines et donc d'amplifier le champ magnétique.

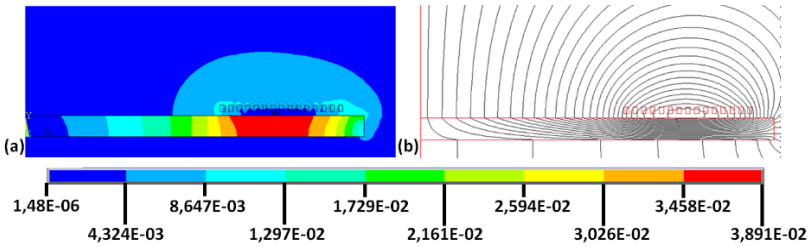


Figure 2.14 : Simulation de la densité du flux magnétique (B), en mT, pour une microbobine de paramètre R_{ex}= 500 µm, N = 15, w = 10 µm, h = 15 µm.

Les mêmes constats que pour des microbobines sans couche de Permalloy© sont visibles :

- les microbobines ne peuvent pas être en contact direct avec le fluide du microcanal : une couche de protection des microbobines doit être réalisée et elle doit être la plus fine possible.
- L'attraction maximale pour des distances est alors obtenue sur les bords intérieur et extérieur de la bobine.
- La distribution du module de B reste sensiblement la même quelle que soit la géométrie simulée.
- Les variations du module B permettent de donner l'indication du $\nabla\vec{B}$, ainsi plus la variation sera forte plus le $\nabla\vec{B}$ sera élevé.

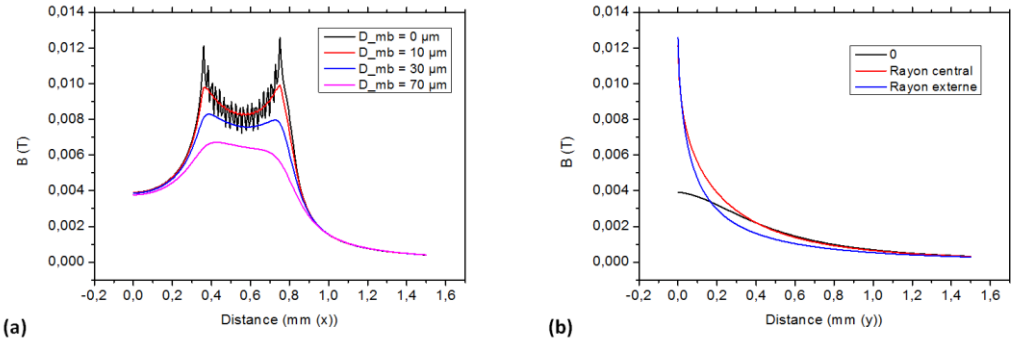


Figure 2.15 : Profil du champ magnétique (B) pour les microbobines avec une épaisseur de Permalloy© pour les lignes parallèles (a) et perpendiculaires(b).

La différence notable et attendue est l'augmentation du champ magnétique, et donc l'augmentation du facteur de mérite. La couche de Permalloy© permet une augmentation nette du champ magnétique maximal et du facteur de mérite de puissance (Figure 2.16). L'étude a été réalisée avec une couche de Permalloy© de 50 µm.

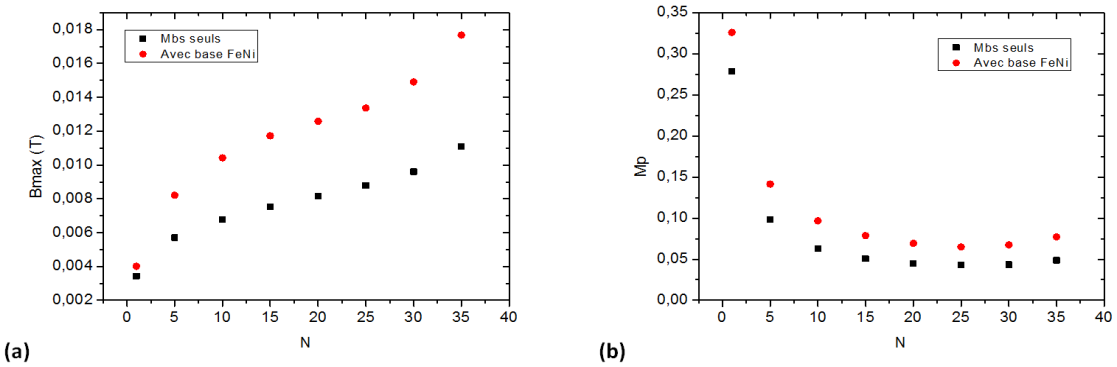


Figure 2.16 : Comparaison du champ magnétique maximal atteint (a) et du facteur de mérite de puissance (b) pour les microbobines de cuivre (mbs seuls) et les microbobines avec une couche de Permalloy© (Avec base FeNi).

Il est intéressant de se pencher sur l'effet de l'épaisseur de la couche de Permalloy© sur le champ magnétique. L'insertion d'une couche de Permalloy© de 10 µm permet de passer d'un champ magnétique de 12,72 mT à 17,59 mT, soit une augmentation de 38 %. La différence entre une couche de Permalloy© de 10 µm (17,59 mT) et une couche de 1 mm (17,89 mT) est seulement de 1,7 % (Figure 2.17).

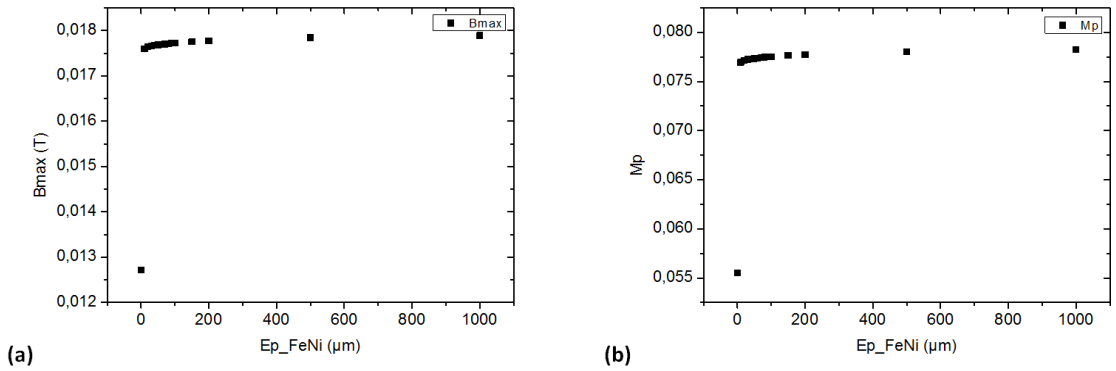


Figure 2.17 : Etude de la variation du champ magnétique maximal atteint et du facteur de mérite de puissance en fonction de l'épaisseur de Permalloy©.

L'insertion d'une couche de Permalloy© est donc très utile pour augmenter le maximum du champ magnétique mais il n'est pas nécessaire d'insérer une couche d'une grande épaisseur. Ce résultat est à rapprocher des résultats de la littérature qui prédisent un doublement de l'inductance (donc du champ magnétique) pour une couche d'épaisseur infinie ((Roshen, 1990) ; (Martinez, 2004, p56)).

Les autres études réalisées pour les microbobines seules l'ont été pour les microbobines accompagnées d'une couche de Permalloy©. Les résultats ont donné les mêmes conclusions générales, bien que le champ magnétique soit plus important.

IV - 2 - Conclusion du dimensionnement des microbobines de capture

L'étude des microbobines a été réalisée de nombreuses fois dans la littérature. De nombreux cas ont été étudiés. Cependant, la littérature ne permet pas de comparer les résultats de manière homogène : chaque famille de simulation de la littérature est effectuée avec des microbobines de dimensions différentes, de matériaux différents, de courants différents …

Quelques règles générales peuvent cependant être extraites de la littérature. En particulier les structures basées sur des spires concentriques sont préférables aux structures en méandres : le module du champ magnétique plus faible obtenu pour les structures en méandres n'est que partiellement contrebalancé par un gradient plus fort.

Les simulations réalisées pour nos microbobines ont permis d'extraire plusieurs principes, pour la plupart déjà identifiés dans les travaux précédents :

- le champ magnétique décroit rapidement le long de l'axe z.
- A plus de 50 µm de distance de la microbobine, l'intensité est réduite de 50 %.
- la surface du substrat doit être au maximum remplie avec des spires de cuivre.
- Il ne doit pas y avoir de vide au centre de la microbobine.

Une conséquence est que l'épaisseur de la couche protectrice des microbobines doit être la plus fine possible, qu'elle soit réalisée à partir d'un oxyde ou nitrure de silicium, ou par un polymère (PDMS, polyimide …).

- L'insertion d'une couche magnétique (ici de Permalloy©) sous la bobine permet une augmentation du champ magnétique.
- L'insertion de la couche de 10 µm entraîne une augmentation du maximum du champ magnétique (+38%).

L'insertion de la couche magnétique est un point de départ très intéressant dans l'évolution de nos microbobines.

Ce paragraphe nous permet donc de disposer d'un corpus de données homogènes, que nous pouvons utiliser comme référence pour comparer les structures de la littérature avec les structures des prochains paragraphes, qui n'ont été que peu ou pas étudiées dans la littérature pour des applications à la capture ou à la détection de nanoparticules et jamais réalisées.

V - Optimisation des performances de la détection magnétique : matériau magnétique

V - 1 - Introduction

Précédemment dans notre étude bibliographique, les bobines étudiées ont peu ou pas de matériau magnétique dans leur environnement. Le champ d'induction (B) obtenu à l'extérieur du matériau est d'autant plus important que la quantité de matériau magnétique est importante. L'idéal serait d'obtenir un circuit magnétique quasiment fermé, ne présentant qu'un faible entrefer. Si ces dispositifs sont courants dans le monde macroscopique (transformateurs ou inductances d'alimentations à découpage notamment), leur intégration en petite taille dans une géométrie quasiment planaire est très difficile. Il n'existe que 7 réalisations de transformateurs ou d'inductances avec un noyau magnétique fermé dans la littérature (Ã, Donnell, Roy, Mccloskey, & Mathuna, 2007; Anthony, Mathúna, & Rohan, 2016; Kim, Kim, Kim, & Herrault, 2015; Sirotkin, Walker, Terry, Smith, & Walton, 2014; Wang et al., 2005; Woytasik et al., 2006a; Yoon, Han, Yoon, & Kim, 1998) et aucune réalisation comportant également un circuit microfluidique.

L'intérêt d'un tel circuit magnétique « 3D » est très grand, puisqu'il pourrait fortement réduire le courant nécessaire à la capture et donc l'échauffement de la puce lors de la capture. Il pourrait également fortement augmenter la capacité de détection des microbobines ainsi fabriquées.

Pour ce travail, l'objectif est de dimensionner une microbobine (de détection) conçue avec un circuit magnétique quasiment fermé. La microbobine et son circuit magnétique doivent être intégrés au circuit microfluidique dont une partie sera formée par l'entrefer du circuit magnétique. Ce type de dispositif est inédit dans la littérature.

V - 2 - Présentation du dispositif

Un des enjeux du travail exposé ici est donc de proposer un dispositif pour lequel un procédé de fabrication peut être proposé. Un premier choix a été fait : nous garderons pour le dispositif choisi ici une bobine dont les enroulements sont situés dans le plan du substrat. Le dispositif présenté ici est donc de la famille des transformateurs 3D (Brunet, Donnell, & Brien, 2002) plutôt que (Woytasik et al., 2006b; Yoon et al., 1998).

La Figure 2.18 représente un schéma de principe d'une telle inductance : La partie (C) représente la bobine constituée de conducteurs de cuivre. Les parties (A), (D) et (E) représentent le circuit magnétique « fermé ». La partie (B) correspond à un matériau isolant et adhésif qui assure l'isolation des spires de la bobine entre elles et avec le circuit magnétique, et la cohésion des branches du circuit magnétique (B) et du plot central (E) avec la branche « porteuse » (A). Enfin, (F) représente le canal avec au fond une couche de NPM (G).

Le schéma de principe de la Figure 2.18 suppose une fabrication en plusieurs étapes, et notamment avec des étapes de report. Ces techniques ont été employées pour la fabrication de dispositifs en technologies hétérogènes dans plusieurs travaux du laboratoire (Brault, 2010; Dinh, 2016).

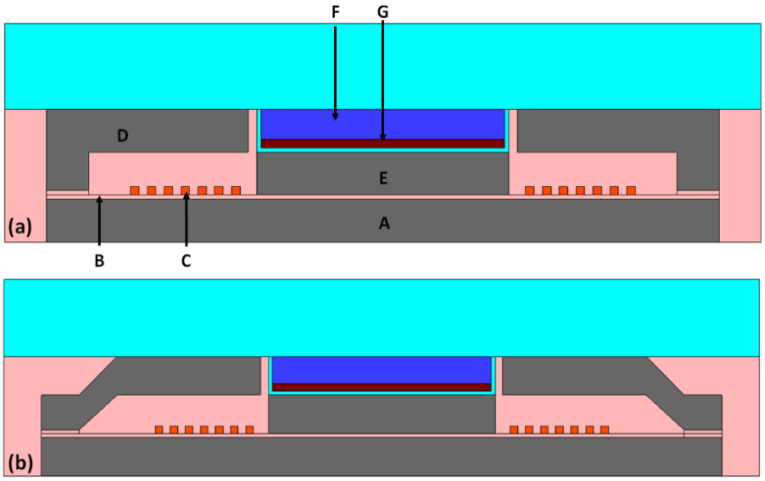


Figure 2.18 : Représentation schématique de la microbobine de détection en vue transversale. (a) poutre section droite, (b) poutre section inclinée.

Le schéma de la Figure 2.18 suppose une étape de transfert des bras (D). Cette étape technologique est risquée du fait de la non planéité du substrat donneur comme du substrat receveur (cf. Chapitre 3 V – 6). Un schéma alternatif (Figure 2.18.b) a été imaginé. Dans ce cas, l'ensemble des parties de Fer-Nickel peuvent être obtenues par croissance électrolytique. Seuls les bras font l'objet d'un transfert et il a lieu dans ce cas d'une surface plane vers une surface plane. C'est donc la variante Figure 2.18.a du procédé qui a été choisie pour le dimensionnement et la fabrication du dispositif de détection.

V - 3 - Eléments de dimensionnement du dispositif magnétique

V- 3 - a - Prédéterminations analytiques

Le calcul du champ magnétique, ou de l'inductance d'une bobine sans matériau magnétique ou sans circuit magnétique fermé, est largement empirique ou basé sur des calculs par éléments finis. Dans le cas d'un circuit magnétique fermé, la relation d'Hopkinson permet des calculs exacts. Ces calculs seront d'autant plus justes que la part d'ouverture du circuit magnétique (entrefer) est petite.

Pour un tel circuit magnétique, on a :

$\boldsymbol{\varphi} = \frac{Ni}{R}$ **(2-27)** et $\boldsymbol{u} = N\frac{d\varphi}{dt}$ **(2-28)**

La relation entre le courant et la tension aux bornes d'une bobine contenant un circuit magnétique est $\boldsymbol{u} = \frac{N^2}{R}\frac{di}{dt}$ **(2-29)**. L'inductance L est : $\boldsymbol{L} = \frac{n^2}{R}$ **(2-30)**. Elle varie donc en 1/R. Dans notre cas, le circuit présente différentes réluctances (équivalent de la résistance électrique) : la réluctance du matériau magnétique et la réluctance des entrefers. Le circuit étant considéré en série, les réluctances s'additionnent, il faut donc avoir le moins d'entrefer possible ou qu'ils soient négligeables[4]. En regardant de plus près la formule de la réluctance de l'entrefer: $\boldsymbol{R_e} = \frac{1}{\mu_0}\frac{e_{eq}}{A_e}$ **(2-31)**, il est notable que l'épaisseur d'entrefer e_{eq} doit être la plus faible possible pour diminuer la valeur de la réluctance. Dans le cas de la réluctance du matériau magnétique :

$$\boldsymbol{R_{fer}} = \frac{1}{\mu_e\mu_0}\frac{e}{A_e} \qquad \textbf{(2-32)}$$

[4] Rendre la réluctance des entrefers négligeables est difficile. La perméabilité du matériau magnétique (ici le Permalloy©) est de 3 à 4 ordres de grandeur supérieure à celle de l'air. 1 µm d'entrefer a donc le même effet que 1 mm de Permalloy©.

Les deux grandes conditions à retenir sont :

- Diminuer le nombre d'entrefers dans le circuit,
- Diminuer l'épaisseur des entrefers présents dans le circuit.

Le circuit magnétique (parties A, D et E) est coupé par le microcanal (F), éventuellement par les NPM (G) mais également par le matériau adhésif B. En l'absence de NPM, les parties F, et certaines parties de B représentent des entrefers pour le circuit (R_{e1}, R_{e2}, R_{e3}, R_{e4}).

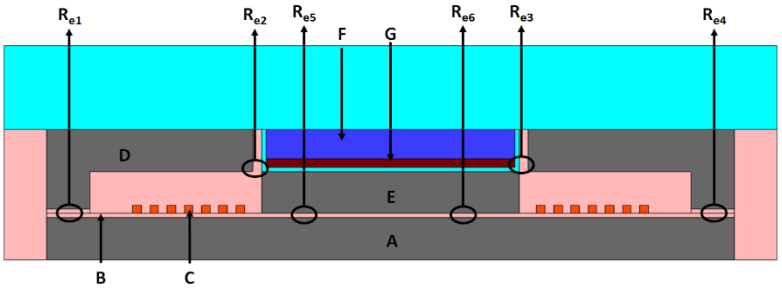


Figure 2.19 : Représentation schématique de la microbobine de détection en vue transversale, $R_{e1,2,3,4,5,6}$ représentant les résistances des entrefers.

La symétrie du dispositif conduit à $R_{e1} = R_{e4} = R_{e5} = R_{e6}$ et $R_{e2} = R_{e3}$. On obtient alors l'expression du champ magnétique en fonction des propriétés du circuit magnétique.

$$\boldsymbol{B} = \frac{\boldsymbol{ni}*\mu_{\boldsymbol{e}}\mu_{\boldsymbol{0}}\boldsymbol{A_e}}{\boldsymbol{S}} * \frac{\mathbf{1}}{\frac{\left(\boldsymbol{e_{eq1}}+\mathbf{2}*\boldsymbol{e_{eq2}}\right)^{\mathbf{2}}}{\mathbf{2}*\mu_{\boldsymbol{e}}(\boldsymbol{e_{eq1}}+\mathbf{2}*\boldsymbol{e_{eq2}})}+\boldsymbol{l_{fer}}} \qquad \textbf{(2-32)}$$

Le terme $\frac{ni*\mu_e\mu_0 A_e}{S}$ ne dépend pas de la géométrie. R_{e2} et R_{e3} sont fortement contraints par la présence du canal microfluidique. Les paramètres de conception se résument alors à déterminer les valeurs acceptables de R_{e2} et R_{e3}, ainsi que les valeurs acceptables de R_{e1} et R_{e4}, c'est à dire les dimensions des entrefers.

On remarque que le rôle de R_{e1} et R_{e2} (entrefers « technologiques » et entrefer du microcanal respectivement) est identique dans la formule du champ magnétique **(2-22)**.

La Figure 2.20 représente le champ magnétique moyen obtenu (tant dans les entrefers que dans le circuit magnétique) sous les hypothèses : R_{e1}=R_{e2} et R_{e1} fixe et R_{e2} variable (différentes échelles). On remarque que si les 2 entrefers sont très faibles (hypothèse non réaliste de par la présence du canal), dès les premiers microns, la présence d'un entrefer fait diminuer fortement la valeur du champ magnétique.

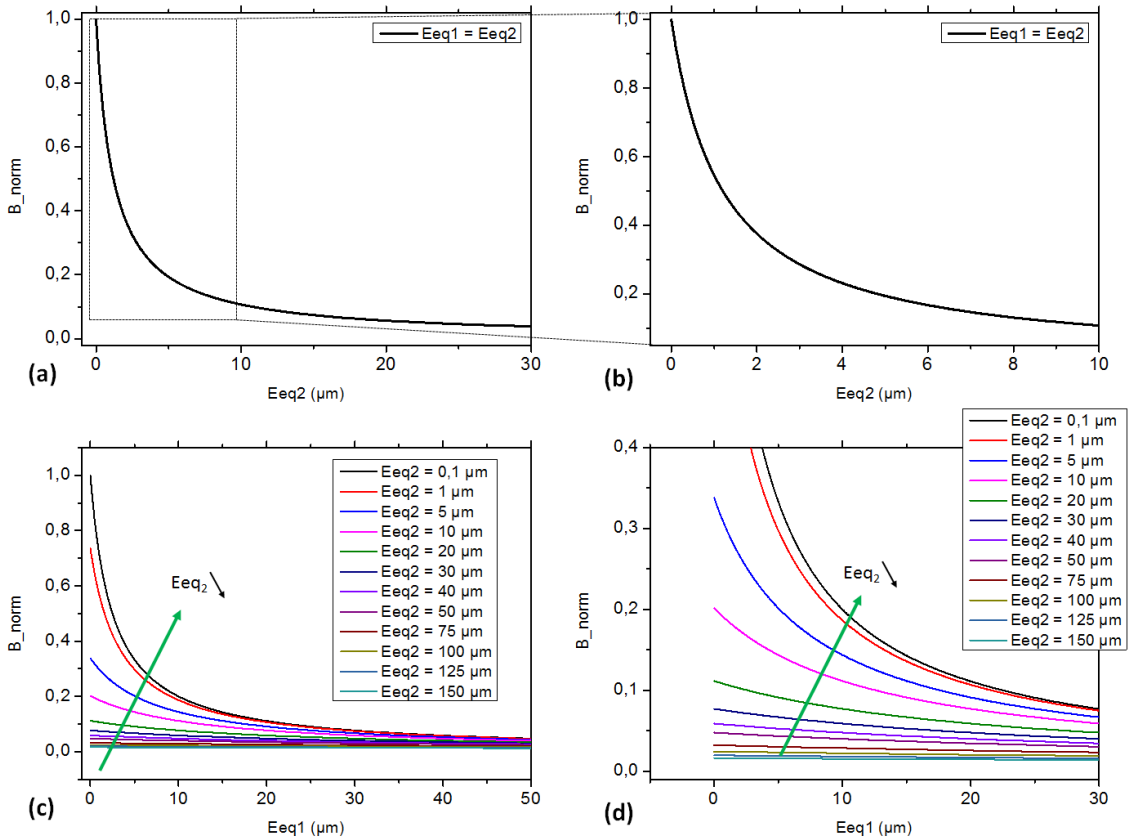


Figure 2.20 : Etude des entrefers dans le circuit magnétique dans le cas (a), (b) où la distance des entrefers est équivalente (c), (d) avec E_{eq2} fixe.

L'entrefer non lié au canal doit donc être conçu avec comme objectif de minimiser l'épaisseur de la couche adhésive.

V- 3 - b -Détermination par éléments finis

De la même manière que précédemment, la répartition du champ magnétique dans la zone d'intérêt (ici l'entrefer/le canal) n'est pas représentée fidèlement par les formules analytiques. Elle ne peut être connue que grâce à la modélisation par éléments finis. La Figure 2.21 représente une simulation d'une variante de l'inductance avec circuit fermé en poutre section droite, réalisée avec le logiciel Ansys®.

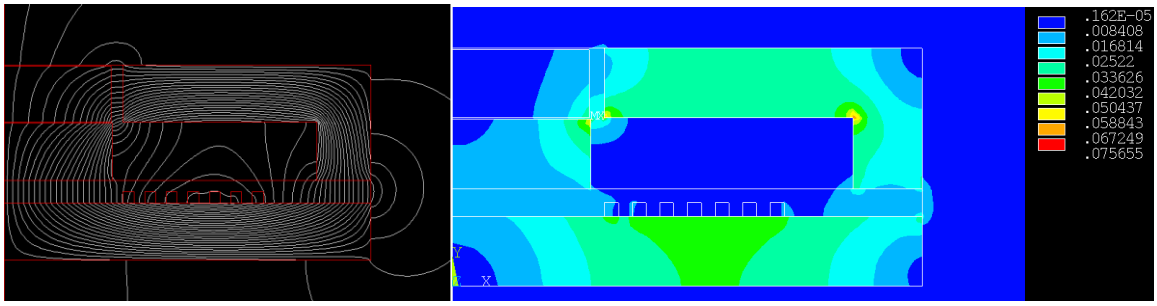


Figure 2.21 : Visualisation sous ANSYS du champ magnétique en vue transversale. (Gauche) lignes de champ magnétique et (Droite) intensité de l'induction magnétique (T).

On observe à la Figure 2.21.a que les lignes de champ sont canalisées dans les parties en FeNi. Une plus grande densité de lignes correspond à une induction magnétique plus importante (Figure 2.21.b), facteur favorable à la capture comme à la détection.

De la même façon qu'au paragraphe précédent, il est difficile de synthétiser l'effet du champ magnétique dans le canal microfluidique sur les NPM. Les résultats des simulations magnétiques ont donc été extraits le long de différentes lignes placées dans le canal. Ces lignes sont représentées à la Figure 2.22. Elles ont été choisies comme précédemment perpendiculaires à la microbobine (1-3) et parallèles à la microbobine (4-11). Le champ magnétique permet de prédire de quelle manière seront affectées les NPM en fonction de leur position dans le canal et d'adapter le dimensionnement à la capture ou la détection de NPM.

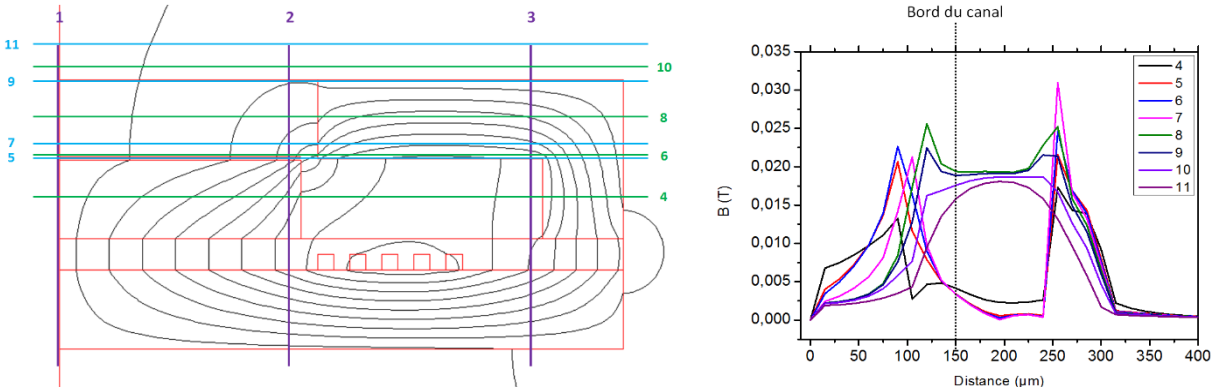


Figure 2.22 : (Gauche) Représentation schématique des lignes sur lesquelles le champ magnétique est calculé (Droite) Calcul des lignes de champ de 4 à 11 pour les dispositifs de détection complets, la ligne 8 va servir de ligne de référence pour la suite des simulations.

V - 4 - Etude du champ magnétique et du facteur de mérite de puissance après l'insertion d'un circuit magnétique

La Figure 2.23 présente les paramètres géométriques de la microbobine. Certains de ces paramètres ont été modifiés au cours des simulations dans le but d'observer leur influence.

Dans un premier temps nous avons fait varier les paramètres généraux de la microbobine (l'épaisseur de FeNi, le nombre de spires de cuivre, etc.) dans le but de déterminer les paramètres les plus intéressants pour nos études sur les NPM.

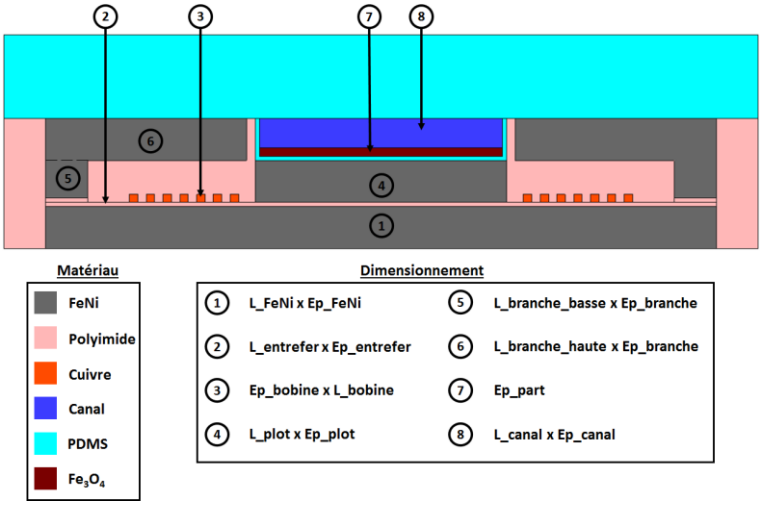


Figure 2.23 : Représentation schématique de la microbobine et de ses différents paramètres (Ep : Epaisseur et L : Largeur).

Pour cela il est nécessaire de fixer l'ensemble des paramètres pour n'en faire varier qu'un seul. Les paramètres ont été choisis à partir de l'épaisseur de la chambre fluidique (50 µm) :

Epaisseur FeNi	50 µm	**Epaisseur branche**	50 µm	**Epaisseur cuivre**	10 µm
Epaisseur entrefer	10 µm	**Largeur branche basse**	50 µm	**Largeur cuivre**	10 µm
Hauteur plot	50 µm	**Largeur branche haute**	90 µm	**Nombre de spires**	5
Epaisseur plot	50 µm	**Largeur branche moyenne**	50 µm	**Interspires**	10 µm
Largeur plot	500 µm			**Epaisseur particule**	0,5 µm
Largeur canal	500 µm			**Largeur particule**	0,5 µm

Tableau 2.5 : Dimensions des paramètres fixés pour la réalisation des simulations.

A chaque simulation les dimensions les plus avantageuses du paramètre étudié sont choisies et fixées pour les simulations suivantes.

V- 4 - b -Simulation du circuit magnétique avec différentes insertions du matériau magnétique autour des microbobines

L'intégration d'un matériau magnétique influe sur le champ magnétique. L'influence de l'insertion des différentes parties du circuit magnétique, sur le champ magnétique et le facteur de mérite, est étudiée ici. Dans la microfabrication du dispositif final, différentes étapes peuvent être séparées. Tout d'abord les microbobines seules (Figure 2.24.(a)), puis sur une couche de FeNi (Figure 2.24.(b)), puis en insérant un plot de FeNi (Figure 2.24.(c)) et enfin le dispositif final (Figure 2.24.(d)). Notons que les configurations des Figure 2.40.(a) et (b) sont celles déjà vues dans la littérature et décrites au paragraphe précédent.-

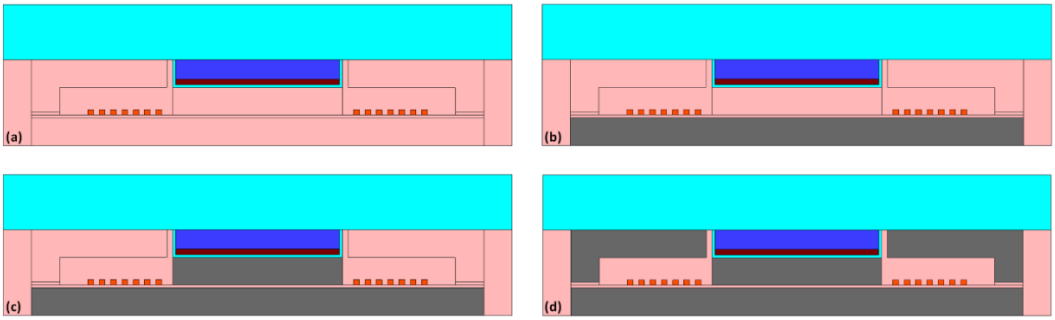


Figure 2.24 : Schéma des microbobines à différentes étapes de fabrication.

La Figure 2.25 présente l'amplitude du champ magnétique sur l'axe x en fonction des différentes étapes de fabrication. L'amplitude du champ magnétique est calculée :

- sur la ligne 8 (Figure 2.22), c'est-à-dire à 15 µm au-dessus du plot (dans le canal - Figure 2.25.a),
- sur la ligne 9 (Figure 2.22), c'est-à-dire à 20 µm au-dessus du plot (dans le canal - Figure 2.25.b).

Sur l'axe des abscisses, le canal finit à x=150 µm et les branches du circuit magnétique commencent à x=160 µm. On observe que l'insertion des branches complètes du circuit magnétique provoque une augmentation de l'amplitude du champ magnétique d'un ordre de grandeur environ.

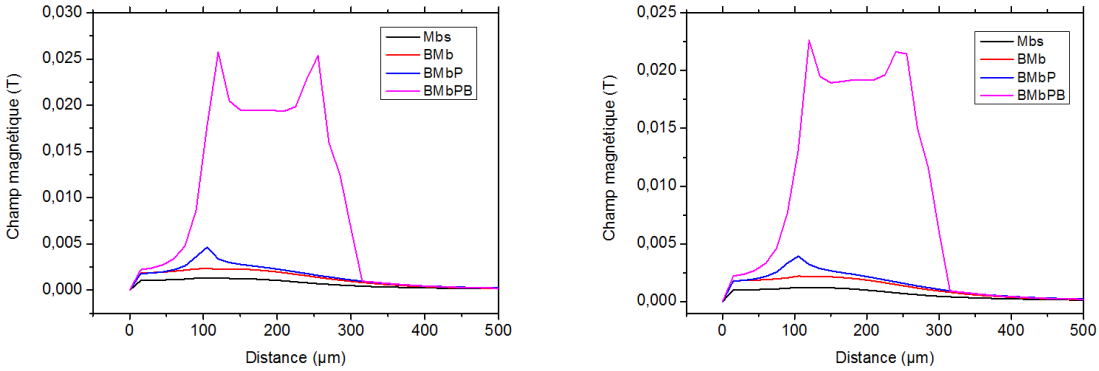


Figure 2.25 : Représentation du champ magnétique en fonction de l'axe x pour les lignes 8 et 9. Mbs : Microbobine seul, BMb : Base de FeNi et Microbobine, BMbP : Base de FeNi, Microbobine et Plot de FeNi, BMbPB : Base de FeNi, Microbobine, Plot de FeNi et Branche de FeNi.

Le champ magnétique augmente donc lors de l'insertion des branches de FeNi. Ce constat est parfaitement illustré par les cartes faisant apparaître les lignes de champ (Figure 2.26) pour les différentes étapes de fabrication étudiées. L'insertion du circuit magnétique à une bobine seule tend à concentrer ces lignes. Cette concentration, synonyme d'un champ magnétique plus intense s'accentue à chaque étape technologique d'insertion de matériau magnétique. Enfin, l'insertion des branches qui « ferment » le circuit magnétique sur le canal microfluidique permet nettement de rapprocher les fractions des lignes de champ situées dans le canal microfluidique. On obtient ainsi une meilleure sensibilité et une plus forte amplitude du champ magnétique.

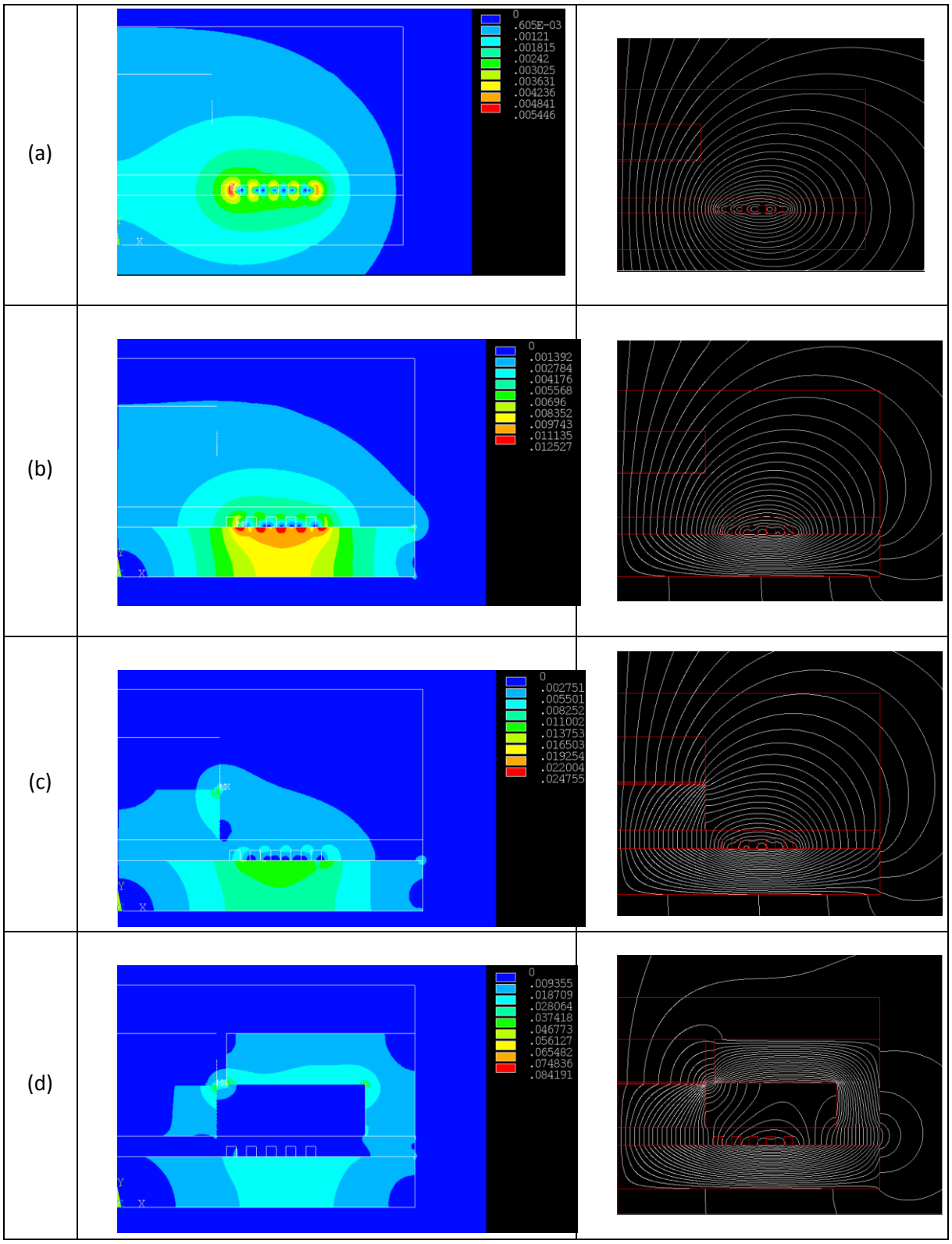


Figure 2.26 : Cartes des lignes de champ pour les différentes étapes de fabrication étudiées. (a) Microbobine seule, (b) Base de FeNi et Microbobine, (c) Base de FeNi, Microbobine et Plot de FeNi, (d) Base de FeNi, Microbobine, Plot de FeNi et Branche de FeNi.

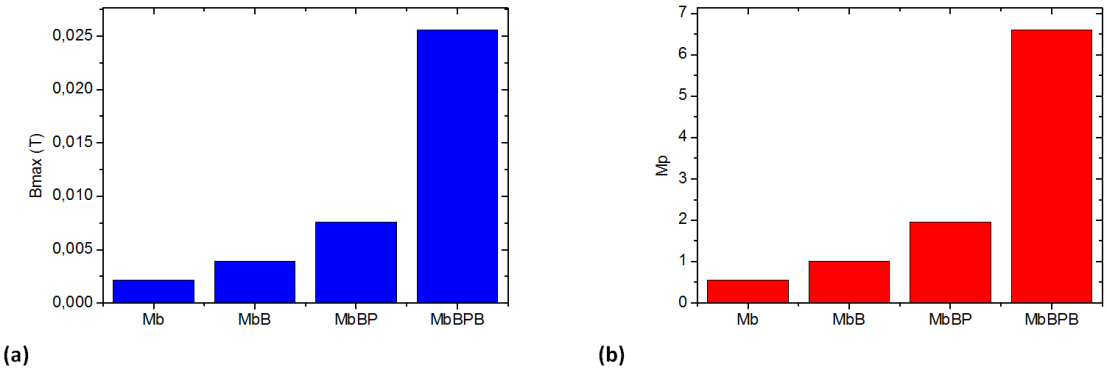


Figure 2.27 : Etude du champ magnétique maximal (a) et du facteur de mérite de puissance (b) pour les microbobines seules (Mbs), les microbobines avec une base de Permalloy© (MbB), les microbobines avec une base et un plot de Permalloy© (MbBP), les microbobines avec une base, un plot et des branches de Permalloy© (MbBPB).

La Figure 2.27.a présente une synthèse des résultats. Le maximum du champ magnétique augmente avec l'insertion des différents composants. La plus forte augmentation du champ magnétique est due à l'insertion des branches de Permalloy© ce qui correspond à la fermeture du circuit magnétique. La Figure 2.27.b présente l'effet sur le facteur de mérite, qui passe d'environ 0 ,5 pour la bobine seule à environ 6,5 pour le circuit magnétique complet.

V- 4 - c - Etude du champ magnétique en fonction du nombre de spires

En réalisant les simulations, les premiers résultats facilement observables sont les amplitudes du champ magnétique créé par la microbobine.

La Figure 2.28 appelle plusieurs observations. Tout d'abord le champ magnétique, dans tous les cas, passe principalement au travers de la branche de FeNi. L'augmentation du nombre de spires augmente l'amplitude du champ, ce qui aurait dû être de manière proportionnelle puisque l'hypothèse de simulation est que chaque spire est parcourue par un courant donné. Cette amplitude est bien plus forte dans les branches du circuit magnétique, en dehors du canal. Cette proportionnalité n'est pas vérifiée dans les branches du matériau magnétique aux abords du canal, ce qui traduit la dispersion des lignes de champ et une répartition du champ magnétique dans une zone du canal plus large qu'attendu.

L'augmentation du nombre de spires conduit également à un allongement des bras. On constate également, comme le prédisent les équations que cet allongement n'a pas de conséquence sur l'amplitude du champ magnétique dans le canal.

Il a été montré que l'insertion d'un circuit magnétique autour des microbobines augmente le champ magnétique. Comme pour l'étude des microbobines seules, la variation du nombre de spires dans le dispositif a été étudiée. Les autres paramètres ont été fixés selon le Tableau 2.5.

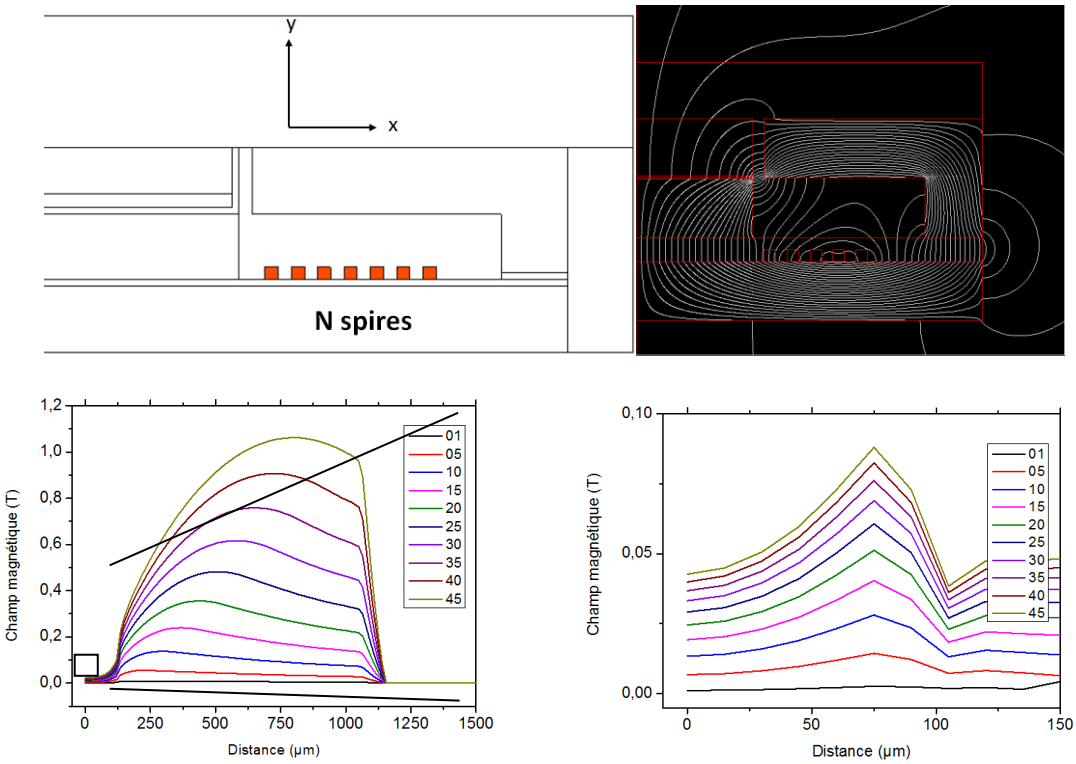


Figure 2.28 : Champ magnétique en fonction de l'axe x pour différents nombres de spires et une largeur de branche de FeNi fixe selon la ligne 9 (Figure 2.22).

La Figure 2.29.(a) permet d'observer que l'insertion du circuit magnétique permet une augmentation du maximum du champ magnétique par rapport à des microbobines seules. Pour 35 spires, le maximum du champ magnétique est multiplié par 1,84, par 5,74 en insérant une base et un plot magnétique et par 41,6 en en refermant le circuit magnétique.

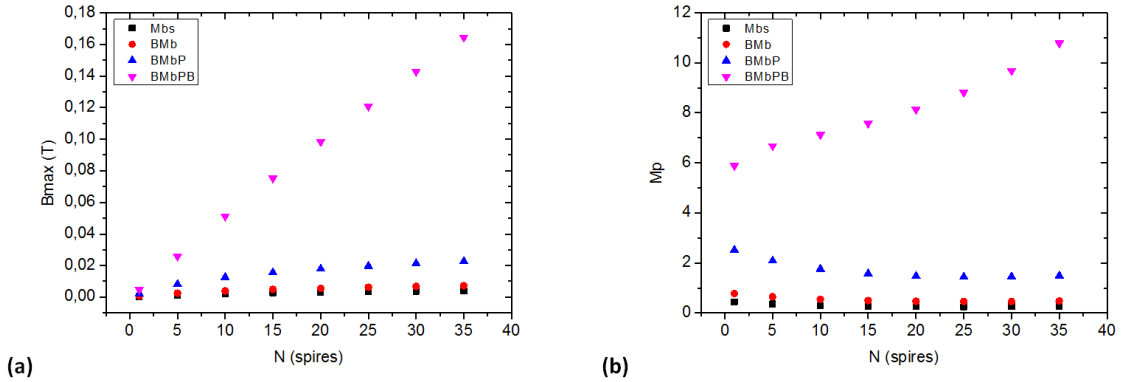


Figure 2.29 : Etude de la variation du champ magnétique maximal Bmax atteint (a) et du facteur de mérite de puissance (b) en fonction du nombre de spires pour des microbobines seules (Mbs) et des microbobines avec un circuit magnétique (MbBPB).

En revanche, pour le facteur de mérite de puissance Mp (Figure 2.29.(b)) seules les microbobines avec un circuit magnétique complet présentent une augmentation. En absence d'un circuit magnétique fermé le facteur de mérite de puissance diminue avec le nombre de spires.

V - 5 - Application à la détection de nanoparticules magnétiques

Le cas analysé dans ce paragraphe est la détection de NPM. Le paramètre étudié pour la mesure de la quantité de NPM est l'inductance de la microbobine. La sensibilité (ou variation) de l'inductance ΔL à la présence de NPM est la différence entre l'inductance en présence de NPM $\mathrm{L(NPM \neq 0)}$ dans le bas du canal et l'inductance en l'absence de NPM $L(NPM = 0)$ divisée par l'inductance de la microbobine en l'absence de NPM :

$$\boldsymbol{\Delta L = \frac{L(NPM \neq 0) - L(NPM = 0)}{L(NPM = 0)}} \qquad \textbf{(2-33)}$$

V- 5 - a - Etude de l'inductance et de la variation d'inductance en fonction du nombre de spires

Dans le but de conserver le flux magnétique, la largeur de la branche de FeNi a été modifiée en fonction du nombre de spires, en fixant donc les autres paramètres selon le Tableau 2.5.

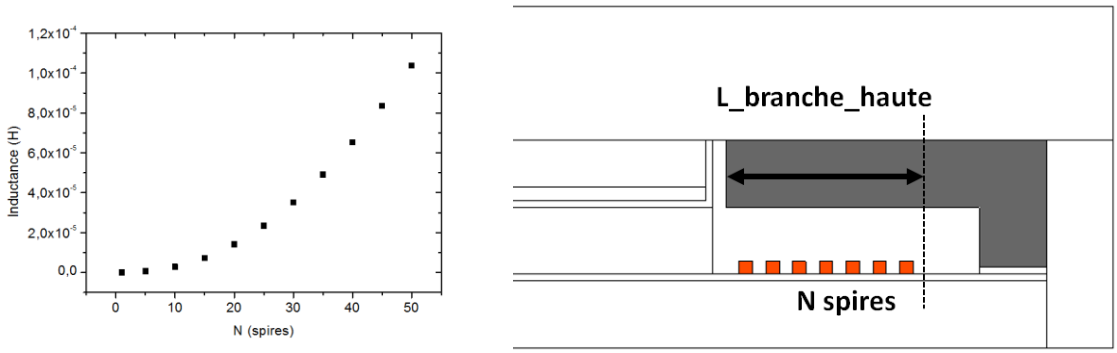


Figure 2.30 : Inductance en fonction du nombre de spires pour une épaisseur de NPM de 1 µm.

Le premier constat sur la Figure 2.30 est l'augmentation de l'inductance en fonction du carré du nombre de spires, comme le laisse supposer la formule de l'inductance **(2-30)**. La largeur de la branche ne semble pas affecter la valeur de l'inductance, ou très peu, ce qui était attendu, puisque la réluctance du circuit magnétique est peu affectée par cette largeur.

A priori, la variation d'inductance ne devrait pas non plus être affectée par le nombre de spires de la bobine, l'insertion de matériau magnétique (les NPM) agissant de la même manière sur le circuit magnétique. La Figure 2.31 présente la variation de la variation d'inductance de la microbobine calculée en fonction du nombre de spires pour les différentes insertions du circuit magnétique. On constate que la variation d'inductance est affectée, voire fortement affectée par la largeur des branches.

Pour le cas des microbobines seules (Figure 2.31.a), l'augmentation du nombre de spires entraine une baisse de la variation d'inductance de 0,11 à 0,03, soit une diminution de 73 %. Cette baisse est difficile à expliquer. On peut faire l'hypothèse que les fuites magnétiques (les lignes de champ passant en dehors du canal) deviennent plus importantes lorsque le nombre de spires augmente. Cette inductance fixe s'insère à la part de l'inductance affectée par la présence de NPM. La part variable de l'inductance est donc proportionnellement plus faible. Nous n'avons pas réalisé d'avantage de simulations pour étayer cette hypothèse.

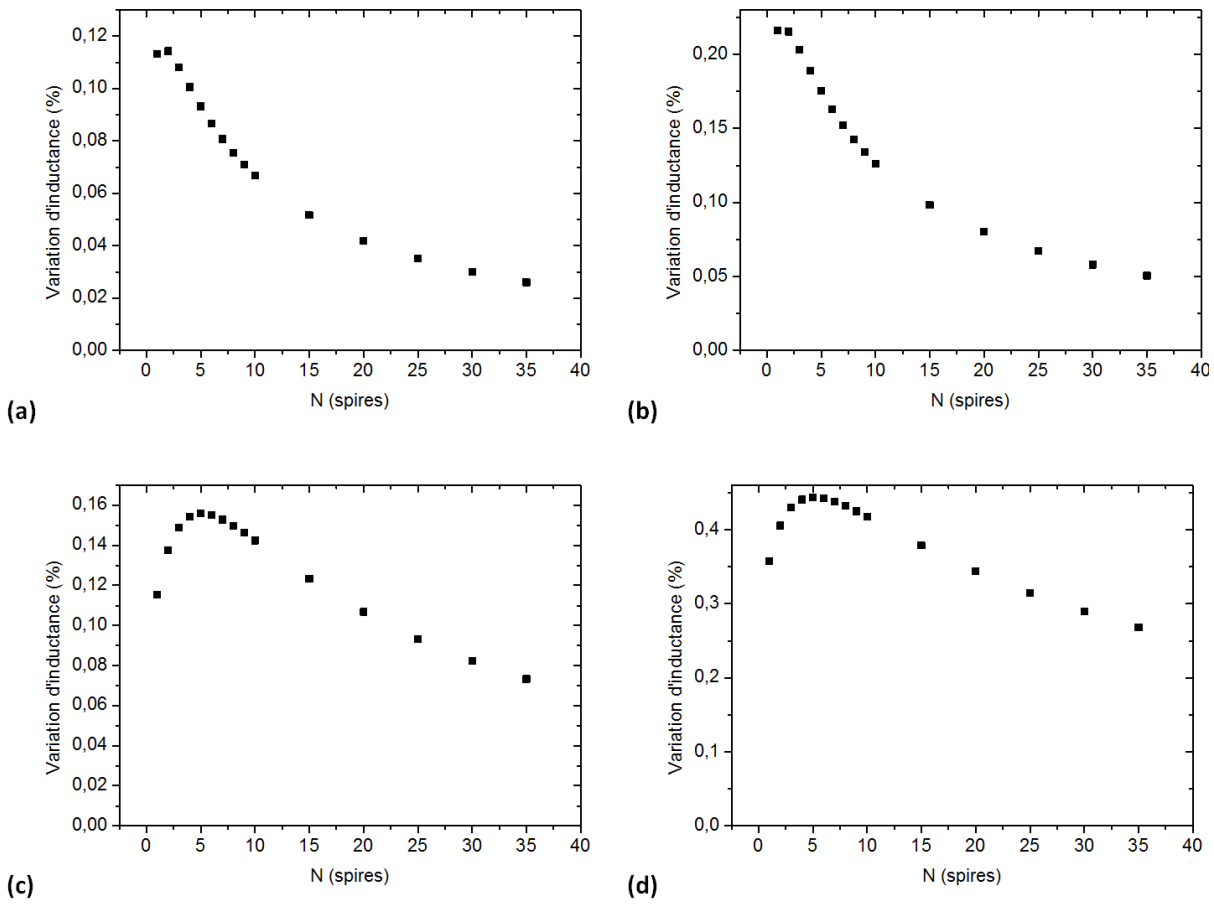


Figure 2.31 : Variation de la variation d'inductance en fonction du nombre de spires pour (a) les microbobines seules (Mbs), (b) les microbobines avec une base de Permalloy© (MbB), (c) les microbobines avec une base et un plot de Permalloy© (MbBP), (d) les microbobines avec une base, un plot et des branches de Permalloy© (MbBPB).

L'insertion d'une base de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ (Figure 2.31.b) augmente la variation d'inductance du dispositif et n'entraine pas de changement dans l'allure de la courbe.

L'apparition du plot de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ au centre du dispositif (Figure 2.31.c) entraine une modification de la courbe de la variation d'inductance en fonction du nombre de spires. Un optimum apparaît pour un nombre de spires égal à 5. De plus le maximum de la variation d'inductance est plus faible que pour les microbobines avec une base de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ (0,16 contre 0,22).

En refermant le circuit magnétique avec les branches de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ (Figure 2.31.d) le maximum de la variation d'inductance est multiplié par trois par rapport aux microbobines avec une base et un plot de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$. La courbe présente le même optimum à 5 spires.

Le maximum de la variation d'inductance est obtenu pour sept spires. La Figure 2.32 révèle l'intérêt de l'insertion du circuit magnétique : en effet l'insertion de chaque élément du circuit magnétique apporte une amélioration de la variation d'inductance du dispositif. Le maximum de la variation d'inductance est multiplié par quatre pour les microbobines avec une base, un plot et des branches de Permalloy© par rapport aux microbobines seules.

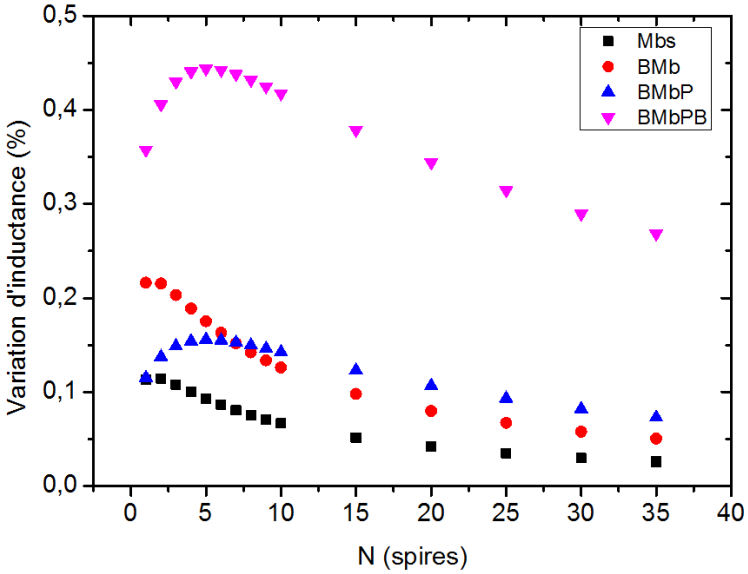


Figure 2.32 : Variation de la variation d'inductance (pour une épaisseur de NPM de 1 µm) en fonction du nombre de spires pour les microbobines seules (Mbs), les microbobines avec une base de Permalloy© (MbB), les microbobines avec une base et un plot de Permalloy© (MbBP), les microbobines avec une base, un plot et des branches de Permalloy© (MbBPB).

V- 5 - b -Influence de la technologie de fabrication des branches en FeNi

La Figure 2.18 proposait deux alternatives technologiques pour la fabrication des microbobines avec circuit magnétique. Un choix a été arrêté pour la fabrication. Cependant, l'influence de ce choix sur la variation d'inductance de la détection mérite d'être quantifiée.

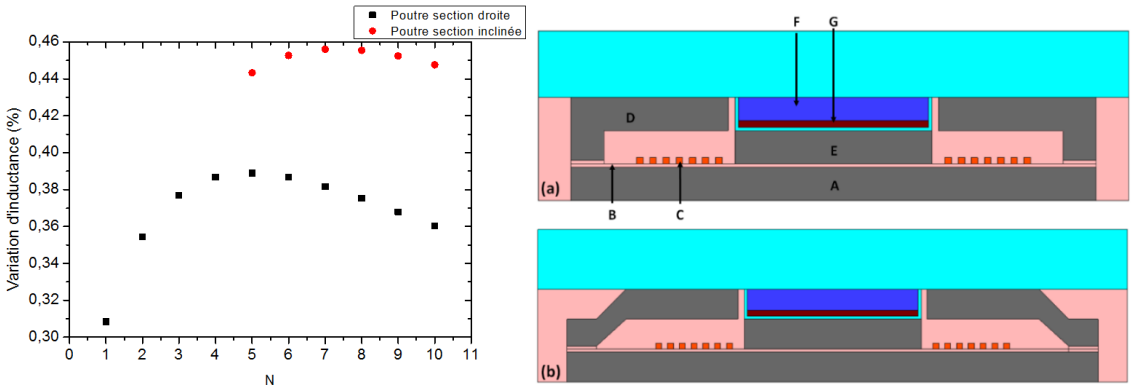


Figure 2.33 : Variation d'inductance en fonction du nombre de spires ; comparaison entre (a) la microbobine à poutre à section droite et (b) la microbobine à poutre à section inclinée.

La Figure 2.33 permet d'observer que la section inclinée permet d'obtenir une variation d'inductance plus importante et que les pics de variation d'inductance entre les deux sections sont décalés. La différence entre les deux variations d'inductance les plus importantes sont assez faibles. La variation d'inductance maximale est de 0,389% pour cinq spires dans le cas de la section droite et de 0,456% pour sept spires dans le cas de la section inclinée. La différence entre les deux maximums de variation d'inductance des deux types de microbobines proposées est de 0,067%, ce qui représente une amélioration de l'ordre de 15% en faveur de la section inclinée.

V- 5 - c - Epaisseur de la couche FeNi (Base)

L'épaisseur de la couche de FeNi (base pour la microbobine) est le deuxième paramètre étudié. Tous les paramètres (microbobine et circuit magnétique) ont été fixés, selon le Tableau 2.5, et l'épaisseur de la couche de FeNi a été étudiée pour des variations entre 0 et 900 µm.

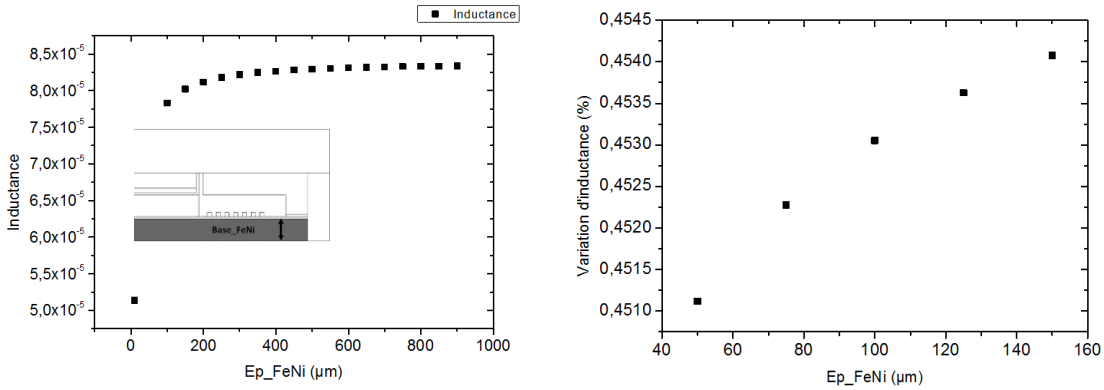


Figure 2.34 : Variation d'inductance en fonction de l'épaisseur de FeNi.

La Figure 2.34 présente la variation d'inductance et de variation d'inductance en fonction de l'épaisseur de la base de FeNi. Les résultats montrent une augmentation rapide de l'inductance avant d'atteindre un plateau à partir de 200 µm.

L'augmentation est conforme aux attentes : si un des termes de la formule **(2-29)** de l'inductance devient nul ou très grand, on obtient une courbe de cette nature, c'est-à-dire présentant un plateau où l'augmentation des paramètres n'entraînent plus de variation significative de l'inductance.

Une précision est néanmoins nécessaire ici : les simulations réalisées sont magnétostatiques. Or, la mesure de l'inductance dans le cas de microbobines à faible nombre de spires est le plus souvent réalisée à quelques centaines de kHz, voire quelques MHz. L'épaisseur de peau dans le FeNi de composition voisine (Xu, Liakopoulos, & Ahn, 1998) est de 24,5 µm à 100 kHz, 7,9 µm à 1 MHz et 2,5 µm à 10 MHz. L'effet favorable de l'augmentation de l'épaisseur pourra donc être constaté pour les applications de capture de NPM mais le sera beaucoup plus modérément pour les applications de détection.

V- 5 - d -Epaisseur de la branche de FeNi

L'étude suivante a été réalisée sur l'épaisseur de la branche de FeNi. Tous les paramètres (microbobine et circuit magnétique) ont été fixés, selon le Tableau 2.5, puis l'épaisseur de la branche a été modifiée entre 10 et 150 µm.

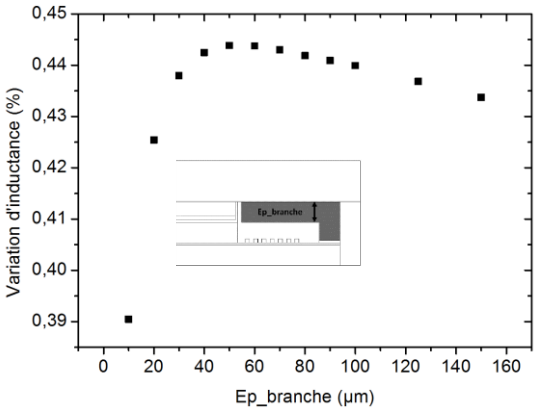


Figure 2.35 : Variation de la variation d'inductance en fonction de (A) l'épaisseur de la branche de FeNi.

La Figure 2.35 présente la variation de variation d'inductance de la microbobine en fonction de l'épaisseur de la branche. La partie intéressante des résultats de l'étude se situe autour des 50 µm d'épaisseur de branche. En effet un maximum de variation d'inductance est atteint à 50 µm d'épaisseur. Il convient donc de fixer l'épaisseur de la branche de FeNi à 50 µm. En fixant l'épaisseur des branches de FeNi, la hauteur du microcanal et l'épaisseur du plot de FeNi sont aussi fixées.

V- 5 - e - Largeur des branches de FeNi

Par la suite, nous avons fait varier la largeur des branches basse et moyenne, séparément, entre 25 et 200 µm. Les autres paramètres ont donc été fixés, selon le Tableau 2.5, pour observer les variations d'inductance liées à ces paramètres.

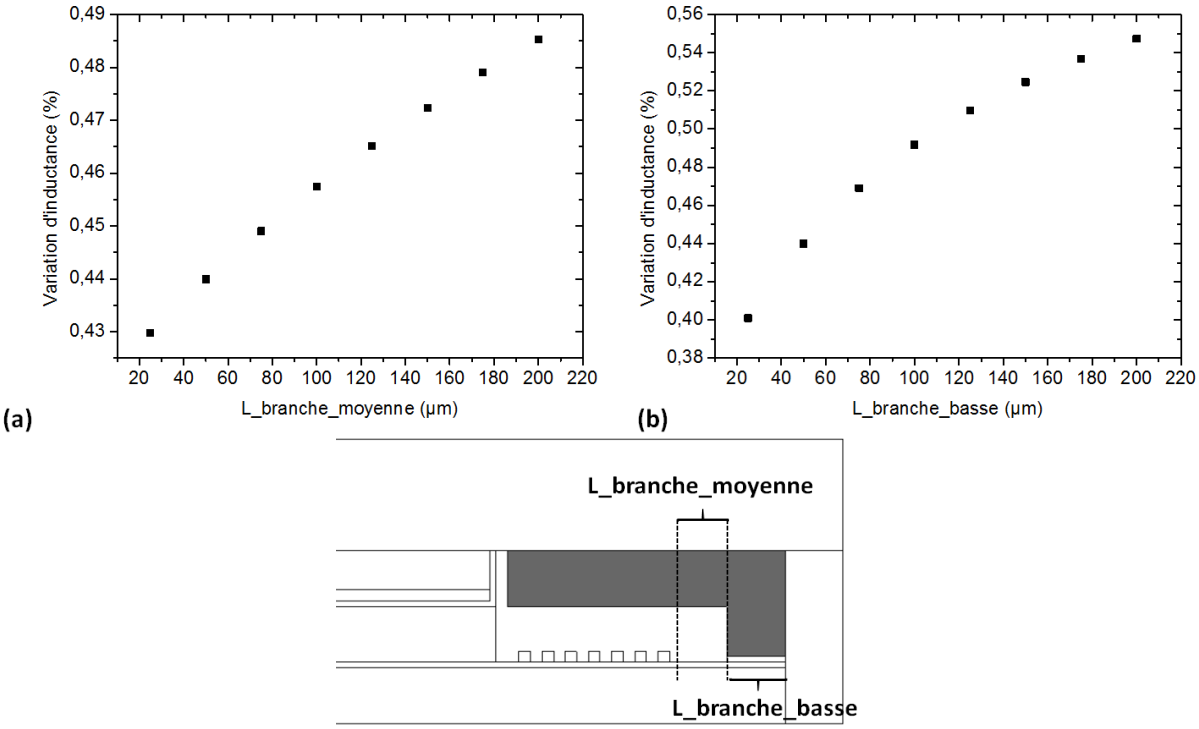


Figure 2.36 : Variation de la variation d'inductance en fonction de (Gauche) la largeur de la branche moyenne, (Droite) la largeur de la branche basse.

La Figure 2.36 permet d'observer que la variation d'inductance de la microbobine augmente avec l'augmentation de la largeur des branches basse et moyenne. En analysant les variations d'inductance on remarque que l'augmentation de la variation d'inductance de la branche moyenne est plus lente (de 0,43% à 25 µm à 0,49% à 200 µm) que pour la branche basse de 0,40% à 25 µm à 0,54% à 200 µm). Cela s'explique par le fait que la branche basse récupère plus de ligne de fuite en s'élargissant car elle se situe plus près des spires de cuivre.

V- 5 - f - Largeur de la chambre microfluidique

La variation de la largeur du canal microfluidique a été simulée, en faisant varier la largeur du plot (situé en-dessous de la chambre fluidique) de la même façon et en fixant les autres paramètres selon le Tableau 2.5 (Figure 2.37). Un maximum de variation d'inductance peut être observé pour une largeur de canal de 300 µm, ce qui nous permet de fixer le canal à 300 µm.

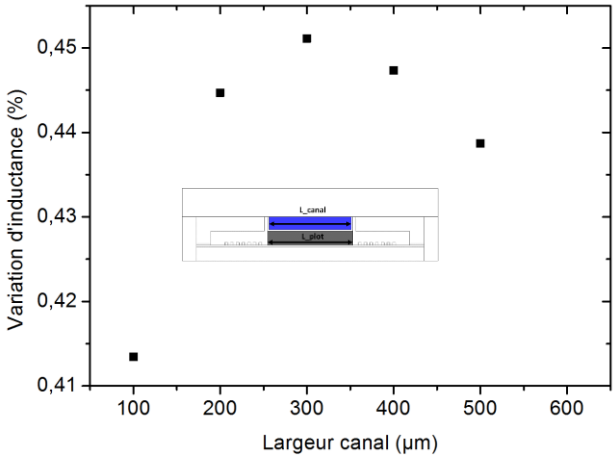
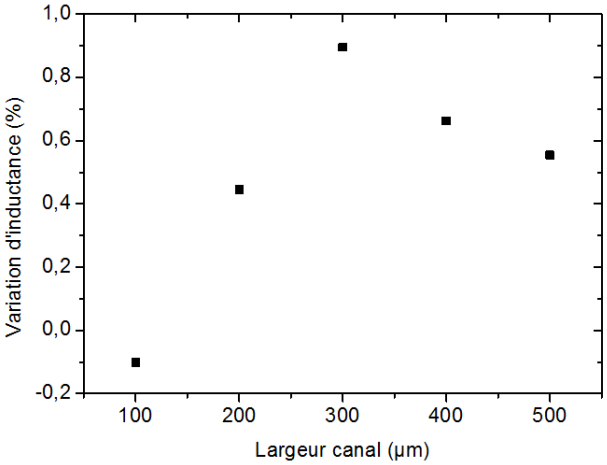


Figure 2.37 : Variation de la variation d'inductance en fonction de la largeur du canal pour une largeur de plot équivalente.

V- 5 - g - Largeur du plot de FeNi et largeur du canal microfluidique:

Enfin, le lien entre deux paramètres : la largeur du plot de FeNi et la largeur du canal microfluidique a été étudié. Ces deux paramètres sont liés car les lignes de champ vont se comporter différemment selon les cas suivants :

- la largeur du plot est plus faible que la largeur du canal,
- la largeur du plot est plus grande que la largeur du canal.



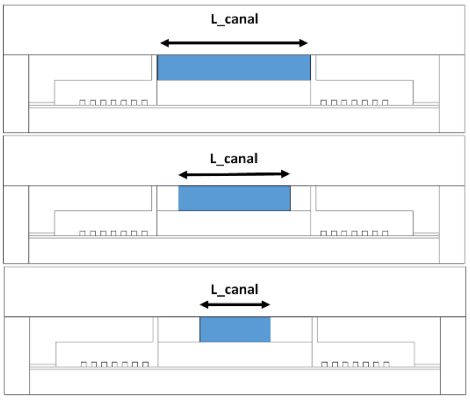


Figure 2.38 : Variation de l'inductance en fonction de la largeur du canal pour une largeur de plot fixe.

La largeur du plot a donc été fixée à 300 µm et nous avons fait varier la largeur du canal microfluidique entre 100 et 500 µm. Les résultats de la Figure 2.38 montrent un pic de variation d'inductance à partir du moment où la largeur du canal est égale à celle du plot de FeNi. On peut attribuer ce résultat à l'augmentation de l'entrefer, puisque la distance entre le bord du canal contenant les NPM et les branches de FeNi varie. Il est donc intéressant de garder les largeurs du plot de FeNi et du canal microfluidique équivalentes.

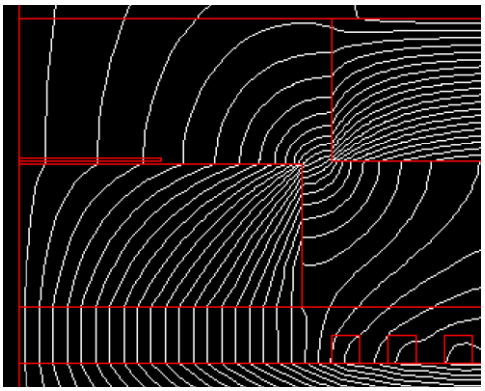


Figure 2.39 : Lignes de champ magnétique obtenues pour un canal de 100 µm et un plot de 300 µm (détail).

On remarque l'apparition d'une variation d'inductance négative pour une largeur du canal de 100 µm. La Figure 2.39 montre les lignes de champ simulé. Le bruit de simulation et l'erreur écartés, aucune explication n'a pu être proposée pour expliquer ce phénomène, qui devra être confronté à l'expérience.

V- 5 - h -Simulation de la microbobine à différentes étapes

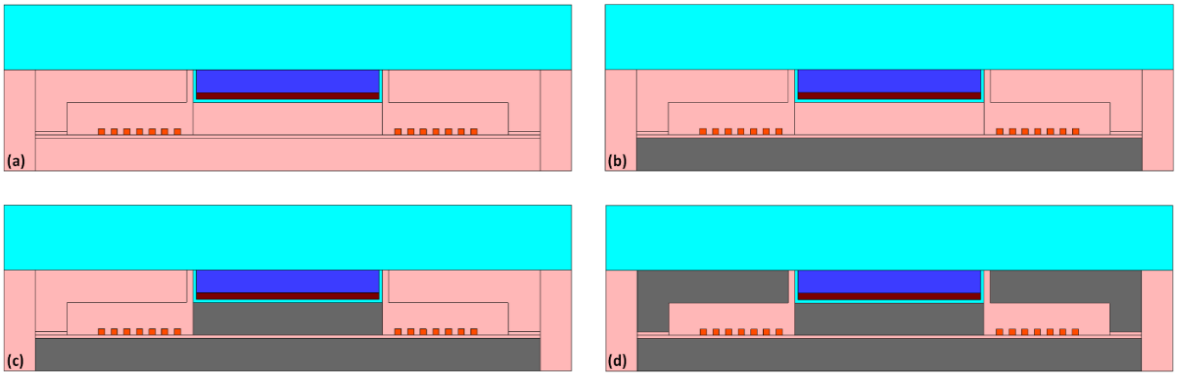


Figure 2.40 Schéma des microbobines à différentes étapes de fabrication (a) les microbobines seules (Mbs), (b) les microbobines avec une base de Permalloy© (MbB), (c) les microbobines avec une base et un plot de Permalloy© (MbBP), (d) les microbobines avec une base, un plot et des branches de Permalloy© (MbBPB).

La dernière étude en simulation réalisée a été l'étude des microbobines à différentes étapes de fabrication. Dans la microfabrication du dispositif final, différentes étapes peuvent être étudiées. Tout d'abord la variation d'inductance des microbobines seules (Figure 2.40.(a)), puis celle des

microbobines sur une couche de FeNi (Figure 2.40.(b)), puis en insérant un plot de FeNi (Figure 2.40.(c)) et enfin le dispositif final (Figure 2.40.(d)).

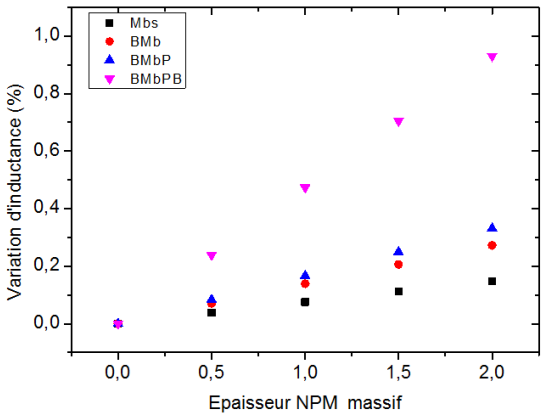


Figure 2.41 : Variation d'inductance des microbobines à différentes étapes de fabrication en fonction de l'épaisseur des NPM.

Les résultats présentés en Figure 2.41 montrent l'intérêt de chaque composant. La variation d'inductance ne cesse d'augmenter avec l'insertion des différents composants. Comme attendu, le plus grand saut de variation d'inductance (de 0,29 % à 0,94 %) est dû à l'intégration des branches de FeNi ce qui correspond à la fermeture du circuit magnétique.

V- 5 - i - Conclusion du dimensionnement du dispositif de détection

Le logiciel ANSYS© a permis de calculer l'inductance des différentes microbobines simulées. A partir de ces résultats la variation d'inductance des microbobines a été calculée, c'est-à-dire, la variation d'inductance entre la présence ou non de NPM. Ces calculs ont permis de réaliser des études sur les différents paramètres des microbobines imaginées. Ainsi, le nombre de spires, les dimensions des spires de cuivre, leur espacement, les dimensions et la forme du circuit magnétique ont été étudiés. Les paramètres de fabrication ont été choisis dans le but d'obtenir la plus forte variation d'inductance possible en prenant en compte les interactions entre les différents paramètres. Ces résultats ont permis d'établir une liste des différents paramètres de fabrication des microbobines. Ils sont récapitulés dans le Tableau 2.6 et la Figure 2.42.

Epaisseur FeNi	50 µm	**Epaisseur cuivre**	10 µm	**Hauteur plot**	50 µm
Largeur canal	300 µm	**Largeur cuivre**	10 µm	**Epaisseur plot**	50 µm
Epaisseur entrefer	10 µm	**Nombre de spires**	5	**Largeur plot**	300 µm
Epaisseur PDMS	20 µm	**Interspires**	10 µm		
Epaisseur particule	0,5 µm	**Largeur branche moyenne**	50 µm	**Epaisseur branche**	50 µm
Largeur particule	0,5 µm	**Largeur branche haute**	90 µm	**Largeur branche basse**	50 µm

Tableau 2.6 : Paramètres de la microbobine utilisée.

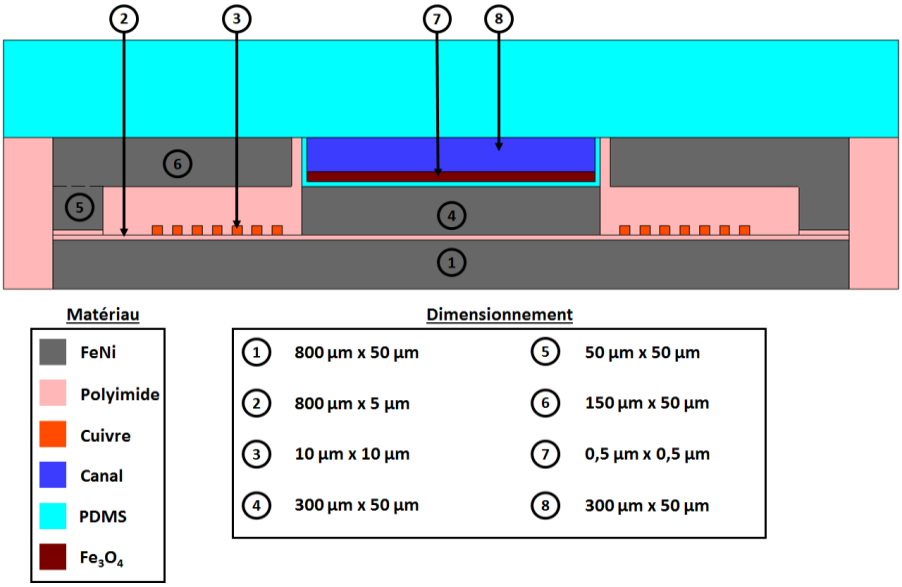


Figure 2.42 : Représentation schématique de la microbobine et des différents paramètres géométriques du circuit magnétique.

VI -Conclusion du chapitre 2

Dans un premier temps, le champ magnétique créé par des microbobines a été étudié et simulé par le logiciel ANSYS© dans le but d'étudier la capture des NPM par ce moyen et de compléter les travaux précédents. Les résultats de simulation donnent une vue d'ensemble du champ magnétique à différentes positions et distances de la microbobine. Les simulations ont montré que le champ magnétique décroit rapidement le long de l'axe z. Un fait marquant est qu'à plus de 50 µm de distance de la microbobine, l'intensité est réduite de 50 %. Ce résultat montre un point essentiel : l'épaisseur de la couche protectrice des microbobines doit être la plus fine possible.

De nombreuses règles de conception ont pu être déterminées à l'aide de ces résultats. La famille de géométries les plus efficaces pour la capture est composée des bobines. Les géométries de type méandres sont peu efficaces pour la création de champ magnétique. L'utilisation du facteur de mérite permet de conclure qu'il n'existe pas de géométrie « originale ». Les règles « de bon sens » s'appliquent : par exemple, la surface du wafer doit être au maximum remplie avec des spires de cuivre, il ne doit pas y avoir d'espace sans spire au centre de la microbobine. D'autre part, l'espace entre deux spires doit être minimisé : le facteur de remplissage (coefficient de foisonnement pour les enroulements macroscopiques) doit être rendu aussi proche de 1 que possible.

Dans un second temps, l'étude des microbobines de détection a été réalisée. Le but est de détecter les variations du champ magnétique en présence de NPM. L'un des objectifs est de chercher à détecter la plus faible quantité de NPM possible. Pour ce faire il a été décidé de s'appuyer sur l'inductance des microbobines et afin de comprendre facilement les résultats, sur la variation d'inductance de l'inductance aux NPM. Cette dernière est définie comme étant le rapport de la différence entre l'inductance en présence de NPM et l'inductance de la microbobine en l'absence de NPM divisée par cette dernière. De nombreux paramètres ont été étudiés tels que les dimensions des spires de cuivre, la largeur du canal ou encore les dimensions et la forme du circuit magnétique.

Une structure de microbobine originale a été proposée : elle inclut un circuit magnétique quasiment fermé et une chambre microfluidique (zone biosensible) dans la zone d'entrefer. Une telle géométrie est inédite dans la littérature. Les résultats ont permis de maximiser l'inductance et définir les dimensions des microbobines. Les différents paramètres simulés ont mis en valeur les paramètres clés (nombre de spires) qui vont affecter grandement la variation d'inductance de l'inductance au NPM et d'autres présentant un impact moindre (la largeur de la chambre fluidique et du plot de FeNi). C'est pour ces derniers que nous aurons lors de la fabrication une marge de manœuvre plus importante dans leur réalisation. Ces dimensions définies, les différentes étapes de fabrication du circuit magnétique ont été simulées et les résultats ont montré pour chaque étape un gain en variation d'inductance et donc une détection plus optimale des NPM dans la chambre microfluidique.

VII - Bibliographie

Ã, N. W., Donnell, T. O., Roy, S., Mccloskey, P., & Mathuna, C. O. (2007). Micro-inductors integrated on silicon for power supply on chip. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *316*. http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.02.098

Anthony, R., Mathúna, C. O., & Rohan, J. F. (2016). Microelectronic Engineering MEMS based electrochemical process for fabrication of laminated micro-inductors on silicon. *Microelectronic Engineering*, *155*, 33–38. http://doi.org/10.1016/j.mee.2016.02.009

Baglio, S., Pérez-rodríguez, A., Martínez, S., Serre, C., Morante, J. R., & Esteve, J. (2007). Microinductive Signal Conditioning With Resonant Differential Filters : High-Sensitivity Biodetection Applications. *IEEE Transaction on instrumentation and measurement*, *56*(5), 1590–1595.

Benali Khoudja, M.Hafez, M. (2014). VITAL : A VIbroTActiLe Interface with Thermal Feedback. *IRCICA*, (July).

Beyzavi, A., & Nguyen, N. (2008). Modeling and Optimization of Planar Microcoils. *Journal of Micromechanics and Microengineering*.

Brault, S. (2010). *Etude du procédé de transfert de films. Applications Encapsulation sur tranche et Elaboration de micro-dispositifs*. Université Paris-Sud.

Brunet, M., Donnell, T. O., & Brien, J. O. (2002). Thick photoresist development for the fabrication of high aspect ratio magnetic coils. *Journal of Micromechanics and Microengineering*.

Carrasco, J. A., Soto, J. F., Maganto, F., & Moro, C. (2001). A method for calculating the magnetic ® eld produced by a coil of any shape. *Sensors and Actuators A Physical*, *91*, 230–232.

Chen, C., & Hsu, S. (2013). Multi-layer planar micro-coils chip as actuators and heaters for biological applications. *Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), 2012 IEEE*, 392–395. http://doi.org/10.1109/BioCAS.2012.6418414

Dinh, N. H. T. (2016). *Etudes technologiques de composants PDMS pour applications biomédicales : développement de capteurs souples de pression par transfert de film*.

Fulcrand, R., Bancaud, A., Escriba, C., He, Q., Charlot, S., Boukabache, A., & Gué, A. (2011). Chemical On chip magnetic actuator for batch-mode dynamic manipulation of magnetic particles in compact lab-on-chip. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, *160*(1), 1520–1528. http://doi.org/10.1016/j.snb.2011.08.011

Hejazian, M., Li, W., & Nguyen, N.-T. (2015). Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. *Lab Chip*, *15*(4), 959–970. http://doi.org/10.1039/C4LC01422G

Hong Ha, C. (2016). *The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications Hong Ha Cao To cite this version : Discipline : physique Microsystèmes pour Biomédical Thèse de doctorat*. Université Paris Saclay.

Hosseini, A., Philpott, D. N., & Soleymani, L. (2017). Enrichment of magnetic particles using temperature and magnetic field gradients induced by benchtop fabricated micro-electromagnets. *Lab on a Chip*, 4097–4104. http://doi.org/10.1039/c7lc00825b

Kakri-Bouchet, L., & Zahraoui, M. (2017). Implantable Microcoil for In-vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, *3*(2), 2–6. http://doi.org/10.15406/ijbsbe.2017.03.00056

Kim, J., Kim, M., Kim, J., & Herrault, F. (2015). Anisotropic nanolaminated CoNiFe cores integrated into microinductors for high-frequency dc – dc power conversion. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *462001*, 462001. http://doi.org/10.1088/0022-3727/48/46/462001

Koo, C., Godley, R. F., Park, J., Mcdougall, M. P., Wright, M., & Han, A. (2011). A magnetic resonance (MR) microscopy system using a microfluidically. *Lab on a Chip*, 2197–2203. http://doi.org/10.1039/c1lc20056a

Kriz, K., Gehrke, J., & Kriz, D. (1998). Advancements toward magneto immunoassays, *13*, 817–823.

Larimi, M. M., Ramiar, a., & Ranjbar, a. a. (2014). Numerical simulation of magnetic nanoparticles targeting in a bifurcation vessel. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *362*, 58–71. http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.03.002

Miao, X., Dai, X., Huang, Y., Ding, G., & Zhao, X. (2014). Segmented magnetic circuit simulation of the large displacement planar micro-coil actuator with enclosed magnetic yokes. *Microelectronic Engineering*, *129*, 38–45. http://doi.org/10.1016/j.mee.2014.07.006

Pancharoen, K., Zhu, D., Beeby, S. P., Maeguchi, T., & Masuda, A. (2015). Silicon MEMS bistable electromagnetic vibration energy harvester using double-layer micro-coils Silicon MEMS bistable

electromagnetic vibration energy harvester using double-layer micro-coils. *Journal of Physics*. http://doi.org/10.1088/1742-6596/660/1/012124

Pawinanto, R. E., Yunas, J., Said, M. M., & Noor, M. M. (2014). Design and Fabrication of PCB Based Planar Micro-coil For Magnetic MEMS Actuator. *IEEE*, 487–490.

Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D. P., & Yu, C. (2006a). An integrated microfluidic platform for magnetic microbeads separation and confinement. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*(9), 1693–1702. http://doi.org/10.1016/j.bios.2005.08.006

Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D., & Yu, C. (2004a). On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *281*, 150–172. http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.04.100

Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D., & Yu, C. (2004b). On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *281*(2–3), 150–172. http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.04.100

Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D., & Yu, C. (2006b). Magnetic-based microfluidic platform for biomolecular separation. *Biomedical Microdevices*, *8*(2), 151–158. http://doi.org/10.1007/s10544-006-7710-x

Roshen, W. A. (1990). Effect of Finite Thickness of Magnetic Substrate on Planar Inductors. *IEEE Transactions on Magnetics*, *26*(1).

Sirotkin, E., Walker, R., Terry, J. G., Smith, S., & Walton, A. J. (2014). Air-CPW test structure for broadband permeability spectra measurements of thin ferromagnetic films. *IEEE Conference on Microelectronic Test Structures*, 177–181.

Snr, I., & Temperature, W. (1992). Three-dimensional NMR microscopy : improving SNR with temperature and microcoils. *Magnetic Resonance Imaging*, *I*(D), 279–288.

Wang, N. Ã., Donnell, T. O., Roy, S., Brunet, M., Mccloskey, P., & Mathuna, S. C. O. (2005). High-frequency micro-machined power inductors. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *291*, 1347–1350. http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.11.434

Webb, A. G. (2012). Radiofrequency microcoils for magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Journal of magnetic resonance*. http://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.10.004

Woytasik, M., Grandchamp, J., Gilles, J., Megherbi, S., Martincic, E., Mathias, H., & Crozat, P. (2006a). Two- and three-dimensional microcoil fabrication process for three-axis magnetic sensors on flexible substrates. *Sensors and Actuators A*, *132*, 2–7. http://doi.org/10.1016/j.sna.2006.06.062

Woytasik, M., Grandchamp, J., Gilles, J., Megherbi, S., Martincic, E., Mathias, H., & Crozat, P. (2006b). Two- and three-dimensional microcoil fabrication process for three-axis magnetic sensors on flexible substrates, *132*, 2–7. http://doi.org/10.1016/j.sna.2006.06.062

Xu, M., Liakopoulos, T. M., & Ahn, C. H. (1998). A Microfabricated Transformer for High-Frequency Power or Signal Conversion. *IEEE Transactions on Magnetics*, *34*(4 PART 1), 1369–1371. http://doi.org/10.1109/20.706551

Ying, Q., Ning, W., Cheng, L., Koh, G., Yeung, H., Wen, L., & Lew, S. (2016). Isolation of magnetically tagged cancer cells through an integrated magnetofluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1–9. http://doi.org/10.1007/s10404-016-1804-4

Yoon, J.-B., Han, C.-H., Yoon, E., & Kim, C.-K. (1998). Monolithic Fabrication of Electroplated Solenoid Inductors Using Three-Dimensional Photolithography of a Thick Photoresist. *The Japan Society of Applied Physics*, *37*. http://doi.org/10.1143/JJAP.37.7081

Yunas, J., Majlis, B. Y., & Bais, B. (2015). Fabrication and testing of electromagnetic MEMS microactuator utilizing PCB based planar micro-coil. *Asian Research Publishing Network*, (January).

Zhi, C., Shinshi, T., Saito, M., & Kato, K. (2014). Sensors and Actuators A : Physical Planar-type micro-electromagnetic actuators using patterned thin film permanent magnets and mesh type coils. *Sensors & Actuators: A. Physical*, *220*, 365–372. http://doi.org/10.1016/j.sna.2014.10.012

Zhu, X., Cheng, P., Chen, P., & Ding, G. (2018). Design , Simulation and Fabrication of A MEMS- based Double-layer Spiral Planar Inductor with Patterned Permalloy as Magnetic Layers Design , Simulation and Fabrication of A MEMS-based Double-layer Spiral Planar Inductor with Patterned Permalloy as Magnet. *Journal of Physics*. http://doi.org/10.1088/1742-6596/986/1/012036

Chapitre 3

Procédés de fabrication d'un dispositif fluidique intégrant des microbobines de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques

---

I - Introduction

Ce chapitre présente les différents procédés de fabrication des dispositifs de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques (NPM) qui sont au cœur de cette thèse. L'élaboration de dispositifs complexes dans un but précis tel que le contrôle et la détection de NPM implique de nombreuses étapes de fabrication. L'association de procédés de fabrication simples pour réaliser un dispositif peut s'avérer complexe à cause des différentes interactions qui peuvent avoir lieu entre les procédés. L'assemblage d'un dispositif va donc nécessiter des choix qui seront dictés par les appareils mis à disposition (limite de résolution, choix des matériaux…), les compétences des utilisateurs et les interactions possibles entre les différentes étapes.

La première partie du chapitre fait un point rapide sur l'état de l'art des procédés de microfabrication existants qui sont en lien avec le dispositif visé. Les différents choix effectués pour établir les procédés de fabrication des dispositifs sont expliqués dans les parties suivantes. En effet, les trois autres parties présentent les trois procédés distinctement :

- La fabrication des circuits fluidiques présents dans les dispositifs de contrôle et de détection des NPM;
- La fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des NPM ;
- La fabrication du circuit de détection magnétique, c'est-à-dire le circuit magnétique et les microbobines de détection.

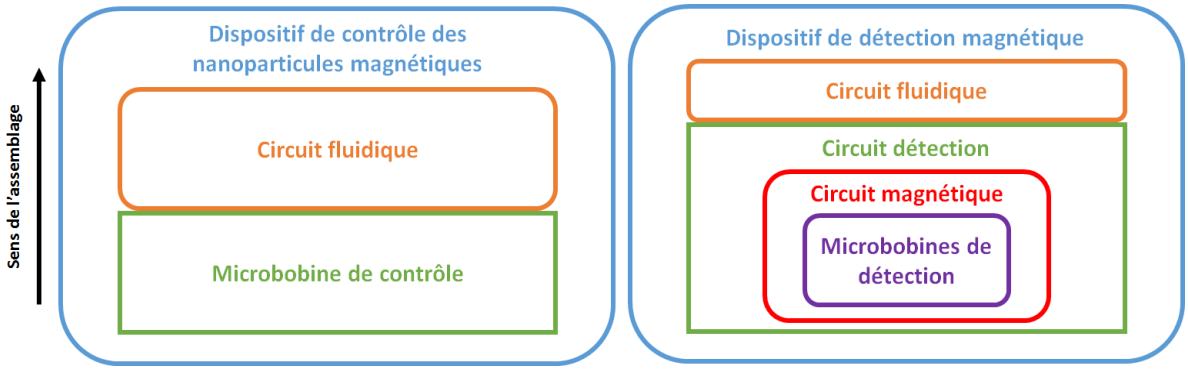


Figure 3.1 : Schéma de principe des dispositifs de contrôle et de détection magnétique.

II - Etat de l'art de la microfabrication des dispositifs fluidiques intégrant des composants pour le contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques et la détection magnétique

II - 1 - La fabrication de dispositifs fluidiques

Les techniques de fabrication de dispositifs fluidiques vont dépendre des matériaux que l'on choisit ou dont l'on dispose et inversement.

II- 1 - a -Techniques de fabrication de dispositifs fluidiques

Il existe plusieurs manières de fabriquer des dispositifs microfluidiques (Fiorini & Chiu, 2005), (Figure 3.2). On peut trouver des techniques utilisant la gravure sèche ou humide (Garra, Advanced, & Currie, 2002; Matteucci, Christiansen, Cech, Systems, & Marie, 2014), le thermoformage, l'utilisation de polymère ou encore l'utilisation de verre.

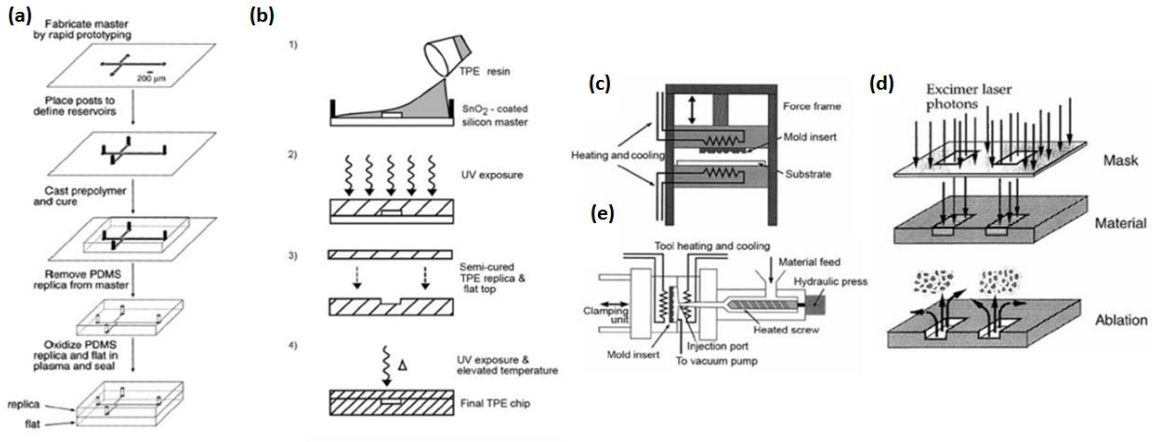


Figure 3.2 : Différentes méthodes de fabrication de dispositifs microfluidiques : (a) utilisation de PDMS, (b) par thermoformage, (c) par gaufrage, (d) par injection de polymère, (e) par ablation laser (Fiorini & Chiu, 2005).

II - 1 - a - ii - Ablation directe

La manière la plus simple pour fabriquer des microstructures est d'utiliser des procédés d'écriture directe tels que le perçage mécanique conventionnel, le sciage, la machine laser et le poudrage (Suriano et al., 2011). Ces techniques permettent de faire des micro-dispositifs très rapidement, parfois en 3D. Mais la résolution peut être limitée et la forme des canaux est inhomogène, l'ablation mécanique du matériau entraînant des défauts sur les parois des canaux.

II - 1 - a - iii - La gravure

La gravure consiste, après la protection de certaines parties d'un substrat, dans l'attaque chimique et/ou physique des parties non protégées. Il existe deux grands types de gravure, la gravure humide et la gravure sèche.

♦ ***Gravure humide***

Dans le cas de la gravure humide, une solution chimique est utilisée. Le substrat est gravé selon les trois dimensions si le substrat est isotrope, ou selon des plans cristallins si le substrat a une orientation cristalline. Par exemple en utilisant une solution d'hydroxyde de potassium, un substrat de silicium d'orientation (100) peut être gravé selon un angle de 54,7°.

♦ ***Gravure sèche***

Dans le cas de la gravure sèche, la réaction peut être physique, chimique ou une combinaison des deux. Le principe d'une réaction physique est l'utilisation de l'énergie cinétique d'un faisceau d'ions, d'électrons ou de photons. Cette énergie permet d'arracher les atomes de la surface du substrat.

Le principe de la réaction chimique est l'utilisation d'un gaz. La molécule de gaz va réagir avec la surface du substrat et arracher les atomes présents.

Un exemple de gravure sèche à la fois chimique et physique est la RIE (Reactive Ion Etching). L'énergie de collision provenant de l'ionisation d'un gaz permet d'aider la dissociation de la molécule gravée en une espèce plus réactive.

II - 1 - a - iv - Le thermoformage

Le thermoformage consiste dans la cuisson d'un matériau pour le rendre plus malléable dans le but de lui faire prendre la forme voulue. C'est une technique principalement utilisée dans le cas de produits plastiques. On peut réaliser le dispositif par moulage par injection ou par « gaufrage » à chaud.

Le moulage par injection introduit des pastilles thermoplastiques dans un moule chauffé pour créer le dispositif. Cette technique offre une fabrication à haute fréquence une fois les paramètres optimisés mais le coût élevé de l'équipement et du moule rend cette solution peu utilisée en laboratoire.

Le « gaufrage » à chaud est une méthode qui consiste à presser un moule de silicone ou de métal chauffé contre une feuille thermoplastique. Des matériaux tels que le Polyméthylméthacrylate (PMMA) ou le Cyclique Olefin Copolymère (COC) sont couramment utilisés pour cette méthode.

II - 1 - a - v - Les polymères

La dernière façon de faire un dispositif microfluidique est de créer un moule et d'utiliser un polymère pour le reproduire. Différents moyens existent pour faire le moule mais le schéma est toujours le même. Le négatif de canal est créé avec un matériau dur ou rendu dur, puis un polymère liquide est versé sur celui-ci. Le polymère est ensuite polymérisé grâce à la chaleur ou aux UV puis il est décollé du moule pour obtenir le dispositif microfluidique.

II- 1 - b -Les matériaux utilisés pour la fabrication de dispositifs fluidiques

II - 1 - b - i - Le verre

L'utilisation du verre pour les composants de microsystèmes, en particulier pour les pièces microfluidiques, requiert un faible coefficient de dilatation thermique α. Le verre borosilicaté à base de silice et de trioxyde de bore répond à cette demande avec un α d'environ 3.10^{-6} K^{-1} à 20°C. Il est donc résistant aux chocs thermiques et moins soumis à des contraintes thermiques. Un autre avantage est que le verre de borosilicate peut être collé au silicium en appliquant une tension de 200-1000 V.

De même, il peut être lié de manière irréversible au PDMS après un traitement au plasma d'oxygène du PDMS et des surfaces de verre. De plus, le verre de borosilicate peut être lié à lui-même. Pour ce faire, les surfaces de liaison doivent être chimiquement activées, alignées les unes aux autres puis exposées à la charge mécanique et à la chaleur. En outre, le verre peut être modelé par des techniques de gravure chimique et sèche, ainsi que par ablation laser.

Le principal avantage du verre par rapport aux autres matériaux est sa transparence optique. De plus, il a un module d'Young élevé (64 GPa, (Microchem, 2015)), une haute résistance contre de nombreux acides et bases et il est biocompatible et bon marché.

Un dérivé du verre très intéressant pour la microfluidique, les MEMS et les MOEMS est le verre photosensible appelé Foturan® fabriqué par Schott AG. Foturan est un verre de lithium-potassium parsemé de petites quantités d'oxydes d'argent et de cérium. Ce matériau combine les propriétés uniques du verre telles que la transparence, la dureté, la résistance chimique et thermique avec la possibilité de réaliser des structures très fines avec des tolérances serrées et un rapport d'aspect élevé. Les plus petites structures possibles sont de l'ordre de 25 µm avec une rugosité de 1 µm (Pamme & Manz, 2004b).

II - 1 - b - ii - Le PDMS

Dans le domaine de la microfluidique et de la micro-optique, le polydiméthylsiloxane (PDMS) a suscité un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies. Les principales raisons sont le procédé de fabrication qui est rapide, facile et économique, ainsi que ses différentes propriétés chimiques et physiques. Le PDMS possède une combinaison unique de propriétés résultant de la présence d'un squelette siloxane inorganique et de groupes méthyle organiques liés au silicium (Clarson & Semlyen, 1993). Il appartient donc à un groupe de composés organosiliciés polymériques communément appelés silicones ("Linear Polydimethylsiloxane.," 1994). Le PDMS fournit une bonne stabilité chimique et n'est pas hygroscopique. En outre, il est inerte, non toxique, biocompatible, ininflammable, optiquement transparent jusqu'à une λ de 300 nm et perméable aux gaz non polaires comme l'oxygène. Le PDMS est durable et a une bonne stabilité thermique (jusqu'à 186°C dans l'air), une rigidité diélectrique de 21 kV/mm et une permittivité diélectrique (de 2,7 F/m) stable sur une large gamme de fréquence (Kalangutkar, 2015). Il est également isotrope et homogène, disponible commercialement (eg, Sylgard 184 par Dow Corning Inc.), et peu coûteux (Xia & Whitesides, 1998). Il offre une manipulation facile et peut être collé à lui-même et à une série d'autres matériaux après un traitement par plasma d'oxygène ou d'air (Lucas, Demming, Jordan, Sichler, & BUttgenbach, 2008). Cependant, il existe certains inconvénients qui accompagnent ces avantages :

- Le PDMS se rétracte d'environ 1% lors du durcissement ;
- Le PDMS polymérisé peut être facilement gonflé ou dissous par un certain nombre de solvants organiques non polaires tels que le toluène et l'hexane ;
- L'élasticité et la dilatation thermique du PDMS peuvent limiter son utilité dans la fabrication multicouche et / ou la nanofabrication ;
- Il peut absorber des médicaments, des protéines et de petites molécules hydrophobes (Toepke & Beebe, 2006).
- Sa fabrication est lente.

Malgré ces quelques inconvénients, l'utilisation de PDMS pour la fabrication de dispositifs fluidiques est donc la méthode la plus appropriée pour le développement d'un capteur microfluidique dans un processus de recherche.

II - 2 - La fabrication de systèmes de contrôle et de manipulation de nanoparticules magnétiques

La réalisation de dispositifs fluidiques est la première étape pour fabriquer un dispositif de manipulation et de capture de particules magnétiques. Le dispositif le plus simple à mettre en œuvre comporte l'intégration d'un aimant permanent (Pamme & Manz, 2004a). Il ne nécessite pas de fabrication et peut être incorporé ou non au dispositif. En revanche, l'aimant permanent peut être dimensionné (dimensions et technologie) mais une fois choisi, ses caractéristiques sont fixes. En particulier, il ne permet pas de contrôler l'amplitude du champ magnétique influant sur les particules magnétiques. Il est donc nécessaire de se pencher sur la fabrication d'éléments de contrôle du champ magnétique, en particulier les microbobines.

La manière la plus simple de fabriquer des microbobines est de les fabriquer sur un seul niveau en utilisant un matériau conducteur tel que le cuivre ou l'or.

Hafner et al. (Hafner et al., 2017) présentent une méthode de croissance de microbobine pour des applications d'orthodontie télémétrique. La séquence du procédé de fabrication des microbobines sur des substrats de verre de silicate est illustrée sur la Figure 3.3. Une métallisation de la couche sacrificielle (50 nm titane et 100 nm or) est réalisée sur un substrat de verre de 300 à 500 µm d'épaisseur. En utilisant la photolithographie, la gravure sèche et la gravure par faisceau d'ions la couche d'or est structurée en laissant la couche de titane intacte. La couche de titane sert de couche conductrice et la couche d'or sert de couche sacrificielle et conductrice pour la croissance électrolytique. En utilisant une seconde étape de photolithographie et un dépôt électrolytique de cuivre, les microbobines sont créées. Une couche d'or est ensuite ajoutée pour faciliter les étapes suivantes. Après avoir enlevé la résine et la couche de titane, les microbobines sont encapsulées à l'aide de la résine SU8, qui à l'aide d'une étape de photolithographie permet l'ouverture des contacts électriques des microbobines. La microbobine est ensuite mise en contact électrique à l'aide d'une liaison par fil ou d'un « retournement de puce » où les surfaces à souder doivent être face-à-face.

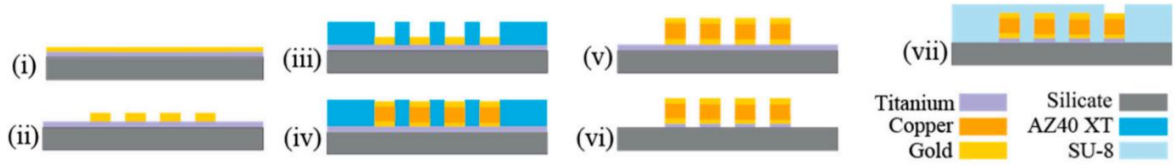


Figure 3.3 : Illustration du procédé de fabrication présenté par Hafner et al.

Pawinanto et al. (Pawinanto, Yunas, Majlis, Bais, & Said, 2015) proposent une autre méthode pour la fabrication de microbobines (Figure 3.4). La première étape est le dépôt de cuivre par croissance électrolytique sur une couche de PCB (Printed Circuit Board). L'étape terminée, une résine est déposée puis une étape de photolithographie est réalisée pour obtenir les motifs voulus et ouvrir les accès sur la couche de cuivre. Puis une solution de 70% de $FeCl_3$ est utilisée pendant une heure et vingt minutes pour graver le cuivre non protégé par la résine. La résine est ensuite enlevée pour obtenir les microbobines.

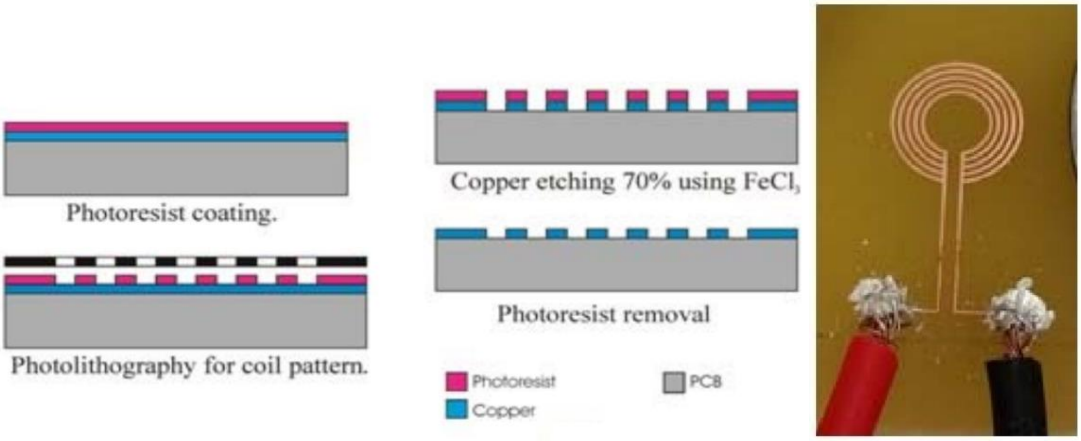


Figure 3.4 : Illustration du procédé de fabrication présenté par Pawinanto et al.

L'utilisation d'un seul niveau pour fabriquer les microbobines comprend un défaut important pour leur intégration dans les dispositifs. Il est difficile d'obtenir la forme de microbobines souhaitée si l'on choisit d'avoir des connexions à l'extérieur des microbobines (et inversement). Pour obtenir les deux connexions à l'endroit choisi par l'utilisateur, il est nécessaire de réaliser la microbobine sur plusieurs niveaux.

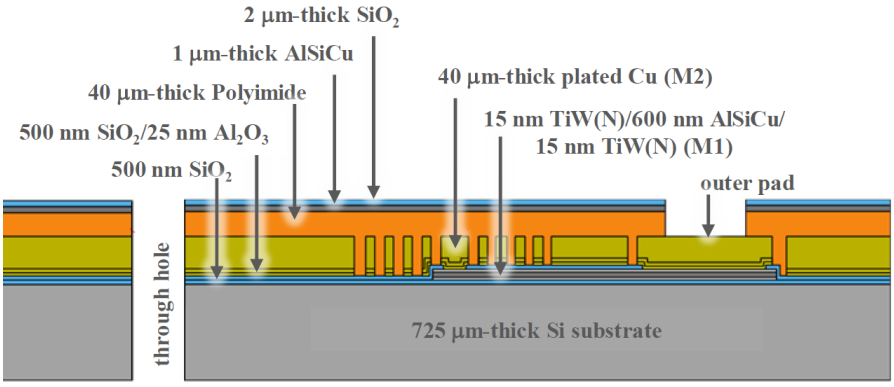


Figure 3.5 : Schéma de la microbobine réalisée par (Silverio et al., 2017).

Silverio et al. (Silverio et al., 2017) présentent un laboratoire sur puce utilisé pour la manipulation et la capture de nanoparticules pour des applications biomédicales (Figure 3.5). La première étape est un dépôt d'une couche de SiO_2 de 500 nm d'épaisseur par PECVD sur le substrat. Une sous-couche conductrice constituée de 15 nm de TiW/ 600 nm AlSiCu / 15 nm TiW est réalisée par lithographie optique et gravure (système SPP ICP). Cette sous-couche permet de relier le centre des bobines au plot de contact. Un deuxième dépôt de 500 nm de SiO_2 sert à isoler la microbobine de la sous-couche. Après des étapes de photolithographie et de gravure pour ouvrir des trous pour réaliser des connexions entre la sous-couche et la microbobine, une couche sacrificielle et conductrice (10 nm Ta / 200 nm Cu) est pulvérisée. Après une nouvelle étape de photolithographie, les microbobines de cuivre sont réalisées par dépôt électrolytique. La couche sacrificielle est ensuite gravée. Une couche de polyimide de 40 µm d'épaisseur est ensuite enduite dans plusieurs buts : la passivation, le renforcement de la structure et l'amélioration de la planéité de la surface. La couche d'AlSiCu, de 1 µm d'épaisseur, garantit un contraste optique optimal pour la détection de la fluorescence. Une couche supplémentaire de SiO_2 de 2 µm est ensuite pulvérisée pour garantir la surface plane nécessaire à la capture magnétique.

La technique de fabrication sur trois niveaux permet de choisir les différents paramètres (forme, dimension…) par simulation des microbobines, tout en permettant une facilité d'accès aux connexions électriques du dispositif.

II - 3 - La fabrication de systèmes de détection de nanoparticules magnétiques

La fabrication de dispositifs de détection reposant sur des microbobines va suivre la même logique que la fabrication de microbobine de capture.

Martínez et al. (Martínez, Mu, & Baldrich, 2013) présentent la fabrication d'une microbobine pour détecter la présence de NPM. Les auteurs utilisent l'aluminium pour la fabrication de leurs microbobines (Figure 3.6). Le premier niveau d'aluminium a été déposé sur une couche d'oxyde thermique de 800 nm. Une deuxième couche a été déposée par la suite pour créer un pont métallique qui permet une liaison électronique externe à l'aide d'un fil. Les deux couches ont été séparées par une couche de SiO_2 par PECVD. Enfin, le pont d'aluminium a été passivé avec une couche de SiO_2 de 400 nm et un revêtement de Si_3N_4 de 700 nm (tous deux par PECVD).

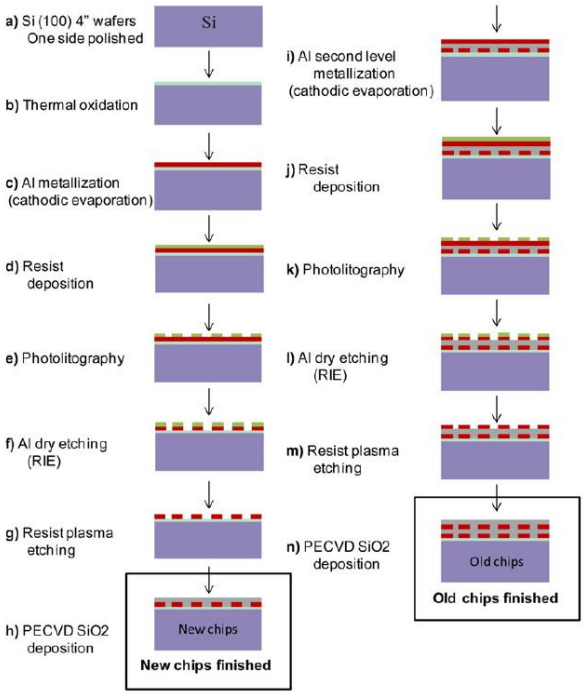


Figure 3.6 : Illustration du procédé de fabrication présenté par Martínez et al(Martínez, Mu, & Baldrich, 2013).

Puisque l'inductance d'une microbobine est profondément influencée par des facteurs externes, le système de mesure présenté par les auteurs consiste en une paire de bobines adjacentes et similaires. Les deux bobines ont été placées sur une carte de circuit imprimé (PCB) spécialement conçue pour leurs caractérisations. Dans cette configuration double, une des bobines est utilisée comme la bobine active (où l'échantillon étudié est déposé), l'autre est utilisée comme bobine de référence (passive). L'acquisition de mesures différentielles permet ainsi de compenser d'éventuelles variations des conditions externes (changements de température) qui pourraient affecter la mesure expérimentale de l'inductance ou d'effectuer une mesure différentielle entre une des bobine exposée aux NP magnétiques et l'autre non exposée.

II - 4 - Conclusion de l'état de l'art de la microfabrication des dispositifs de capture et de détection magnétique

La fabrication de dispositifs de contrôle du déplacement des NPM et de détection magnétique comporte de nombreux défis technologiques qui peuvent être résolus par différentes stratégies. Il s'agit en grande partie d'étudier les avantages et inconvénients des différents procédés pour se rapprocher au plus de la structure souhaitée.

La réalisation de nos dispositifs se déroule en plusieurs parties :

- La fabrication des circuits microfluidiques qui doivent résister à différentes solutions, pressions, températures …
- La fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des NPM qui représente le point essentiel dans la capture des particules magnétiques
- La fabrication du circuit magnétique et des bobines de détection qui vont permettre la détection de l'apparition de particules magnétiques dans la zone ciblée.

Il est donc nécessaire de choisir des procédés qui pourront correspondent aux enjeux du projet, c'est-à-dire la réalisation d'un circuit fluidique qui vient au plus près des éléments de contrôle et de détection magnétique. Il est donc avantageux de se tourner vers la fabrication de microbobines sur plusieurs niveaux permettant le report des connexions électriques à l'extérieur du circuit fluidique. Dans le cas de la réalisation du circuit magnétique la méthode de transfert semble permettre plus de liberté dans l'ajout du circuit fluidique.

III - Procédé de fabrication des microcanaux fluidiques

III - 1 - Réalisation des moules en résine

III- 1 - a - Le choix de la résine SU8

La réalisation de motifs sur substrat de silicium nécessite d'utiliser une résine photosensible pouvant être déposée suivant des épaisseurs relativement importantes. Le dimensionnement des dispositifs fluidiques voulus est présenté dans la Figure 3.7. La résine recherchée nécessite au moins deux points clés :

- Elle doit permettre de réaliser une épaisseur de 50 µm facilement (ce qui est un standard en microfluidique) ;
- Elle doit résister à une pression mécanique forte (qui provient du démoulage du PDMS).

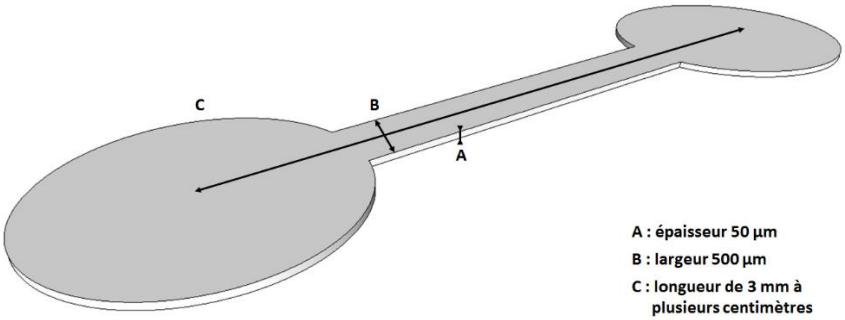


Figure 3.7 : Coupe longitudinal d'un canal microfluidique fabriqué.

La société Microchemical fournit une série de résines négatives, la SU8, qui correspond aux différentes caractéristiques attendues. Cette résine est très visqueuse et elle peut être étalée sur une épaisseur allant de 0,5 µm (SU8 2000.5) à 660 µm (SU8 2150) selon le type de SU8 choisi. La résine SU8 2050 a été choisie car les paramètres d'enduction pour une épaisseur de 50 µm, correspondant à l'épaisseur recherchée étaient déjà bien maitrisés dans la centrale technologique au C2N.

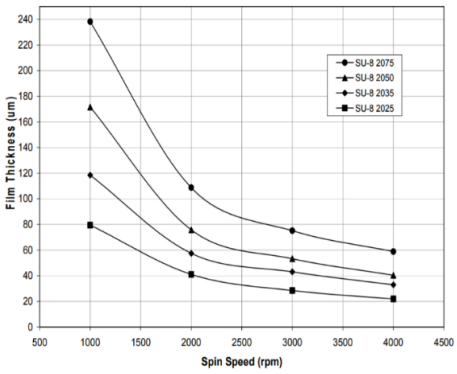


Figure 3.8 : Epaisseur en fonction de la vitesse d'enrésinement pour les différentes résines de SU8 20XX.

III- 1 - b - La conception des masques

Les motifs réalisés lors de la fabrication de microcanaux en microfluidique peuvent être très variés en forme et en taille. Le logiciel GNU Inkscape© permet une prise en main simple pour ce travail. La Figure 3.9 présente un aperçu des différents masques réalisés à l'aide de ce logiciel.

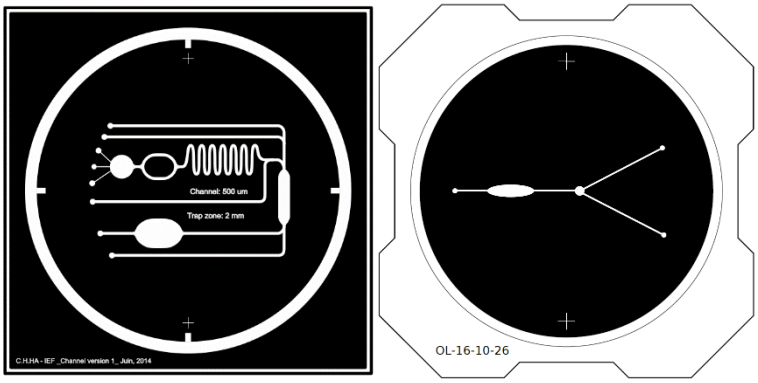


Figure 3.9 : Dessins de masques pour la fabrication de dispositifs microfluidiques.

Le coût des masques en chrome par les fournisseurs habituels de la microélectronique est élevé (plusieurs centaines d'euros par masque). Au vu de la quantité de masques à réaliser et de la résolution souhaitée (> 50 µm) il a été décidé de se diriger dans un premier temps vers une solution plus rapide et moins coûteuse, l'impression sur films plastiques dits « haute résolution ». L'utilisation de cette méthode comporte un inconvénient : les dimensions minimales possibles à atteindre sont de l'ordre de 30 µm et ces dimensions ne sont pas atteignables pour toutes les géométries. Les motifs des circuits microfluidiques auront donc des dimensions supérieures à 100 µm. Des canaux de dimension minimale « 100 µm de largeur » sont donc choisis pour notre application. Le coût d'un masque est alors de quelques dizaines d'euros. L'impression des masques a été réalisée par la même société Imprimerie IDM© (www.impridm.fr) pour garantir la reproductibilité de nos motifs.

III- 1 - c - Nettoyage du substrat

Le procédé de réalisation du support en SU8 utilise un substrat de silicium oxydé comme base. Le substrat a un diamètre de 100 mm, une épaisseur de 500 - 550 µm et une résistivité de 5 -10 Ohm.cm. Afin d'obtenir un procédé stable et répétable, la première étape est le nettoyage des substrats. Le nettoyage consiste à éliminer les contaminations résiduelles. Ces contaminations se présentent sous différentes formes : particules provenant de l'air ambiant, de la préparation des substrats en industrie, ou du matériel de manipulation des substrats.

La présence de contamination à la surface du substrat a pour effet d'introduire des impuretés et des défauts lors des différentes étapes de fabrication et par la suite de dégrader les propriétés physiques des motifs réalisés.

Le nettoyage utilise deux solutions :

- la solution d'acide fluorhydrique tamponnée (BHF) qui est une solution corrosive,
- la solution piranha, mélange d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui se caractérise par une réaction exothermique.

La première étape consiste en l'élimination de la couche d'oxyde natif de 1 à 1,5 nm due à l'oxydation du silicium à l'air ambiant. Cette étape est réalisée en plongeant le substrat dans un bain de la solution de HF. Ensuite, le substrat est plongé dans un bain de la solution dite piranha ce qui

permet d'éliminer efficacement la plupart des contaminations organiques (Reinhardt & Kern, 2008). Ce cycle peut être répété une seconde fois si nécessaire. Afin de minimiser les interactions entre le substrat propre et l'opérateur et/ou l'air ambiant, il est nécessaire d'effectuer la dernière étape de désoxydation juste avant l'étape suivante du procédé.

Etape	Solution	Temps
Désoxydation	BHF	1 min
Formation d'un oxyde en surface	H_2SO_4/H_2O_2 Proportion (4 pour 1)	5 min
Désoxydation	BHF	1 min

Tableau 3.7 : Étapes et paramètres de nettoyage d'un substrat de silicium.

III- 1 - d - Fabrication du motif en SU-8 par photolithographie

Après enduction sur le substrat, le film de résine doit être traité thermiquement pour favoriser l'évaporation du solvant et pour durcir le film. Dans le cas d'une résine épaisse, il est nécessaire de prendre des précautions et d'imposer une montée en température progressive, par des températures paliers dans notre cas. Le but de cette précaution est de minimiser les contraintes mécaniques dans le film de résine et de permettre à la résine un échauffement doux pour permettre au solvant d'être évacué complètement (un durcissement en surface provoqué par une température trop haute conduit à l'apparition de bulles dans la résine). Le substrat est donc soumis à une température de 65°C pour une durée de trois minutes avant d'augmenter la température à 95°C pour une durée de six à neuf minutes.

La résine SU8 utilisée possédant une viscosité élevée, les effets de bords lors de l'enduction sont importants et entraînent l'apparition d'un bourrelet au niveau du bord du substrat. Pour obtenir le contact entre le masque et la résine, il est nécessaire de supprimer cette surépaisseur.

L'étape d'insolation est réalisée avec l'aligneur double face EVG 620. L'utilisation d'un masque transparent comme il a été défini précédemment entraîne une absorption des UV par ce masque. Il en résulte que la dose d'insolation doit être 1,5 fois plus élevée que celle utilisée dans le cas d'un masque « chrome ». L'étape d'insolation permet de réaliser une impression des motifs du masque sur la résine. Pour insoler les 50 µm de résine SU8, la dose d'insolation nécessaire est 250 mJ/cm². La résine SU8 étant une résine négative, les motifs insolés subissent un effet de réticulation le poids moléculaire augmente et la solubilité diminue. Les motifs insolés seront conservés lors du développement.

Dans le cas de la résine SU8, une étape de recuit après insolation est nécessaire. Elle assure l'élimination rapide d'une partie des solvants et la polymérisation de la matrice. Le taux de solvant passe ainsi de 20 - 30 % restant après le premier recuit à 4 - 7 %. Cela a pour conséquence une perte d'épaisseur de la résine de l'ordre de 10 %. Le taux de solvant résiduel influe notamment sur le développement : plus ce taux est faible et plus la dissolution de la résine est rapide. Pour la résine SU8, le recuit après exposition est de 65°C pendant une minute puis de 95°C pendant cinq minutes.

L'étape de développement permet de dissoudre la résine non-insolée (dans le cas d'une résine négative) dans une solution de développement pour obtenir les motifs désirés. La résine SU8 est développée dans un bain de « SU8 developer » pendant cinq minutes. Elle est ensuite rincée à

l'isopropanol. Enfin le substrat, séché par un flux de N_2, est prêt pour réaliser le dispositif fluidique (Figure 3.10).

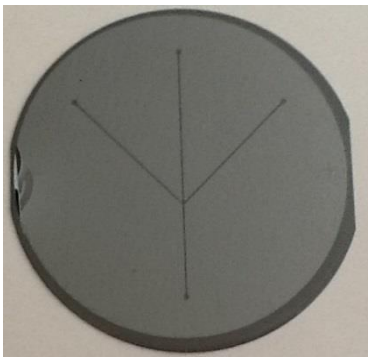


Figure 3.10 : Photographie du moule des canaux en résine SU8 (épaisseur de 50 µm, largeur de 500 µm et longueur de 7 cm).

III- 1 - e - Caractérisation des moules de SU8

Lorsque le moule de SU8 est réalisé, une caractérisation par profilomètre mécanique (Dektak 8-Veeco) est réalisée pour contrôler la largeur et l'épaisseur des motifs réalisés.

Les caractéristiques obtenues, présentées dans la Figure 3.11, ont été vérifiées sur les différents moules en SU8 réalisés. L'épaisseur obtenue est de 50 µm avec une variation de l'ordre de 4 µm.

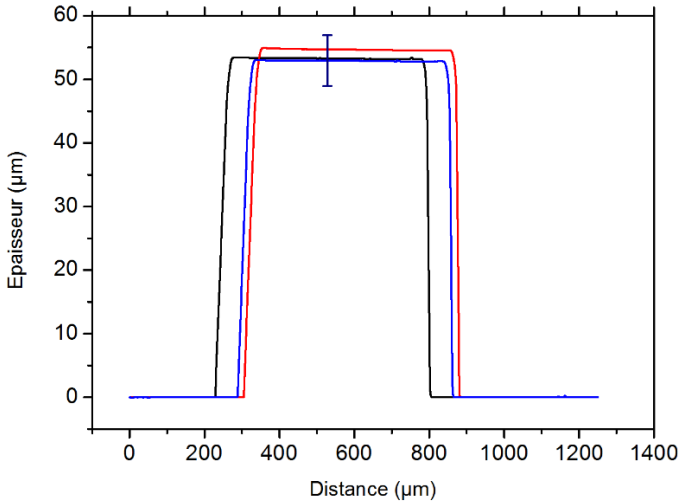


Figure 3.11 : Mesures au profilomètre mécanique Dektak 8 de l'épaisseur des microcanaux.

III - 2 - Réalisation des canaux en PolydiméthylSiloxane

Le moule en SU8 fabriqué, la réalisation des canaux microfluidique en PDMS est possible. Un moule en SU8 permet de réaliser plusieurs dispositifs fluidiques. En effet, ces derniers sont réutilisables jusqu'au moment où la résine SU8 se détache du substrat ou si le moule en résine SU8 est dégradé. La vitesse de dégradation des substrats dépend de nombreux facteurs notamment leurs conditions de stockage, le temps de recuit du PDMS, la délicatesse de l'utilisateur.

Le PDMS utilisé dans cette étude est un kit commercial Sylgard184 (Dow Corning©) qui se compose de deux parties : un pré-polymère constitué de chaînes polydiméthylsiloxanes et un agent réticulant qui est une solution de copolymères de méthylhydrosiloxane et de diméthylsiloxane et d'un catalyseur organométallique à base de platine. Lorsque le mélange est soumis à la température de recuit, une réaction d'hydrosilylation permet d'obtenir le PDMS (Figure 3.12).

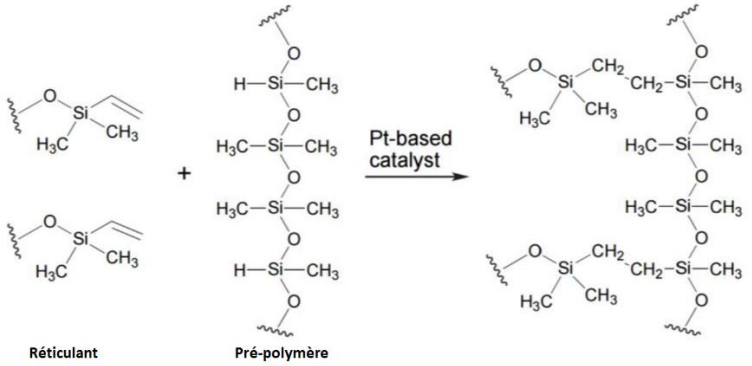


Figure 3.12 : Réaction entre l'agent réticulant et le pré-polymère pour former du PDMS(Campbell et al., 1999).

Les propriétés mécaniques du PDMS dépendent du rapport de masses du pré-polymère et de l'agent réticulant (Fong & Lee, 2013), et de la température de recuit (Johnston, McCluskey, Tan, & Tracey, 2014). En effet, plus il y a de réticulant, plus le PDMS est dur, tandis que plus il y a de pré-polymère, plus le PDMS est déformable (Campbell et al., 1999). Dans notre cas, un rapport pré-polymère/réticulant de 10:1 a été choisi pour obtenir les dispositifs de PDMS.

L'agent réticulant et le polymère sont pesés et mélangés manuellement à l'aide d'une tige en aluminium. Un dégazage sous vide, d'une durée d'une heure, est ensuite effectué pour éliminer les bulles d'air apparaissant lors du mélange. Le PDMS est ensuite versé sur le moule de SU8 qui est disposé dans une boîte de pétri tapissée avec de l'aluminium (Figure 3.13). Un capteur de température peut être ajouté avant le recuit, ce capteur permet de connaître la température au niveau du microcanal lors des expériences. L'ensemble est recuit à l'aide d'une étuve. Les conditions de recuit ont été fixées à une température de 75°C et une durée de deux heures.

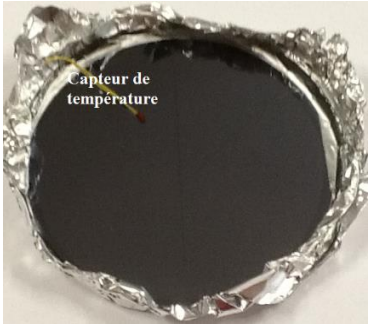


Figure 3.13 : Photographie d'un moule recouvert de PDMS (l'aluminium sert de protection).

Dès que le recuit est fini, le moule de SU8 est séparé de la boîte de pétri et l'aluminium est enlevé. Le PDMS est découpé pour obtenir la forme à coller sur un substrat d'accueil. Les entrées et sorties sont réalisées par perforation. Deux manières de réaliser les entrées et sorties ont été utilisées. La première manière est de faire une perforation de bout en bout du PDMS à l'aide d'une tige métallique.

La seconde est de réaliser un coude dans le PDMS en perforant deux cotés adjacent d'un cube de PDMS (Figure 3.14.a&b).

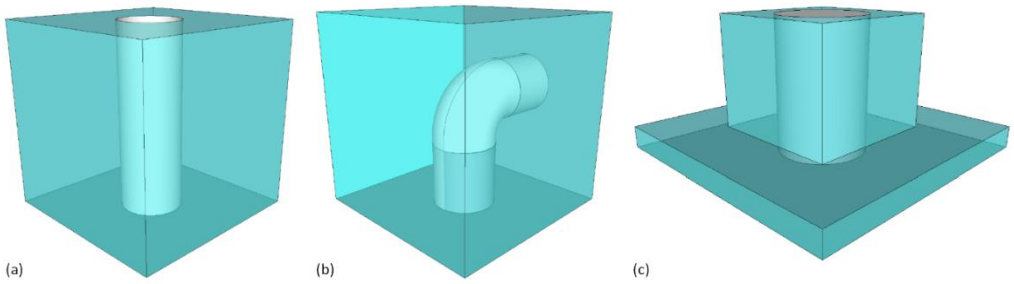


Figure 3.14 : Présentation des différents types de perforation du PDMS pour réaliser les entrées et sorties du circuit fluidique. (a) Perforations droites et (b) en coudes, (c) ajout d'un cube de PDMS avant la perforation.

Dans le but de faire un capot de PDMS aussi fin que possible au-dessus des canaux microfluidique, une adaptation de la première méthode a été réalisée afin de permettre d'insérer les capillaires fluidiques. Il s'agit d'ajouter un cube de PDMS prédécoupé au niveau des entrées et sorties (Figure 3.14.c). Cette technique est utile pour observer les microcanaux fluidiques en microscopie droite.

III - 3 - Collage entre le capot en PDMS et un substrat recouvert de PDMS

Pour réaliser le dispositif fluidique, le capot de PDMS doit être scellé avec un substrat. Dans le cas des microbobines, il est nécessaire de les protéger avant de sceller le dispositif. La couche de protection est une fine couche de PDMS. Le collage de PDMS sur du PDMS est connu et facilement mis en œuvre (Eddings, Johnson, & Gale, 2014; Li et al., 2005).

L'étape de collage qui est présentée peut être réalisée sur trois types de surface : verre, Si/SiO_2, voire n'importe quel substrat recouvert d'une couche de PDMS.

III- 3 - a - Dépôt d'une couche de PDMS par spin coating pour assurer le collage PDMS-PDMS

Pour réaliser un collage PDMS/PDMS, il est nécessaire de recouvrir la surface du substrat utilisé par une fine couche de PDMS. Pour cela, le PDMS est mélangé dans les proportions 10:1 ou 2,5:1 pour le rendre plus fluide, ce qui permet d'atteindre des épaisseurs faibles plus rapidement.

Les paramètres utilisés pour réaliser la couche de PDMS sont présentés dans le Tableau 3.8.

Epaisseur (µm)	Vitesse (rpm)	Accélération (rpm/s)	Temps (s)
20	3000	500	30
100	500	100	90

Tableau 3.8 : Paramètres de dépôt de PDMS pour un ratio de 10 : 1.

Deux types de collage existent :

- le collage irréversible : le capot de PDMS ne peut pas être séparé du substrat après collage,

- le collage réversible : le capot de PDMS peut-être séparé du substrat après collage, ce qui permet une réutilisation des substrats.

III- 3 - b - Collage irréversible

Dans le cas d'un collage irréversible, un court traitement par plasma oxygène puis un traitement par température permet d'obtenir une force de collage très importante (Duffy, Mcdonald, Schueller, & Whitesides, 1998; McDonald & Whitesides, 2002). Le collage irréversible permet de réaliser des tests rapides et simples pour des dispositifs fluidiques étanches durablement (Eddings et al., 2014; Li et al., 2005).

Dans notre cas, le moule de PDMS et le substrat d'accueil subissent un traitement par plasma O_2 dans un délaqueur avec un générateur RF de 13,56 MHz. Les paramètres utilisés sont : une pression de 0,4 mbar, une durée de 1 minute, et une puissance de 160 Watt. Le traitement par plasma O_2 étant effectué, il faut coller le plus rapidement possible le moule de PDMS et le substrat d'accueil. En effet après quinze secondes les liaisons atomiques en surface se reforment soit avec d'autres liaisons libres, soit avec des gaz présents dans l'air et le collage perd en qualité. La mise en contact effectuée, un traitement thermique d'une heure à 75°C est réalisé afin de finaliser le collage.

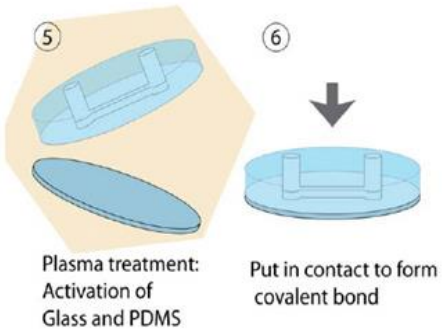


Figure 3.15 : Réalisation du collage entre le substrat et le capot de PDMS.

Le collage irréversible a été principalement utilisé dans le cas d'études avec des dispositifs uniques ou utilisés avec des aimants externes. Dans le cas de dispositifs fluidiques avec des éléments intégrés, il devient intéressant d'étudier la possibilité de réaliser un collage réversible qui permet de réutiliser les microbobines plusieurs fois.

III- 3 - c - Collage réversible

Deux techniques de collage réversible sont présentées. Ces techniques ont été étudiées dans le département Microsystème et NanoBiofluidique par Nhung Dinh et Ha Cao (Cao, 2016; Cao et al., 2015).

III - 3 - c - i - Collage utilisant le Dimethyl-MethylPhenylMethoxy Siloxane

La première technique utilise le Dimethyl-MethylPhenylMethoxy Siloxane (DMPMS) comme couche adhésive sur les substrats couverts de PDMS. Cao et al. a démontré la possibilité d'utiliser cette technique pour réaliser un collage PDMS sur PDMS et PDMS sur verre. Le procédé est présenté dans la Figure 3.16, une couche de DMPMS est enduite sur un substrat de verre. Le capot de PDMS est « appuyé » sur la couche de DMPMS puis posé sur le substrat d'accueil. L'ensemble subit ensuite un

traitement thermique avec ou non un poids dessus. Un désavantage pour cette technique est le fait que seulement une partie du microcanal est remplacée et non l'ensemble. Ainsi si le bas du canal est dégradé, il faut remplacer l'ensemble du dispositif fluidique (microbobines comprises).

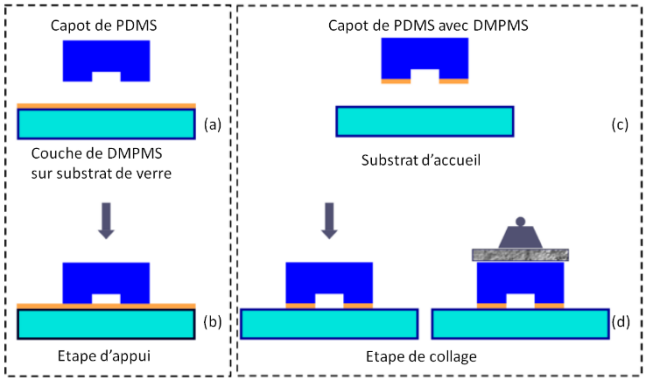


Figure 3.16 : Procédé de collage à l'aide du DMPMS(Cao, 2016; Cao et al., 2015).

III - 3 - c - ii - Collage utilisant le Téflon sous forme liquide

La deuxième technique utilise une couche antiadhésive de Téflon. Une fine couche de Téflon est enduite sur le substrat ayant les microbobines. Puis une couche de PDMS est enduite, ce qui permet de réaliser un collage irréversible. Les microcanaux sont donc scellés de façon irréversible mais l'ensemble peut être séparé des microbobines. Une couche de Téflon d'épaisseur de 1,5 µm est enduite : une vitesse de 500 rpm pendant dix secondes puis une vitesse de 3000 rpm est appliquée pendant vingt secondes. Le substrat est ensuite recuit sur une plaque chauffante à 100°C pendant quatre-vingt-dix secondes puis dans un four à 180°C pendant une heure.

Durant ma thèse, le procédé de collage utilisant le Téflon a été choisi. Le circuit fluidique étant réalisé (Figure 3.17), nous pouvons nous concentrer sur la fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des NPM qui correspondent à la deuxième partie du dispositif de détection.

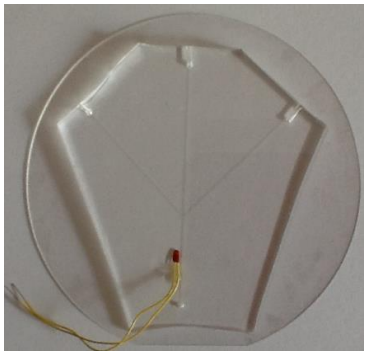


Figure 3.17 : Photographie d'un circuit fluidique

IV -Procédé de fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques

IV - 1 - Procédé global de fabrication

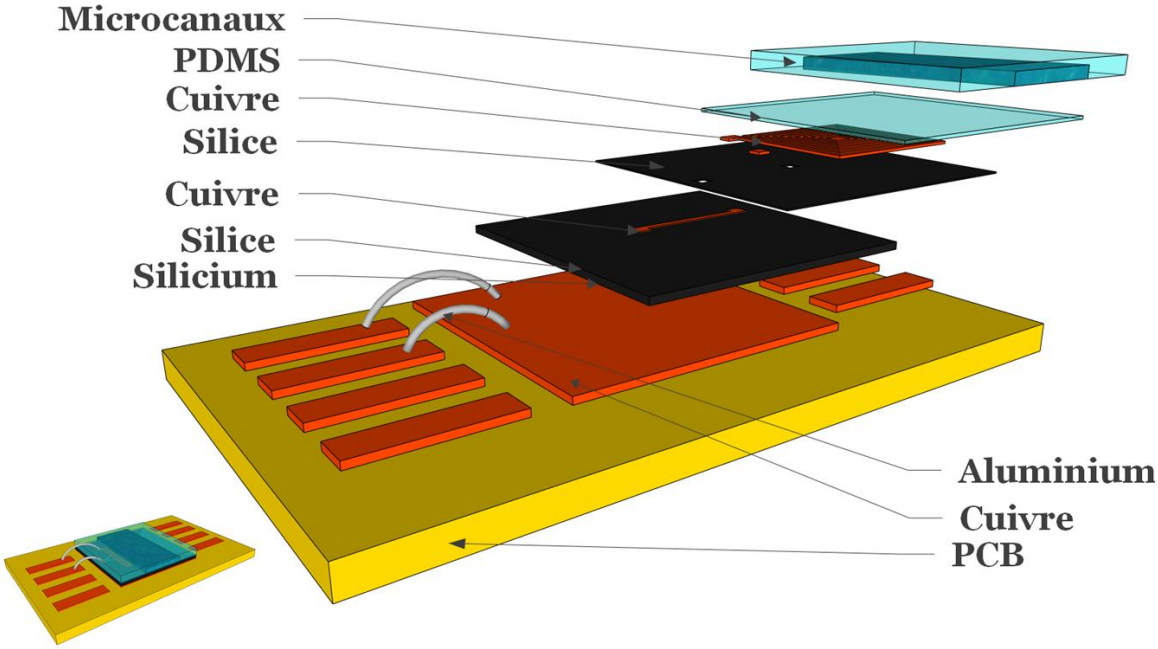


Figure 3.18 : Vue en 3D de la microbobine de contrôle du déplacement des NPM.

Dans cette partie la fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des NPM est détaillée. Il s'agit d'un procédé comprenant trois couches de fabrication sur un substrat de silicium préparé. Le dimensionnement de ces microbobines a été détaillé dans le chapitre 2.

Il a été décidé, du fait des contraintes spatiales du masque de ne choisir que certains types de microbobines simulées. En accord avec la simulation, les microbobines ayant le meilleur facteur de mérite ont été sélectionnées (Figure 3.19).

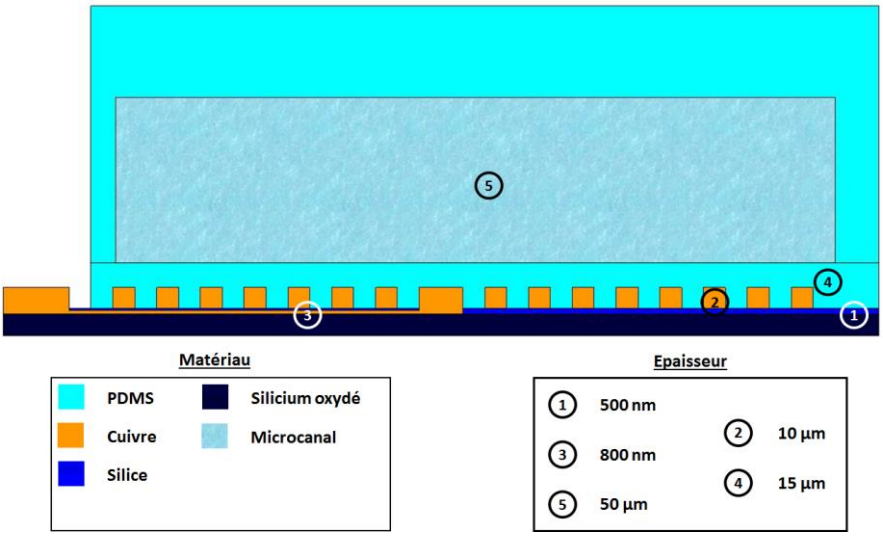


Figure 3.19 : Schéma de la microbobine de contrôle du déplacement des NPM.

Le logiciel LASI7 (ver.7.0.86) a été choisi pour concevoir les masques, les dimensions minimales des motifs étant ici de l'ordre de quelques micromètres. Les motifs ont ensuite été imprimés sur un masque « chrome » (TOPPAN PHOTOMASK, Inc.) afin d'obtenir les motifs avec une résolution suffisante.

Dans le chapitre 2, les simulations ont donné le critère suivant : les spires de cuivre doivent remplir le plus d'espace possible, il ne doit donc pas y avoir d'espace vide au centre de la microbobine. Pour satisfaire ce critère, il faut pouvoir reporter la connexion électrique qui se situe au centre de la microbobine. Pour cela trois niveaux de fabrication sont nécessaires :

- La sous-piste de cuivre, (Figure 3.20.a) ;
- La couche d'isolation du cuivre, (Figure 3.20.b) ;
- La couche de croissance des spires de cuivre, (Figure 3.20.c) ;

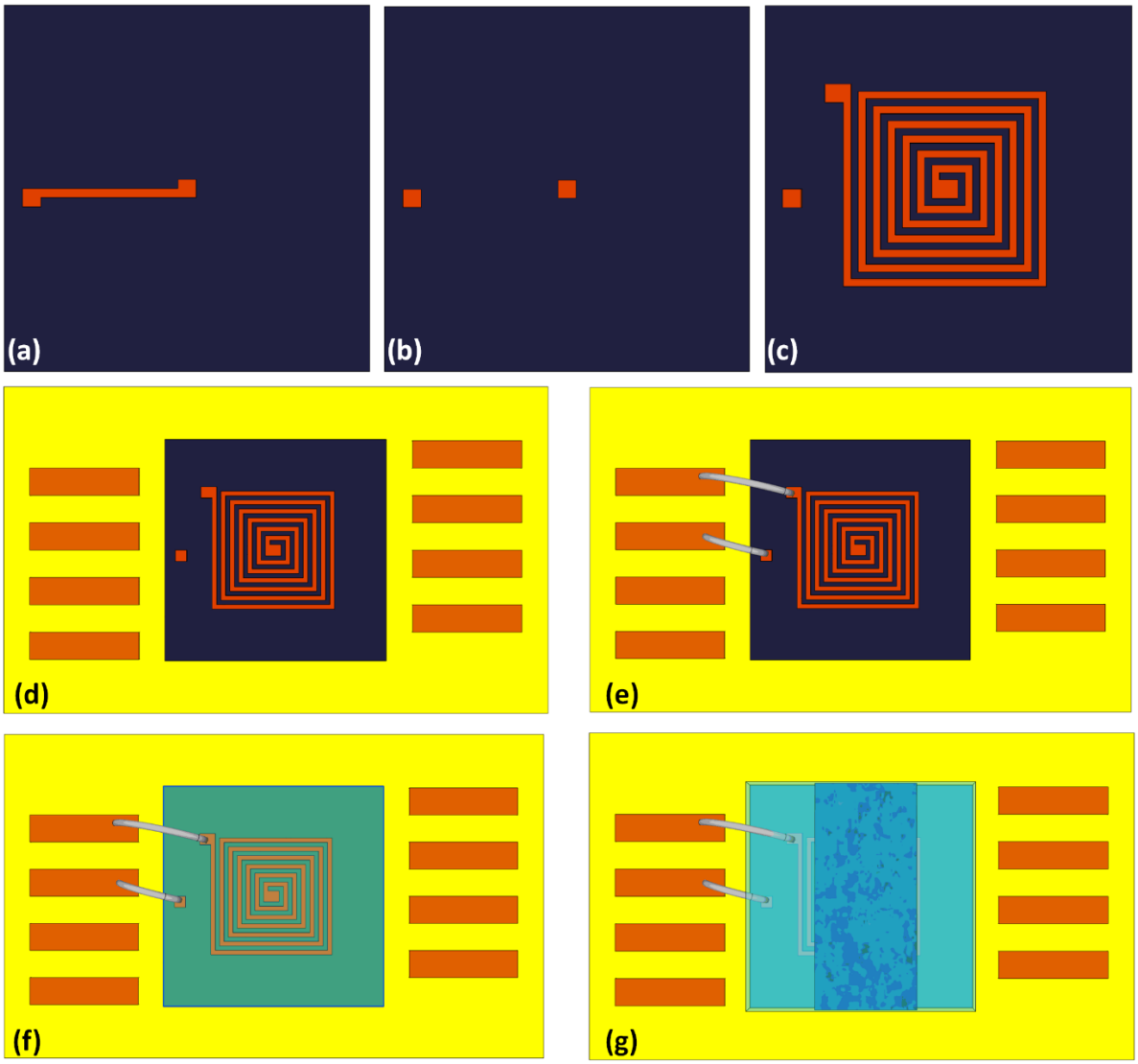


Figure 3.20 : Schéma des résultats des étapes de fabrication de la microbobine de contrôle du déplacement des NPM (a) Sous piste de cuivre (épaisseur 800 nm), (b) Couche isolante en silice (épaisseur 500 nm), (c) Microbobine de cuivre (épaisseur 10 µm), (d) Collage sur plaque de PCB, (e) Connexion des microbobines à la plaque de PCB, (f) Ajout d'une fine couche protectrice de PDMS (g) Ajout du capot de PDMS.

Les microbobines étant fabriquées, il ne reste plus qu'à réaliser les connexions électriques (Figure 3.20.d&e) et ajouter le circuit fluidique (Figure 3.20.f&g).

IV- 1 - b - Préparation du substrat de silicium

Comme présenté en III- 1 - c -, le substrat de silicium doit être nettoyé de toutes les contaminations présentes à sa surface. Afin de minimiser les interactions entre le substrat propre et l'opérateur et/ou l'air ambiant, et donc l'ajout de contaminations, l'étape suivante est réalisée avec le minimum de temps d'attente.

Pour rendre isolantes électriquement les surfaces non impliquées dans la croissance électrolytique, le substrat est préalablement recouvert d'une couche isolante de silice thermique de 200 nm d'épaisseur, obtenue par oxydation thermique humide à 1050°C (four VEGATEC) en présence de dioxygène et de vapeur d'eau pendant 1h sur les deux faces du substrat donneur.

IV- 1 - c - Premier niveau de fabrication : création d'une sous piste de cuivre

Le premier niveau est consacré à la création d'une sous-piste de cuivre (Figure 3.21). Comme il a été démontré dans le chapitre II, les microbobines doivent être remplies de cuivre en leurs centres. Cette condition entraine la contrainte d'une connexion au centre de la microbobine. La sous-piste permet de reporter spatialement cette connexion du centre vers l'extérieur de la microbobine. Lors du dimensionnement de la sous piste de cuivre il faut aussi prendre en compte la place du futur circuit fluidique qui viendra se placer au-dessus de la microbobine. De plus pour ne pas créer de décalage en épaisseur pour les autres étapes, la sous piste de cuivre ne peut pas être trop épaisse tout en ayant une épaisseur compatible avec une résistance électrique raisonnablement basse.

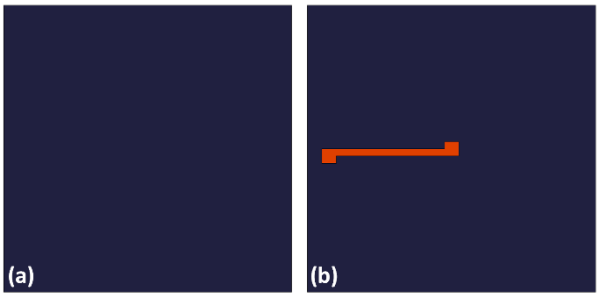


Figure 3.21 : Création d'une sous piste de cuivre (a) substrat vierge, (b) substrat avec une sous piste de cuivre.

Le procédé de lift-off est utilisé pour réaliser cette piste de cuivre. Le principe (Figure 3.22) consiste à enduire un substrat de résine avec une épaisseur au moins trois fois supérieur à l'épaisseur du métal déposée. Une étape de photolithographie est ensuite réalisée pour imprimer des motifs. Puis une étape de dépôt de métal (de cuivre dans ce cas) est effectuée. Pour finir le substrat est plongé dans une solution qui enlève la résine restante et laisse sur le substrat uniquement les motifs métalliques voulus.

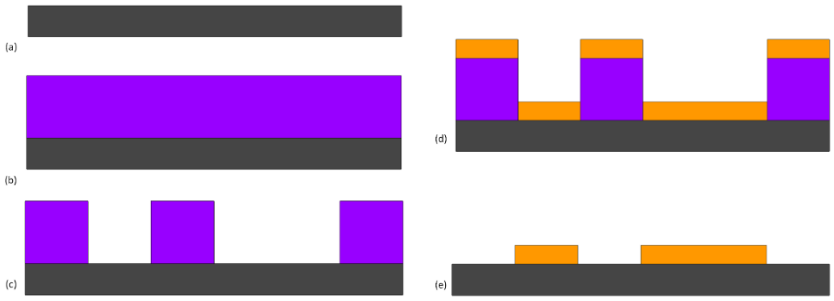


Figure 3.22 : Principe du procédé de lift-off.

Les détails du procédé sont présentés dans l'annexe du chapitre 3. Le substrat est ensuite plongé dans une solution de « chrome etch » diluée dans de l'eau désionisée en proportion un pour quatre pendant cinq secondes. La dernière étape est nécessaire avant de faire une courte gravure de cuivre pour diminuer la rugosité et arrondir les arêtes des motifs de cuivre.

IV- 1 - d - Deuxième niveau : ajout d'une couche isolante

Le deuxième niveau est destiné à ajouter une couche isolante au-dessus des pistes de cuivre. En effet, la piste de cuivre devant relier le centre de la microbobine à l'extérieur de celle-ci, elle se retrouve en-dessous des futures spires de cuivre. La couche isolante sert donc à séparer électriquement les deux parties. Afin de pouvoir réaliser les connexions électriques, il est nécessaire de graver aux extrémités de la piste de cuivre la couche isolante déposée précédemment (Figure 3.24).

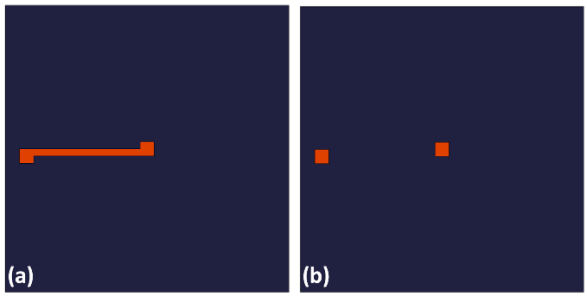


Figure 3.23 : Schéma de l'ajout d'une couche isolante : (a) substrat avec une sous-piste de cuivre, (b) ajout d'une couche isolante et ouverture des extrémités de la sous piste de cuivre.

Les détails du procédé sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

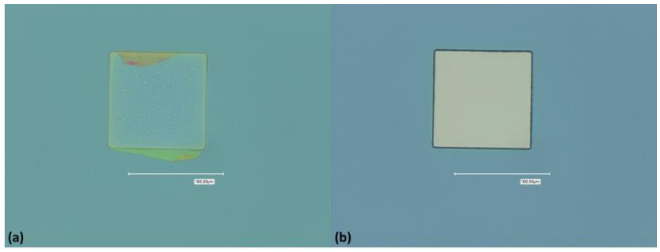


Figure 3.24 : Images en microscopie (a) avant et (b) après gravure.

Le niveau étant terminé, la sous piste de cuivre est réalisée et séparée électriquement des futures spires de cuivre. La croissance des spires de cuivre de la microbobine peut être réalisée.

IV- 1 - e - Troisième niveau : la croissance des spires de cuivre

Le troisième niveau de la fabrication des microbobines de contrôle du déplacement des NPM concerne la croissance des spires de cuivre. La sous-piste de cuivre étant protégée et ouverte pour les connexions, une couche d'amorce de faible résistivité est déposée. Elle sert de conducteur électrique sur l'ensemble du substrat. Le cuivre et l'or représentent des possibilités pour la couche d'amorce du fait de leurs faibles résistivités, 1,7 Ω.cm et 2,2 Ω.cm respectivement. Le cuivre, en plus de sa plus faible résistivité par rapport à l'or, a un coût plus faible. Pour éviter la diffusion du cuivre dans la silice et augmenter l'adhérence de la surface, on dépose une couche intermédiaire entre le cuivre et la silice. Selon la littérature, le titane est une bonne barrière à la diffusion du cuivre dans la silice (Kirchner et al. 1993), (Braud, 1995). De plus, la sous-couche de titane garantit une adhérence suffisante des motifs lors de l'étape de croissance des spires de cuivre (Magdalena Couty, 2012).

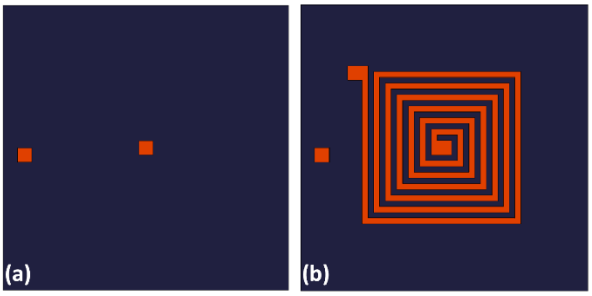


Figure 3.25 : Schéma de l'ajout des microbobines de cuivre : (a) substrat avec une couche isolante et des ouvertures sur la sous-piste de cuivre, (b) ajout des microbobines de cuivre.

L'étape suivante est la réalisation des motifs par enduction et photolithographie d'une résine. Le choix s'est porté sur la résine AZ4562, cette résine permettant d'obtenir des motifs d'épaisseur de 20 microns. Les conditions d'enduction et de recuit de cette résine ont été préalablement optimisées dans le laboratoire. La résine nécessite un recuit avec une rampe de température d'une heure en partant de la température ambiante jusqu'à 90°C. Après le recuit, la résine nécessite un temps de réhydratation important de quatre heures. En effet la lithographie exige un taux d'hydratation de la résine plus élevé que celui obtenu après recuit.

Comme pour toute enduction épaisse, une surépaisseur apparaît à la périphérie lors de l'enduction du substrat. Comme précisé en III.1.c, il est nécessaire d'enlever cette surépaisseur. La technique la plus simple pour enlever cette surépaisseur est d'utiliser un coton-tige avec de l'acétone.

L'insolation effectuée, la croissance des spires de cuivre peut être réalisée. Pour cela la méthode de dépôt électrolytique est utilisée. Cette technique permet d'obtenir des dépôts conformes, même à fort rapport d'aspect, avec des vitesses de croissance relativement élevées. Des épaisseurs de films dans une gamme allant de la centaine de nanomètres jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres peuvent être obtenues facilement avec de faibles taux de contraintes intrinsèques.

L'électrolyse est un processus qui permet la transformation de l'énergie électrique en énergie chimique. Le dispositif expérimental (Figure 3.26) le plus simple comporte deux électrodes (une anode et une cathode) plongeant dans une solution, appelée électrolyte, et reliées à une source externe de courant.

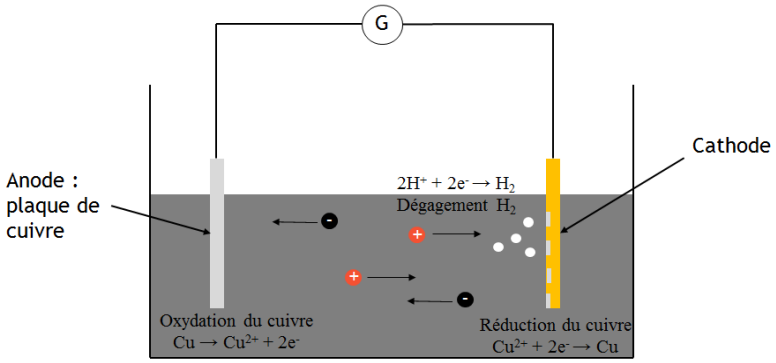


Figure 3.26 : Dispositif expérimental du dépôt électrolytique.

· L'anode est le siège de l'oxydation du métal M :

$M \rightarrow M^{n+}_{sol} + n*e^-$

Les ions métalliques créés (M^{n+}_{sol}) vont alors passer dans l'électrolyte.

· La cathode, lieu où arrivent les électrons (e^-), est le siège de la réduction des espèces métalliques en solution :

$M^{n+}_{sol} + n*e^- \rightarrow M$

L'électrolyte utilisé est un bain sulfaté acide (pH<1) commercial (Shipley). Un additif de type brillanteur, l'electroposit 270 (Shipley), est par ailleurs ajouté à cette solution de 2,5 $mL.L^{-1}$ à chaque utilisation.

Avant la croissance électrolytique, le substrat est traité par plasma oxygène afin d'augmenter la mouillabilité de la résine (Tableau 3.9). Il est à noter que sans ce traitement, la croissance n'est pas possible dans les petites ouvertures à cause des effets de tension superficielle, ce qui peut entrainer des défauts de fabrication.

Surface	Avant plasma O_2	Après plasma O_2
Résine AZ4562	80°	20°
Couche d'amorce Ti/Cu	70°	30°

Tableau 3.9 : Angle de contact avant et après traitement par plasma O_2.

La couche d'amorce est ensuite enlevée par gravure ionique (Ion Beam Etching IBE Roth & Rau IonSys 500).

L'ensemble des détails du procédé de fabrication des spires de cuivre est présenté dans l'annexe du chapitre 3.

Les microbobines sont ensuite caractérisées à l'aide du profilomètre mécanique DEKTAK et présentent une épaisseur de 15 µm +/- 2 µm.

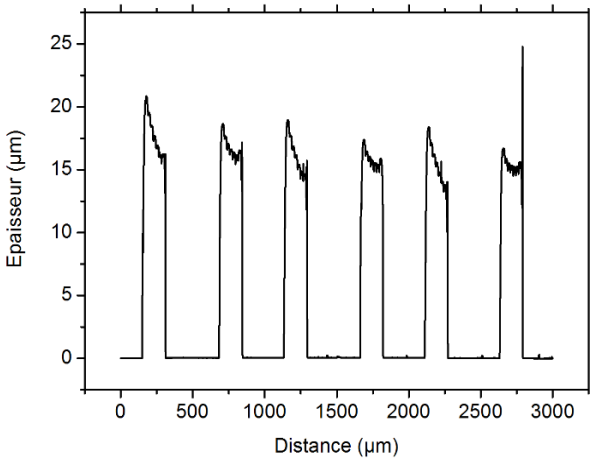


Figure 3.27 : Mesures par profilomètrie mécanique (Dektak 8) des microbobines réalisées.

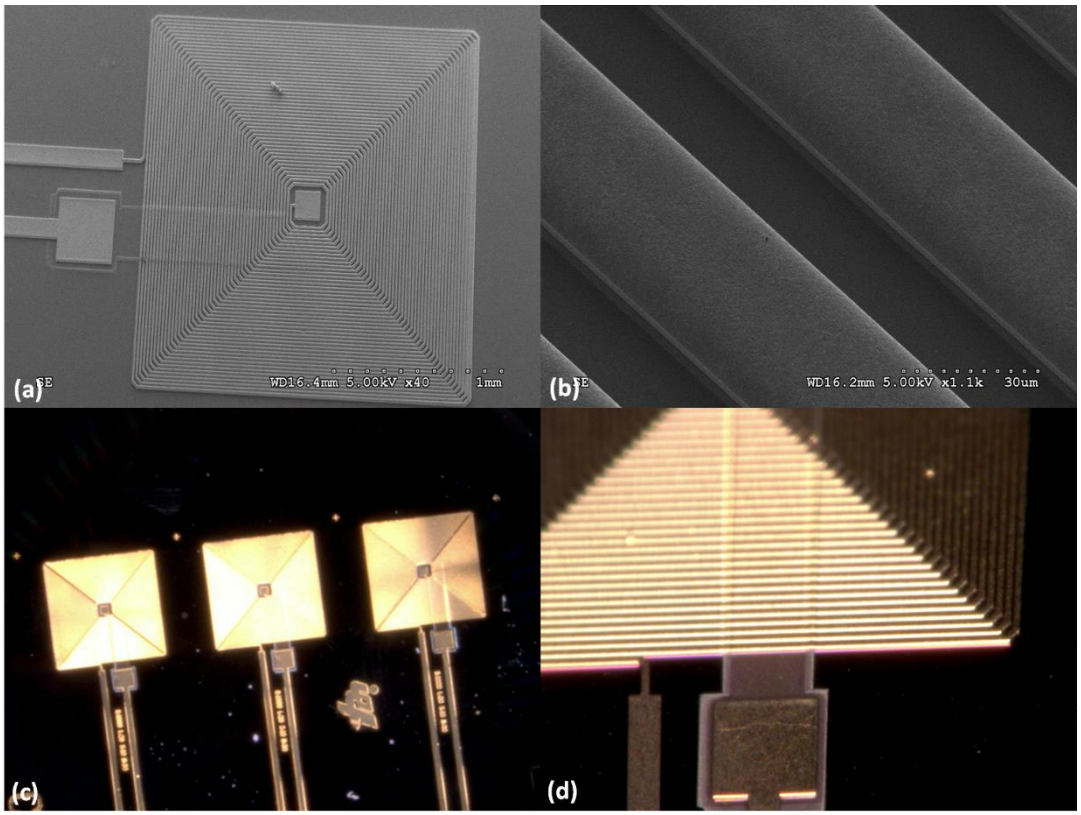


Figure 3.28 : Images des microbobines de contrôle du déplacement des NPM réalisées (a) au microscope électronique à balayage, (a) au microscope optique (Keyence).

IV - 2 - Finalisation du dispositif de contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques

Les microbobines présentes sur le substrat étant fabriquées et protégées, elles peuvent être séparées les unes des autres à l'aide d'une scie diamantée.

Une fois découpées, elles sont collées, à l'aide d'une colle liquide, sur une plaque de circuit imprimé. Cette plaque de PCB est constituée de larges pistes de cuivre permettant de relier le circuit de

détection aux appareils électriques à l'aide de deux soudures. La première soudure relie un des « pads » des microbobines de cuivre jusqu'à une des pistes de cuivre de la plaque de PCB. Et la deuxième relie la même piste de cuivre de la plaque de PCB à un fil électrique.

Les microbobines étant collées sur la plaque de PCB, elles sont connectées électriquement aux pistes de cuivre de la plaque de PCB par wire-bonding.

Le principe du wire-bonding est d'utiliser un fil d'aluminium de 20 microns de diamètre afin de relier deux métaux. La soudure est réalisée par ultrasons, le principe est présenté dans la Figure 3.29.

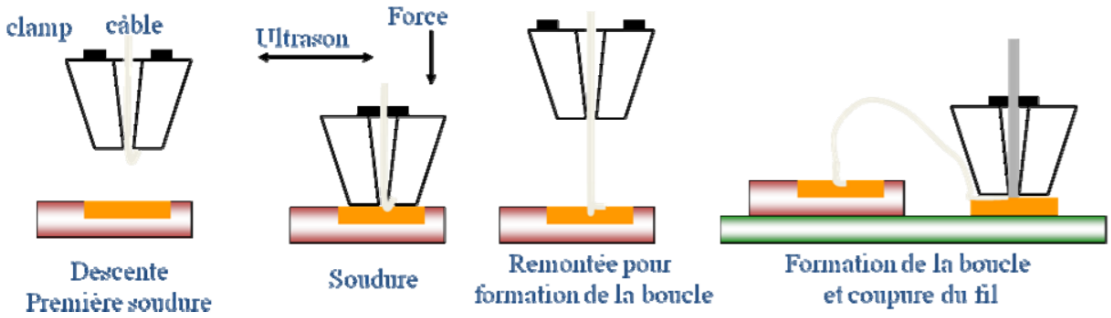


Figure 3.29 : Schéma de principe du wire-bonding.

Enfin, une soudure par étain classique est réalisée pour relier le circuit aux équipements de laboratoire (Figure 3.30).

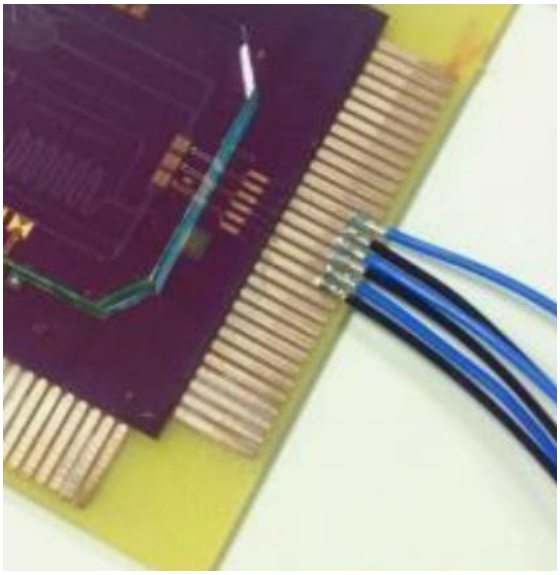


Figure 3.30 : Photographie d'un dispositif de contrôle du déplacement des NPM et des soudures réalisées.

La dernière étape consiste en l'assemblage du circuit fluidique. Le circuit fluidique est fabriqué tel qu'il a été décrit au Chapitre 3 II - 1 -. La différence est la forme du circuit utilisée (Figure 3.31). Elle permet d'utiliser plusieurs entrées afin de réaliser plusieurs injections de solutions (réactifs) en même temps.

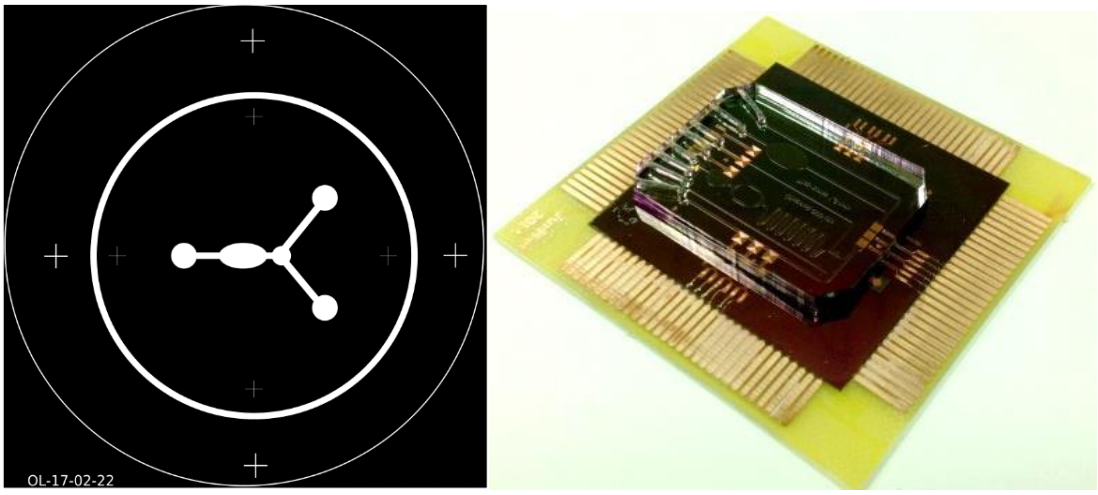


Figure 3.31 : (Gauche) Un des masques utilisé pour la fabrication des canaux microfluidiques (Droite) Photographie d'un dispositif de capture des NPM.

V - Procédé de fabrication du dispositif de détection magnétique

V - 1 - Procédé global de fabrication

Dans cette partie la fabrication des microbobines de détection est détaillée. Il s'agit d'un procédé comprenant neuf couches de fabrication sur un substrat de silicium (Figure 3.32). La conception de ces microbobines a été détaillée dans le chapitre 2.

La forme générale du cœur de la structure magnétique est représentée vue en coupe à la Figure 3.33.

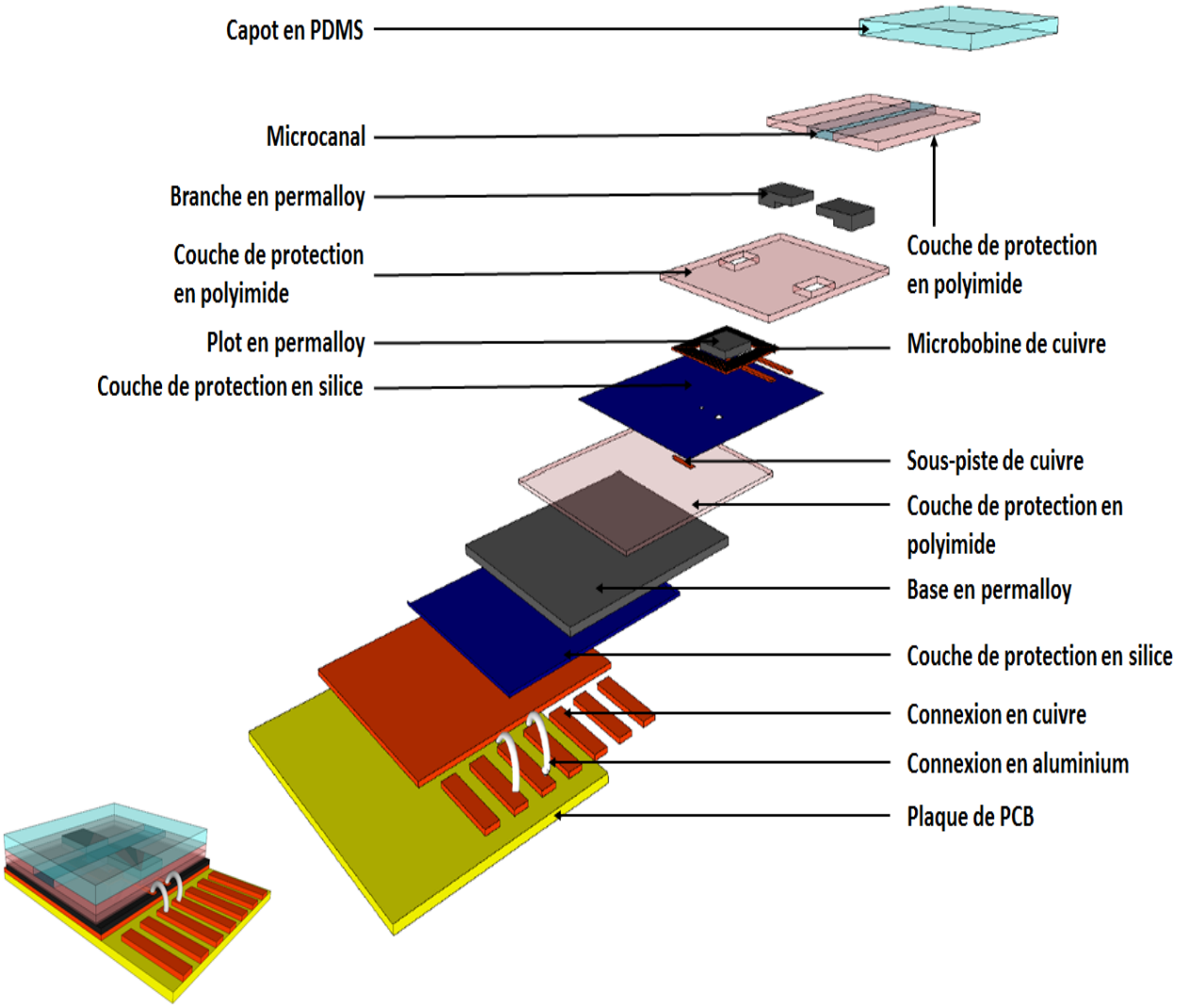


Figure 3.32 : Vue en 3D de la microbobine de détection.

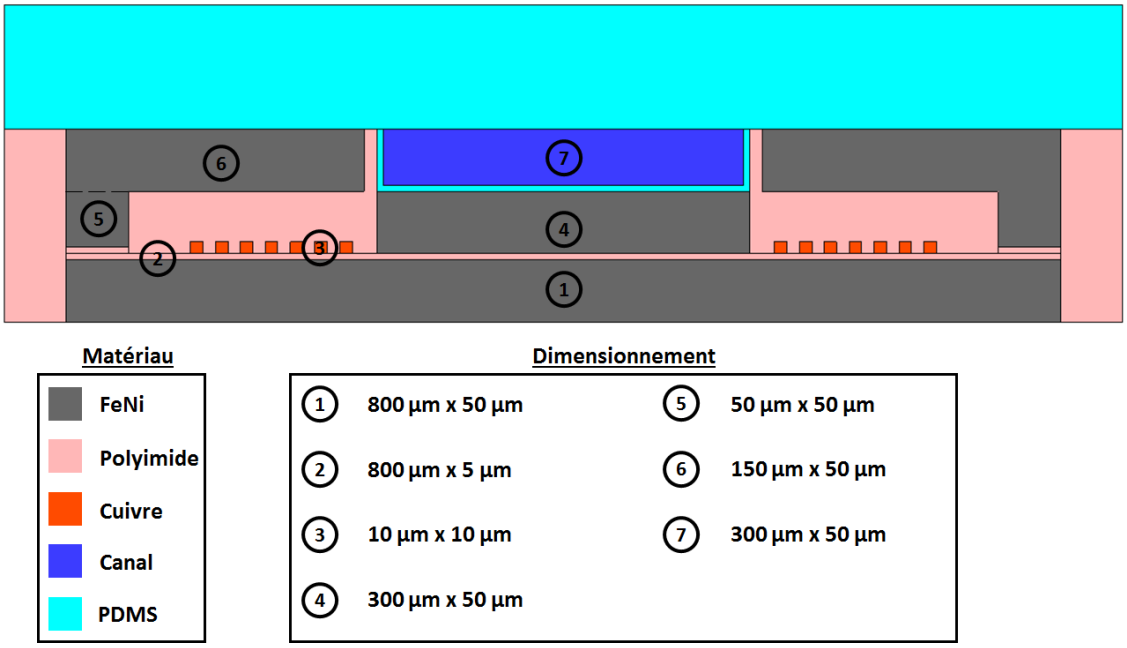


Figure 3.33 : Schéma du dimensionnement du dispositif de détection magnétique.

La conception des étapes de fabrication des microbobines de détection a été réfléchie et discutée pour établir la stratégie optimale pour les réaliser. Les différents choix technologiques réalisés sont commentés et expliqués au cours de cette partie.

La séquence des étapes est représentée en vue de dessus à la Figure 3.34. Ces étapes sont :

- La fabrication de la base du circuit magnétique (a-b) ;
- La couche de protection isolante (c) ;
- Les microbobines sur trois niveaux de masques (d-e-f) ;
- La fabrication du plot central en matériau magnétique (g) ;
- L'insertion des branches en matériau magnétique pour fermer le circuit magnétique (h-i) ;
- La réalisation des connexions électriques (j-k) et la superposition le circuit fluidique (l).

En fonction des étapes et des formes géométriques et des dimensions choisies, la conception des masques sera différente en fonction des étapes technologiques. Le dessin des masques a été réalisé soit sur un masque « chrome » (TOPPAN PHOTOMASK, Inc.) pour la réalisation des microbobines (Figure 3.34.d,e&f) soit imprimé sur feuille plastique « haute résolution » (Imprimerie IDM) pour la réalisation du circuit magnétique (Figure 3.34.b,g&i) et du polyimide (Figure 3.34.h&j).

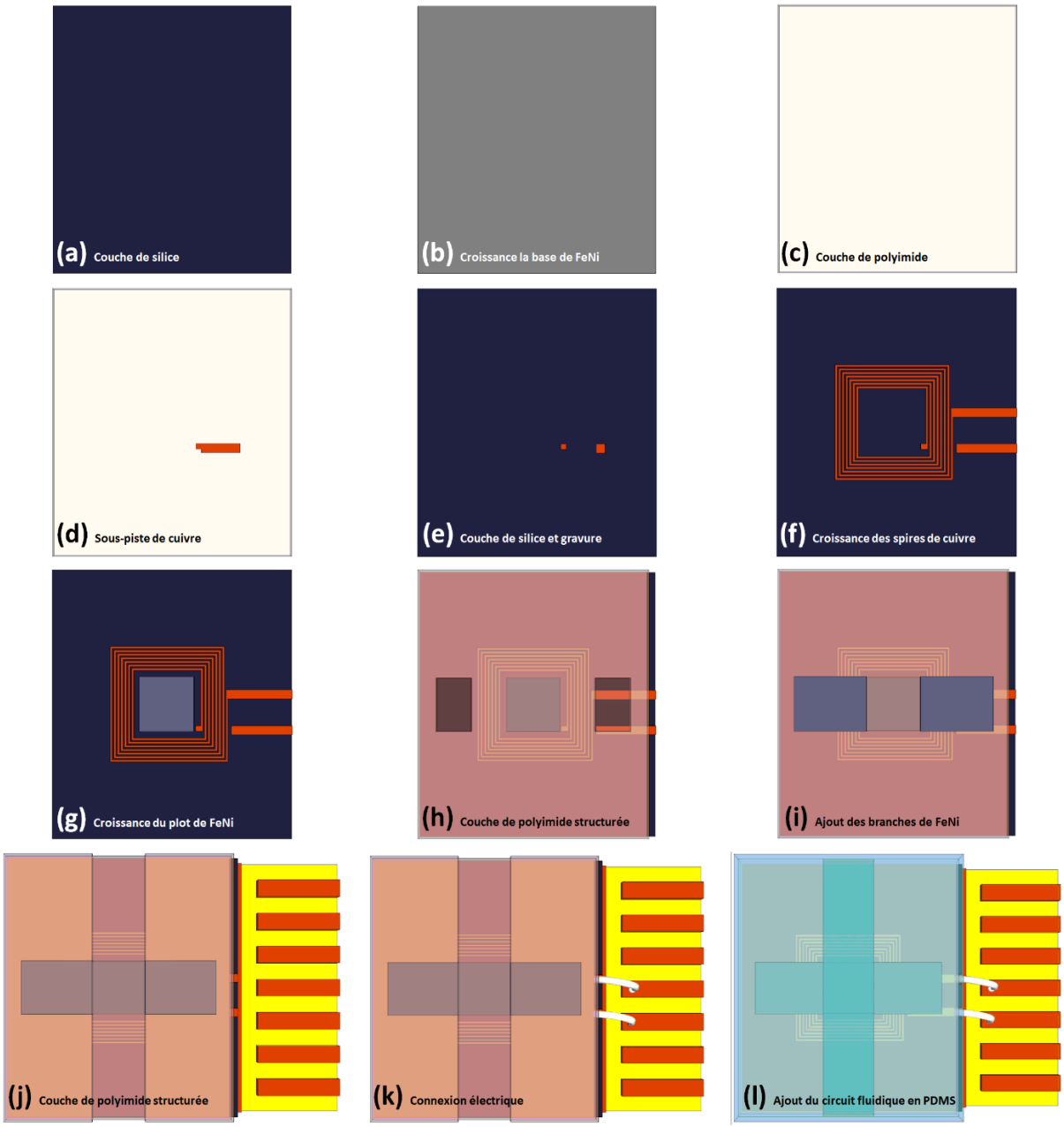


Figure 3.34 : Schéma détaillé des étapes de fabrication de la microbobine de détection. (a) Substrat nettoyé, (b) Base de Permalloy© (épaisseur 50 µm), (c) Couche de protection en polyimide (épaisseur 4,1 µm), (d) Sous piste de cuivre (épaisseur 800 nm), (e) Couche isolante en silice (épaisseur 500 nm), (f) Microbobine de cuivre (épaisseur 10 µm), (g) Plot en Permalloy© (épaisseur 50 µm), (h) Couche de protection en polyimide (épaisseur 50 µm), (i) Transfert des branches de Permalloy© (épaisseur 100 µm), (j) Couche de protection en polyimide (épaisseur 50 µm) et collage sur plaque de PCB, (k) Connexion des microbobines à la plaque de PCB, (l) Scellement fluidique avec un capot de PDMS.

V - 2 - Croissance sur trois niveaux des microbobines de détection

La croissance des microbobines de cuivre suit les mêmes étapes que celles présentées dans la partie IV -. Les motifs visés sont différents du fait de l'intégration du circuit magnétique et en particulier pour le nombre de spires visé (Figure 3.35).

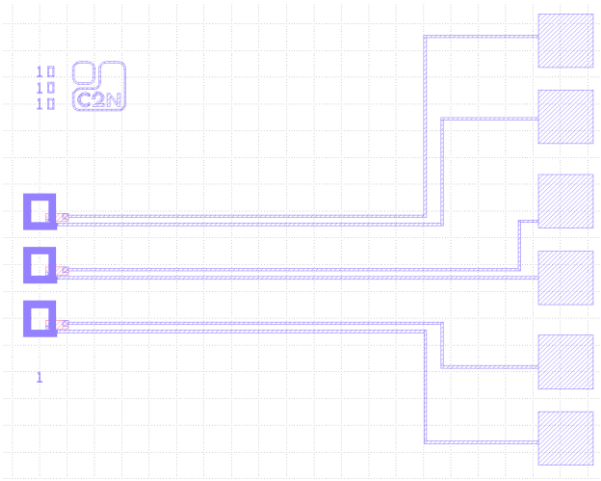


Figure 3.35 : Vue du dessin des masques des différents niveaux d'une microbobine de détection.

V- 2 - b -Premier niveau : création d'une sous-piste de cuivre

Le premier niveau est consacré à la création d'une sous-piste de cuivre. Tout comme lors de la création des microbobines de contrôle du déplacement des NPM, il faut prendre en compte la place du futur circuit fluidique qui viendra se placer au-dessus de la microbobine. Dans le cas du centre de la microbobine, il faut prendre en compte la croissance du plot en FeNi. Les alignements doivent être très précis pour éviter le recouvrement entre la connexion au centre de la microbobine et le plot en FeNi.

Les détails du procédé sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

Le substrat est ensuite plongé dans une solution de « chrome etch » diluée dans de l'eau désionisée en proportion un pour quatre pendant cinq secondes.

V- 2 - c - Deuxième niveau : ajout d'une couche isolante

Le deuxième niveau est destiné à ajouter une couche isolante au-dessus des pistes de cuivre.

A la différence des microbobines de contrôle du déplacement des NPM la température de dépôt par PECVD ne peut pas excéder 150°. Les détails du procédé sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

Une fois ce niveau terminé, la sous-piste de cuivre est réalisée et est séparée électriquement des futures spires de cuivre.

V- 2 - d -Troisième niveau : la croissance des spires de cuivre

Le troisième niveau concerne la croissance des spires de cuivre. Une fois la sous-piste de cuivre protégée et ouverte pour les connexions, une couche d'amorce de titane et de cuivre est déposée.

L'étape suivante est la réalisation des motifs par enduction et photolithographie d'une résine. Pour cette étape, la planéité du wafer est importante. Les conditions standard d'exposition de la résine supposent une épaisseur uniforme et un masque en contact avec la résine. Si l'épaisseur de FeNi varie, les dimensions finales des motifs peuvent différer des dimensions du masque. Nous avons choisi une dimension minimale de 10 µm, valeur relativement ambitieuse compte-tenu des reliefs attendus pour

ce procédé. Une fois l'insolation réalisée, la croissance des spires de cuivre peut être réalisée par dépôt électrolytique.

L'ensemble des détails du procédé est présenté dans l'annexe du chapitre 3.

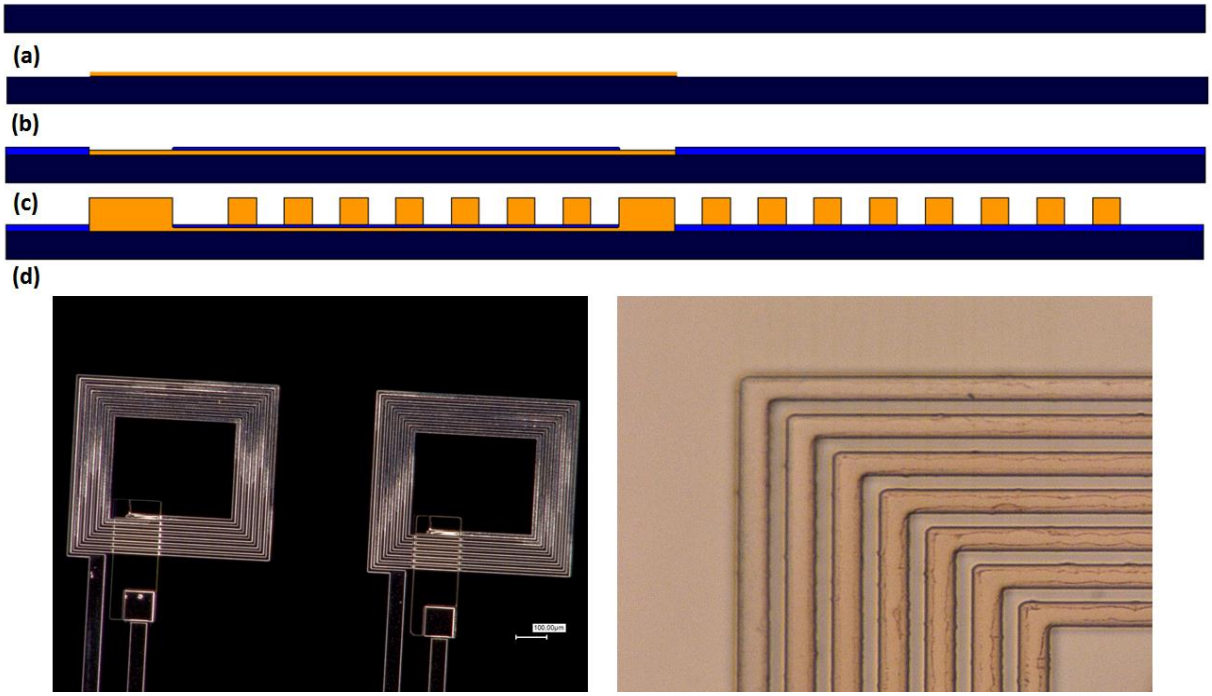


Figure 3.36 : (a-b-c-d) Schéma de la création des trois niveaux d'une microbobine, (e-f) Images au microscope optique (Keyence) des microbobines de détection.

V - 3 - L'utilisation de polyimide en tant que couche isolante structurable

La protection la plus courante dans la littérature, comme pour les microbobines à trois niveaux précédemment présentées, consiste à déposer une couche diélectrique de silice (SiO_2)par PECVD (Golda, Lang, & Culpepper, 2008). Les couches déposées par pulvérisation (CVD, PECVD …) ne peuvent cependant pas avoir plusieurs microns d'épaisseur. Les motifs réalisés ici ont une épaisseur de quelques microns à quelques dizaines de microns. Il est donc nécessaire de rechercher des couches isolantes plus épaisses que les couches habituelles de la microélectronique.

Les polyimides peuvent être utilisés comme couche structurelle, couche sacrificielle, en remplacement des substrats de silicium pour l'élaboration de capteurs souples ou encore pour l'encapsulation de composants (Cheang, Christensen, & Reynaga, 1996; Guisiano, 2011; Mochizukil & Ueda, 2001; Wilson & Atkinson, 2007; Windrich, Malanin, J.Eichhorn, Voit, & Lang, 2014). Suivant son utilisation et la méthode de dépôt (enrésinement, spray coating…), l'épaisseur du film obtenu est très variable : pour son utilisation en tant que substrat ou dans le packaging, le film peut avoir quelques dizaines de microns d'épaisseur tandis que pour son utilisation en tant que film diélectrique, pour des récupérateurs d'énergie capacitifs par exemple, l'épaisseur du film doit être préférentiellement inférieure à la dizaine de microns. Les appellations commerciales les plus connues de tels polyimides sont : Kapton, Kinel, Upilex, Upimol, Vespel.

Les compositions chimiques des polyimides sont très variées et compatibles avec l'adjonction d'additifs ce qui leur confère un grand nombre de propriétés matérielles. Ils peuvent être conducteurs, magnétiques, piézoélectriques ou photosensibles. De manière générale les polyimides sont de bons diélectriques, ils ont une bonne résistance aux radiations, sont stables thermiquement et chimiquement. Ils sont de plus très résistants et peu chers.

Dans le cas du procédé développé ici, la couche recherchée doit être isolante. Le matériau doit être déposé en épaisseurs de quelques microns à quelques dizaines de microns et on doit pouvoir y réaliser des motifs. Notre choix s'est porté sur le polyimide LTC 9310 de FUJIFILM.

V- 3 - a -Présentation du polyimide LTC 9310 de FUJIFILM

Cette partie résume les principales données fournies par le fabricant sur la composition et les propriétés de la série de polyimide LTC 9300. Le polymère LTC 9310 est photosensible. Il est prévu pour réaliser préférentiellement des dépôts de 10 µm d'épaisseur.

V - 3 - a - i - Composition du polyimide

Composé	Fonction	Proportion
Gamma.-butyrolactone	Solvant	30-60%
Ester d'acide polyamique	Polymère	25-45%
Silane amidocarboxylique trialcoxylé	Promoteur d'adhésion	0,5-2%
1,2-Octanedione, 1-[4-(phenylthio)phenyl]-, 2-(O-benzoyloxime)	Composé photosensible	0,8-1,5%

Tableau 3.10 : Composition chimique du polyimide.

Le Tableau 3.10 résume les différents composants du polyimide.

V - 3 - a - ii - Propriétés physiques du polyimide

Dans cette sous-partie seules les propriétés décrites par le fournisseur du polyimide photosensible (Fujifilm) sont présentées.

♦ ***Propriétés thermiques :***

La température de transition vitreuse du polyimide est supérieure à 300°C et la température de décomposition se situe au-delà de 400°C.

♦ ***Propriétés mécaniques :***

Le polyimide possède une bonne résistance à la fatigue et une bonne adhérence. Ses autres caractéristiques sont :

- une résistance à la traction supérieure à 100 MPa
- un module d'Young supérieur à 3 GPa
- une rupture à l'élongation supérieure à 50%

♦ ***Propriétés chimiques :***

Le polyimide possède une bonne résistance aux solutions chimiques (solvants, acides et bases) et résiste aux réactions d'hydrolyse ce qui est particulièrement avantageux pour les applications médicales.

♦ ***Propriétés électriques :***

Les propriétés électriques du polyimide sont une constante diélectrique d'environ 3,3 $F.m^{-1}$, une rigidité diélectrique supérieure à 400 V/µm et une résistivité égale à 10^{15} Ω.cm.

V- 3 - b -Mesure de l'épaisseur en fonction de la vitesse et du temps de rotation de la tournette d'enduction

Une étude sur l'enduction du polyimide a été réalisée. La Figure 3.37.a présente les résultats obtenus pour un temps donné (trente secondes) et en faisant varier la vitesse de rotation. L'épaisseur du film varie alors de 6,8 µm pour une vitesse de 5000 tr/min à 90 µm pour une vitesse de 500 tr/min. Les disparités d'épaisseurs entre les bords et le centre de l'échantillon augmentent avec l'épaisseur du film. Si l'on désire un film épais homogène, il sera alors préférable de déposer plusieurs fines couches de polyimide (10-20 µm) plutôt qu'une seule couche épaisse.

Pour réaliser une épaisseur plus fine, il est possible de faire varier le temps de rotation de 30 secondes à 3 minutes tout en gardant une vitesse de rotation de 5000 tr/min. Comme le montre la Figure 3.37.b, l'épaisseur du film varie respectivement de 6,7 µm à 4,1 µm.

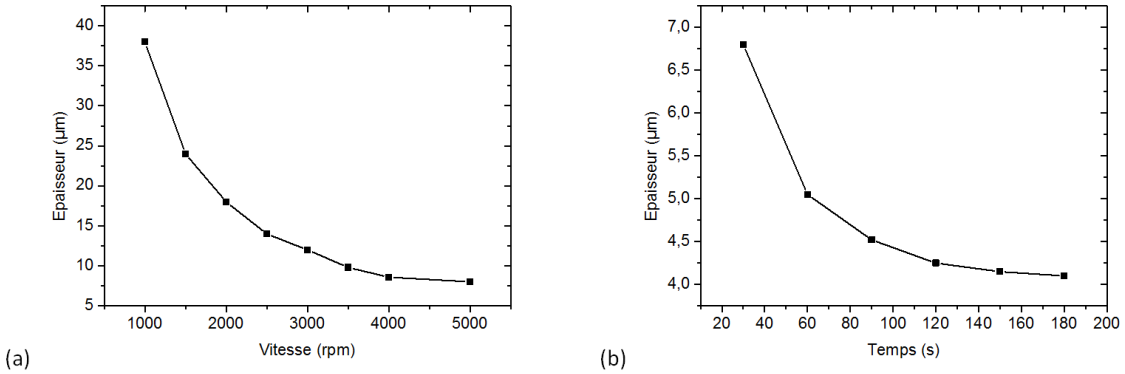


Figure 3.37 : (a) épaisseur en fonction de la vitesse de rotation pour une durée de 30 secondes (b) épaisseur en fonction du temps de rotation pour une vitesse de 5000 tours/min.

V- 3 - c - Structuration du polyimide

Une couche de polyimide de 4,1 µm étant enduite sur un substrat, elle peut être structurée à l'aide d'une étape de photolithographie. Pour cela, les conditions d'utilisation du fournisseur sont observées et une insolation de 400 mJ/cm² est réalisée. L'utilisation d'un masque est nécessaire pour structurer le polyimide. En effet, le polyimide se polymérise et se durcit à l'aide du rayonnement ultra-violet, les motifs protégés sont solubles dans la solution appropriée (HTR D2). Un recuit après exposition, d'une minute à 50°C ou trente minutes à température ambiante, est nécessaire. Il permet de compléter la

réaction de polymérisation amorcée par l'insolation et de réduire les contraintes mécaniques dans le film.

Le développeur utilisé est le HTR D2, composé de cyclopentanone, un solvant organique oxygéné apolaire. Pour le rinçage de l'échantillon on utilise un autre solvant apolaire le RER 600, composé d'Acétate de 2-méthoxy-1-méthyléthyle. Le fournisseur préconise de développer le polyimide par pulvérisation en spray du développeur. La technique étant difficile à mettre en place, il a été choisi de développer les échantillons dans des bains de solvants avec une agitation manuelle continue. Le temps de développement dépend de l'épaisseur du film et de la quantité de polyimide à solubiliser.

Les temps reportés ci-après sont des temps indicatifs pouvant varier fortement, selon la quantité de polyimide à dissoudre. La révélation du motif est réalisée en 3 étapes, le développement, le pré-rinçage et le rinçage. L'échantillon est développé dans un bain de HTR D2 pendant 2 min 20s, il est ensuite pré-rincé dans un mélange HTR D2 : RER 600 (1 :1) pendant 40 s, et on termine le rinçage dans un bain de RER 600 pendant 1 min. L'échantillon est ensuite séché à l'azote.

V - 3 - c - i - Étude de la résolution des motifs

♦ ***Observation par microscopie optique***

Nous avons donc utilisé un masque en chrome composé de motifs de différentes largeurs (10, 20, 50, 100, 200 et 400 µm) espacées d'intervalles de dimensions équivalentes sur un film de polyimide de 12 µm d'épaisseur. L'insolation est réalisée en mode « hard contact », c'est-à-dire au plus près du substrat. Après développement, l'échantillon est observé au microscope optique pour déterminer la limite de résolution. Le masque permet de tester une résolution allant de 10 à 400 µm. Les motifs de 10 µm ont donnés lieu à des motifs de 10,05 µm en moyenne. (Figure 3.38).

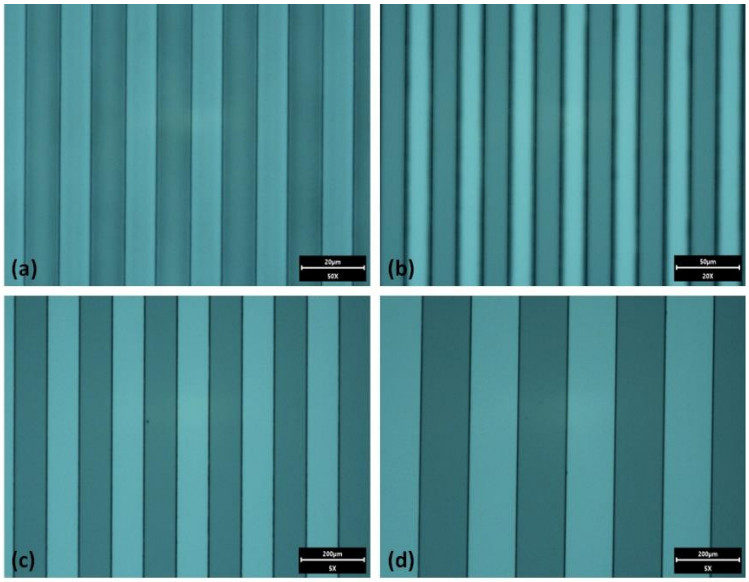


Figure 3.38 : Observation en microscopie optique (Keyence) : lignes de polyimide d'épaisseur 20 µm et de largeur (a) de 10 µm, grossissement X 50 ; (b) de 20 µm, grossissement X 20 ; (c) de 100 µm, grossissement X 5 ; (d) de 150 µm, grossissement X 5.

♦ ***Observation MEB des flancs d'un film de polyimide***

L'échantillon est clivé puis observé au MEB. Les images obtenues sont présentées en Figure 3.39. On observe que les flancs de la résine sont relativement verticaux. Les flancs sont légèrement bombés, ce qui indique des conditions d'insolation proches des conditions optimales. La base des poutres est légèrement élargie.

Les formes obtenues étant satisfaisantes pour l'application visée, aucune expérience supplémentaire n'est menée. Cependant, il serait intéressant de modifier à la marge les conditions d'insolation et de développement pour obtenir des flancs droits et un pied de motif sans élargissement.

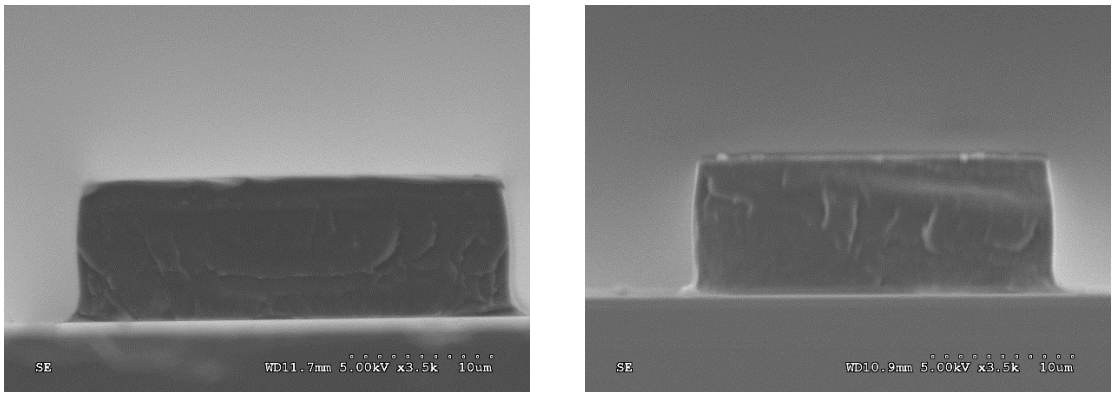


Figure 3.39 : Observation par microscopie électronique à balayage des flancs d'une poutre de polyimide (épaisseur de (Gauche) 25 µm et (Droite) 30 µm).

V- 3 - d -Utilisation du film de polyimide dans les procédés de fabrication

Les réactions du polyimide sur les différentes étapes du procédé ont été observées afin d'observer sa compatibilité avec l'ensemble du procédé.

V - 3 - d - i - Pulvérisation cathodique

La première étude a été de tester la compatibilité entre un film de polyimide et un dépôt de titane/cuivre. La compatibilité de ces deux étapes de fabrication se traduit par une bonne adhérence entre la couche conductrice Ti/Cu et le film diélectrique de polyimide. Cette adhérence est généralement mesurée dans un premier temps par de simples tests de traction de films adhésifs (Woytasik, 2005).

	Titane	**Cuivre**
Pression en Argon (µbar)	8	8
Courant (mA)	200	400
Temps de décapage (s)	600	250
Temps de dépôt (s)	200	200

Tableau 3.11 : Paramètres de dépôt des couches de titane (10 nm) et de cuivre (100 nm)

Le dépôt de la couche Ti/Cu a été réalisé sur trois substrats de diamètre 2 pouces enduits de polyimide d'une épaisseur de 12 µm sur toute leur surface. Le premier n'a pas été traité avant le dépôt,

les deux autres ont été traités par plasma oxygène de différentes durées (30 secondes et 2 minutes). Pour chacun des échantillons, différents films adhésifs ont été utilisés, et aucun n'a permis l'arrachement le la couche métallique.

Le polyimide est par conséquent un polymère sur lequel des dépôts de couches minces adhèrent suffisamment pour y faire croître des motifs. Notons que ce n'est pas le cas de tous les polymères diélectriques : le PDMS, par exemple se décolle immédiatement lors de ce test de traction.

V - 3 - d - ii - Dépôts de métaux par croissance électrolytique

Afin de tester la compatibilité du polyimide avec les procédés d'électrodépôt, les croissances de cuivre et de FeNi ont été réalisées.

Deux procédés ont ainsi été testés :

- l'utilisation du polyimide pour le micromoulage du cuivre.
- la structuration du polyimide sur des plots de $Ni_{20}Fe_{80}$ électrodéposés.

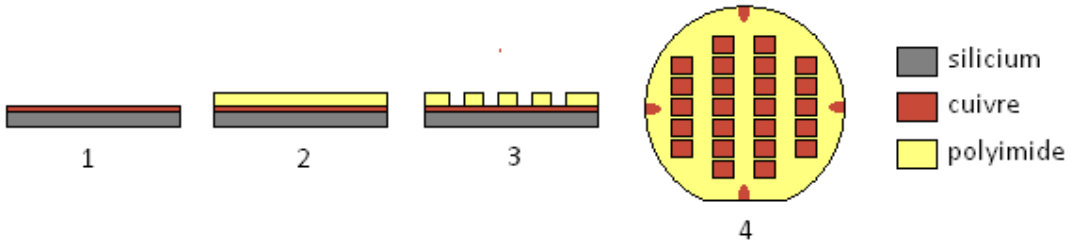


Figure 3.40 : Préparation de l'échantillon pour le dépôt de cuivre : (1) pulvérisation cathodique de titane cuivre sur un substrat silicium (2) enduction du polyimide (épaisseur = 12 µm) (3) motif après insolation et développement (vue de profil) (4) motif après insolation et développement (vue de face).

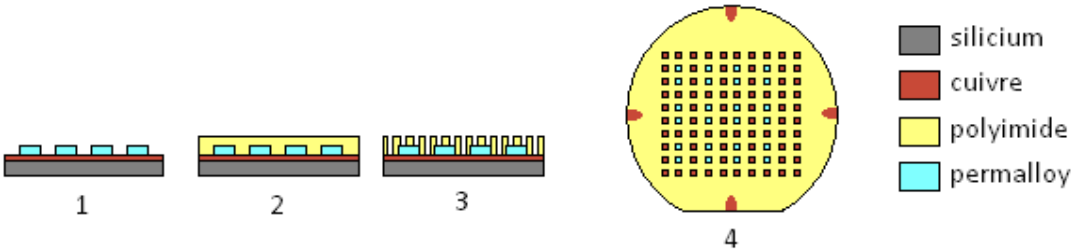


Figure 3.41 : Préparation de l'échantillon pour le dépôt de fer-nickel (1) réutilisation d'un échantillon possédant une sous-couche de titane/cuivre avec des plots de Permalloy© (2) enduction du polyimide (épaisseur = 12 µm) (3) motif après insolation et développement (vue de profil) (4) motif après insolation et développement (vue de face).

La microstructuration de polyimide est compatible avec les procédés de dépôt électrolytique. D'une part il permet une bonne isolation électrique des zones protégées, d'autre part le film n'est pas altéré par la nature acide de l'électrolyte, en particulier celui du cuivre.

V - 3 - d - iii - Tests de résistance aux solutions chimiques

Afin d'évaluer la compatibilité du polyimide avec certains procédés de fabrication, sa résistance face à des solutions chimiques acides et basiques ainsi qu'aux solvants des procédés utilisés pour les présents travaux doit être étudiée. Pour cela, un substrat de silicium oxydé recouvert d'un film de polyimide d'épaisseur 12 µm est laissé au repos dans les différentes solutions pendant 48 heures. Les différentes solutions testées et les résultats sont récapitulés dans le Tableau 3.12.

Procédé de fabrication		Composé actif	pH	Compatibilité
Croissance électrolytique	Ni ou NiFe	Acide borique	≈ 3,5	Oui
	Cu	Acide sulfurique	0,17	Oui
Gravure chimique	Ni ou NiFe	Aqua regia	Non-mesuré	Oui
	Cu	Sodium persulfate	1,04	Oui
	Cu	Ammoniaque	≈ 9	Oui
Solvants		Acétone	Non mesuré	Non (déstructuration)
		Isopropanol		Oui
		Ethanol		Oui

Tableau 3.12 : Tests de résistance du polyimide pour les différentes solutions du procédé.

V - 3 - d - iv - Procédé de dépôt de la couche isolante de polyimide

Les différentes études ont montré que le polyimide supporte les différentes étapes de notre procédé technologique.

Pour réaliser la couche isolante de polyimide le procédé finalement adopté est le suivant :

- Le substrat est enduit de polyimide avec une vitesse de 5000 tours par minute pour une durée de 180 secondes pour atteindre une épaisseur de 4,1 µm.
- Le recuit du substrat se fait sur plaque chauffante à 100°C pendant quatre minutes.
- Le polyimide est insolé sur un aligneur double face EVG 620 avec une dose de 400 mJ/cm².
- Un recuit à 50°C pendant une minute est ensuite réalisé.

La couche de polyimide étant déposée sur le substrat, la fabrication des microbobines de détection peut être réalisée.

V - 4 - Croissance de FeNi par dépôt électrolytique

Le substrat est préparé suivant les étapes décrites en III- 1 - c -. Le substrat étant nettoyé et la couche sacrificielle de titane/cuivre déposé, l'étape d'enduction peut être réalisée.

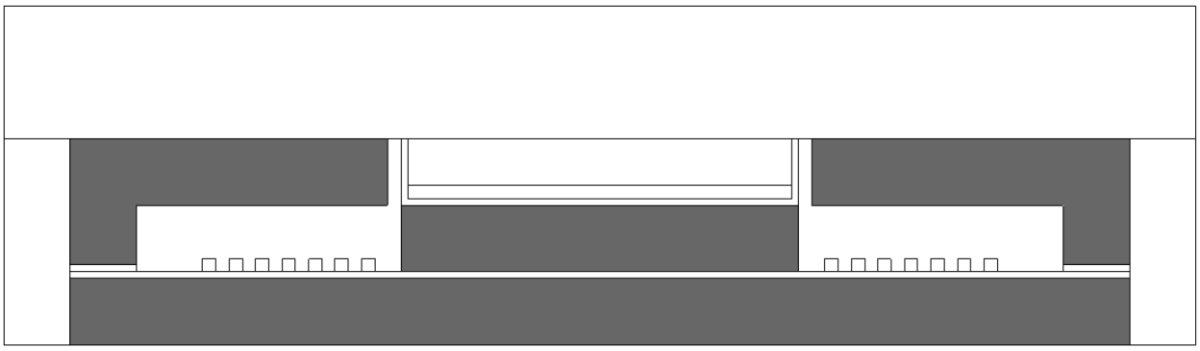


Figure 3.42 : Schéma du circuit magnétique réalisé par dépôt électrolytique en FeNi.

V- 4 - b -Enduction d'une résine épaisse

Pour réaliser une croissance de métaux de 50 µm, il faut utiliser une résine d'épaisseur supérieure. La résine SU8 utilisée dans la fabrication de canaux microfluidiques ne peut être utilisée ici. En effet une des propriétés de la résine SU8 est sa forte résistance au solvant une fois polymérisée. Elle ne peut donc pas être enlevée après la croissance électrolytique.

La résine AZ40XT MicroChem© (https://microchemicals.com/micro/tds_az_40xt.pdf) est une résine positive ultra-épaisse (15 – 100 µm) et peut être dissoute après insolation. La résine AZ 40XT ne nécessite pas de temps de réhydratation. De plus les temps de recuit de la résine AZ 40XT sont courts (<10 min).

Un recuit post-exposition est nécessaire pour compléter la réaction de photolithographie et rendre la résine « développable ».

Des tests de calibration de l'épaisseur ont été réalisés : Les résultats (Figure 3.43) ont permis de choisir les paramètres d'enduction pour la suite du procédé.

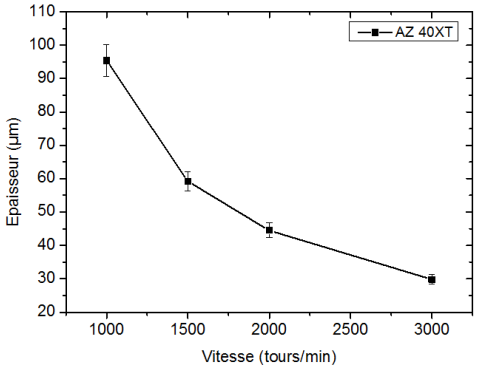


Figure 3.43 : Epaisseurs de résine AZ 40XT en fonction de la vitesse d'enduction pour une durée de 20 secondes. Mesures réalisées au profilomètre mécanique DEKTAK 8.

L'épaisseur à choisir dépend du but des différentes étapes. La résine va servir pour réaliser le dépôt d'une épaisseur maximale de 50 µm de Permalloy©. Les paramètres choisis pour l'enduction de la résine AZ 40XT sont :

- Une enduction du substrat à une vitesse de 1500 tours par minute pendant vingt secondes pour obtenir une épaisseur de 60 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant deux minutes puis à 95°C pendant deux minutes et enfin à 125°C pendant trois minutes.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 850 mJ/cm².
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant vingt secondes puis à 95°C pendant deux minutes quarante.
- La résine insolée est enlevée à l'aide de la solution MIF 326 MicroChem© pendant quatre fois une minute.

La résine choisie, le dépôt du matériau magnétique peut être réalisé.

V- 4 - c - La croissance de Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$

La croissance d'alliage de FeNi par dépôt électrolytique est réalisée à l'aide d'un bain électrolytique. Dans le cas de l'alliage binaire Fe_xNi_y, la composition de l'alliage déposé diffère fortement de la composition du bain. De plus, la composition de l'alliage dépend très fortement de la densité de courant. Ainsi, pour de faibles densités de courant (<5 mA/cm^2), l'alliage est très riche en fer (jusqu'à 40%) et ce contenu en fer diminue si la densité de courant augmente. Les études réalisées (Courtot, 2003 & Sasaki, 1998) ont permis d'établir une densité de courant permettant d'obtenir une composition $Fe_{20}Ni_{80}$, proche du Permalloy©, pour 14,5 mA/cm2. Pour le bain choisi, la vitesse de dépôt du Permalloy© $Fe_{20}Ni_{80}$ est de 0,075 µm par minute. En considérant la vitesse linéaire, pour réaliser une épaisseur de 50 µm il est nécessaire d'avoir un temps de dépôt de 667 minutes (soit environ onze heures).

Il a été choisi de fabriquer l'ensemble de la microbobine sur une base de matériau magnétique, en prenant en compte les reports des connexions électriques. Ainsi les motifs réalisés sont de grandes tailles : 16 x 9,9 mm.

Les paramètres de la solution de bain sont :

- 0,75 M $NiSO_4 \cdot 6H_2O$
- 0,02 M $NiCl_2 \cdot 6H_2O$
- 0,4 M H_3BO_3
- 0,016 M $C_7H_5NO_3S$
- 0,03 M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

Les paramètres de la croissance en FeNi sont :

- Une contre-électrode de Nickel à une distance de 2 centimètres du substrat.
- Un dépôt pulsé avec un courant anodique de -10 mA/cm² pendant 20 ms et un courant cathodique de 22,5 mA/cm² pendant 2,22 ms.

Pour rappel, avant la croissance électrolytique, le substrat est traité par plasma oxygène afin d'augmenter la mouillabilité de la résine. Il est à noter que sans ce traitement, la croissance n'est pas possible dans les petites ouvertures à cause des effets de tension superficielle.

V- 4 - d - L'étude de la croissance de FeNi pour des couches de grandes épaisseurs

V - 4 - d - i - Stabilisation du procédé de croissance

Les premiers essais de croissance de FeNi ont été réalisés sur un masque contenant des carrés de 1 cm² afin de stabiliser le procédé avant de commander des masques avec les motifs voulus.

En prenant en compte le temps nécessaire pour réaliser 50 µm d'épaisseur, un point se dégage avant même le premier essai. Il est nécessaire lors du dépôt électrolytique de faire réaliser des quarts de tours au substrat afin d'obtenir des motifs réguliers. En effet le système utilisé pour le dépôt électrolytique amène le courant au substrat à travers une pince crocodile. Le courant va donc être légèrement plus fort sur les premiers motifs rencontrés, entraînant une légère différence de vitesse de croissance et de composition sur le substrat. La rotation imposée au substrat va donc diminuer fortement ce défaut.

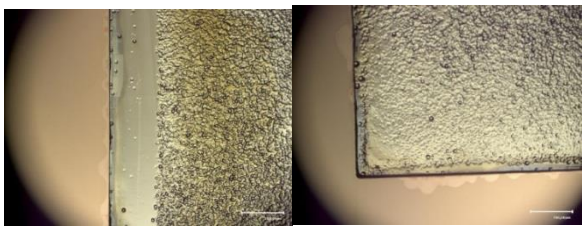


Figure 3.44 : Photographies au microscope optique (Keyence) de plots en FeNi après des cycles de 45 minutes.

Le temps maximum pour un cycle de croissance est 30 minutes. La Figure 3.45 présente le potentiel en fonction du temps observé lors du dépôt du FeNi pour une durée de 60 minutes (a) et une durée de 30 minutes (b). Après 35 minutes le potentiel perd sa stabilité, ce qui s'est caractérisé l'apparition d'une couche granuleuse sur les carrés en FeNi qui est visible sur la Figure 3.44.

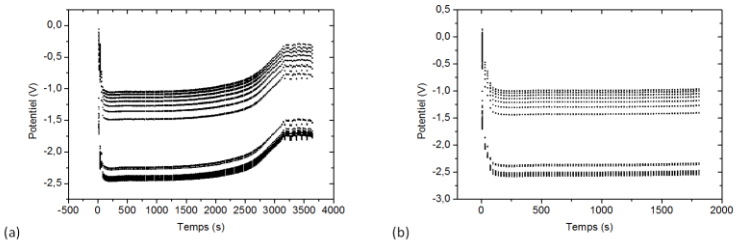


Figure 3.45 : Potentiel en fonction du temps du dépôt électrolytique de FeNi pour une durée de 60 minutes (a) et 30 minutes (b).

Comme le montre la Figure 3.46.a, un dépôt continu conduit à un décollement des motifs lors de l'élimination de la résine.

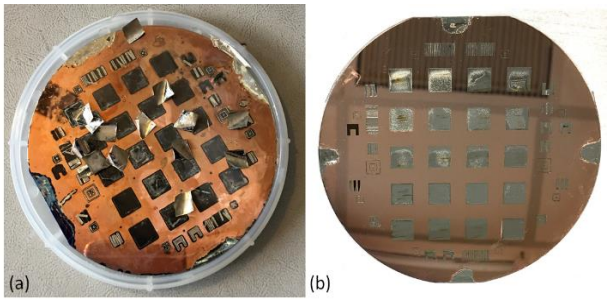


Figure 3.46 : Photographie des substrats après dépôt électrolytique. (a) Premier essai, (b) après changement de procédé de dépôt électrolytique (ajout des temps de relaxation).

Le procédé a donc été : les premiers cycles ont été modifiés en imposant des temps de repos. Pour chaque croissance de Permalloy©, les quatre premiers cycles durent une minute et entre chaque cycle un temps de relaxation de dix minutes est imposé au substrat. Après ces quatre cycles, les quatre suivants durent dix minutes et ont un temps de « relaxation » de tente minutes. Les cycles suivants durent trente minutes et ont un temps de relaxation de trente minutes. Les résultats sont visibles à la Figure 3.47.

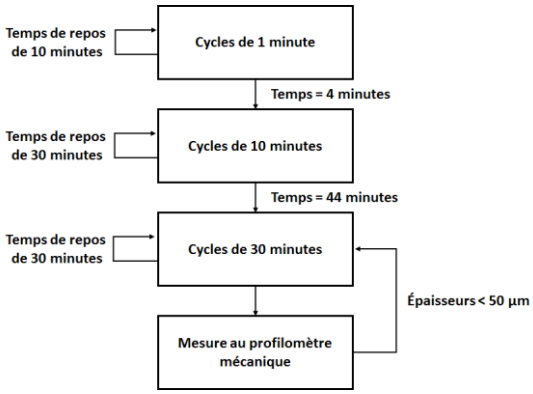


Figure 3.47 : Représentation du cycle de dépôt du Permalloy© à température ambiante.

V - 4 - d - ii - Premiers essais : apparition de surépaisseur de FeNi en bordure : « oreilles de chat »

Le procédé de croissance du FeNi étant stabilisé sur les motifs tests, le premier masque pour la fabrication des bases du circuit magnétique a été réalisé (Figure 3.48.a).

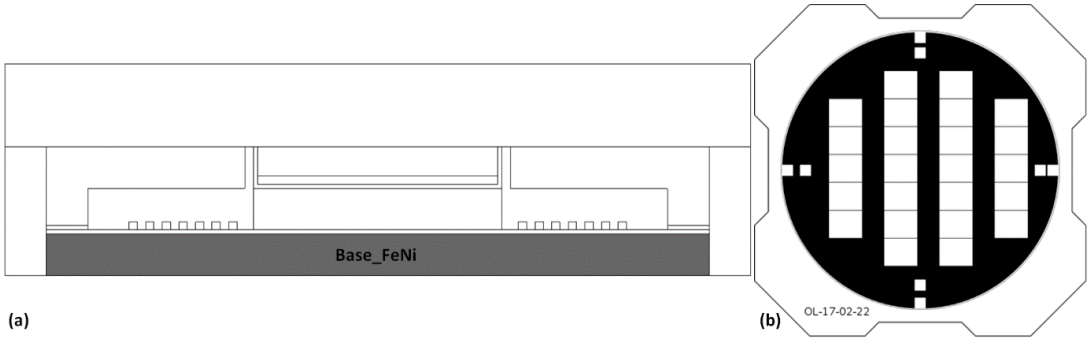


Figure 3.48 : Schéma (a) en coupe de la base de Permalloy© et (b) du premier masque des motifs de la base du circuit magnétique.

Les premiers résultats expérimentaux utilisant ce masque ont révélé une amplification des surépaisseurs sur les pourtours des motifs par rapport aux motifs de test : les bords sont deux fois plus épais que le centre ce qui forme des structures en « oreilles de chat » Figure 3.49.a.

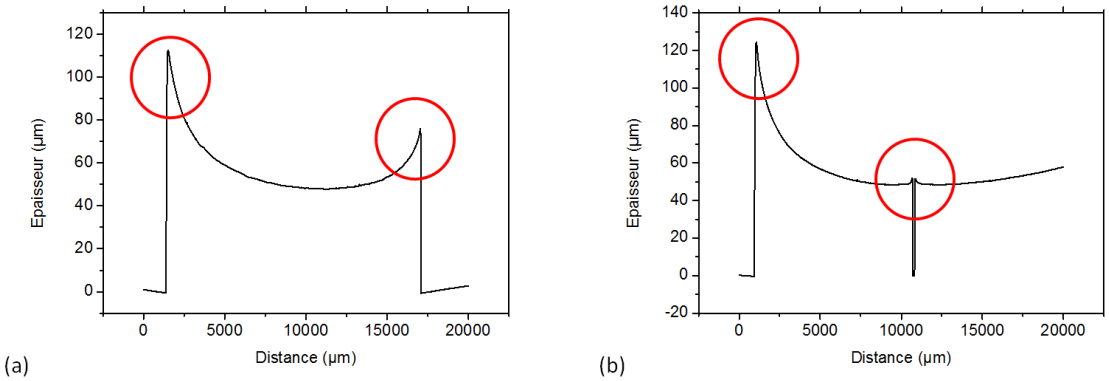


Figure 3.49 : Mesures au profilomètre mécanique Dektak 8 de la base en FeNi.

Une autre observation est le fait qu'entre deux bases relativement proches (une distance de 100 µm) la différence de hauteur tend à disparaître Figure 3.49.b.

La première conséquence visible est le manque de planéité de l'ensemble de la base en FeNi. L'ensemble des étapes suivantes se fait sur un rectangle de 1 cm par 0,8 cm. Il est nécessaire d'obtenir une structure plane de cet ordre de grandeur.

La deuxième conséquence est reliée à la différence de hauteur. La différence entre le pic de plus haute épaisseur atteint et le centre de la base est d'environ 70 µm. Cette distance va entraîner, lors des étapes de photolithographie, une séparation importante entre le substrat et le masque. Des phénomènes de diffraction vont apparaître et les motifs voulus ne seront pas correctement imprimés.

Ces pics sont liés à la concentration des lignes de courant aux bords des motifs lors de la croissance par dépôt électrolytique, illustrés à la Figure 3.50.

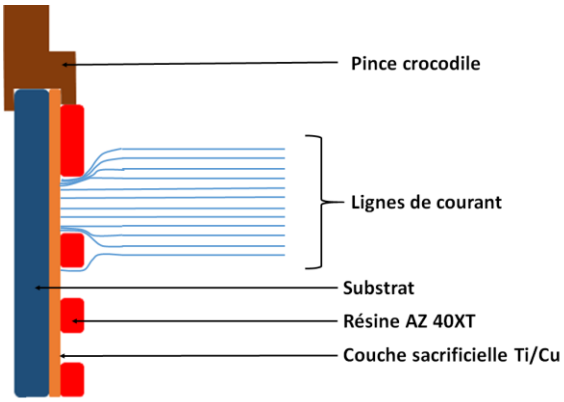


Figure 3.50 : Schéma explicatif du comportement des lignes de champ lors du dépôt électrolytique.

Les opérations suivantes (notamment les étapes de lithographie) peuvent être mises à mal, soit du fait d'un mauvais contact entre le substrat (la résine) et le masque ou alors du fait de déformations de cette première couche de FeNi. Il est donc nécessaire d'améliorer la planéité des échantillons. Les expériences menées en ce sens sont détaillées dans les paragraphes suivants.

V - 4 - d - iii - Solutions proposées aux problèmes rencontrés

♦ Le polissage

Deux méthodes ont été étudiées pour diminuer ces surépaisseurs. La première méthode testée est la technique de polissage. Les tests ont été réalisés, manuellement, sur les motifs carrés en FeNi. Pour les expériences préliminaires, des substrats de deux pouces de diamètre ont été utilisés.

Nous avons décidé de nous tourner vers un polissage de type mécanique, déjà exploré dans le laboratoire (Risquez, 2017). Le polissage mécanique utilise classiquement des papiers abrasifs. Il existe plusieurs types de papiers de polissage : Le carbure de silicium (SiC), l'alumine (Al_2O_3), le diamant (C) (son prix ne rend ce matériau intéressant que pour le polissage de céramiques). La procédure de polissage mécanique consiste toujours à polir d'abord avec de gros grains pour avoir une vitesse de polissage rapide puis d'affiner le polissage en réduisant la rugosité et les rayures engendrées en diminuant la taille des grains.

La Figure 3.51, présente le résultat visuel du polissage du substrat ainsi qu'un profil extrait avant et après le polissage. Un échantillon plus complet des valeurs obtenues est présenté dans le Tableau 3.13.

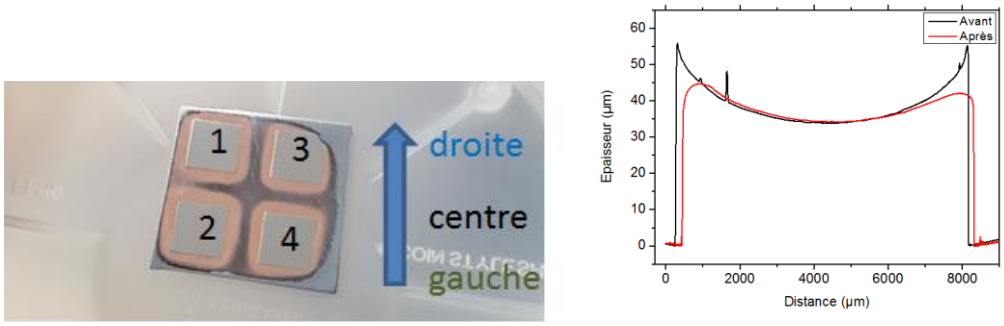


Figure 3.51 : (a) Photographie du substrat après une étape de polissage (b) Mesure au profilomètre mécanique Dektak 8 des motifs en FeNi.

	Motif 1		**Motif 2**		**Motif 3**		**Motif 4**	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Centre (µm)	37,8	37,8	33,6	33,4	33,9	33,6	38	37,4
Gauche (µm)	69,2	43	53,8	44,6	49,1	42	63	46,2
Droite (µm)	57	46,7	52	42,2	49,6	39,3	52	44,9
Moyenne (µm)	44,2	42,5	38,3	40,1	37,9	36,1	42	42,8
Ecart-type	15,8	4,5	11,2	5,9	8,9	4,3	13	4,7

Tableau 3.13 : Résultats de l'étape de polissage sur les bords des carrés en FeNi du substrat.

L'analyse des résultats montre que le polissage permet de réduire de façon importante l'écart entre les valeurs des bords et celles au centre, comme le montre l'écart type entre les valeurs avant (12,225) et après (4,85) polissage.

La méthode a été ensuite testée sur substrat de diamètre 10 cm. Plusieurs problèmes sont apparus : le polissage manuel avec un substrat de 10 cm conduit à une augmentation du risque de casser le substrat. Dans le laboratoire il est possible de fixer le substrat sur une tête de polissage à l'aide d'une cire ayant une température de fusion de 200°C. Ces cycles thermiques semblent avoir eu un effet délétère sur les motifs qui ont été décollés. Cette méthode se révélant trop risquée pour les substrats, une deuxième méthode a été expérimentée.

♦ *L'utilisation de leurres*

La deuxième méthode consiste à utiliser des leurres autours des motifs de croissance du FeNi. Un deuxième masque a été conçu afin d'introduire les leurres. La répartition et le nombre de de motifs ont également été modifiés, également dans le but d'avoir une surface sujette au dépôt électrolytique plus homogène. Le premier masque avec leurres est présenté Figure 3.52.b.

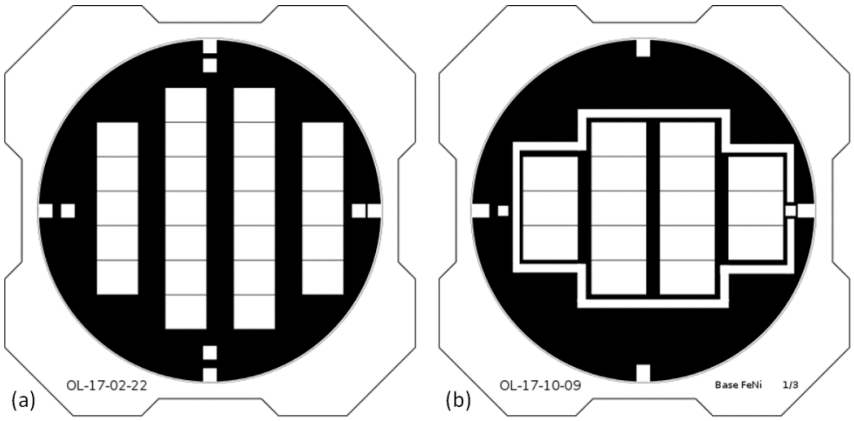


Figure 3.52 : Conception du masque pour la base en FeNi (a) sans leurres (b) avec leurres.

En plus du rajout des leurres, il a été décidé d'augmenter la surface des motifs, de 1,2x0,99 mm² à 1,6x0,99 mm². Des profils d'épaisseurs avant et après l'utilisation de leurres sont présentés en Figure 3.53.

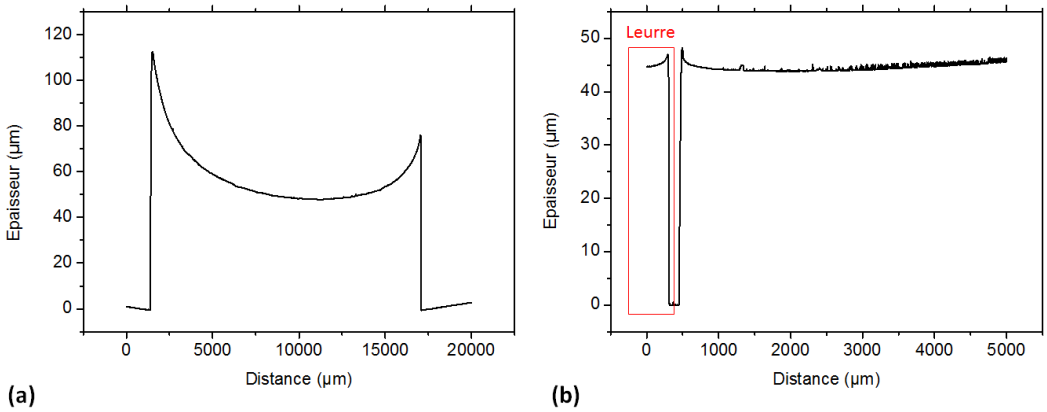


Figure 3.53 : Mesures au profilomètre mécanique Dektak 8 (a) sans utilisation de leurres, (b) avec utilisation de leurres.

La Figure 3.53 permet d'observer un gain important : la différence de hauteur passe de 64,64 à 4,24 µm. Cependant, la présence de leurres ne résout pas l'ensemble des questions posées. L'utilisation de leurres agit en réalité comme un transfert du problème de planéité des motifs sur les leurres. L'étape suivante est donc l'élimination des leurres. Pour cela plusieurs solutions sont possibles : la gravure chimique du FeNi, l'ajout d'une couche sacrificielle sous les leurres, la réalisation d'un « lift-off » ...

Notre choix s'est porté sur la gravure chimique. Les bases en FeNi ont été protégées par une couche de 60 µm de résine AZ 40XT. La photolithographie permet de ne laisser que les leurres accessibles.

Les paramètres choisis pour l'enduction de la résine AZ 40XT sont :

- Une enduction du substrat à une vitesse de 1000 tours par minute pendant vingt secondes pour obtenir une épaisseur de 60 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant deux minutes puis à 95°C pendant deux minutes et enfin à 125°C pendant trois minutes.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 850 mJ/cm².

- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant vingt secondes puis à 95°C pendant deux minutes quarante.
- La résine insolée est enlevée à l'aide de la solution MIF 326 MicroChem© pendant quatre fois une minute.

Le substrat est ensuite plongé dans une solution d'attaque. Deux solutions ont été testées :

- une solution de chrome-etch
- une solution d'eau régale

L'attaque de la couche de FeNi par l'eau régale présente une grande vitesse de gravure, mais attaque également la résine de protection, exposant alors les motifs à ne pas graver.

L'attaque par une solution de chrome-etch n'attaque pas la résine de protection. Par précaution, la gravure a été arrêtée avant la gravure complète des leurres (en maintenant une épaisseur inférieure à 50 µm). Des images réalisées par microscope électronique à balayage présentent un leurre partiellement gravé par la solution de « Chrome etch » (Figure 3.54).

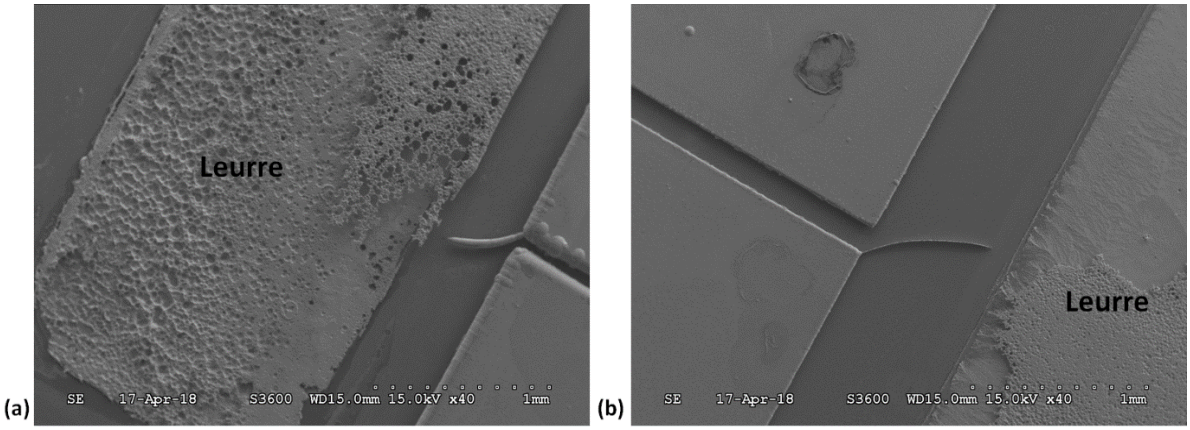
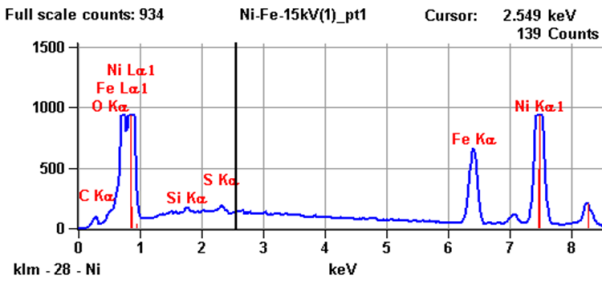


Figure 3.54 : Images réalisées par microscope électronique à balayage présentant un leurre gravé partiellement avec une solution de « Chrome etch » sur deux substrats différents.

V - 4 - d - iv - Caractérisation de la composition de la base en FeNi

Une fois les motifs en FeNi réalisés, il est nécessaire de contrôler la composition des motifs. Pour cela un microanalyseur EDX (Analyse dispersive en énergie par rayons X) relié au microscope électronique à balayage est utilisé. Il permet de donner la composition des matériaux étudiés par étude des photons générés par les atomes sous excitation électronique.



Net Counts

	O-K	Si-K	S-K	Fe-K	Ni-K
Ni-Fe-15kV(1)_pt1	544	373	650	10396	24119

Weight %

	O-K	Si-K	S-K	Fe-K	Ni-K
Ni-Fe-15kV(1)_pt1	0.95	0.25	0.38	18.88	79.54

Weight % Error (+/- 1 Sigma)

	O-K	Si-K	S-K	Fe-K	Ni-K
Ni-Fe-15kV(1)_pt1	+/-0.11	+/-0.04	+/-0.04	+/-0.41	+/-0.99

Figure 3.55 : Résultats de l'étude des bases en FeNi par analyse dispersive en énergie.

Des mesures de composition ont été réalisées en plusieurs endroits de l'échantillon, majoritairement dans la zone centrale qui accueillera par la suite la partie utile du circuit magnétique. Les mesures ont donné des compositions de 19% +/- 2% de fer et de 78% +/- 3% de nickel. Les motifs obtenus ont donc une composition proche de celle que nous recherchons pour notre dispositif.

Les bords des motifs donnent les compositions les plus éloignées de la composition cible en raison de différents facteurs :

- La surface des ouvertures dans la résine est différente de celle qui a été calculée, pour cause de problème de résine ou de photolithographie. La densité de courant est donc différente de celle qui a été calculée et la composition de l'alliage est donc également différente,
- Le courant injecté lors du dépôt a connu des arrêts ou des variations importantes (visible au moment de l'expérience),
- La solution du bain du dépôt électrolytique a subi des variations, notamment en fer, élément absent de la contre-électrode. Les concentrations en éléments métalliques du bain n'est plus dans les proportions choisies.

Ces écueils étant connus, un contrôle soigneux du travail effectué est nécessaire à chaque étape.

La base en FeNi réalisée, elle doit être protégée électriquement pour permettre la fabrication des microbobines de cuivre, suivant le procédé décrit précédemment au paragraphe V - 2 du présent chapitre.

V - 5 - Fabrication des plots en FeNi

V- 5 - a -Croissance des plots en FeNi

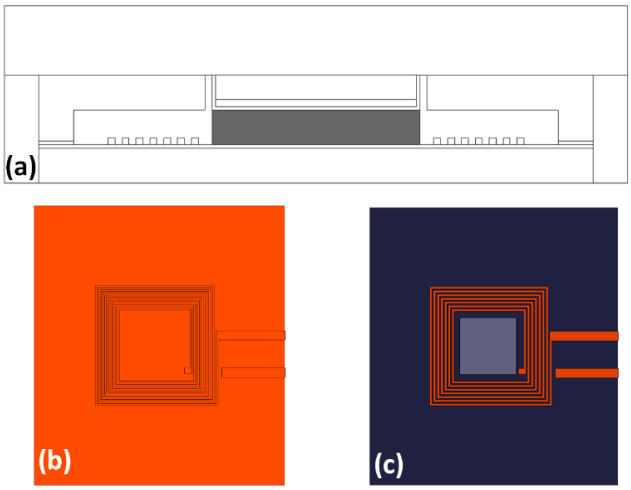


Figure 3.56 : Schéma de croissance des plots de Permalloy© (longueur = largeur = 300 µm, épaisseur = 50 µm), (a) vue en coupe, (b) avant la croissance, (c) après la croissance.

La croissance des plots en FeNi est réalisée juste à la suite de la fabrication des microbobines de détection (Figure 3.56) : la sous-couche de titane-cuivre est conservée pour servir une nouvelle fois de couche conductrice. Pour réaliser les motifs des plots en FeNi, la résine AZ 40XT est de nouveau utilisée. Les conditions utilisées sont les mêmes que pour la fabrication des bases en FeNi (V-3). Les paramètres pour l'enduction de la résine AZ 40XT sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

Pour rappel, avant la croissance électrolytique, le substrat est traité par plasma oxygène afin d'augmenter la mouillabilité de la résine. Il est à noter que sans ce traitement, la croissance n'est pas possible dans les petites ouvertures à cause des effets de tension superficielle. Les plots en FeNi ayant pour dimension 300 µm par 300 µm, cette étape devient critique pour la bonne croissance des plots. Les paramètres de la croissance de FeNi sont présentés en V - 4 -.Les motifs obtenus ont été caractérisé par profilomètrie mécanique afin de valider la croissance de FeNi.

L'étape de croissance électrolytique réalisée, la résine AZ 40XT est supprimée à l'aide d'un bain d'acétone pendant cinq minutes puis un bain d'isopropanol de deux minutes.

La couche conductrice de titane-cuivre peut être ensuite éliminée par gravure ionique (Ion Beam Etching).

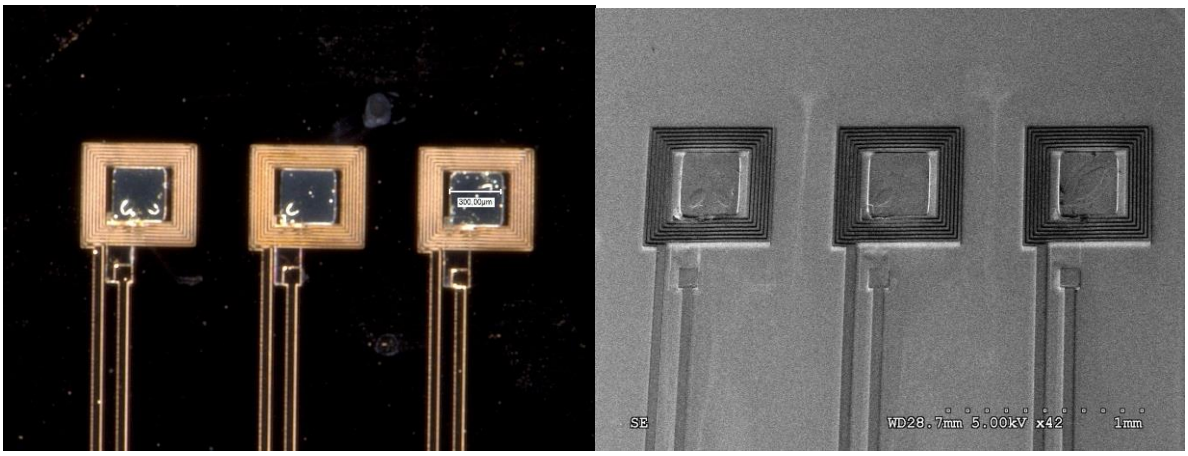


Figure 3.57 : Images (a) au microscope optique (Keyence) et (b) au MEB des plots en FeNi.

V- 5 - b -Préparation de l'accueil des branches du circuit magnétique

Les microbobines de cuivre et les plots en FeNi étant réalisés, les étapes suivantes doivent permettre de « refermer » le circuit magnétique. Cette « fermeture » repose sur la fabrication de branches dont une des extrémités est libre. Il est donc nécessaire de prévenir un affaissement des branches qui entraînerait une géométrie différente de celle qui est attendue, voire des court-circuits. Cette fonction de renfort et d'isolement est réalisée par enduction d'une couche de polyimide. Elle permettra en outre une protection des microbobines en cas de fuite des microcanaux. Enfin, il a été choisi de réaliser les branches en FeNi par transfert (le procédé est décrit au paragraphe suivant). Le polyimide servira également de surface d'accueil pour les branches de FeNi.

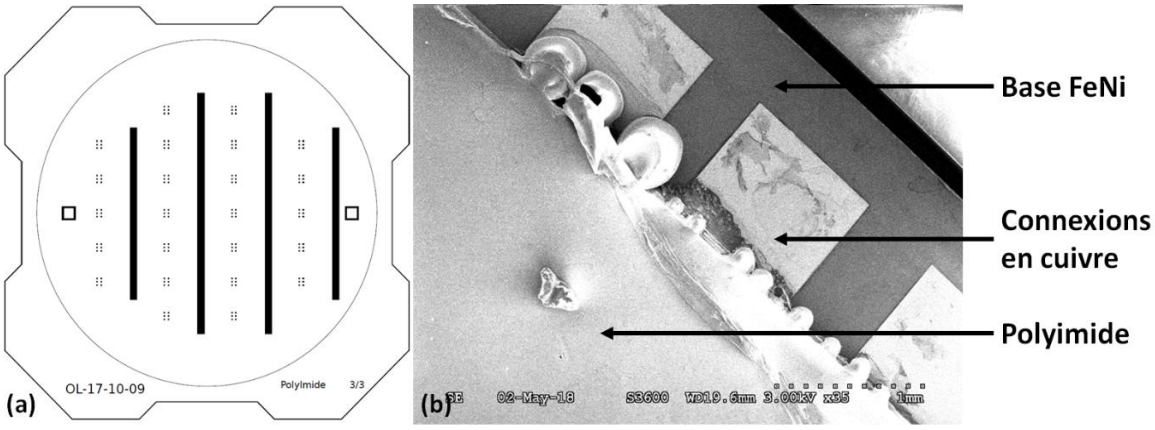


Figure 3.58 : Masque utilisé pour la mise au niveau de polyimide. Image MEB des connexions électriques après dépôt du polyimide.

Pour réaliser la couche de polyimide, plusieurs choix sont possibles. Le polyimide étant très visqueux, la réalisation de 50 µm de polyimide en une seule enduction entraîne l'apparition d'un bourrelet sur les bords. Il a été choisi d'enduire plusieurs couches de polyimide de plus faible épaisseur afin de limiter la surépaisseur des bourrelets en périphérie du wafer.

Le masque prévoit donc des ouvertures pour l'accueil des bras ainsi que pour les pour les connexions électriques de la microbobine (Figure 3.58). Les paramètres pour l'enduction du polyimide sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

V - 6 - Croissance et méthode de transfert des branches de FeNi

La Figure 3.59 montre la disposition et les dimensions des branches du circuit magnétique. Les couches de polyimide ont été omises sur ce dessin de principe.

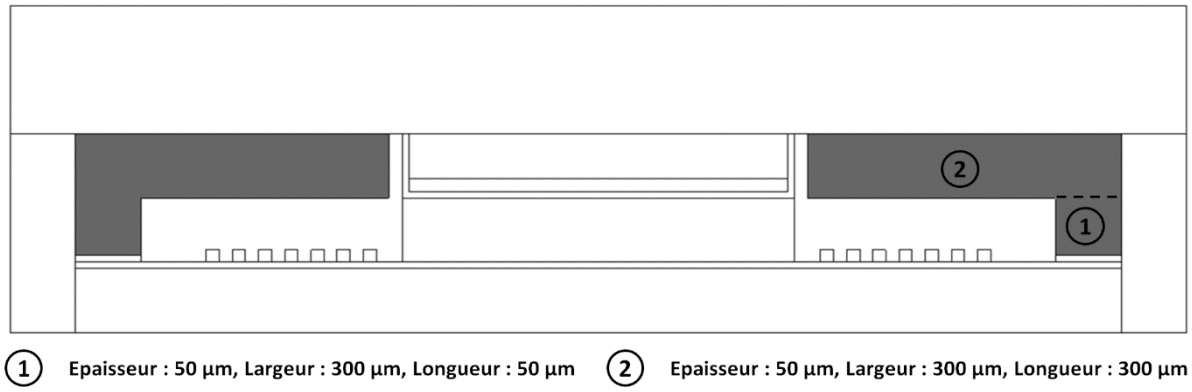


Figure 3.59 : Schéma en coupe des branches de Permalloy© dans le dispositif.

A priori, rien ne s'oppose à une poursuite de la croissance électrolytique dans les formes 1 et 2 de la Figure 3.59. L'inconvénient majeur de cette proposition est le fait qu'il est quasiment impossible de réaliser des branches de cette forme en suivant cette idée.

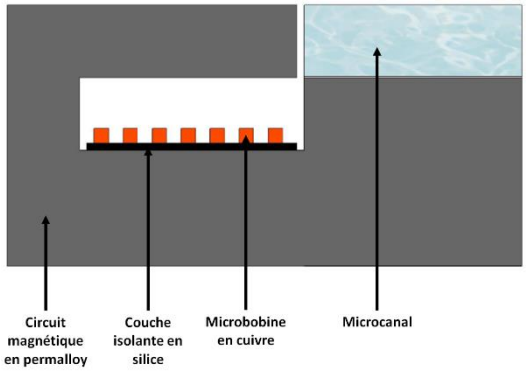


Figure 3.60 : Schéma d'une vue en coupe d'une moitié du circuit magnétique de détection.

Yoon et al. (J.-B. Yoon, Han, Yoon, & Kim, 1998) ont montré que la croissance de ponts de nickel ou de cuivre (ce que l'on peut assimiler à deux poutres à relier) par dépôt électrolytique entraîne une forme spécifique (Figure 3.61) avec des reliefs importants.

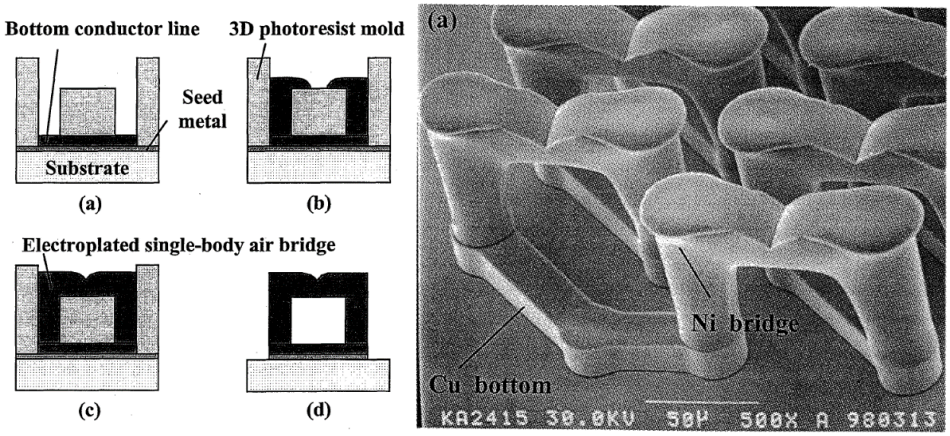


Figure 3.61 : (Gauche) Procédé de fabrication des ponts de nickel ou de cuivre. (Droite) Image MEB des ponts de nickel.

De nouvelles phases complètes de dépôts électrolytiques (couche initiale, lithographie ...) débouche sur des étapes technologiques risquées, notamment en ce qui concerne la continuité électrique des couches fines.

Nous avons donc opté pour un procédé de transfert pour la fabrication des branches.

V- 6 - b -Rappels sur le transfert de films ou de motifs

La fabrication de dispositifs en salle blanche nécessite la plupart du temps l'intégration de différents matériaux (magnétiques, piézoélectriques, polymères, etc.) et structures (composants optiques, mécaniques, optoélectroniques, etc.). Dans certains cas les procédés utilisés présentent certaines incompatibilités (bilan thermique élevé, contraintes thermomécaniques, contaminations, phénomènes de diffusion, etc.).

Un moyen de contourner ces différents problèmes est d'utiliser des techniques de transfert. Il s'agit de transférer les différents films de matériaux ou composants, d'un substrat dit donneur, vers un substrat cible. Lors de l'assemblage, les deux substrats sont mis en contact intime, puis séparés, laissant ainsi les différents composants souhaités au niveau du substrat cible sur lequel ils ont adhéré.

Deux grandes familles de procédés ressortent de la littérature et sont présentées sur la Figure 3.62. Le transfert direct impliquant une seule étape d'assemblage et de séparation (Figure 3.62.a) (Matsumura, Esashi, & Harada, 2010; Vj, Katzenmeyer, & Islam, 2010; J. Yoon et al., 2010) et le transfert multiple (Figure 3.62.b), s'apparentant à la technologie de "pick and place", pouvant impliquer deux ou plusieurs étapes d'assemblage et de séparation (Bower, Menard, Bonafede, & Burroughs, 2009; Burroughs et al., 2010; Chan, Hsieh, & Yang, 2009).

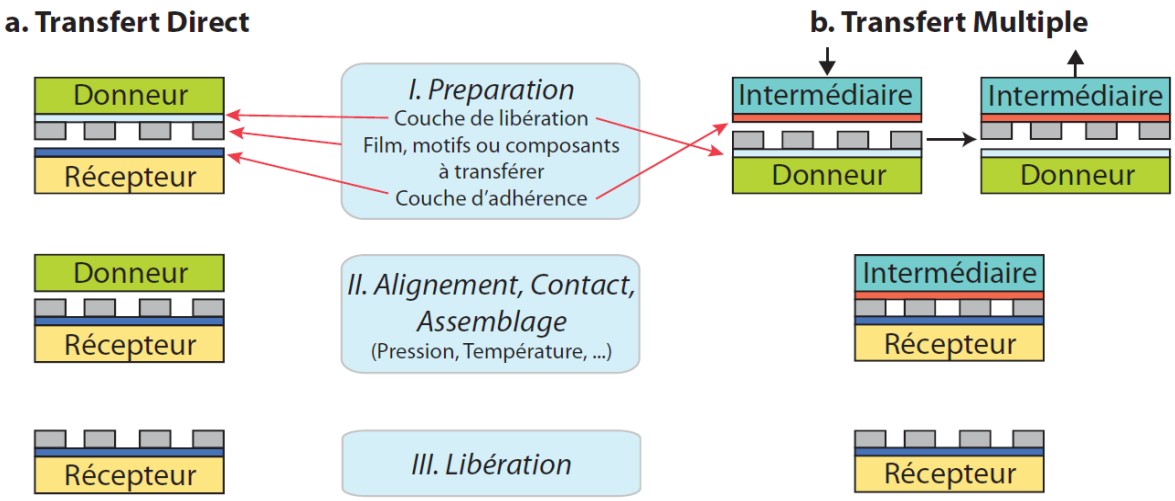


Figure 3.62 : Principes des transferts de film direct et multiple.

L'étape la plus critique est la libération des films ou dispositifs (Figure 3.63). Celle-ci peut être réalisé par amincissement et/ou gravure du substrat donneur, par l'utilisation d'une couche sacrificielle ou par rupture mécanique localisée (Bruel, Aspar, & Auberton-Herve, 1997; Panchawagh et al., 2007; Phommahaxay, Bogaerts, & Naito, 2011; Saharil et al., 2010). Une autre méthode consiste à obtenir une faible énergie d'interface entre le film à transférer et le substrat donneur, combinée à une forte énergie d'interface entre le film et le système cible (Park, Schift, Padeste, & Schnyder, 2004; Wu, Shen, Chuang, & Wei, 2007). La séparation est ainsi assurée par application d'une contrainte mécanique ou thermomécanique au système.

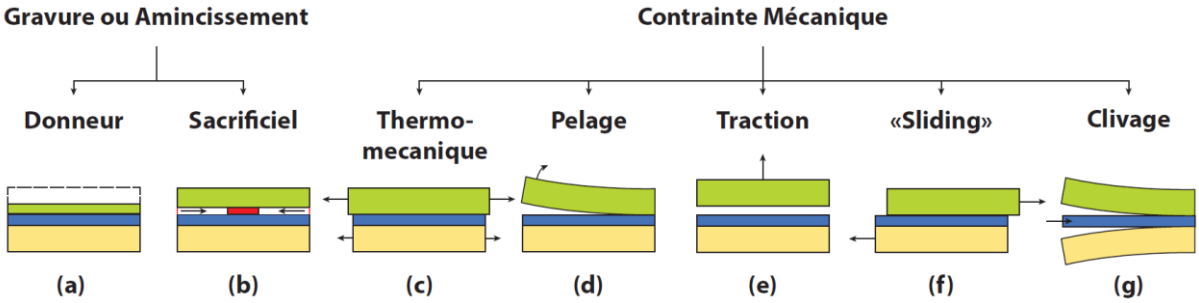


Figure 3.63 : Méthodes de séparation des substrats.

V- 6 - c - Discussion sur le choix de la méthode de fabrication des branches de FeNi

Une fois le choix du transfert de motifs arrêté, les modalités de détail restent à définir. Plusieurs variantes ont été étudiées

V - 6 - c - i - Variante 1 : transfert partiel des branches et du canal

Le but est ici d'intégrer plus facilement le circuit fluidique au dispositif de détection. La Figure 3.64.a présente les principales étapes de cette proposition. Ici, le canal et les parties supérieures des branches

(repère ② de la Figure 3.64) sont fabriqués sur un deuxième substrat puis transférées. Le procédé est détaillé à la Figure 3.64 (gauche).

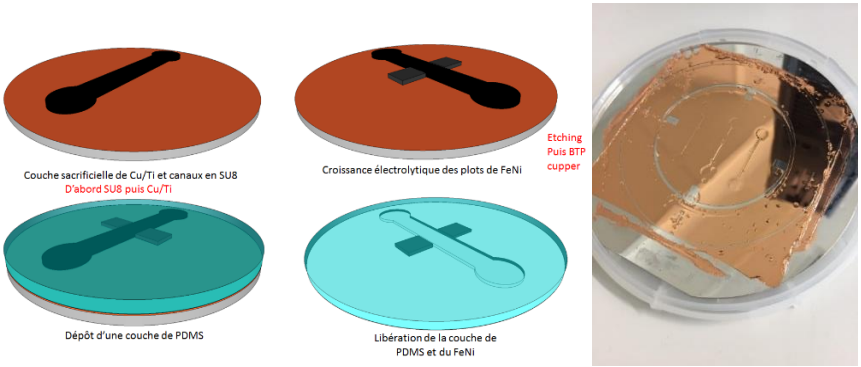


Figure 3.64 : Schéma des étapes de transfert d'une partie des branches. Photographie d'une réalisation.

Un test préliminaire a été réalisé pour connaître la faisabilité de la méthode. La Figure 3.64.b (droite), montre le résultat de la croissance de FeNi sur le substrat de cuivre avec le canal en résine SU8. L'étape de « pelage » du PDMS a conduit à éliminer cette variante : en effet, la force de liaison entre le cuivre et le FeNi est, dans notre cas, plus grande que la force entre le PDMS et le FeNi ; les branches en FeNi restent sur le substrat de croissance et ne sont pas transférées.

En outre, pour réaliser le transfert il est nécessaire d'utiliser une couche intermédiaire. Cette couche intermédiaire entraîne une augmentation des entrefers ce qui est défavorable à la détection de particules magnétiques.

Cette variante n'est donc pas retenue

.

V - 6 - c - ii - Variante 2 : transfert du plot central et des branches

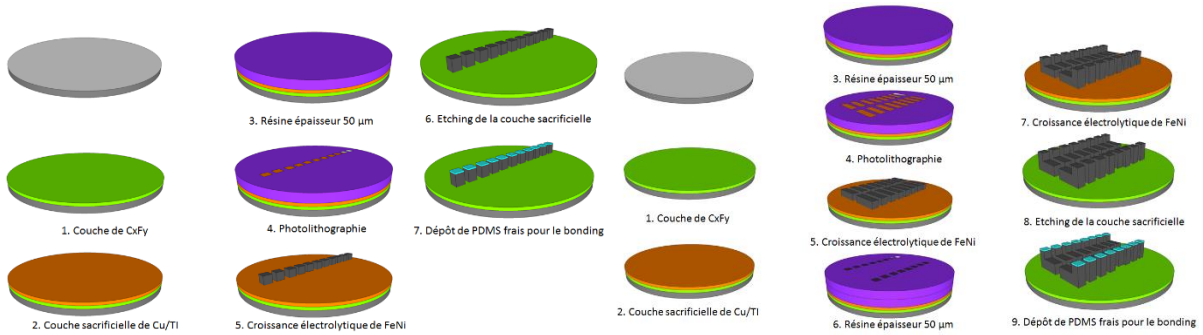


Figure 3.65 : Schémas des étapes de fabrication des plots et branches en FeNi.

Cette variante repose sur la réalisation à la fois le plot central et les branches en FeNi sur un substrat donneur puis à leur transfert. Pour cette méthode, il est nécessaire d'utiliser une couche de faible adhérence sur le substrat donneur. La forme des branches peut alors être respectée. Toutefois une couche de promotion d'adhérence est présente entre le bas des motifs transférés et le substrat. Cette couche introduit là encore des entrefers dans le circuit magnétique et détériore donc la capacité de détection. Les étapes sont présentées en Figure 3.65.

Cette variante a également été écartée.

V - 6 - c - iii - Variante 3 : transfert des branches en FeNi complètes seules

Dans cette variante, la fabrication des plots est réalisée directement sur le substrat contenant la base de FeNi (comme en V - 5 -), et les branches complètes sont réalisées sur un substrat donneur pour être ensuite transférées sur le substrat contenant la base de FeNi.

Comme pour toute étape de transfert, un entrefer ajouté dans le circuit magnétique est attendu. Cet entrefer est cependant limité aux branches. Parmi les 3 variantes envisagées, c'est donc cette variante n°3 qui semble la plus prometteuse et qui a été choisie pour la réalisation des dispositifs.

La question de la création du canal microfluidique s'est ensuite posée. Deux processus sont possibles :

- création du canal lors de la fabrication des branches : le substrat donneur est d'abord enduit d'une couche de polyimide, recouvert des branches de FeNi puis du canal en PDMS (Figure 3.66, stratégie 1). . Le canal est fermé dès le transfert des branches. Dans ce cas, la surface du canal microfluidique est mixte : Polyimide/PDMS.

- réalisation du canal microfluidique après le transfert des branches en FeNi (Figure 3.66, stratégie 2). La fabrication et la fermeture du canal ont alors lieu sur des surfaces fortement structurées. Les dimensions des canaux, la couverture des flancs des motifs de FeNi et la reproductibilité du procédé sont alors délicates à assurer.

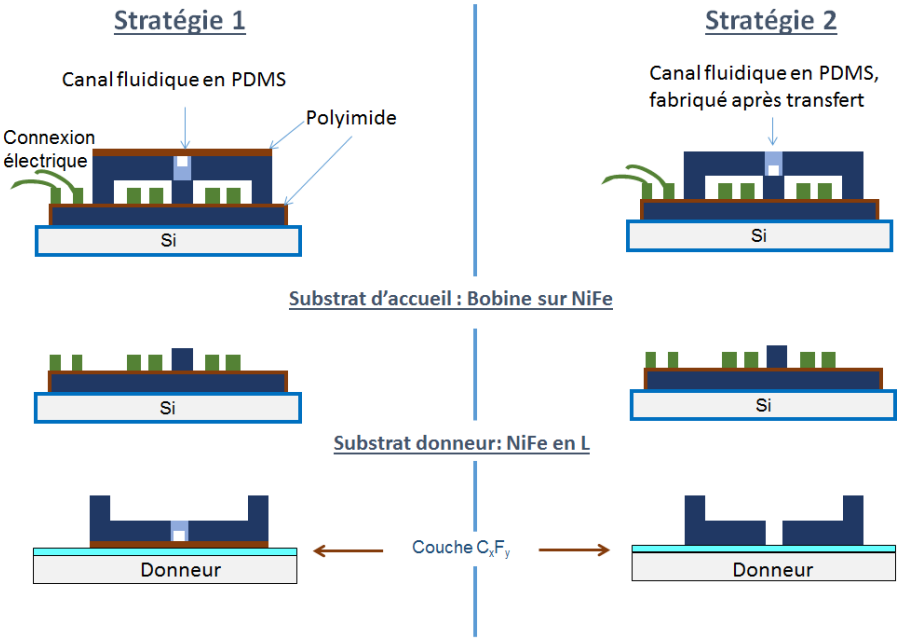


Figure 3.66 : Présentation schématique des deux stratégies de transfert des branches en FeNi.

L'utilisation du polyimide a permis de structurer le canal microfluidique, le choix a été de créer le canal microfluidique après le transfert des branches en FeNi, de manière à ne pas introduire d'incertitude sur le comportement des anticorps/NPM/espèces biologiques lors de leur interaction avec une surface de polyimide non connue.

V- 6 - d -Préparation du substrat de transfert

Le substrat donneur, qui correspond au substrat ayant les motifs à transférer, est un substrat de silicium. Pour éviter de métalliser inutilement l'autre face du substrat pendant la croissance électrolytique, celle-ci est préalablement recouverte d'une couche isolante de silice comme présenté en III- 1 - c -.

Afin de réaliser un alignement de deux substrats de silicium, il est nécessaire de réaliser des croix d'alignement en face arrière du substrat. La méthode de lift-off (décrite en IV-1-c), est utilisée.

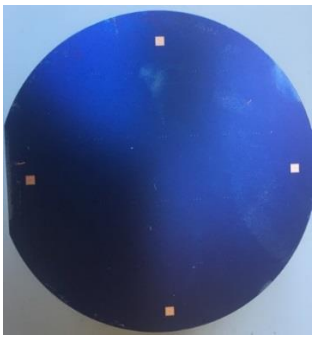


Figure 3.67 : Photographie des motifs d'alignement face arrière du substrat.

Afin de réduire le coût du procédé, des substrats polis sur une seule face ont été utilisés. Les motifs obtenus, Figure 3.67, sont suffisamment visibles pour la suite du procédé.

V- 6 - e -Procédé de transfert : la couche d'adhésion contrôlée de C_xF_y

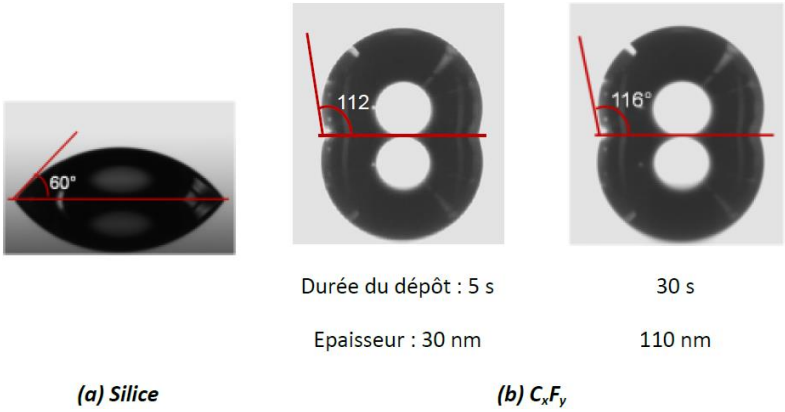


Figure 3.68 : Représentation de l'angle de contact sur différentes surfaces : (a) Silice et (b) C_xF_y.

Pour réaliser le procédé de transfert, une couche de faible adhérence doit être utilisée. Une couche anti-adhérente fluorocarbonée CxFy est choisie et déposée à l'aide d'un bâti de Deep RIE (Deep Reactive Ion Etching ou gravure ionique réactive profonde). Le cycle de passivation du procédé Bosch consiste à déposer une couche fluorocarbonée par polymérisation plasma à partir du gaz précurseur C_4F_8(Keller, Haefliger, & Boisen, 2007). Les paramètres du dépôt sont donnés dans le Tableau 3.14. L'épaisseur de la couche varie en fonction du temps du dépôt. On peut voir que la surface de CxFy est très hydrophobe avec un angle de contact à l'eau supérieur à 100° contre 60° dans le cas de la surface de silice (Figure 3.68). Cette couche est aussi appelée « simili-Téflon » car elle contient un rapport F/C de 1,76, proche de celui du Téflon (mesuré par XPS). La caractérisation chimique de cette couche et

des informations plus détaillées peuvent être trouvées dans les thèses de S. Brault (Brault, 2010) et de G. Schelcher (Schelcher, 2012).

Débit C4F8 (sccm)	Pression (mTorr)	Générateur RF 13,56 MHz (W)	Puissance générateur (W)	Température substrat (°C)
200	15	20	1500	25

Tableau 3.14 : Paramètres de dépôt de la Couche C_xF_y par polymérisation plasma (DRIE).

Afin de présenter une adhérence significative et d'assurer une tenue mécanique suffisante des motifs, tout en gardant la possibilité de les libérer facilement à l'étape finale, la couche CxFy nécessite de subir un post-traitement. Les travaux de thèse de S. Brault (Brault, 2010) ont montré qu'un traitement thermique à 250°C sur une couche CxFy peut augmenter l'adhérence d'un facteur supérieur à trois par rapport à celle d'un film non traité. Il a été établi qu'une exposition au plasma d'oxygène améliore l'adhérence de quelques MPa (Brault, 2010). Schelcher et al. (G Schelcher, Brault, Parrain, Lefeuvre, & Dufour-Gergam, 2011), ont étudié deux types de post-traitement : thermique et plasma froid de N_2/H_2. Nous avons utilisé ici un traitement thermique et un plasma d'oxygène pour stabiliser la couche C_xF_y et augmenter son adhérence. Ce choix a été alors souvent dicté par les équipements disponibles à la centrale de technologie du C2N.

Les travaux de thèse de T. H. N. Dinh (Dinh, 2016) ont montré les comparaisons des propriétés de la couche CxFy ayant subi un traitement thermique seul ou un traitement thermique couplé avec un plasma d'oxygène le tout comparé à un film non traité. Le traitement thermique est effectué sur une plaque chauffante dont la température est augmentée progressivement de 20 à 250°C en 15 min, suivi d'un palier de 10 min ou 25min à 250°C. Un réacteur de type délaqueur Pico est utilisé pour le traitement plasma. Une diminution de l'épaisseur de la couche (de 110 à 20 et 55 nm) et de l'angle de contact à l'eau (de 116°C à 90° et 100°) est alors observée, probablement à cause du fluage de la couche durant le recuit et l'exposition au plasma. Notons que le traitement plasma grave la couche à une vitesse de 0,8 nm.s-1 (Beix, 2013).

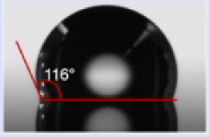
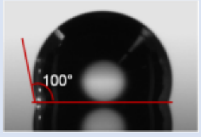
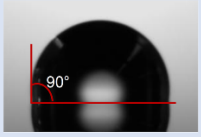
	Non traité	Test traitement thermique	Test traitement thermique et plasma
Traitement thermique	-	25 à 250°C : 15 min 250°C : 25 min	25 à 250°C : 15 min 250°C : 25 min
Traitement plasma oxygène	-	-	Pression : 0.8 mbar Durée : 12 s Puissance : 80 W
Angle de contact (eau)			
Epaisseur (nm)	110	55	20

Tableau 3.15 : Représentation de l'angle de contact (eau) avant et après le traitement thermique.

V- 6 - f - Fabrication des branches sur le substrat donneur

L'ensemble des détails du procédé est présenté dans l'annexe du chapitre 3.

Un dépôt d'une couche conductrice, base de la croissance électrolytique est d'abord réalisée (voir paragraphe IV- 1 - b -).

Les branches en FeNi sont réalisées en deux étapes. La première consiste en la fabrication de la partie plate. La deuxième étape est la réalisation des piliers des branches (Figure 3.69). Chaque étape nécessite une enduction de résine AZ 40XT. Les épaisseurs des motifs étant les mêmes que celles des bases en FeNi, il a été choisi de garder la même résine. Le recuit de la résine AZ 40XT a été adapté : il a été décidé de ne pas dépasser les 100°C et d'augmenter le temps de recuit pour diminuer l'effet de contrainte liée à la température.

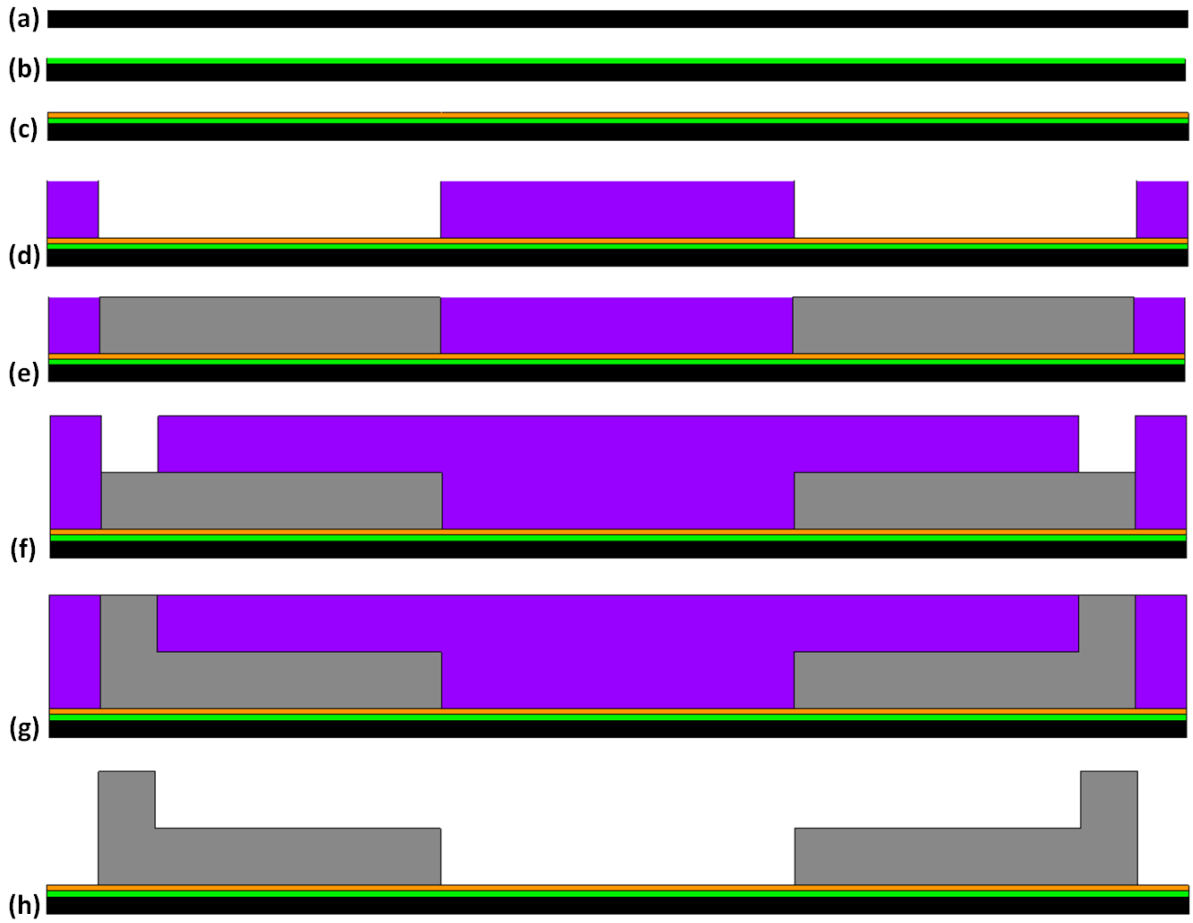


Figure 3.69 : Schéma de la fabrication des branches de Permalloy©. (a) Substrat de silicium oxydé, (b) Ajout d'une couche de téflon, (c) Ajout d'une couche sacrificielle de Ti/Cu, (d) Enduction de résine AZ 40XT, (e) Croissance de la partie haute des branches de Permalloy©, (f) Enduction de résine AZ 40XT, (g) Croissance de la partie basse des branches de Permalloy©, (h) Suppression de la résine AZ 40XT.

Une couche de résine est enduite, une première croissance électrolytique est réalisée, puis une deuxième couche de résine est enduite avant de continuer la croissance électrolytique. Les paramètres choisis pour l'enduction de la résine AZ 40XT présentés dans l'annexe du chapitre 3.

La dissolution de la résine a nécessité d'utiliser un procédé spécifique, les procédés usuels tendant à dissoudre la couche CxFy et à décoller les motifs. Le procédé choisi consiste à ré-insoler la résine puis à utiliser le « developer » MIF 326. Dans ce cas, le rendement est de 99% des branches intactes.

Le changement de vitesse a dû être pris en compte dans les paramètres de dépôt électrolytique. Le temps total de croissance sera moins long et passe de onze heures à cinq heures et les épaisseurs de la centaine de microns à 50 µm.

V- 6 - g -Transfert : enduction, alignement et collage

Dès que les deux substrats sont préparés, une couche de polyimide est enduite sur le substrat donneur (celui ayant les branches en FeNi). Le polyimide a été choisi pour garder l'ensemble du circuit de détection avec le même polymère. De plus, l'enduction du polyimide a permis d'obtenir une fine couche augmentant la planéité du bas des branches qu'on peut structurer facilement à chaque étape du procédé et tenait compte aussi de son évolution.

La plus faible épaisseur de polyimide doit être recherchée. En effet, une surépaisseur va dégrader la variation d'inductance de la détection comme cela a été démontré dans le chapitre 2. Les paramètres de la couche de polyimide permettant d'enduire la base en FeNi peuvent être choisis.

Pour réaliser la couche de polyimide le procédé est le suivant :

➢Le substrat est enduit de polyimide avec une vitesse de 5000 tours par minute pour une durée de 180 secondes pour atteindre une épaisseur d'environ 4 µm.

La résine enduite, l'alignement entre le substrat donneur et le substrat d'accueil est requis. Pour cela, un aligneur double face EVG 620 est utilisé en combinaison avec un outil de collage spécifique « bond-tool » de l'appareil de collage EVG 501. Le « bond-tool » peut s'adapter sur l'insolateur EVG 620 pour l'alignement et permet également de fixer les deux substrats alignés en contact via des crampons de fixation (Figure 3.70).

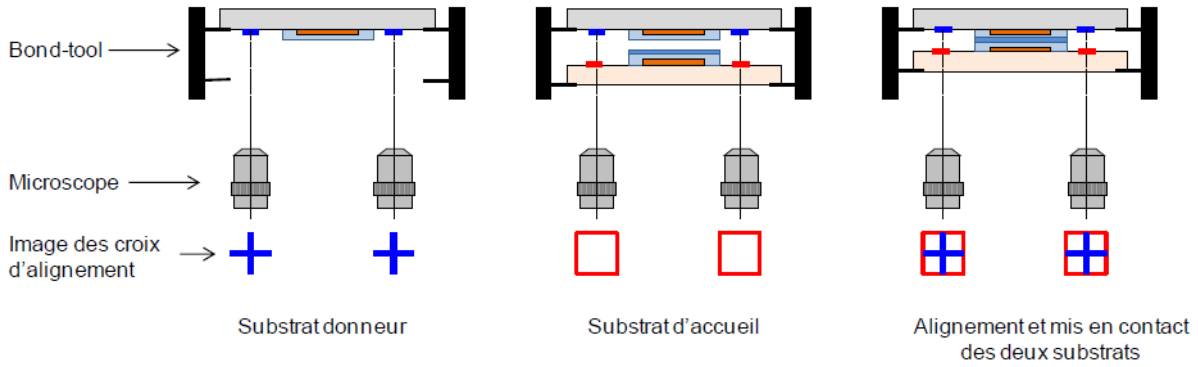


Figure 3.70 : Principe d'alignement de deux substrats à l'aide de l'EVG 620.

La soudure est réalisée avec une force de compression de 1500 N à 3500 N (soit une pression de 191 kPa à 446 kPa) lors d'un cycle thermique (T=75°C) présenté en Figure 3.71.

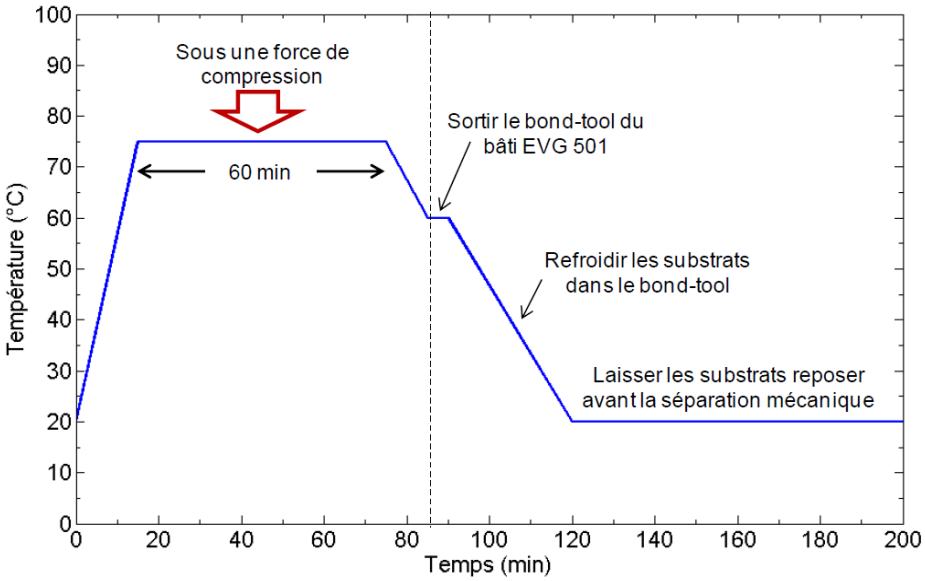


Figure 3.71 : Cycle de température utilisé pour le transfert de substrat.

Le substrat donneur est ensuite séparé des motifs pour finaliser le transfert à l'aide d'une lame métallique. La lame est utilisée comme un levier et permet la libération mécanique des deux parties.

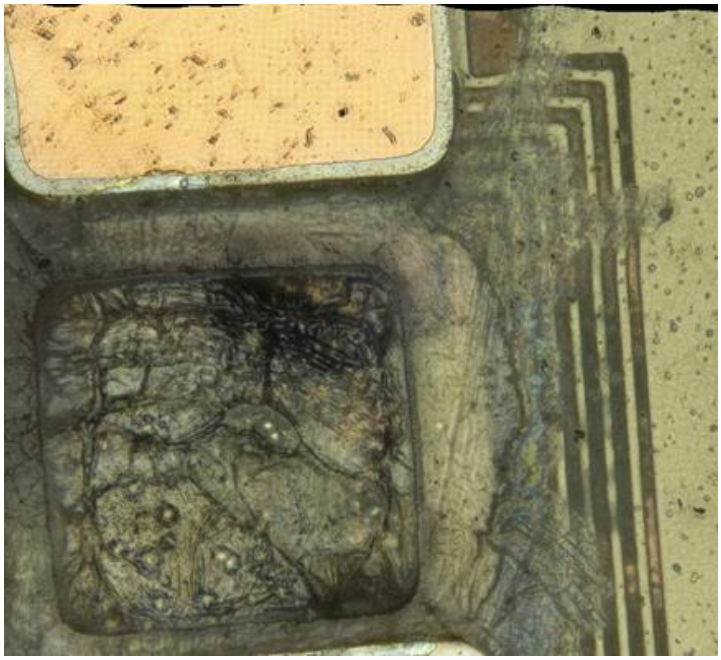


Figure 3.72 : Image au microscope optique (Keyence) du dispositif de détection magnétique. Observation des branches de FeNi, de la chambre fluidique au-dessus du plot de FeNi et des microbobines.

V - 7 - Finalisation du dispositif de détection

V- 7 - a - Nivellement et structuration de la dernière couche de polyimide

Les branches en FeNi étant transférées, une couche de polyimide d'épaisseur équivalente à l'épaisseur du circuit magnétique est enduite sur le substrat. L'objectif de cette couche est double.

Premièrement, elle permet d'obtenir une surface plane pour y déposer le circuit fluidique. Deuxièmement, elle peut être structurée pour des reliefs dans le circuit microfluidique, par exemple pour réaliser une chambre microfluidique entre les branches en FeNi. Les conditions d'enduction sont les mêmes que dans la partie **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**. Les paramètres pour l'enduction u polyimide sont présentés dans l'annexe du chapitre 3.

V- 7 - b - Enduction d'une couche d'assemblage de PDMS

Le polyimide et le PDMS recuit présentant une faible adhérence, une fine couche de PDMS est déposée par enduction. La préparation du PDMS est réalisée comme décrit dans la partie III - 2 -, et les conditions d'enduction sont les suivantes :

➢Une enduction du substrat à une vitesse de 4000 tours par minute pendant 300 secondes avec une accélération de 1000 tours par seconde.

Afin que les chambres fluidiques ne soient pas entièrement recouvertes de PDMS, ce dernier est versé sur le substrat en rotation. La Figure 3.73 montre des profils avant et après l'enduction de PDMS. On observe que même si la géométrie des reliefs a varié, les canaux ne sont pas obstrués et les dimensions ont grossièrement été conservées.

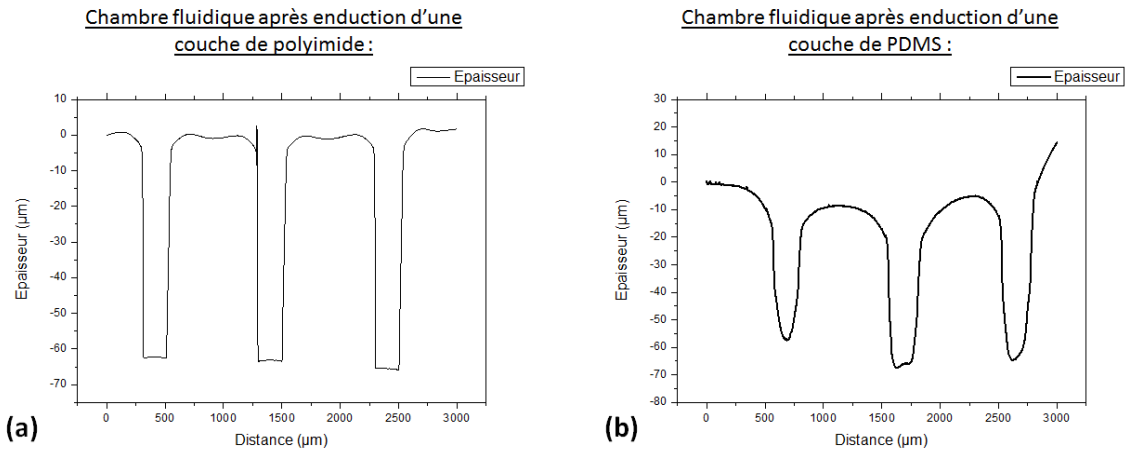


Figure 3.73 : Mesure des chambres fluidiques après enduction de la couche (a) de polyimide, (b) de PDMS.

V- 7 - c - Conditionnement électrique des circuits de détection

La fabrication et la protection de l'ensemble des circuits étant effectuées, les dispositifs peuvent être séparés les uns des autres à l'aide d'une scie diamantée. Le circuit de détection est ensuite collé sur une plaque de caractérisations électriques (type PCB : Printed Circuit Board) comme au paragraphe IV-2-b, puis les connexions de la microbobine de détection sont reliées à la plaque PCB par « wire-bonding ». Le circuit imprimé (PCB) est lui-même connecté aux fils électriques par soudure étain (Figure 3.74).

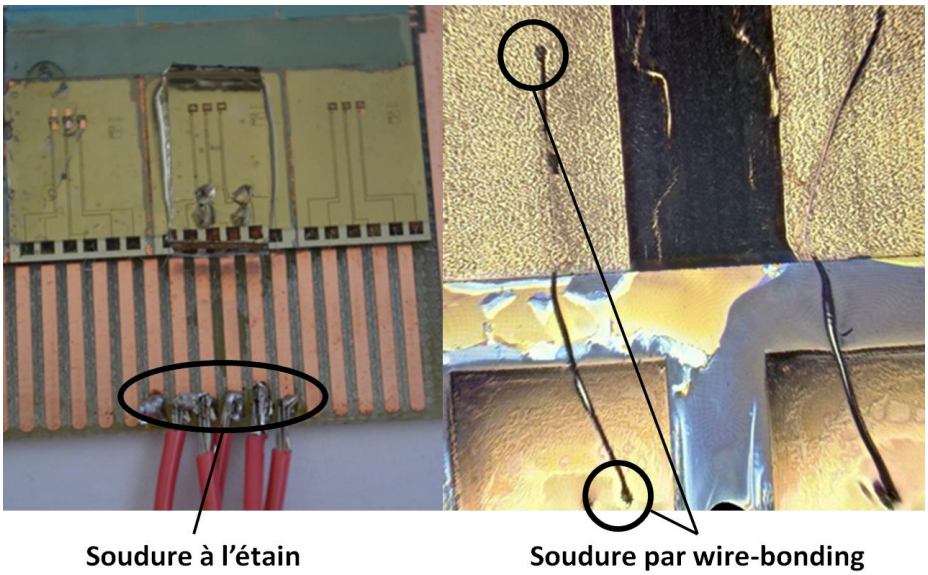


Figure 3.74 : Photographie (Gauche) d'un dispositif de détection et des soudures réalisées (Droite) zoom sur la soudure par wire-bonding.

V- 7 - d -Assemblage du circuit fluidique

La dernière étape consiste en l'assemblage du circuit fluidique. Le circuit fluidique est fabriqué tel qu'il a été décrit dans la partie III. La forme du circuit utilisée est ici de dimensions plus faibles que le circuit microfluidique complet du projet. Un seul canal sans embranchement est réalisé (Figure 3.75).

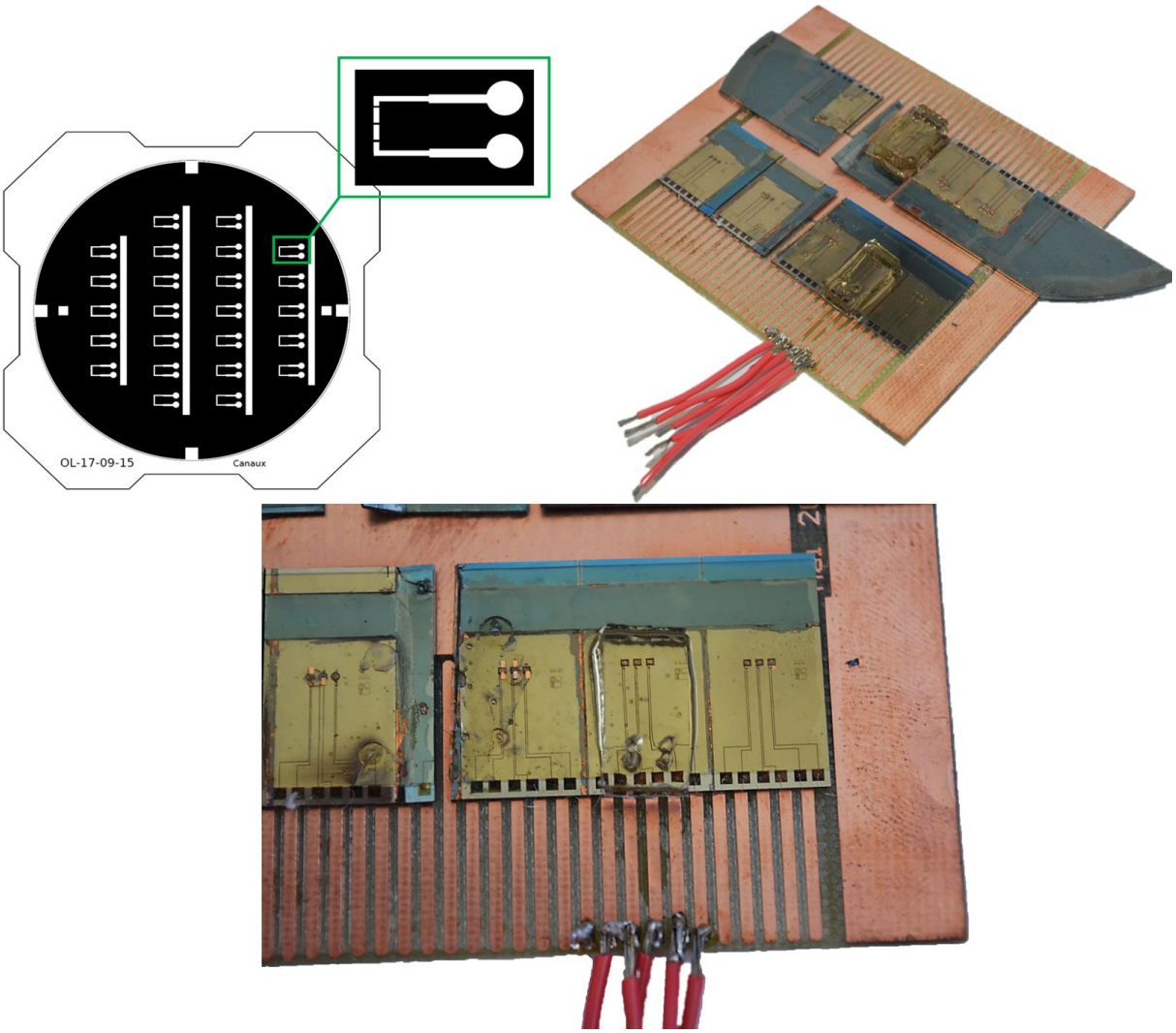


Figure 3.75 : (Gauche) Masque utilisé pour la fabrication des canaux microfluidiques (Droite et bas) Photographies du dispositif fluidique de détection des NPM.

On remarque en particulier les interruptions des motifs des canaux, réalisées afin de mettre à profit les reliefs de la partie du circuit fluidique évoqués au paragraphe V - 4.

VI -Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre un cheminement de fabrication a été présenté pour la conception de dispositifs de contrôle du déplacement des NPM et de détection magnétique. Dans cette démarche l'objectif a été de concevoir un procédé permettant de réaliser le dispositif étudié par simulation dans le chapitre 2, avec des paramètres aussi proches que possible de ceux de la simulation.

La fabrication de ces deux dispositifs peut être décrite en trois parties : la fabrication du circuit fluidique qui est présent dans les deux dispositifs, la microbobine de contrôle du déplacement des NPM et le circuit de détection.

Le circuit fluidique a été réalisé de manière classique à l'aide de PDMS, dont la forme est donnée par l'utilisation d'un moule en résine SU8.

La réalisation des microbobines de contrôle des NPM ou de détection a été menée suivant 2 modalités :

- microbobines « simples », sans matériau magnétique : ces bobines ont nécessité 3 niveaux de masques. La connexion électrique est reportée du centre vers l'extérieur de la microbobine. Une sous-couche de cuivre est déposée avant de la protéger électriquement des futures spires de cuivre à l'aide d'une couche de silice. La croissance électrolytique assure une croissance rapide du cuivre (0,5 µm par minute) et relativement homogène. L'épaisseur importante de conducteur obtenue (10 µm) permet de limiter intrinsèquement l'échauffement et/ou d'obtenir un coefficient de qualité important.

- microbobines avec circuit magnétique quasi-fermé et canal microfluidiques intégrés : le circuit magnétique a nécessité la croissance de FeNi en épaisseur importante (50 µm) Une étude spécifique sur la croissance du FeNi a étudiée et le procédé usuel a été adapté afin de répondre aux différentes questions posées par cette épaisseur importante. Les surépaisseurs présentes sur les bords des bases en FeNi ont été atténuées par la réalisation de motif leurres et leur gravure à la suite du dépôt. Pour améliorer la planéité des surfaces et protéger électriquement la base en FeNi, le polyimide photosensible LTC 9310 de FUJIFILM a été utilisé. Les étapes de fabrication suivantes ont été menées en respectant la contrainte de ne pas dénaturer le polyimide. Les étapes ont donc été étudiées pour respecter une température maximale de 150°C.

La quasi-fermeture du circuit magnétique par la réalisation des branches en FeNi a été l'objet de nombreuses spéculations. L'utilisation d'une méthode de transfert a été choisie. Une couche de faible adhérence a été utilisée pour faire croître les branches en FeNi avant d'en réaliser le transfert sur le substrat d'accueil contenant la base de FeNi, les bobines et un plot central du circuit magnétique. Le polyimide a également été utilisé afin d'aplanir la surface et de permettre la réalisation du support pour soutenir les branches en FeNi.

Le polyimide a été utilisé une dernière fois pour réaliser des puits au centre des microbobines avant de déposer une fine couche de PDMS pour permettre l'ajout du circuit fluidique.

La réalisation d'un tel circuit magnétique quasi-fermé et comprenant un circuit fluidique au plus près du circuit de détection magnétique 3D est inédite dans la littérature.

VII - Bibliographie

Beix, V. (2013). Etudes des procédés d ' encapsulation hermétique au niveau du substrat par la technologie de transfert de films To cite this version : HAL Id : tel-01037897 Etude des procédés d ' encapsulation hermétique au niveau du substrat par la technologie de transf. Université Paris Sud - Paris XI.

Bower, C. A., Menard, E., Bonafede, S., & Burroughs, S. (2009). Transfer-Printed Microscale Integrated Circuits. *IEEE*, 618–623.

Brault, S. (2010). Etude du procédé de transfert de films. Applications Encapsulation sur tranche et Elaboration de micro-dispositifs. Université Paris-Sud.

Bruel, M., Aspar, B., & Auberton-Herve, A.-J. (1997). Smart-Cut : A New Silicon On Insulator Material Technology Based on Hydrogen Implantation and Wafer Bonding. *Journal of Applied Physics*, *1636*.

Burroughs, S., Conner, R., Furman, B., Menard, E., Gray, A., Meitl, M., … Place, B. (2010). A New Approach For A Low Cost CPV Module Design Utilizing Micro-Transfer Printing Technology. *American Institute of Physics*, *163*. http://doi.org/10.1063/1.3509179

Campbell, D. J., Beckman, K. J., Calderon, C. E., Doolan, P. W., Ottosen, R. M., Ellis, A. B., & Lisensky, G. C. (1999). Replication and Compression of Bulk and Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer. *Journal of Chemical Education*, *75*(4), 537–541. http://doi.org/10.1021/ed076p537

Cao, H. H. (2016). The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications Hong Ha Cao To cite this version : Discipline : physique Microsystèmes pour Biomédical Thèse de doctorat. Université Paris Saclay.

Cao, H. H., Hong, T., Dinh, N., Hamdi, F. S., Couty, M., Martincic, E., … Cachan, F. (2015). Reversible bonding by dimethyl-methylphenylmethoxy siloxane – based stamping technique for reusable poly (dimethylsiloxane) micro fl uidic chip. *The Institution of Engineering and Technology*, *10*, 229–232. http://doi.org/10.1049/mnl.2014.0581

Chan, B., Hsieh, K., & Yang, S. (2009). Thin-film patterns directly fabricated using a transfer stamping technique. *Journal of micromechanics and microengineering*, *25010*. http://doi.org/10.1088/0960-1317/19/2/025010

Cheang, P., Christensen, L., & Reynaga, C. (1996). Optimization of Photosensitive Polyimide Process for Cost Effective Packaging. *Surface Mount Technology Seminar*, 1–18. http://doi.org/10.1.1.588.7706

Clarson, S., & Semlyen, J. (1993). Siloxane polymers. *Prentice Hall, Englewood Cliffs*.

Dinh, N. H. T. (2016). Etudes technologiques de composants PDMS pour applications biomédicales : développement de capteurs souples de pression par transfert de film.

Duffy, D. C., Mcdonald, J. C., Schueller, O. J. A., & Whitesides, G. M. (1998). Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly (dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, *70*(23), 4974–4984.

Eddings, M. A., Johnson, M. A., & Gale, B. K. (2014). Determining the optimal PDMS – PDMS bonding technique for microfluidic devices. *Journal of micromechanics and microengineering*, (May). http://doi.org/10.1088/0960-1317/18/6/067001

Fiorini, G. S., & Chiu, D. T. (2005). Disposable microfluidic devices : fabrication, function, and application. *BioTechniques*, *446*(March), 429–446. http://doi.org/10.2144/05383RV02

Fong, K., & Lee, L. K. (2013). A flexible PDMS capacitive tactile sensor with adjustable measurement range for plantar pressure measurement. *Microsystem Technologies*. http://doi.org/10.1007/s00542-013-1918-5

Garra, J., Advanced, G., & Currie, J. (2002). Dry etching of polydimethylsiloxane for microfluidic systems. *Journal of Vaccum Science & Technology A*, 975–982. http://doi.org/10.1116/1.1460896

Golda, D., Lang, J. H., & Culpepper, M. L. (2008). Two-Layer Electroplated Microcoils With a PECVD Silicon Dioxide Interlayer Dielectric. *Journal of microelectromechanical systems*, *17*(6), 1537–1545. http://doi.org/10.1109/JMEMS.2008.2007264

Guisiano, J. (2011). Développement d'un micro-dispositif intègre pour le contrôle de la fréquence de résonance d'une antenne à haute sensibilité pour l'IRM. Université Paris Sud - Paris XI.

Hafner, J., Kuhl, M., Schwaerzle, M., Hehn, T., Rossbach, D., & Paul, O. (2017). Fabrication of Planar Copper Microcoils for Telemetric Orthodontic Applications †. *Proceedings Eurosensors Paris 2017*, 3–6. http://doi.org/10.3390/proceedings1040571

Johan, M., Iman, S., & Marion, W. (2015). Magnetic Properties Of NiFe And FeCuNbSiB Thin Films : Effect Of Thickness On Static Permeability. *Solid State Phenomena*, 705–708. http://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.233-234.705

Johnston, I. D., McCluskey, D. K., Tan, C. K. L., & Tracey, M. C. (2014). Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *35017*. http://doi.org/10.1088/0960-1317/24/3/035017

Kalangutkar, P. K. (2015). Advances in Biomedical Field using NEMS A Fusion Between MEMS and Nanotechnology. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, *5*(3), 132–136.

Keller, S., Haefliger, D., & Boisen, A. (2007). Optimized plasma-deposited fluorocarbon coating for dry release and passivation of thin SU8 cantilevers. *American Vacuum Society*, (March 2015). http://doi.org/10.1116/1.2806960

Lee, W. Y., Toney, M. F., & Mauri, D. (2000). High Magnetoresistance in Sputtered Permalloy Thin Films Through Growth on Seed Layers of. *IEEE Transaction on magnetics*, *36*(1), 381–385. http://doi.org/10.1109/20.822551

Li, S., Floriano, P. N., Christodoulides, N., Fozdar, D. Y., Shao, D., Ali, M. F., … Chen, S. (2005). Disposable polydimethylsiloxane / silicon hybrid chips for protein detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*, 574–580. http://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.010

Linear Polydimethylsiloxane. (1994). Joint Assessment of Commodity Chemicals. Repport No. 26. ISSN 0773-6339-26.

Lucas, N., Demming, S., Jordan, A., Sichler, P., & BUttgenbach, S. (2008). An improved method for double-sided moulding of PDMS. *Journal of micromechanics and microengineering*, *75037*. http://doi.org/10.1088/0960-1317/18/7/075037

Martínez, S., Mu, F., & Baldrich, E. (2013). Detection of sample conductivity and bacterial presence using inductive microcoils . Effect of device size and geometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *181*, 816–822. http://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.066

Matsumura, T., Esashi, M., & Harada, H. (2010). Multi-band radio-frequency filters fabricated using polyimide-based. *Journal of micromechanics and microengineering*, *95027*. http://doi.org/10.1088/0960-1317/20/9/095027

Matteucci, M., Christiansen, T. L., Cech, J., Systems, S. D., & Marie, R. (2014). Fabrication of combined-scale nano- and microfluidic polymer systems using a multilevel dry etching , electroplating and molding process. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, (September 2012). http://doi.org/10.1088/0960-1317/22/11/115008

McDonald, J. C., & Whitesides, G. M. (2002). Poly (dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Accouts of Chemical Research*, (July).

Microchem. (2015). MicroChem (2015) SU-8 2000 features. Retrieved from www.microchem.compdfSU82000DataSheet2000_5thru2015Ver4.pdf

Mochizukil, A., & Ueda, M. (2001). Recent Development in Photosensitive Polyimide (PSPI). *Journal of Photopolymer Science and Technology*, *14*, 677–687. http://doi.org/https://doi.org/10.2494/photopolymer.14.677

Pamme, N., & Manz, A. (2004a). On-Chip Free-Flow Magnetophoresis : Continuous Flow Separation of Magnetic Particles and Agglomerates. *Analytical Chemistry*, *76*(24), 7250–7256. http://doi.org/10.1021/ac049183o

Pamme, N., & Manz, A. (2004b). On-Chip Free-Flow Magnetophoresis: Continuous Flow Separation of Magnetic Particles and Agglomerates. *Analytical Chemistry*, *76*(24), 7250–7256. http://doi.org/10.1021/ac049183o

Panchawagh, H. V, Faheem, F. F., Herrmann, C. F., Serrell, D. B., Finch, D. S., & Mahajan, R. L. (2007). A flip – chip encapsulation method for packaging of MEMS actuators using surface micromachined polysilicon caps for BioMEMS applications. *Sensors and Actuators A*, *134*, 11–19. http://doi.org/10.1016/j.sna.2006.05.013

Park, S., Schift, H., Padeste, C., & Schnyder, B. (2004). Anti-adhesive layers on nickel stamps for nanoimprint lithography. *Microelectronic Engineering*, *74*, 196–201. http://doi.org/10.1016/j.mee.2004.02.040

Pawinanto, R. E., Yunas, J., Majlis, B. Y., Bais, B., & Said, M. M. (2015). Fabrication and testing of electromagnetic MEMS micro-actuator utilizing PCB based planar microcoil. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, *10*(18), 8399–8403.

Phommahaxay, A., Bogaerts, L., & Naito, Y. (2011). Thin MEMS packages obtained by a novel collective cap transfer process. *Procedia Engineering*, *25*, 1505–1508. http://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.372

Quemper, J., Nicolas, S., Gilles, J. P., Grandchamp, J. P., Bosseboeuf, A., & Bourouina, T. (1999). Permalloy electroplating through photoresist molds. *Sensors & Actuators: A. Physical*, 8–11. http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-4247(98)00323-9

Reinhardt, K. A., & Kern, W. (2008). *Handbook of silicon wafer cleaning technology*. (W. Andrew, Ed.).

Risquez, S. (2017). Microsystème électrostatique tridimensionnel de récupération d ' énergie pour alimenter un stimulateur cardiaque sans sonde To cite this version : HAL Id : tel-01519356 L ' U NIVERSITÉ P ARIS -S ACLAY " U NIVERSITÉ P ARIS -S UD " Mme Sarah RISQUEZ Microsystème électrostatique tridimensionnel de récupération d ' énergie pour alimenter un stimulateur cardiaque sans sonde.

Saharil, F., Wright, R. V., Rantakari, P., Kirby, P. B., Vaha-Heikkila, T., Niklaus, F., … Oberhammer, J. (2010). Low-temperature CMOS-compatible 3D-Integration of monocrystalline-silicon based PZT RF MEMS switch actuators on RF substrates. *IEEE*, 47–50.

Schelcher, G. (2012). Le transfert de films : vers une intégration hétérogène des micro et nanosystèmes. Université Paris Sud - Paris XI.

Schelcher, G., Brault, S., Parrain, F., Lefeuvre, E., & Dufour-gergam, E. (2011). MEMS Process by Film Transfer Using a Fluorocarbon Anti-Adhesive Layer. *Journal of The Electrochemical Society*, *158*(5), 545–550. http://doi.org/10.1149/1.3568823

Silverio, V., López-martínez, M. J., Franco, F., Amaral, M., Gaspar, J., Cardoso, S., … Member, S. (2017). On-chip magnetic nanoparticle manipulation and trapping for biomedical applications. *IEEE*, *9464*(c). http://doi.org/10.1109/TMAG.2017.2715848

Suriano, R., Kuznetsov, A., Eaton, S. M., Kiyan, R., Cerullo, G., Osellame, R., … Turri, S. (2011). Applied Surface Science Femtosecond laser ablation of polymeric substrates for the fabrication of microfluidic channels. *Applied Surface Science*, *257*, 6243–6250. http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.02.053

Toepke, M. W., & Beebe, D. J. (2006). PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications, (c), 1484–1486. http://doi.org/10.1039/b612140c

Vj, L., Katzenmeyer, A. M., & Islam, M. S. (2010). Harvesting and Transferring Vertical Pillar Arrays of Single-Crystal Semiconductor Devices to Arbitrary Substrates. *IEEE Transactions on electron devices*, *57*(8), 1856–1864.

Wilson, W. C., & Atkinson, G. M. (2007). Review of Polyimides Used in the Manufacturing of Micro Systems. *NASA*, (April 2007).

Windrich, F., Malanin, M., J.Eichhorn, K., Voit, B., & Lang, K. D. (2014). Low-Temperature Photosensitive Polyimide Processing for Use in 3D Integration Technologies. *Materials Research Society*, *1*. http://doi.org/10.1557/opl.2014.520

Wu, C., Shen, Y., Chuang, S., & Wei, C. S. (2007). Anti-adhesive effects of diverse self-assembled monolayers in nanoimprint lithography. *Sensors and Actuators A*, *139*, 145–151. http://doi.org/10.1016/j.sna.2006.10.017

Xia, Y., & Whitesides, G. (1998). Soft lithography. *Annu Rev Mater Sci*.

Yoon, J., Jo, S., Chun, I. S., Jung, I., Kim, H., Meitl, M., & Menard, E. (2010). GaAs photovoltaics and optoelectronics using releasable multilayer epitaxial assemblies. *Nature*, *465*(7296), 329–333. http://doi.org/10.1038/nature09054

Yoon, J.-B., Han, C.-H., Yoon, E., & Kim, C.-K. (1998). Monolithic Fabrication of Electroplated Solenoid Inductors Using Three-Dimensional Photolithography of a Thick Photoresist. *The Japan Society of Applied Physics*, *37*. http://doi.org/10.1143/JJAP.37.7081

Chapitre 4

Etude et caractérisation des dispositifs de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques

---

I - Introduction

Dans ce chapitre, les dispositifs de contrôle et de détection de nanoparticules magnétiques (NPM) fabriqués dans le chapitre 3 sont présentés. Dans le présent travail, la première expérience a consisté à utiliser des aimants permanents pour calibrer le blocage des NP. Une fois cette étape validée ce protocole a été employé dans le cadre d'une étude avec des éléments biologiques.

L'immunodosage utilisant des NPM est généralement effectué sous le contrôle d'un aimant permanent proche du microtube de réaction. L'utilisation d'un aimant fournit une méthode puissante pour piloter les NPM mais reste peu fiable ou insuffisante pour un dosage immunologique entièrement intégré en laboratoire sur puce. Le but du développement des microbobines est de les utiliser pour piéger les NPM pendant les étapes de biofonctionnalisation en contrôlant le courant d'excitation et le champ magnétique. Pour cela la méthode de détection par fluorescence du complexe biologique a été utilisée, il s'agit de la méthode la plus connue et la plus facile à mettre en œuvre. Afin de comparer les performances du système d'analyse visé, nous avons tout d'abord démontré la possibilité de réaliser le complexe biologique voulu en tube afin de quantifier sa spécificité et sa reproductibilité. Puis la variation de la concentration de la molécule cible a été étudiée dans le but de déterminer la limite de détection de l'immunodosage.

La détection magnétique de NPM est très rarement utilisée dans la littérature pour la détection biologique. Dans (Baglio et al. 2007), les auteurs présentent la conception et la fabrication de dispositifs inductifs intégrés destinés à des applications de biodétection ayant des gammes de détection en dessous du pM. Le principe de détection est basé sur les changements d'inductance de la bobine dus à la présence de particules magnétiques dans la zone active du dispositif. Pour augmenter la sensibilité du dispositif à la présence des particules magnétiques, une couche magnétique est généralement déposée localement sur la face arrière du substrat en vis à vis des bobines (Figure 4.1). L'analyse de ces dispositifs a montré leur capacité à détecter une quantité minimale de 110 particules magnétiques fixées sur une surface active de 0,8 mm^2, ce qui donne une estimation de la limite de détection des dispositifs d'environ 4.10^{-14} M, ce qui est une limite de détection de très haute sensibilité.

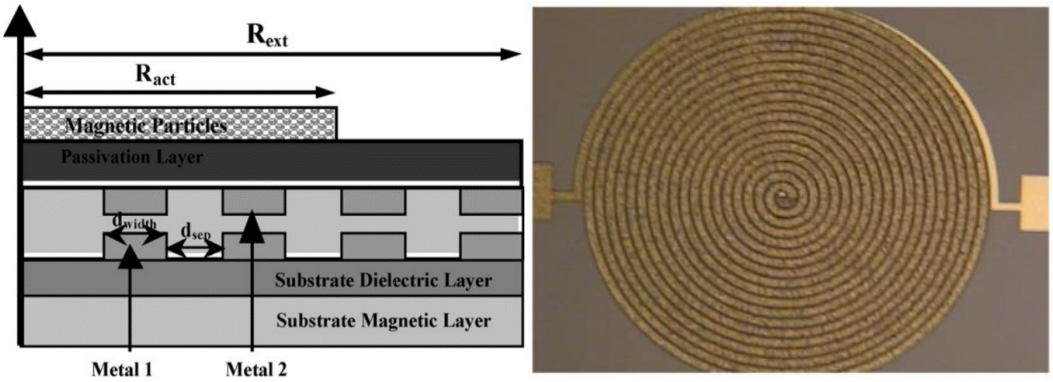


Figure 4.1 : (Gauche) Schéma de principe des microbobines à deux niveaux ; (droite) Image au microscope d'une microbobine deux niveaux fabriquée par Baglio et al.

Notre dispositif de détection créé a pour but de détecter les variations d'inductance dues à la présence de NPM dans la chambre fluidique. Le but du travail expérimental est de démontrer l'intérêt de l'insertion d'un circuit magnétique autour des microbobines pour détecter des NPM. Les structures étudiées par simulation dans le chapitre 2 sont ici étudiées expérimentalement. Dans cette optique, quatre dispositifs correspondant à différentes étapes de microfabrication du biocapteur ont été réalisés et caractérisés :

- Les microbobines seules,
- Les microbobines avec une base en FeNi,
- Les microbobines avec une base et un plot en FeNi,
- Les microbobines avec une base, un plot et des branches en FeNi.

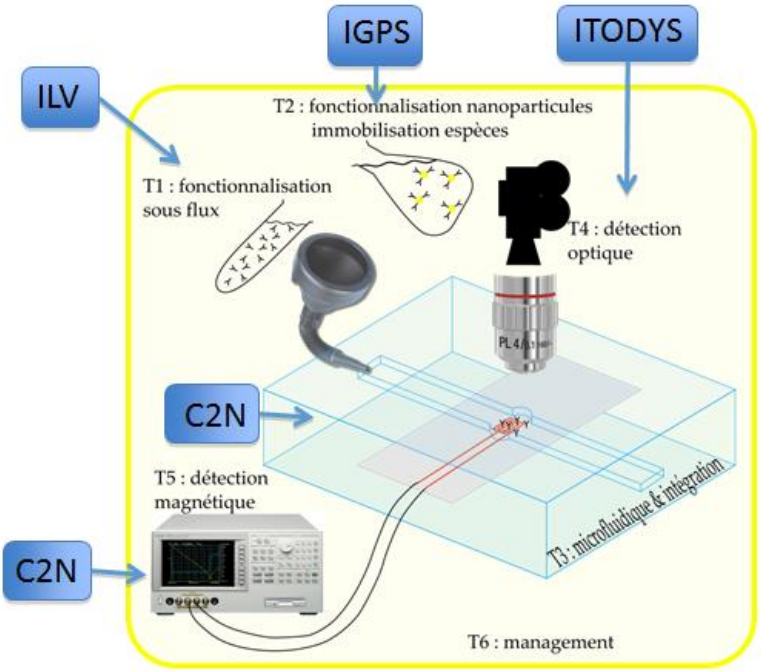
La caractérisation de ces dispositifs permet d'étudier l'intérêt de la configuration d'un circuit magnétique autour de microbobines.

II - Présentation du projet de la thèse : Analyse MultiModale pour la Biodéfense (AMMIB)

Cette thèse s'intègre essentiellement dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et la DGA (Direction Générale de l'Armement). Ce projet vise un concept original et novateur de biocapteur hautement spécifique, comportant un système microfluidique combinant deux modes de détection, optique et magnétique. Pour capturer la molécule cible, des NPM bio-fonctionnalisées avec des anticorps sont utilisés. Le but est de lever plusieurs verrous en vue d'obtenir un système microfluidique intégré, utilisable à terme sur le terrain, employant des nanoparticules. Le système proposé vise explicitement à améliorer les capacités d'analyse et de détection dans le domaine des risques biologiques.

L'intérêt d'utiliser des NPM immuno-fonctionnalisées est multiple :

- une intégration et une manipulation aisée dans un dispositif microfluidique,
- une extraction simple et spécifique de la cible (molécule ou pathogène) dans un grand volume,
- une pré-concentration sous champ magnétique des complexes « antigène cible-NP » au niveau des capteurs du dispositif,
- une détection sensible par des capteurs susceptibles de mesurer des faibles variations de réflectivité de lumière et de champ magnétique liées à la présence de ces nanoparticules immobilisées. Ces NPM peuvent, de plus, être éliminées, lorsque le champ magnétique est supprimé, assurant la réutilisation de la plateforme d'analyse.



ITODYS : Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes
ILV : Institut Lavoisier de Versailles
IGPS : Institut Galien Paris-Sud

Figure 4.2 : Présentation schématique du projet AMMIB et des différentes contributions des partenaires (http://www.agence-nationale-recherche.fr/Projet-ANR-13-ASTR-0021).

La grande originalité de ce projet repose sur la double utilisation des propriétés magnétiques (pour la pré-concentration et la détection) et optiques des NPM immobilisées dans le biocapteur. Cette double détection permettra une analyse rapide, simple, redondante pour l'élimination de faux-positifs, et potentiellement transportable à terme.

Ce projet interdisciplinaire basé sur la reconnaissance biologique va pouvoir être appliqué à la détection d'un grand nombre de protéines, de microorganismes tels que les virus et les bactéries. Pour ce projet, il a été choisi de cibler la détection de micro-organismes (preuve de concept avec E. Coli) et de protéines (ovalbumine) modèles dans le contexte de la bio défense.

III - Etude préliminaire dans les circuits fluidiques

Les travaux sur les immunodosages ont été réalisés avec l'aide du Pr. Claire Smadja de l'Institut Galien Paris Sud et en s'inspirant de la thèse de Thi Phuong Ly Giang(Giang, 2013).

III - 1 - Rappel du principe d'immunodosage

Comme il a été expliqué au chapitre 1, le principe de l'immunodosage est l'utilisation d'anticorps pour détecter la présence d'une substance cible, généralement un biomarqueur en solution.

Le principe, présenté en Figure 4.3, est d'encapsuler la molécule cible entre deux anticorps et d'utiliser un troisième anticorps pour la détection. Les anticorps présentent de site de reconnaissance : les fragments Fab. Le premier anticorps permet de reconnaitre une partie (épitote) de la molécule cible et le deuxième reconnait une partie différente de la molécule cible.

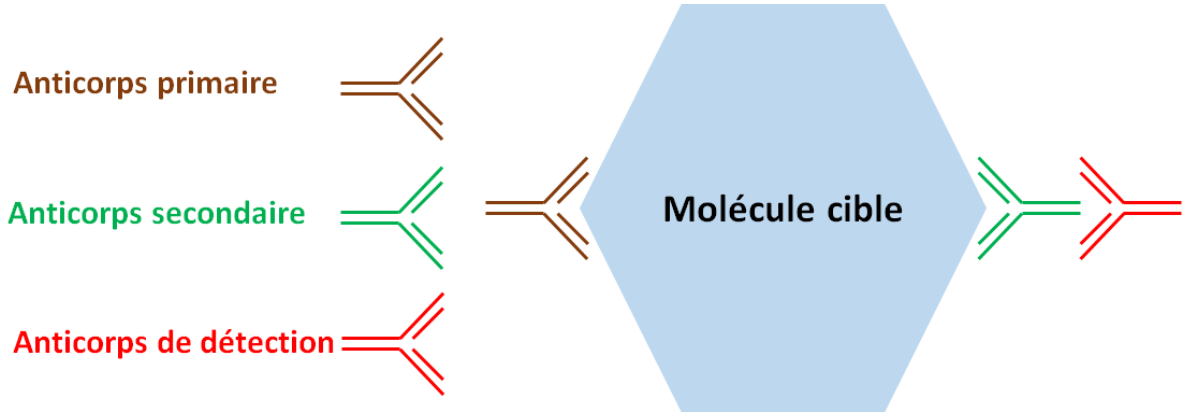


Figure 4.3 : Principe de l'encapsulation d'une molécule cible par la méthode d'immunodosage.

L'ensemble du complexe (anticorps et molécule cible) est complété par l'utilisation d'une NPM. Cet ajout permet de manipuler l'ensemble du complexe à l'aide de la force magnétique. Dans la réalisation de l'immunodosage, la première étape est de réaliser le greffage de l'anticorps primaire sur les NPM puis le blocage des zones libres de la NPM par la BSA, Bovin Serum Albumin qui a la particularité d'occuper indifféremment tous les sites de reconnaissance libres de la NPM (Figure 4.4.a&b&c). La seconde étape est la reconnaissance de la molécule cible par l'anticorps primaire (Figure 4.4.d). La troisième étape est l'ajout de l'anticorps secondaire qui reconnait une autre partie de la molécule cible (Figure 4.4.e). La dernière étape est l'ajout de l'anticorps de détection (fluorescence) qui reconnait une partie de l'anticorps secondaire (Figure 4.4.f).

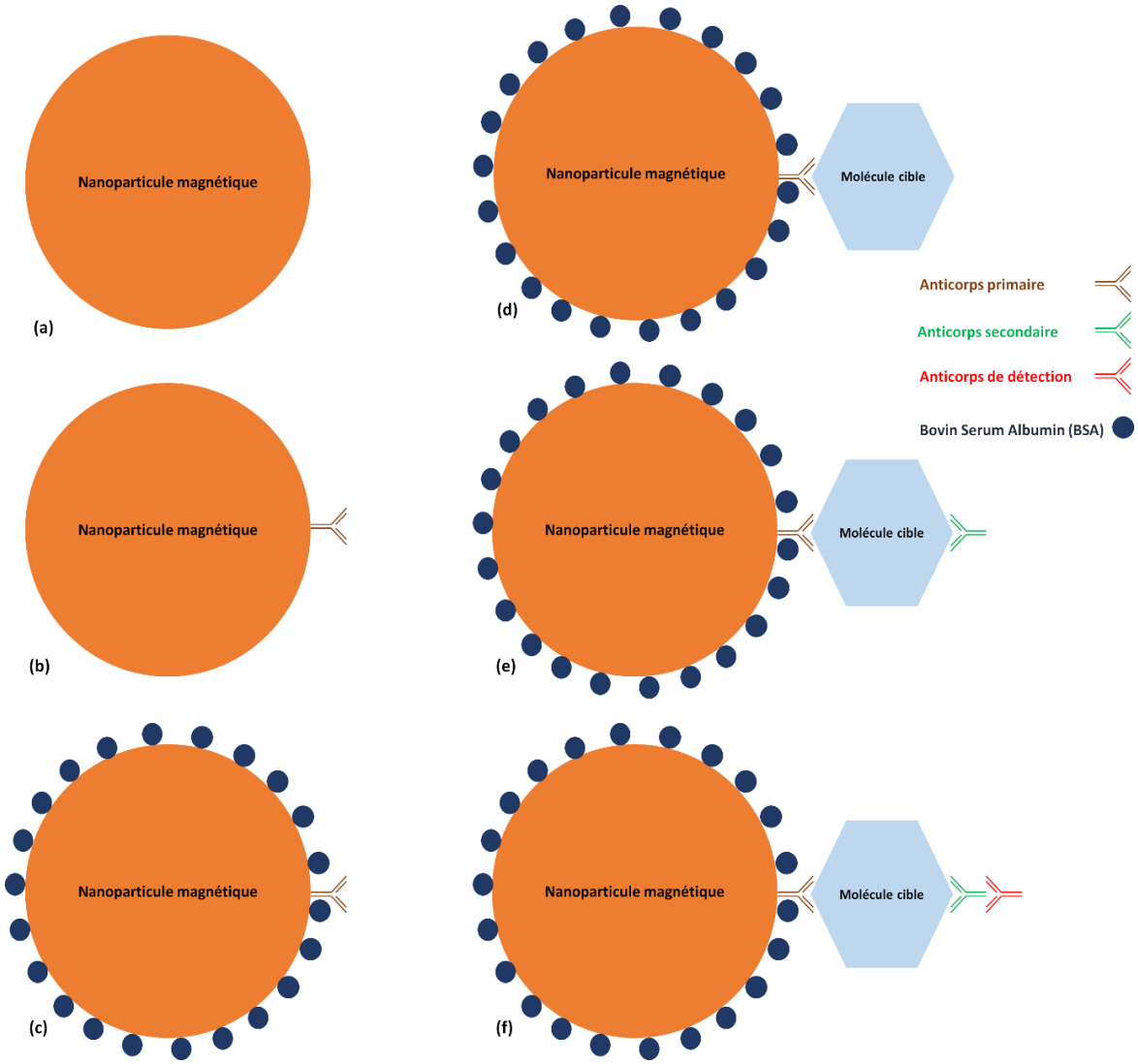


Figure 4.4 : Les différentes étapes d'un immunodosage avec une NPM : (a) NPM seule, (b), Ajout de l'anticorps primaire(c) Protection à l'aide de la BSA, (d) Ajout de la molécule cible, (e) Ajout de l'anticorps secondaire, (f) Ajout de l'anticorps de détection.

Un point important dans la réalisation des immunodosages est la taille des NPM. En effet en fonction du diamètre des NPM un certain nombre de complexes pourront y être greffés. Ce paramètre peut amener des discussions lorsque l'on cherche à détecter des bactéries. Plusieurs solutions peuvent être choisies :

- La taille des NPM est très inférieure à celle de la bactérie, ce qui permet d'entourer la bactérie avec une couche de NPM (Figure 4.5.c&d).
- La taille des NPM est équivalente à celle de la bactérie, dans ce cas le complexe ne pourra que compter qu'une ou deux bactéries par NPM (Figure 4.5.b).
- La taille des particules magnétiques est supérieure à celle de la bactérie, ce qui entrainera la possibilité de détecter de nombreuses bactéries avec une seule particule magnétique (Figure 4.5.a).

La solution la plus intéressante dans notre cas serait d'obtenir une couche de NPM autour de la bactérie afin de réaliser un meilleur contrôle des bactéries cibles.

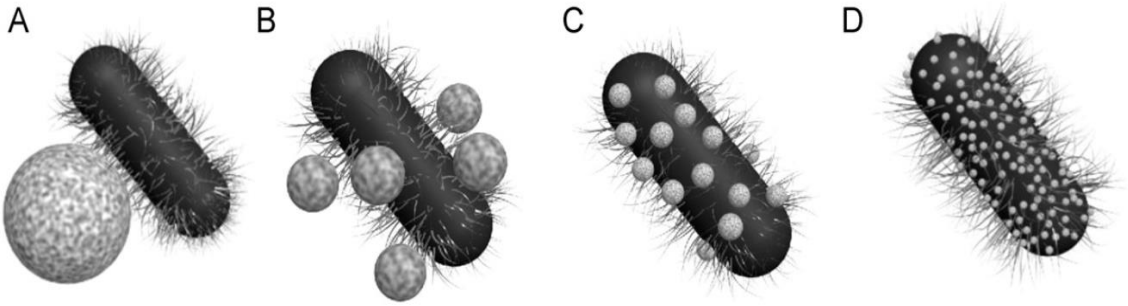


Figure 4.5 : Représentation schématique de l'interaction d'E. coli 0157:H7 avec des NPM de différentes tailles (A) 900 nm; (B) 350 nm; © 150 nm; and (D) 30 nm (Jiang et al., 2011).

III- 1 - b - Le greffage de l'anticorps primaire sur la nanoparticule magnétique

Comme il a été énoncé, les NPM doivent être fonctionnalisées à l'aide de protéines (enzymes, anticorps, anticorps marqués…) pour réaliser un complexe de détection.

Il existe deux grands modes de greffage :

- Le mode covalent (immobilisation orientée ou non orientée) qui entraîne une liaison forte et qui ne peut pas être brisée.
- Le mode non covalent (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, forces de Van der Waals) qui permet une liaison « faible », et qui est réversible (par exemple à l'aide de la liaison avidine/strepavidine).

La méthode utilisant le N-hydroxysulfosuccinimide (N-NHS) et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carboimide (EDC) est un des modes de greffage covalent les plus utilisés (Samantha et al ., 2011). Dans cette expérience, lorsque l'EDC réagit avec le groupement carboxylique sur le polymère entourant la bille magnétique, il forme un intermédiaire qui réagit avec un groupement amine de la protéine à immobiliser. Ceci va conduire à la formation d'un complexe relié à une fonction amide. Cet intermédiaire est facilement hydrolysable. Aussi, l'addition de sulfo-NHS va stabiliser cet intermédiaire qui va réagir avec le groupement aminé et améliorer le rendement de greffage de la réaction. Cette immobilisation covalente permet un greffage performant des biomolécules. Le seul inconvénient est que ce mode de greffage conduit à une immobilisation aléatoire des protéines. Ainsi, les anticorps vont pouvoir être greffés sur les particules magnétiques par l'intermédiaire d'une liaison peptidique (Figure 4.6).

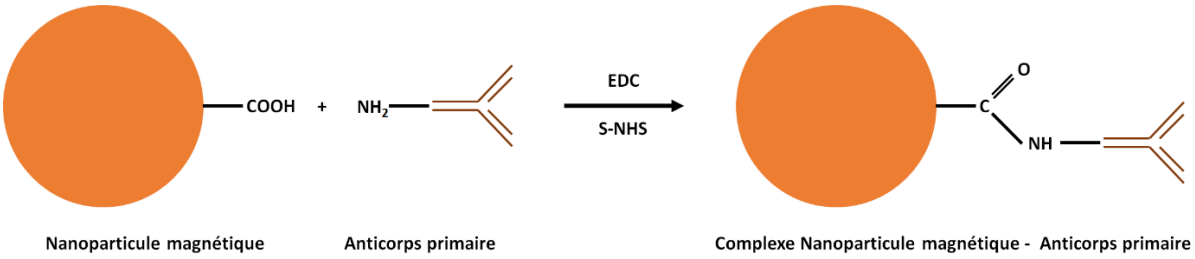


Figure 4.6 : Greffage de la protéine à l'aide d'EDC et S-NHS.

L'étape de greffage terminée, il faut réaliser une étape de prévention d'absorption non spécifique au niveau de la NPM, c'est-à-dire qu'il faut occuper les espaces laissés libres sur la NPM. L'utilisation de la solution de BSA (Bovin Serum Albumin) est donc nécessaire car elle vient se greffer entre les

anticorps sur la surface de la NPM (Figure 4.7).Elle permet un blocage et prévient l'interaction non spécifique de la cible directement avec la surface de la NPM.

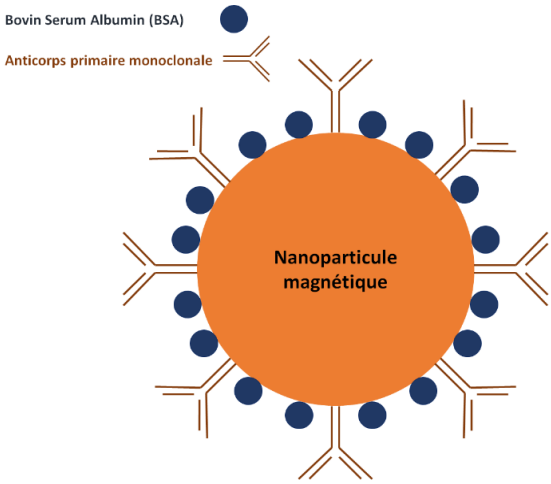


Figure 4.7 : Utilisation de BSA sur la surface de la nanoparticule afin d'empêcher d'autres fixations que l'anticorps choisi.

III- 1 - c - Reconnaissance du complexe « anticorps primaire – ovalbumine – anticorps secondaire »

La détection d'une molécule cible, ici l'ovalbumine, peut se faire en utilisant les anticorps (désignés sous le terme d'Immunoglobuline G ou IgG) et en réalisant un immunoessai/sandwich (anticorps/antigène/anticorps). Il s'agit d'utiliser deux anticorps ciblant deux régions différentes d'un même antigène, Figure 4.8.A. En effet, les parties de la chaîne légère appelées domaine variable dépendent de chaque anticorps et reconnaissent spécifiquement une ou plusieurs parties d'un antigène (ou d'un agent pathogène), Figure 4.8.B.

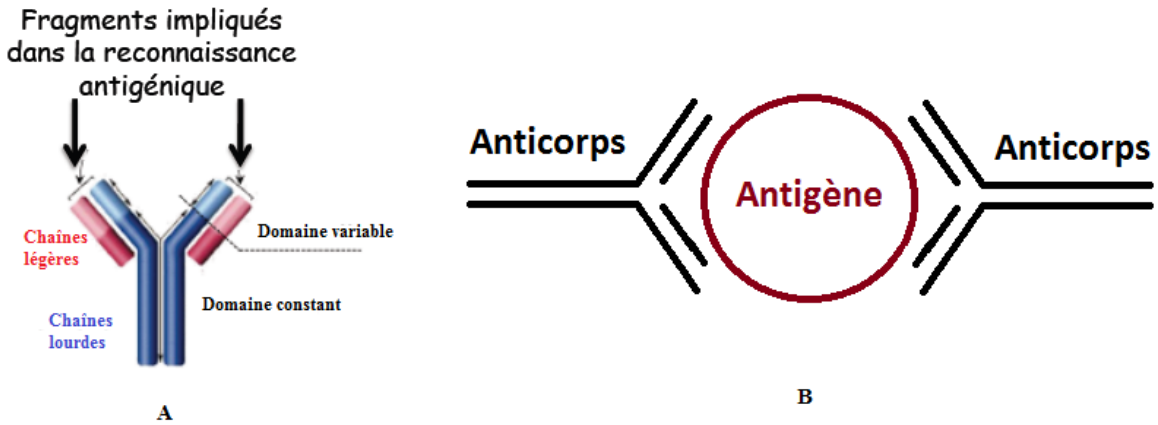


Figure 4.8:(A) Présentation d'un anticorps. (B) Sandwich « anticorps – antigène – anticorps ».

Lors du choix des anticorps, il est donc très intéressant de prendre le premier anticorps spécifique d'une zone de la molécule cible (anticorps monoclonal) et le second anticorps reconnaissant plusieurs zones de la molécule cible, Figure 4.9.

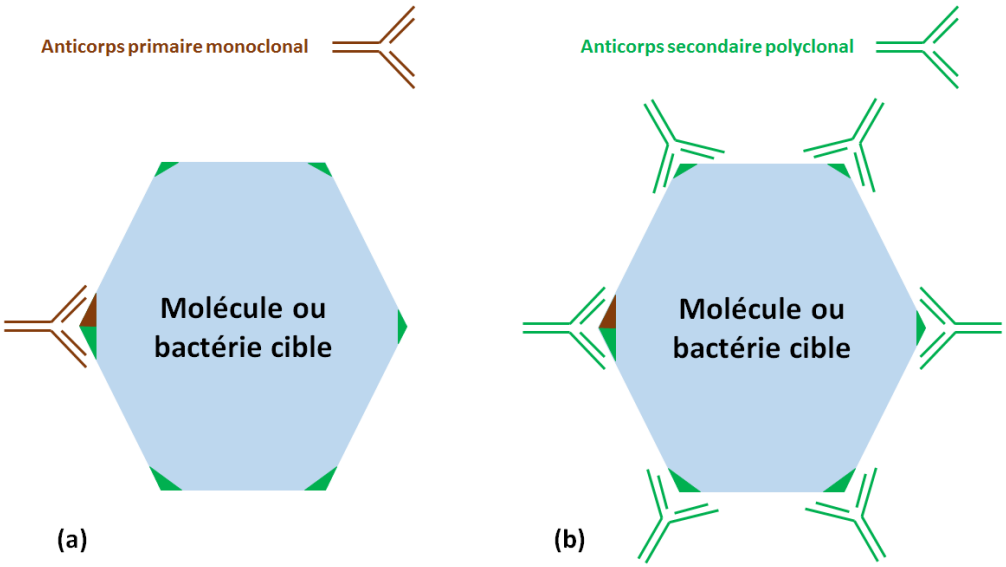


Figure 4.9 : Schéma de principe de reconnaissance des anticorps (a) monoclonaux et (b) polyclonaux.

En effet, en réalisant l'inverse, il existe une probabilité non nulle que l'anticorps polyclonal vienne occuper le site spécifique de l'anticorps monoclonal (Figure 4.10). Dans ce cas-là, la réalisation du complexe visé devient impossible, tout comme la détection de la molécule cible.

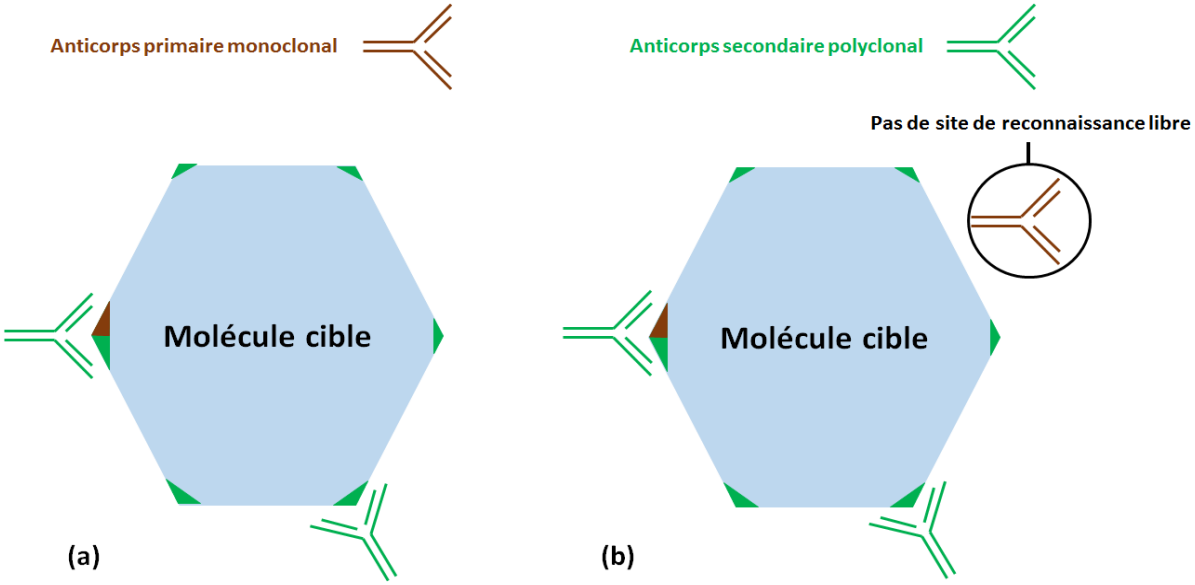


Figure 4.10 : Schéma de principe de l'ajout d'anticorps (a) polyclonaux puis (b) monoclonaux. Les anticorps monoclonaux ne peuvent pas reconnaitre la molécule cible dans cette configuration.

III- 1 - d - L'ajout de l'anticorps de fluorescence comme anticorps de détection

Pour détecter le complexe formé, on utilise un anticorps de détection. La détection peut se faire par fluorescence, par magnétisme, par absorbance optique. Ici, la fluorescence est utilisée pour détecter le complexe biologique. En effet, la méthode de détection par fluorescence permet une approche quantitative et qualitative plus rapide et plus facile à prendre en main.

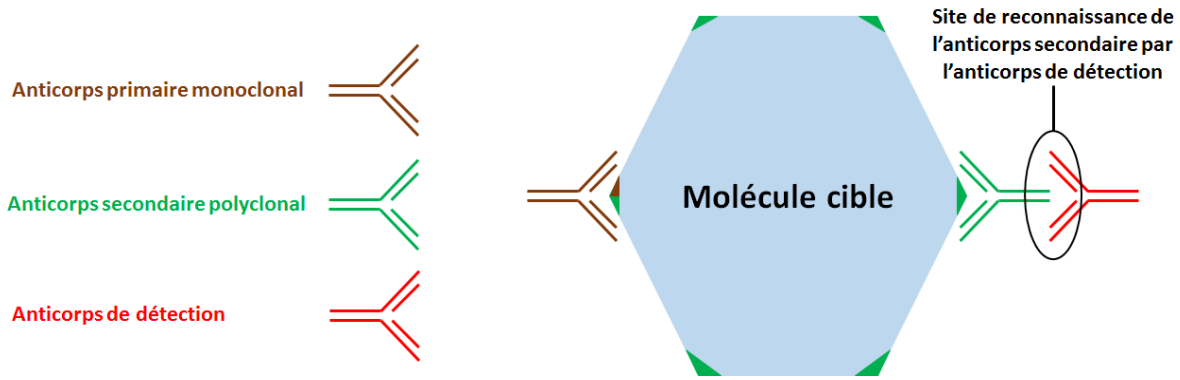


Figure 4.11: Reconnaissance « anticorps primaire - antigène-anticorps secondaire - anticorps de détection ».

Le principe d'encapsulation « anticorps primaire – molécule cible -anticorps secondaire - anticorps de détection » est utilisé. L'anticorps primaire vient se fixer au niveau de l'antigène, et l'anticorps secondaire reconnaît une autre partie de l'antigène. L'anticorps de détection lui, reconnaît l'anticorps secondaire : les fragments de reconnaissance de l'anticorps de détection reconnaissent du fragment Fc de l'anticorps secondaire, Figure 4.11.

L'ensemble du complexe comporte : la NPM, l'anticorps attaché à la nanoparticule, l'antigène, l'anticorps secondaire, l'anticorps de détection qui est marqué par un fluorochrome ou une enzyme permettant la production d'un produit coloré, Figure 4.12.

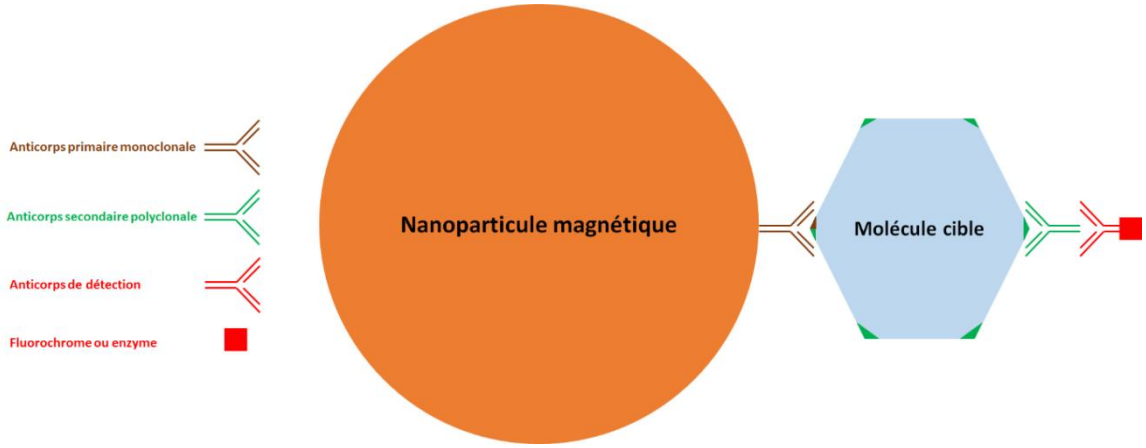


Figure 4.12 : Représentation schématique du complexe biologique crée.

Expérimentalement, il peut y avoir plusieurs anticorps attachés à une même NPM ou plusieurs anticorps secondaires sur la molécule cible. Cela peut entrainer l'apparition de plusieurs complexes sur une seule NPM et donc une intensité plus importante. Lors de l'analyse des données par fluorescence il pourra être nécessaire de prendre en compte cette hypothèse expérimentale.

Le principe d'immunodosage présenté dans cette partie peut s'appliquer pour des expériences dans des microtubes « Eppendorfs », des plaques avec des puits ou en microfluidique. Un problème est présent dans chacun des cas, les parois peuvent absorber de manière non spécifique des éléments biologiques. Pour les éléments commerciaux comme les microtubes ou les plaques avec puits, des versions modifiées existent présentant une couche de protection sur les parois. Dans le cas des dispositifs microfluidiques, particulièrement pour les prototypes, il est nécessaire de protéger leurs parois à l'aide d'un traitement de surface.

III - 2 - Protection des canaux microfluidiques par traitement de surface

III- 2 - a - Absorption d'éléments par les parois du PDMS

L'utilisation d'éléments biologiques dans des canaux microfluidiques en PDMS entraine une contrainte importante. En effet, de par sa nature très hydrophobe, le PDMS absorbe/adsorbe naturellement les éléments biologiques ou les NPM au niveau de ses parois, Figure 4.13. Dans le cas d'une détection qui se veut sensible et spécifique, il est nécessaire d'étudier ce problème. En effet, en présence d'absorption non-spécifique il sera difficile de définir les complexes formés des éléments absorbés.

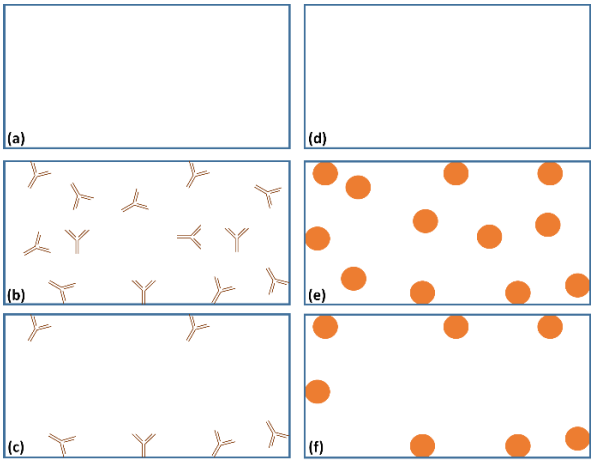


Figure 4.13 : Représentation schématique de l'absorption des éléments biologiques et des NPM par le PDMS (a) et (d) canaux en absence d'éléments biologiques, (b) et (e) ajout de la solution d'anticorps ou de NPM (c) et (f) canaux après rinçage, et présence des éléments absorbés par les parois de PDMS.

Dans la réalisation d'immunodosage dans un dispositif fluidique, les différentes étapes d'ajouts d'anticorps peuvent entrainer leur absorption sur les parois des canaux non protégés. Il en résulte une probabilité de créer une partie du complexe biologique à la surface des canaux, les différents cas sont présentés en Figure 4.14 :

- Absorption par la paroi des anticorps primaires et construction du complexe biologique.
- Absorption par la paroi de la molécule cible et construction du complexe biologique.
- Absorption par la paroi de l'anticorps secondaire et reconnaissance de ce dernier par l'anticorps de détection.
- Absorption par la paroi de l'anticorps de détection.

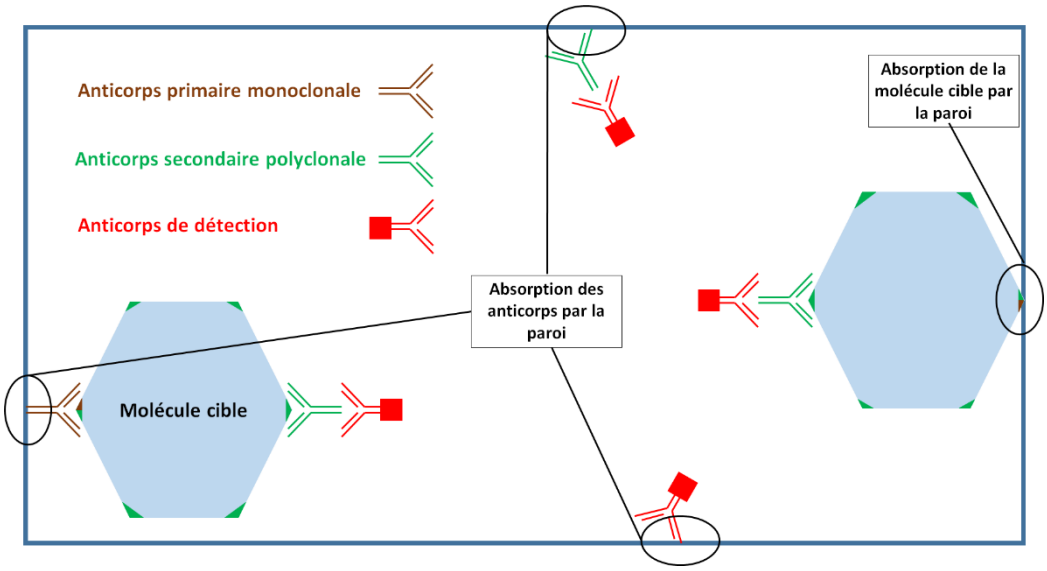


Figure 4.14 : Schéma des différentes possibilités d'absorption non voulue dans le cas de la formation de notre complexe biologique.

Dans la littérature, Boxshall et al. ont démontré en quantifiant la quantité de protéines absorbées que le traitement par Pluronic® F68 implique la plus forte réduction de l'absorption des protéines et de la fixation des cellules. Il est suivi dans leur étude par le Pluronic® F127 et le Tween® 20 qui est le moins efficace. Le traitement par NaOH entraine une augmentation substantielle à la fois de l'adsorption des protéines et de la fixation des cellules (Boxshall et al., 2006).

Nikcevic et al. ont pour leurs parts utilisés la microscopie à épifluorescence pour tenter d'évaluer quantitativement l'adsorption de microbilles sur les parois des microcanaux et les surfaces du PDMS. Leurs différentes expériences ont démontré que la réduction la plus significative de l'adsorption des billes fluorescentes a été observée avec l'utilisation du Téflon AF (Nikcevic et al. 2005).

Durant de cette thèse, en prenant en compte les connaissances dans le département Microsystème et NanoBioFluidique, la technique choisie pour protéger les canaux de PDMS a été d'utiliser le polyéthylène oxyde (PEO) et le sérum d'albumine bovin (BSA). Deux méthodes ont été expérimentées, tout d'abord en réalisant une protection « pleine plaque », c'est-à-dire en protégeant le PDMS avant de sceller le dispositif. Puis cette méthode a été adaptée pour l'utiliser une fois le dispositif scellé afin de tendre vers un dispositif complètement intégré avec une fonctionnalisation sous flux.

III- 2 - b - La protection du PDMS par un procédé pleine plaque de « passivation »

III - 2 - b - i - Explications du principe du greffage du PEO sur le PDMS

Avant incubation avec de la solution de PEO, la surface oxydée de PDMS est prétraitée avec du HCl 1M afin de protoner les groupes silanol sur la surface de PDMS. Les chaînes de PEO contenant des charges négatives, qui proviennent des atomes d'oxygène des groupes éther/oxygène, agissent comme accepteur d'hydrogène (Iki & Yeung, 1996). Les chaînes polymères s'adsorbent alors facilement en surface, riches en groupes hydroxyles, par des liaisons hydrogène.

Il existe deux types de greffage de PEO sur la surface PDMS: la fixation covalente et la fixation par adsorption. Pour la fixation covalente, les chaînes de PEO avec des groupes terminaux hydrophiles sont couplées à la surface PDMS oxydée contenant des groupes silanol (Delamarche et al., 1998;

Belamarche et al,. 1997; Lee et al., 2008; Chen et al., 2005), la surface PDMS nécessite un traitement plasma dans ce cas. Après la première couche de PEO fixée par covalence, les chaines de PEO peuvent être adsorbées sur cette surface conduisant à une couche mince. Par fixation covalente, la couche de PEO polymérisée se lie suffisamment fortement sur les surfaces et peut être stable durant plusieurs cycles d'utilisation des microcanaux.

Dans le cas de fixation par adsorption, la chaîne de PEO peut être adsorbée directement sur le PDMS natif (sans activation de la surface par plasma oxygène). Il est suggéré que l'adsorption comprend l'adsorption physique et chimique. Le mécanisme d'adsorption de PEO ou d'autres polymères tensioactifs sur une surface hydrophobe / hydrophile est décrit dans la littérature (Barnes & Prestidge 2000; Esipova et al. 2002). Sur les surfaces hydrophiles, le polymère s'adsorbe dans une conformation plate résultant d'une interaction des chaines de PEO avec la surface hydrophile. Ceci est principalement dû aux liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène sur la surface et aux interactions acide-base (Moudgil & Prakash 1998). Dans le cas contraire, sur les surfaces hydrophobes du PDMS natif, la chaine de PEO en solution, forme une couche épaisse de PEO. Après cette première couche, la surface devient hydrophile car les parties hydrophobes de PEO s'adsorbent fortement au PMDS. Dans ce cas, les processus d'adsorption ne peuvent pas être suffisamment contrôlés pour garantir l'épaisseur de la couche adsorbée.

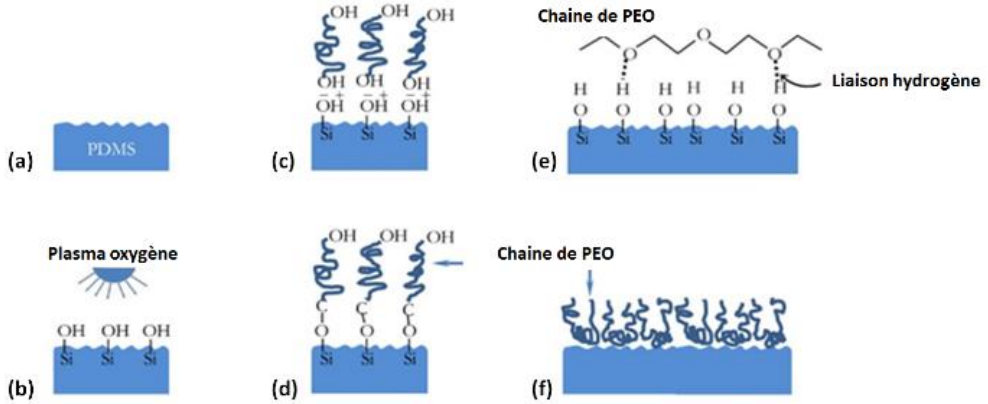


Figure 4.15 : (a) Surface native du PDMS; (b) Production d'une forte densité de groupement silanol par plasma oxygène; (c-d) Les groupements silanol réagissent avec les groupements terminaux des chaines de PEO; (e-f) L'absorption physique et chimique des chaines de PEO génère une couche de polymères à la surface du PDMS.

Pour améliorer la prévention de la surface de PDMS d'une adsorption non spécifique, la surface de PDMS greffée par du PEO peut être bloquée par des agents de blocage de surface. Dans le cas de l'immunodosage, l'utilisation de la BSA est le plus commun (Sugio et al. 1999). La BSA est adsorbée sur la surface pour bloquer les surfaces des canaux. Le BSA ayant des parties hydrophiles, elle s'adsorbe très facilement sur la surface hydrophile. En règle générale, l'adsorption de la BSA est généralement limitée à une monocouche avec un temps d'incubation de moins de 2 heures à faible concentration d'environ 10 mg / mL (Ishiguro et al. 2005). Il y a un compromis entre le temps d'incubation et la concentration de la solution. Un processus de désorption de BSA peut se produire après quelques cycles d'utilisation des microcanaux. Par conséquent, une nouvelle étape d'adsorption de BSA peut être réalisée après chaque expérience.

III - 2 - b - ii - Procédé de passivation du PDMS

Pour protéger les canaux de PDMS, un protocole a été mis en place (Figure 4.16). La préparation des solutions (PEO 0.2% et BSA 2%) utilisées dans ce protocole est présentée dans l'annexe du chapitre 4.

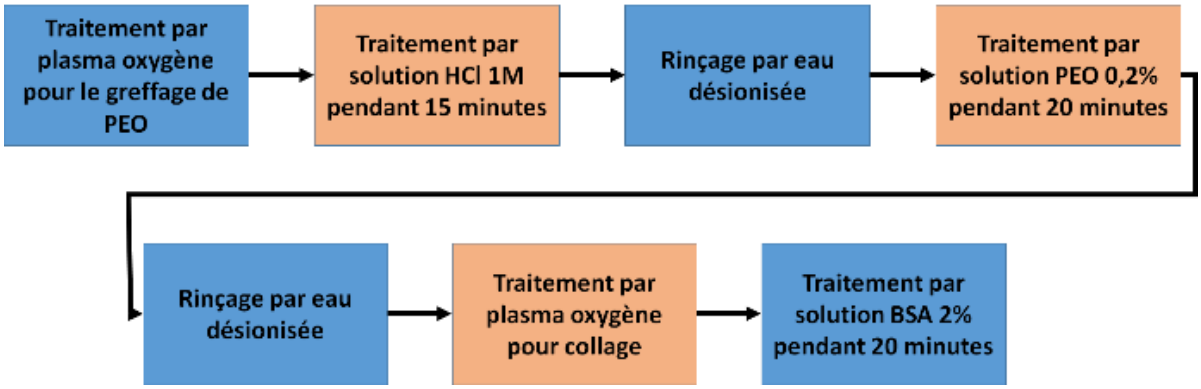


Figure 4.16 : Protocole de protection du PDMS par un procédé pleine plaque.

Premièrement, les surfaces du capot contenant les microcanaux et du substrat contenant la couche de PDMS sont nettoyées avec de l'acétone puis séchées à l'azote. Elles sont ensuite placées dans un plasma d'oxygène pendant trois minutes (puissance de 160 Watts et une pression en oxygène de 0,4 mbar). Après le traitement par plasma, les microcanaux de PDMS sont plongés pendant quinze minutes dans une solution de HCl 1M.

Le substrat est aussi recouvert de solution de HCl 1M sur une zone délimitée par un cadre de PDMS. Dans cette solution, les surfaces actives du PDMS sont acidifiées, ce qui entraine une hydrophilie plus pérenne de la surface et un greffage du PEO plus facile. Les quinze minutes passées, une étape de rinçage avec de l'eau désionisée est effectuée pour nettoyer les molécules d'acide libre.

L'étape de greffage du PEO est ensuite réalisée en utilisant la solution stock de PEO. Les étapes sont les mêmes que lors de l'utilisation de la solution de HCl 1M, avec un temps d'incubation de vingt minutes. Pour éviter toute évaporation de la solution de PEO, cette étape est réalisée dans des béchers fermés.

L'étape de greffage et de rinçage du PEO effectuée, les microcanaux et le substrat sont séchés par azote et placés dans un four à 50°C pendant quelques minutes pour évaporer l'eau restante. Le collage est réalisé tel qu'il est décrit dans le chapitre 3.

Enfin, les microcanaux sont mis au contact avec une solution de BSA 2% pendant vingt minutes afin qu'elle soit absorbée par les parois de PDMS. Pour empêcher toute évaporation, les entrées et sorties des microcanaux sont fermées. Une solution de PBS 1x est ensuite utilisée pour rincer les microcanaux du BSA non-absorbée.

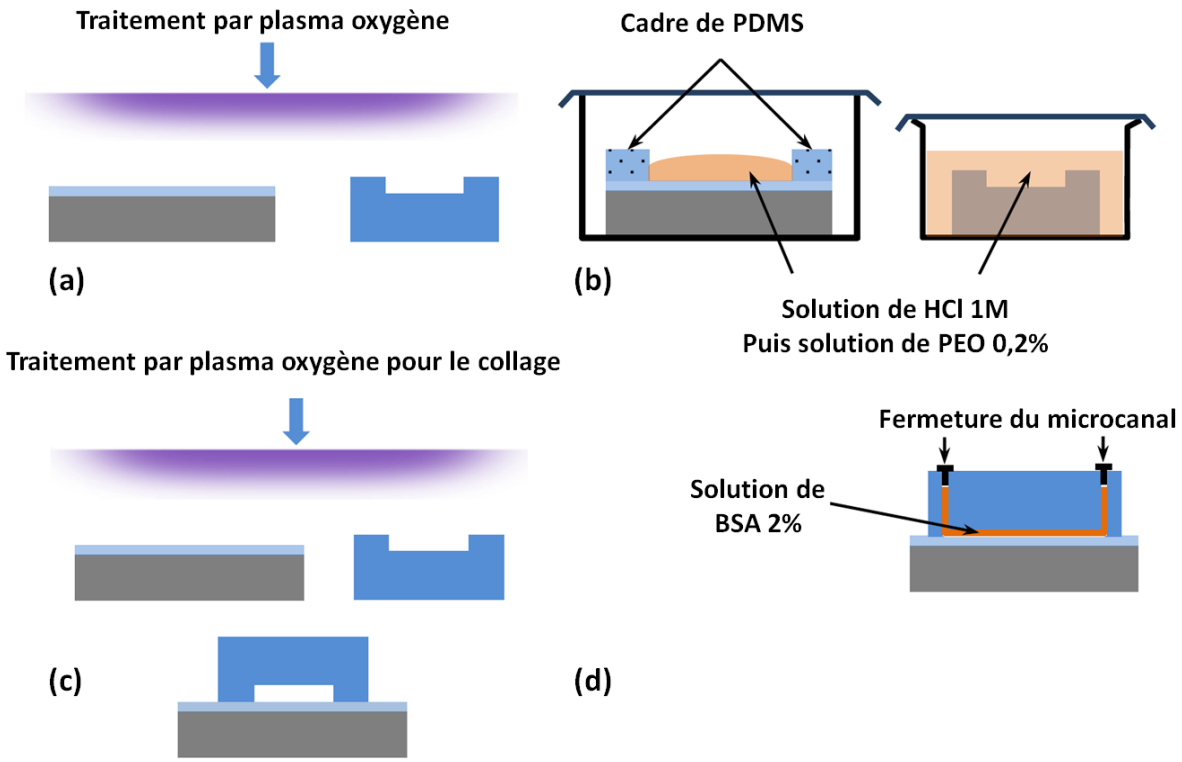


Figure 4.17 : Protocole de protection des canaux de PDMS par un procédé pleine plaque.

III - 2 - b - iii - Etude des surfaces de PDMS protégées par le PEO

◊ Caractérisation des surfaces par le microscope à force atomique

Des investigations au microscope à force atomique (AFM)ont été réalisées, lors de la thèse de Hong Ha Cao (Hong Ha 2016), afin d'évaluer le changement de topographie et l'homogénéité du revêtement de PEO sur la surface PDMS.

Dans le cas de la protection de PEO seul sur une surface PDMS, la topographie après la fixation du PEO a été modifiée de manière significative. La rugosité RMS est passée de 1,09 nm pour le PDMS natif à 0,74 nm pour la surface PDMS - PEO.

Dans le cas de la protection PEO/BSA sur une surface de PDMS, la rugosité plus élevée de la surface BSA / PEO / PDMS (RMS = 4,78 nm) comparée à la surface PDMS native (RMS = 1,09 nm) indique que la fixation de PEO et l'adsorption de BSA induisent une structure plus aérée de ces deux couches, probablement sans haute densité.

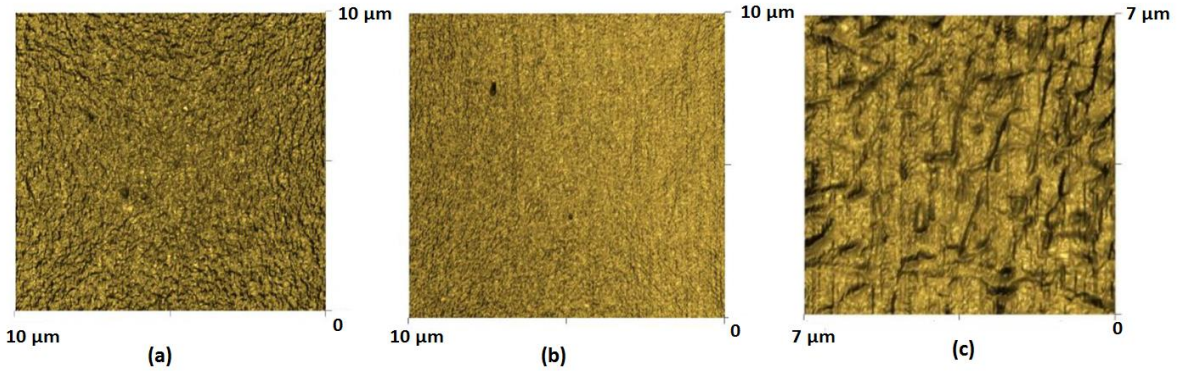


Figure 4.18 : Images par AFM de (a) la surface de PDMS, (b) la surface de PDMS après traitement PEO et (c) la surface de PDMS après traitement PEO et BSA.

◊ *Caractérisation des surfaces traitées par fluorescence*

Afin de confirmer la capacité d'anti-adsorption de la surface modifiée des éléments biologiques du PDMS, une solution d'anticorps fluorescents a été utilisée. Trois circuits fluidiques identiques en PDMS ont été préparés. Le circuit fluidique comprend un substrat de verre avec une couche de PDMS de 20 µm et un monocanal (500 µm de large, 50 µm de haut et 3,5 cm de long).

Le premier circuit est un échantillon témoin: l'étape de collage est réalisée sans traitement de surface PDMS (ni avec PEO ni avec BSA). Pour le deuxième circuit, le procédé de modification de surface PDMS présenté est réalisé pour la partie PEO. Pour le troisième circuit, le procédé de modification de surface PDMS présenté est réalisé dans sa totalité.

Une solution d'anticorps conjugués au fluorochrome Isothiocyanate de Fluorescéine ou FITC (10 µL de 1.5 mg/mL dans 100 µL de PBS) est ensuite injectée dans chaque circuit fluidique puis est incubée dans le canal pendant 2 heures à température ambiante. Le processus d'incubation est effectué dans un espace confiné et sans lumière afin d'empêcher le FITC d'interagir avec la lumière. Après 2 heures d'incubation, les trois circuits fluidiques sont lavés en injectant une solution PBS 1X à 0,5 µL / min de débit pendant dix minutes. Le processus de lavage est également effectué dans un espace confiné et sans lumière.

Les résultats de l'interaction de IgG-FITC-conjugué avec et sans traitement de surface sont montrés dans la Figure 4.19. Dans l'échantillon de contrôle, Figure 4.19.a, le FITC s'adsorbe fortement sur toute la surface du PDMS. Or après lavage on observe très peu de fluorescence. Le procédé de nettoyage supprime en partie la fluorescence donc une partie des anticorps de détection FITC présent à la surface du canal PDMS. Cependant, la fluorescence résiduelle observée montre que le lavage n'a pas permis d'éliminer totalement les IgG-FITC adsorbées. Cette adsorption des IgG va entraîner une altération des immunodosages. Un traitement de surface PEO et PEO-BSA permet de s'affranchir du problème. En effet, ils se greffent de manière non covalente sur la surface de manière aisée. De plus après lavage par PBS nous constatons une absence de fluorescence sur les surfaces de PDMS (Figure 4.19). Ceci montre que dans ces conditions expérimentales, ces prétraitements de surface par PEO (Figure 4.19.b) et PEO – BSA (Figure 4.19.c) préviennent l'adsorption des IgG-FITC sur le PDMS. A partir des résultats obtenus sur la protection des microcanaux de PDMS, le protocole utilisant combinaison PEO – BSA a montré son intérêt et pourra être appliqué ultérieurement aux circuits microfluidiques utilisés pour la réalisation d'immunodosage.

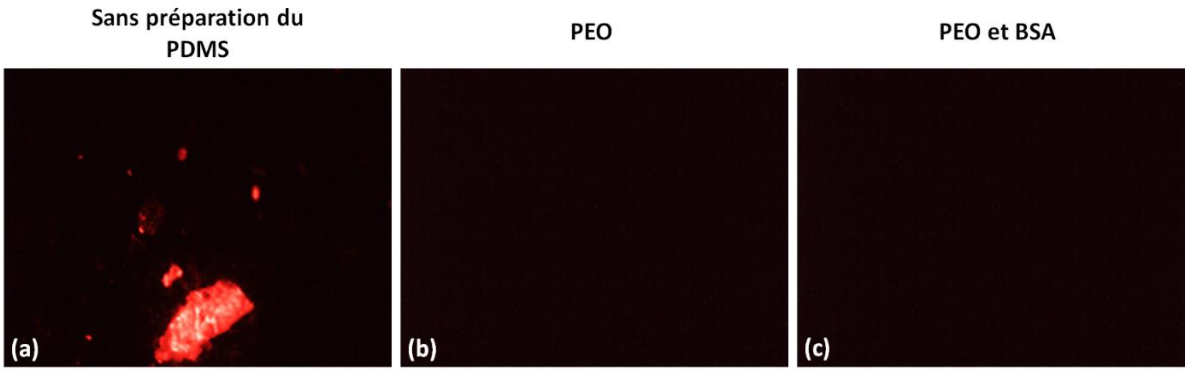


Figure 4.19 : Etude par fluorescence du protocole de protection du PDMS pleine plaque. (a) sans préparation (intensité de 1.1 N. A.), (b) avec de la solution de PEO (intensité de 0.16 N.A.) et (c) avec des solutions de PEO et BSA (intensité de 0.1 N.A.).

III- 2 - c - La protection du PDMS en conditions microfluidiques « passivation »

Ce paragraphe décrit le transfert en conditions microfluidiques du procédé validé sur des surfaces et décrit au paragraphe précédent.

III - 2 - c - i - Présentation du procédé en conditions microfluidiques

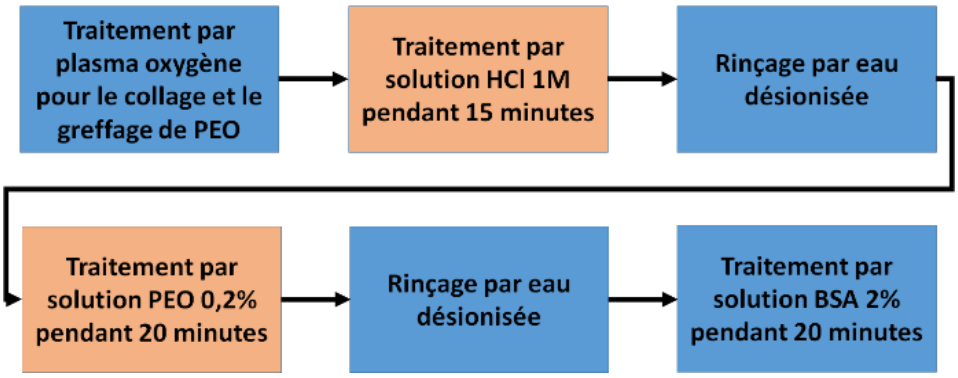


Figure 4.20 : Protocole de protection du PDMS par un procédé fluidique.

Premièrement, les surfaces du capot contenant les microcanaux et le substrat contenant la couche de PDMS sont nettoyées avec de l'acétone puis séchées à l'azote. Elles sont ensuite placées dans un plasma d'oxygène pendant une minute (puissance de 160 Watts et une pression en oxygène de 0,4 mbar). Ce traitement permet à la fois de réaliser l'étape de collage et d'activer la surface pour permettre une activation par solution HCl 1M plus facilement. Après le traitement par plasma, la solution de HCl 1M est injectée dans les microcanaux à une vitesse de 10 µL/min pendant quinze minutes. Dès que la solution de HCl est complétement injectée, une étape de rinçage avec une solution de PBS 1x est effectuée pour nettoyer les molécules d'acide libre.

L'étape de greffage du PEO est ensuite réalisée en utilisant la solution stock de PEO. Les étapes sont les mêmes que lors de l'utilisation de la solution de HCl 1M, avec un temps d'incubation de vingt minutes.

Enfin, les microcanaux sont mis au contact avec une solution de BSA 2% pendant vingt minutes afin qu'elle soit absorbée par les parois de PDMS. Pour empêcher toute évaporation les entrées et sorties des microcanaux sont fermées. Une solution de PBS 1x est ensuite utilisée pour rincer les microcanaux du BSA non-absorbée.

III - 2 - c - ii - Etude et caractérisation du procédé de protection des canaux en PDMS en conditions fluidiques

De la même manière que pour la protection pleine plaque, une solution d'anticorps fluorescents a été utilisée pour confirmer la capacité d'anti-adsorption de la surface modifiée du PDMS. Trois circuits fluidiques identiques en PDMS ont été préparés. Le circuit fluidique comprend un substrat de verre avec une couche de PDMS de 20 µm et un monocanal (500 µm de large, 50 µm de haut et 3,5 cm de long).

Le premier circuit est un échantillon témoin: il est réalisé sans le traitement de la surface de PDMS. Pour le deuxième circuit, le procédé de modification de surface PDMS présenté est réalisé pour la partie PEO. Pour le troisième circuit, le procédé de modification de surface PDMS présenté est réalisé dans sa totalité (c'est-à-dire PEO plus BSA).

Une solution d'anticorps conjuguée au FITC, (10 µL de 1.5 mg/mL dans 190 µL de PBS) est ensuite injectée dans chaque circuit fluidique puis est incubée dans le canal pendant 2 heures (soit un débit de 1.67 µL/min) à température ambiante. Le processus d'incubation est effectué dans un espace confiné et sans lumière afin d'empêcher le FITC d'interagir avec la lumière. Après 2 heures d'incubation, les trois circuits fluidiques sont lavés en injectant une solution PBS 1X à 0,5 µL / min de débit pendant dix minutes. Le processus de lavage est également effectué dans l'espace confiné et sans lumière.

Les résultats de l'interaction de IgG-FITC-conjugué avec et sans traitement de surface sont montrés dans la Figure 4.21. Dans l'échantillon de contrôle, Figure 4.21.a, le FITC s'adsorbe fortement (Intensité de sur toute la surface et en particulier sur les bords de la paroi du canal. Le procédé de nettoyage supprime une partie de FITC sur la surface du canal PDMS. Le FITC adsorbe toujours fortement sur les bords du canal.

La comparaison entre l'ajout ou non de la BSA (b) et (c) permet de montrer l'utilité de cette dernière dans la protection des microcanaux. La capacité de protection des microcanaux dans l'expérience avec la BSA est meilleure que celle sans BSA. Les résultats obtenus sur la protection des microcanaux de PDMS ont montré l'intérêt du protocole qui pourra être appliqué aux circuits microfluidiques utilisés pour la réalisation d'immunodosage.

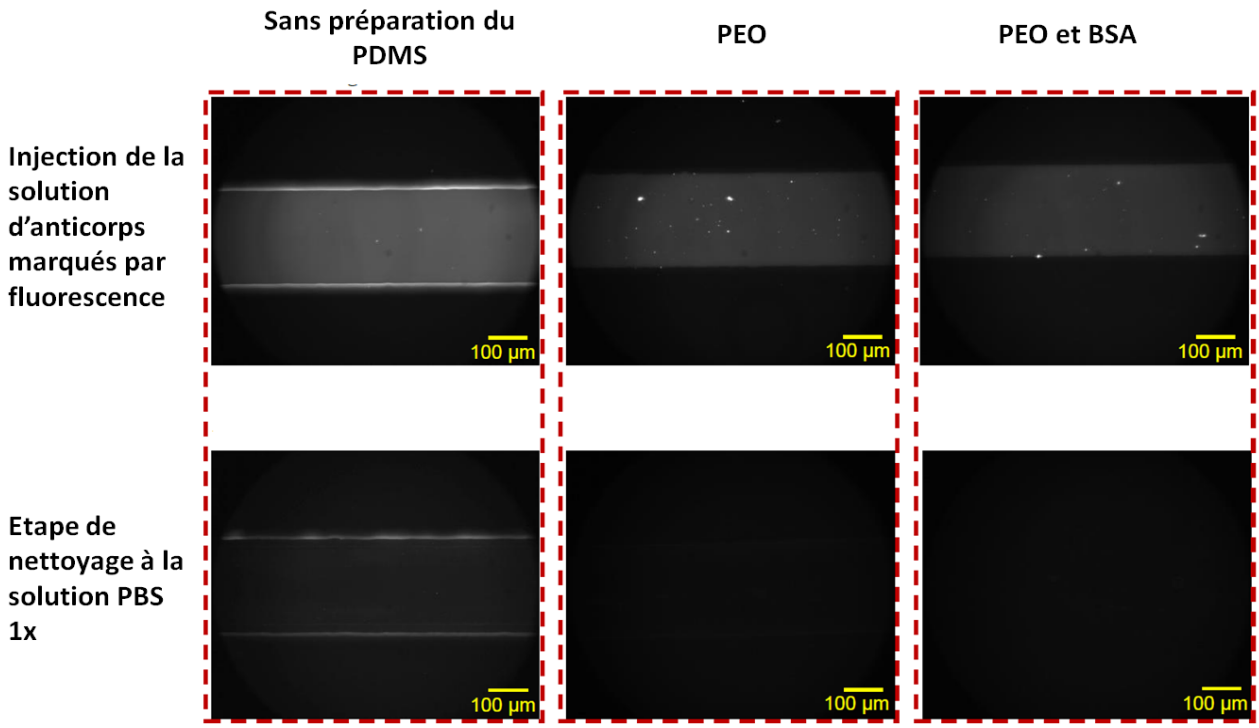


Figure 4.21 : Etude par fluorescence des canaux de PDMS en absence de la protection des canaux (intensité après nettoyage de 0.9 N.A.), après traitement par PEO (intensité après nettoyage de 0.13 N.A.) et après PEO et BSA (intensité après nettoyage de 0.08 N.A.).

III - 3 - Etude des dispositifs de capture en utilisant les nanoparticules magnétiques

Les problèmes liés à l'absorption non spécifique du PDMS étant résolus, les dispositifs fluidiques fabriqués dans le chapitre 3 peuvent être caractérisés. Lors de la manipulation de solution dans un dispositif fluidique, différentes contraintes peuvent apparaître. La première est la résistance du circuit fluidique à la pression. Cette dernière est plus ou moins importante selon le débit fluidique. Ainsi plus le débit est important, plus la pression du fluide sur les parois des canaux sera forte. Une autre contrainte est la résistance du circuit fluidique dans le temps. En effet, l'un des objectifs du projet AMMIB (II -) est de réaliser un dispositif réutilisable. Pour cela il doit pouvoir supporter des injections de solutions à un débit contrôlé pendant un temps suffisamment long.

III- 3 - a - Présentation de la plateforme microfluidique de test

Le montage fluidique (Figure 4.22) utilisé pour réaliser les expériences de contrôle des NPM se compose d'un pousse-seringue permettant de régler le débit du fluide, d'une seringue ou plus selon le nombre de solutions à injecter, du circuit fluidique réalisé en salle blanche, d'un bécher de récupération, d'un module Peltier, avec un contrôleur qui permet la régulation de la température et d'une caméra pour visualiser la circulation des NPM.

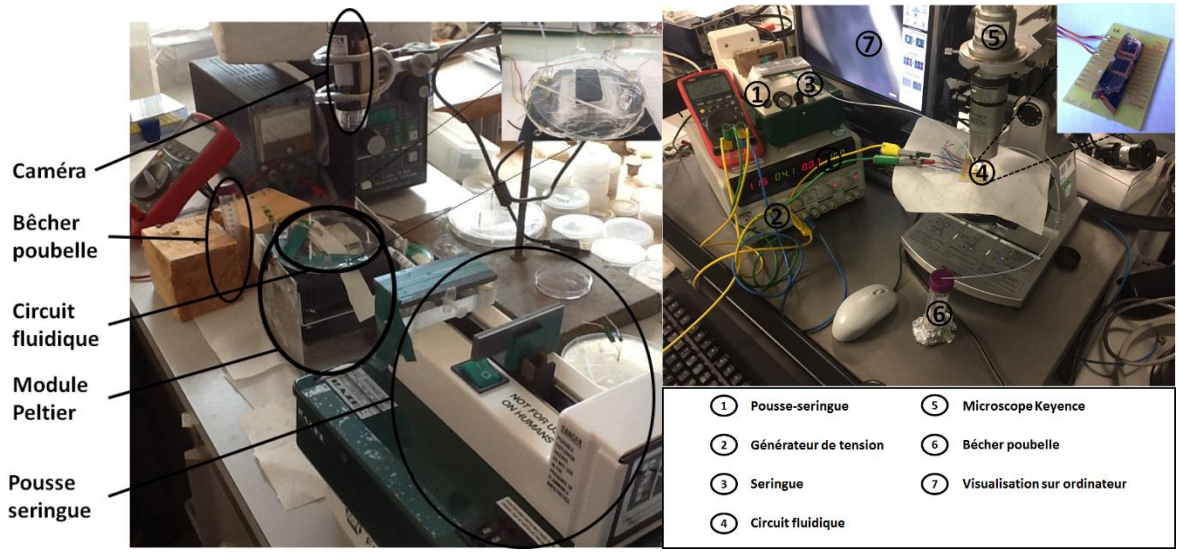


Figure 4.22 : Vue d'ensemble du montage fluidique utilisé pour la manipulation de NPM.

Selon le type d'expérience à réaliser, la caméra peut être remplacée par un microscope à fluorescence ou le microscope optique Keyence. Pour injecter le courant dans les microbobines une alimentation de laboratoire est utilisée.

III- 3 - b - Etude en pression et de l'endurance des dispositifs microfluidiques

Après la fabrication de tout circuit fluidique, ce dernier doit être testé avant de réaliser des expériences. Les premiers tests fluidiques à effectuer sont les tests de pression et d'endurance. Le but de ces tests est de déterminer si le collage résiste aux différentes pressions induites par les fluides et de savoir s'il est résistant sur de longues durées. Pour effectuer ces tests, de l'eau colorée est utilisée, ce qui permet d'observer facilement toute apparition de fuite.

Pour le test de pression ou robustesse sur temps court, le débit donné à la pousse seringue est augmenté progressivement, sans toutefois chercher à atteindre des débits largement supérieurs à ceux utilisés lors des expériences.

Pour la réalisation du test d'endurance robustesse sur temps long, un débit moyen (dans le cas de nos expériences) a été utilisé et ce débit est maintenu pendant une durée supérieure à une journée qui peut être considérée comme longue pour nos expériences.

Grâce à ces tests, il a été montré que les différents dispositifs créés supportent un débit suffisamment important : supérieur à 25 mL/h et de longues durées, supérieures à 6 heures pour certaines solutions et allant jusqu'à 24 heures pour d'autres.

Le circuit fluidique a donc été fabriqué (Chapitre 3), et prétraité par les solutions de PEO (concentration) et de BSA (concentration) (III - 2 -) et testé (III- 3 - b -), il peut être utilisé pour les différentes expériences. La première expérience utilisant les NPM porte sur l'étude de leurs comportements sous l'effet d'un champ magnétique crée par un aimant. Le débit utilisé pour les différentes expériences est de 10 µL/min.

III- 3 - c - Manipulation des nanoparticules magnétiques

L'élément le plus simple pour démontrer la capture de NPM dans un circuit fluidique est l'utilisation d'un aimant non intégré et un dispositif fluidique de géométrie simple (largeur de 500 µm, hauteur de 50 µm et longueur de 7 cm). Le but est de vérifier et de déterminer les conditions pour bloquer et diriger les NPM sous flux.

Diamètre	300 nm
Densité	2,0 g/cm³
Magnétisation à saturation	40 emu/g
Surface spécifique	15 m²/g
Contenu de fer – oxyde	70%
Densité des groupements COOH	> 350 µmol/g
Densité NPM	30 mg/mL

Tableau 4.16 : Présentation des caractéristiques de la solution des NPM de 300 nm de la société « AdemTech ».

Pour ce faire, une solution de NPM de 300 nm de la société « AdemTech » a été utilisée, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4.16. Une petite quantité (10 µL) de la solution stock est prélevée avant de la diluer à l'aide de la solution tampon PBS 1x. Il a été constaté qu'une dilution importante (par 100) est nécessaire afin de pouvoir observer correctement les flux de NPM et non une agglomération.

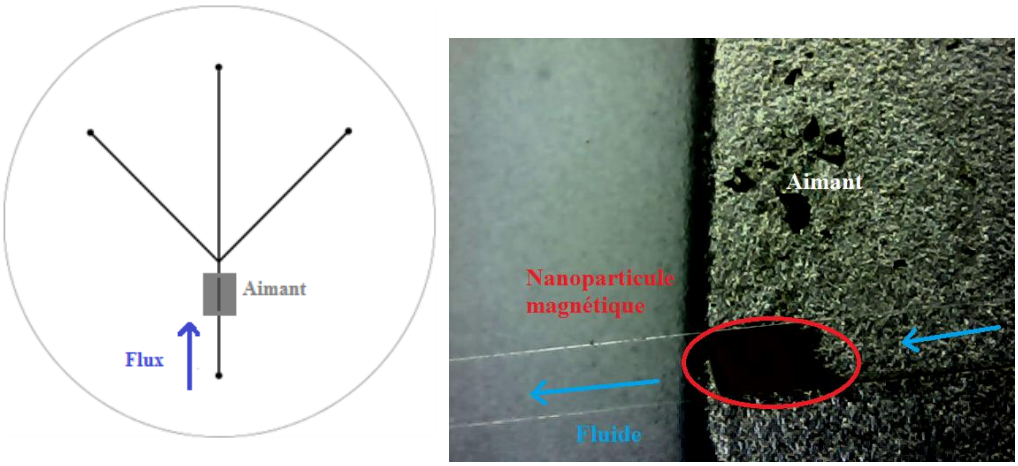


Figure 4.23 :(Gauche) Schéma d'un dispositif fluidique avec un aimant externe, (Droite) Image réalisée par microscopie optique, vue du dessus du dispositif microfluidique (500 µm de largeur et 50 µm d'épaisseur) au niveau de l'aimant, qui montre la capture des NPM.

Pour démontrer la possibilité de manipuler les NPM, différents tests ont été réalisés. Afin de montrer la reproductibilité des résultats, les expériences ont été réalisées de nombreuses fois (>5) dans différents circuits. Le premier test a consisté à bloquer puis re-larguer les NPM avec l'aimant permanent posé sous un des canaux, (Figure 4.23). L'aimant a été fixé sous le wafer afin d'être au plus près des NPM et pour permettre une visualisation simple à l'aide de la caméra. Démontrer la possibilité de contrôle des NPM est une validation nécessaire pour la réalisation des différentes étapes de l'immunodosage.

La deuxième expérience réalisée est la déviation des NPM lors d'un passage par une bifurcation microfluidique. La première étape a été d'observer les NPM se déplaçant au niveau de la bifurcation sans aimant. Il a été observé que ces dernières suivent principalement le courant principal qui ne comporte pas de virage. Avec l'ajout d'un aimant, soit à droite (aimant 1), soit à gauche (aimant 2) de la bifurcation, toutes les nanoparticules magnétiques sont attirées dans le canal le plus proche de l'aimant, Figure 4.24

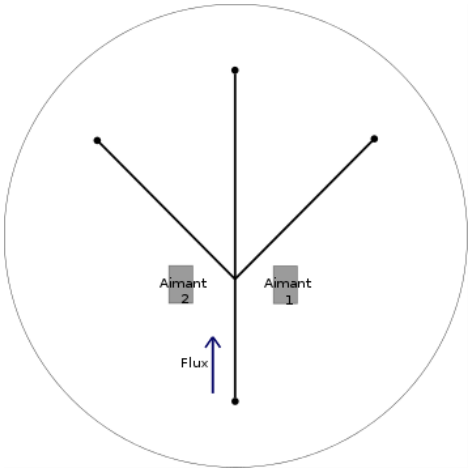


Figure 4.24: Schéma du dispositif avec le placement de l'aimant selon les expériences.

Ces expériences ont pu démontrer la possibilité d'orienter efficacement la direction des NPM à l'aide d'un aimant permanent dans le dispositif, Figure 4.25.Il est donc possible d'orienter les NPM une fois fonctionnalisées à travers le dispositif, si nécessaire.

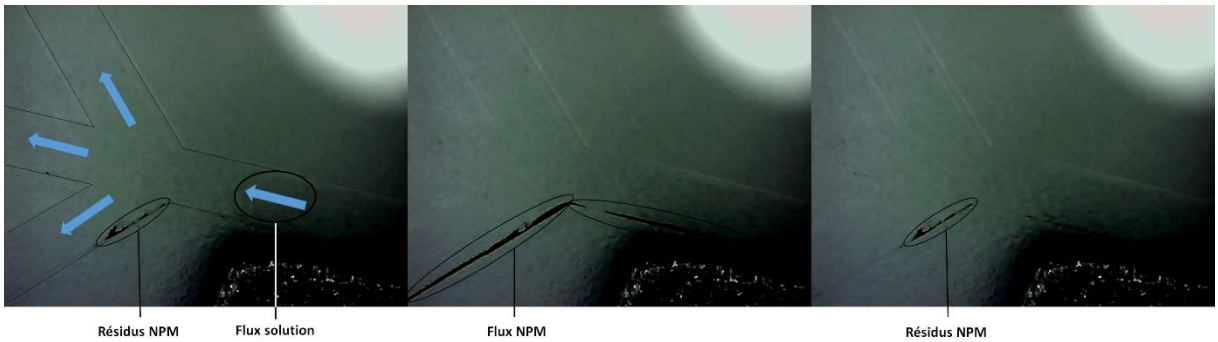


Figure 4.25 : Images de la vue du dessus du dispositif microfluidique au niveau de l'aimant, avant (1), pendant (2) et après (3) injection.

Les tests de manipulation ont démontré la possibilité d'un contrôle efficace sur les NPM. L'ajout des éléments biologiques est l'étape suivante dans la formation du complexe biologique et la réalisation d'un immunodosage.

III- 3 - d - Validation de la création d'un complexe d'immunodosage

Pour valider la réalisation du complexe d'immunodosage, et afin de comparer nos résultats à la littérature, la première étape est la réalisation du complexe en tube. De plus il est nécessaire de valider les différentes étapes du procédé avec les différents éléments biologiques choisis à l'aide d'une technique largement utilisée en biologie (méthode standard).

III - 3 - d - i - Protocole de la création d'un complexe d'immunodosage Développement d'un protocole pour la réalisation d'un immunodosage de type « sandwich »

Le protocole est décrit en détail dans l'annexe du chapitre 4, les grandes lignes sont présentées ici.

La première étape permet de rincer la solution de NPM des éléments permettant la stabilité et la non-agrégation des NPM. Pour l'étape de rinçage, le tube est placé contre une barre aimantée permettant de séparer les nanoparticules de la solution. Le temps nécessaire pour capturer l'ensemble des NPM présentes en solution dépend de la puissance de l'aimant et de la taille des nanoparticules. L'étape de rinçage est très importante et est réalisée après chaque étape pour permettre la suppression des éléments non utilisés pour le complexe biologique. L'étape suivante est le greffage des anticorps primaires sur les nanoparticules magnétiques avec des solutions d'EDC et de NHS. L'ensemble de ces solutions permet de créer un greffage entre le groupement carboxyle des NPM et le groupement amine des anticorps. Ensuite la solution de BSA 2%, décrite dans l'annexe X- 1 – b, est utilisée, pour permettre d'occuper les espaces laissés libres sur les NPM. Le but de cette étape est d'éviter les futures absorptions non-spécifiques. La quatrième étape est l'ajout d'ovalbumine. Cette étape est importante car c'est ici que l'on détermine la quantité de biomarqueurs à doser. Plus la concentration d'ovalbumine est faible, plus il est difficile de créer des complexes et plus la détection est sensible, et réciproquement. L'étape suivante est l'ajout de l'anticorps secondaire qui qui permet l'encapsulation de l'ovalbumine. La dernière étape est l'ajout de l'anticorps de détection. Un fluorochrome est présent sur cet anticorps. Le fluorochrome permet de réaliser une étude quantitative sur la formation de complexe biologique.

La Figure 4.26 reprend les différentes étapes et montre la formation du complexe biologique au cours des étapes.

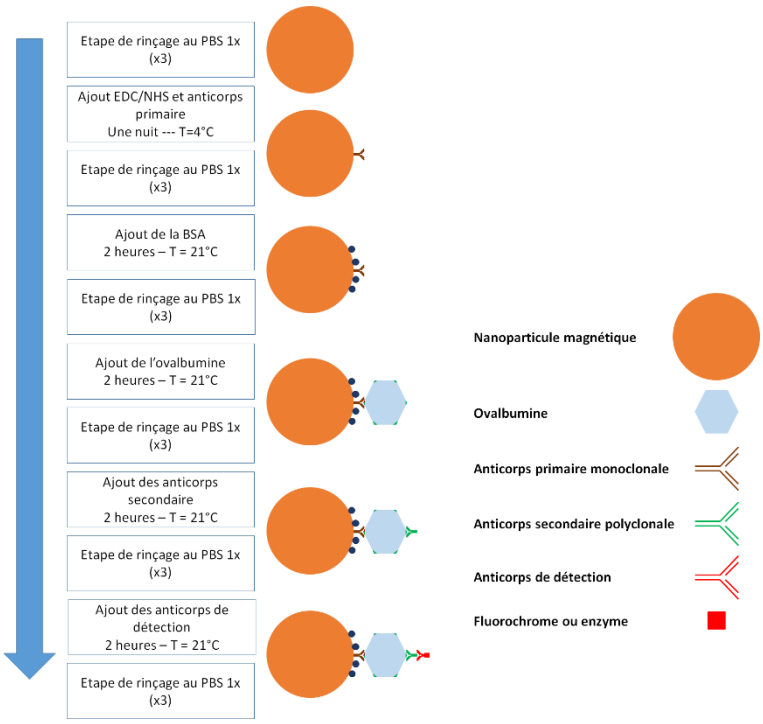


Figure 4.26 : Protocole de réalisation du complexe biologique en microtube.

III - 3 - d - ii - Traitement des images acquises au microscope à fluorescence

Pour valider la réalisation du complexe biologique, un microscope à fluorescence est utilisé. Dans le cas des microtubes, un volume de 10 µL de la solution est prélevé et déposé sur une lame transparente. Un couvre-lame est ajouté afin de protéger les objectifs de la solution. Plusieurs images (appelées par la suite « images expérimentales ») sont réalisées afin d'obtenir une statistique suffisamment représentative de l'échantillon.

Les images acquises sont ensuite traitées à l'aide d'un script de traitement d'images que j'ai développé dans le but de supprimer les bruits du au microscope, les valeurs d'intensité aberrantes, ou encore les agrégats de fluorescence.

Pour enlever le bruit de fond de l'image, dû au microscope ou à la caméra, une image de la lame de verre ou du dispositif « à vide » (en absence de tout élément biologique) est réalisée. Cette image est appelée « image de bruit de fond ». A chaque image réalisée pour étudier l'intensité dans le cadre de nos expériences (image expérimentale), l'intensité de l'image de « bruit de fond » est soustraite à l'image expérimentale.

Un seuil d'intensité est appliqué sur l'image traitée pour enlever les points aberrants résultants de la diffraction ou d'une surexposition de l'échantillon à la lumière blanche ou au laser.

Enfin il a été choisi de retirer les agrégats des images traitées, en réalisant un calcul d'intensité sur un nombre de pixel choisis. Si la valeur du calcul d'intensité est supérieure à une valeur seuil définie, alors le script supprime ce qui est considéré comme un agrégat de fluorescence. Le but de cette étape est de ne considérer que les complexes biologiques formés sur une NPM.

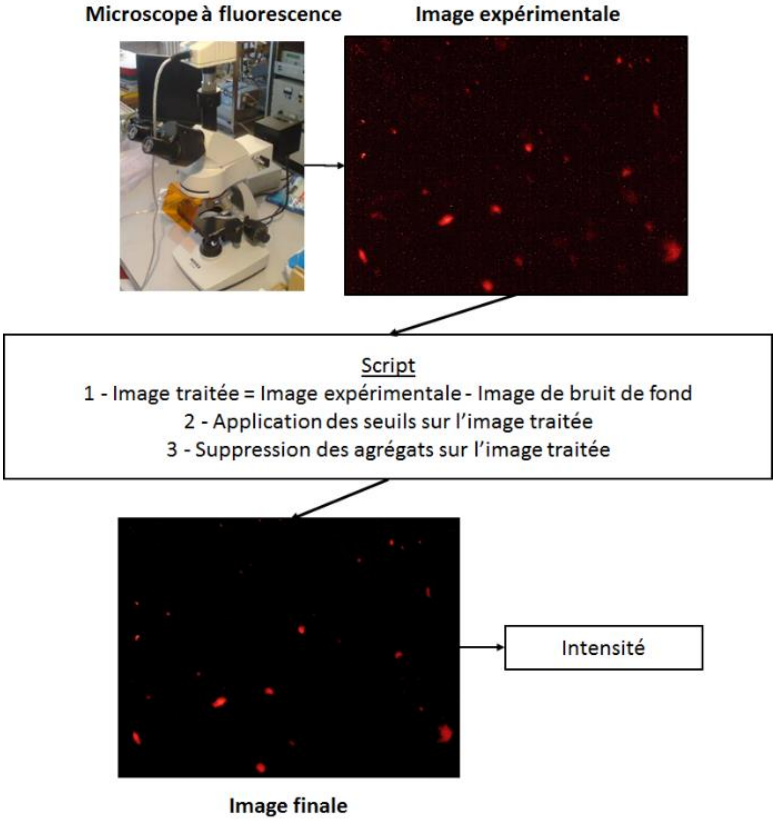


Figure 4.27: Protocole de traitement des images réalisées par microscopie à fluorescence.

III - 3 - d - iii - Réalisation d'expériences de contrôle du protocole d'immunodosage

Pour valider la formation du complexe biologique, il est important de réaliser des expériences dites de « contrôle ». Ces expériences permettent de contrôler la spécificité du complexe visé. La détection du complexe repose sur trois grandes étapes : l'ajout de l'anticorps primaire, la reconnaissance de la molécule cible et l'ajout de l'anticorps de détection. En retirant une de ces étapes du protocole de réalisation du complexe, ce dernier ne devrait pas se former. La formation du complexe indique un manque de spécificité entre les éléments le composant. Il n'est donc plus possible d'affirmer que la molécule cible est bien détectée.

Les expériences de contrôle ont été réalisées en circuit microfluidique avec un aimant externe (Figure 4.28) et en circuit microfluidique avec une microbobine intégrée (Figure 4.29).Les Figure 4.28.a et 4.29.a montrent les résultats lorsque le procédé de greffage est respecté.

La première expérience « contrôle » réalisée est de supprimer l'étape d'ajout de la solution d'ovalbumine, qui est notre molécule cible (Figure 4.28.c avec un aimant et Figure 4.29 avec une microbobine).

La seconde expérience est de supprimer l'étape de greffage de l'anticorps primaire (Figure 4.28.bavec un aimant et Figure 4.29.b avec une microbobine). La spécificité contrôlée ici est celle du greffage des anticorps primaires sur les NPM.

La dernière expérience est de supprimer l'étape d'ajout de l'anticorps de détection (Figure 4.28.davec un aimant et Figure 4.29.c avec une microbobine). Cette expérience permet de vérifier que les éléments biologiques n'interfèrent pas lors de la visualisation du complexe à l'aide d'un microscope à fluorescence.

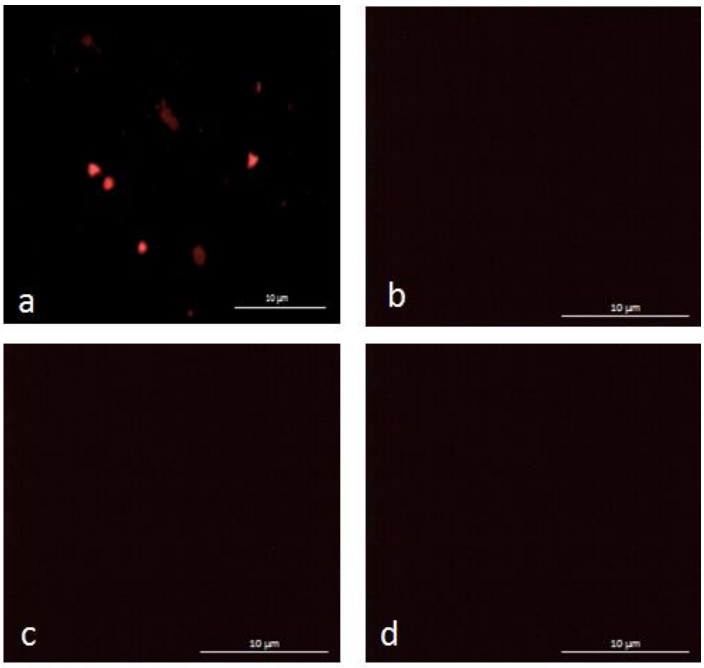


Figure 4.28 : Images réalisées en microscopie à fluorescence (a) lorsque le procédé de greffage est respecté (intensité de 0.7 N.A.). Protocole en absence de (b) l'étape de greffage d'anticorps primaires(intensité de 0.07 N.A.), (c) d'ovalbumine(intensité de 0.07 N.A.), (d)d'anticorps de détection(intensité de 0.05 N.A.), dans le cas d'un aimant externe.

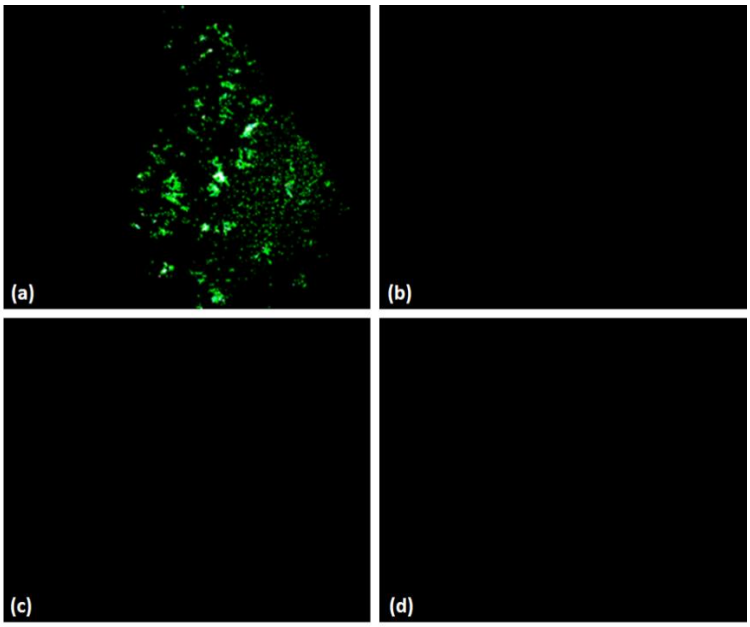


Figure 4.29 : Images réalisées en microscopie à fluorescence (a) lorsque le procédé de greffage est respecté (intensité de 1.1 N.A.). Protocole en absence de (b) l'étape de greffage d'anticorps primaires (intensité de 0.08 N.A.), (c) d'ovalbumine (intensité de 0.05 N.A.), (d) d'anticorps de détection (intensité de 0.06 N.A.) avec des microbobines intégrées.

Les différentes expériences de contrôles réalisées dans cette partie ont permis de montrer la spécificité de chaque étape dans le procédé de greffage du complexe biologique. Les résultats obtenus ont montrés la même spécificité pour le cas du circuit microfluidique avec un aimant externe et du circuit microfluidique avec une microbobine intégrée.

III- 3 - e - Influence du diamètre des nanoparticules magnétiques sur la détection en fluorescence

Un autre paramètre à étudier dans la formation du complexe biologique est l'influence du diamètre des NPM. La taille des NPM a un impact sur la surface spécifique, qui correspond à l'ensemble de la surface accessible des NPM, sur laquelle les anticorps primaires peuvent se greffer. De plus, il a été démontré dans le chapitre 2 que la force magnétique dépend du champ magnétique appliqué et des propriétés des NPM utilisées.

Un des intérêts quand on utilise des objets de dimension nanométrique est l'évolution du rapport surface sur volume $R_{S/V}$. L'hypothèse importante qui a été faite pour évaluer ce rapport est de considérer les NPM utilisées comme des sphères. En effet le volume d'une sphère (de rayon R), qui peut modéliser une nanoparticule, est donné par la formule **(4-1)** et la surface de cette même sphère est donnée par la formule **(4-2)**.

$$\boldsymbol{V_{sphère} = \frac{4\pi R^3}{3}} \qquad \textbf{(4-1)}$$

$$\boldsymbol{A_{sphère} = 4\pi R^2} \qquad \textbf{(4-2)}$$

On obtient donc un rapport surface sur volume proportionnel à l'inverse du rayon : $R_{S/V} = \frac{3}{R}$. Ainsi, plus la sphère est petite, plus son rapport surface sur volume est important, ce qui indique que l'on peut avoir accès à une surface plus grande pour un volume équivalent de solution stock de nanoparticules.

L'augmentation de la surface spécifique permet d'offrir une surface d'accueil plus importante pour le greffage des anticorps primaires sur les NPM et donc un nombre de complexes créés plus important.

Le rapport surface sur volume est étudié pour des nanoparticules allant d'un diamètre de 50 nm à 10 µm dans la Figure 4.30.

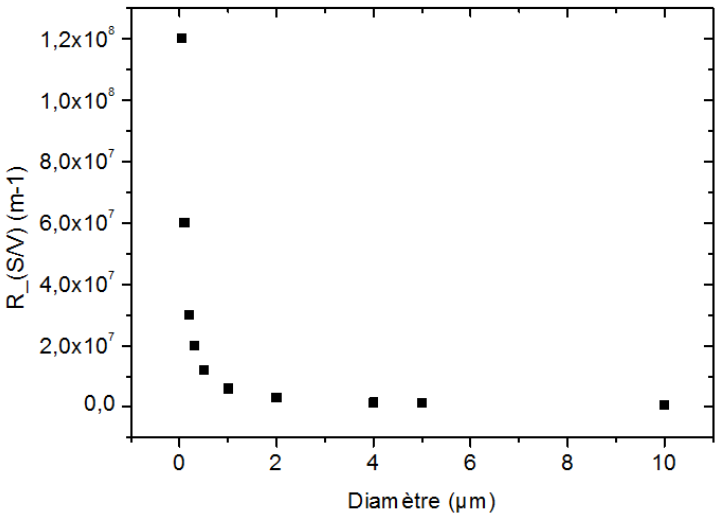


Figure 4.30 : Rapport surface sur volume en fonction du diamètre des NPM.

Afin de comparer l'influence de la taille des NPM, le protocole de réalisation des complexes biologiques a été suivi pour différentes tailles de NPM pour une concentration de NPM en solution de 10^9 NPM par mL. Pour chaque taille de NPM (200 nm, 300 nm, 500 nm) deux solutions sont nécessaires : une sans antigène qui servira de contrôle et une avec une concentration d'antigène de 1 mg/mL.

La première observation a été faite lors de la préparation des solutions : plus les nanoparticules sont petites plus elles mettent de temps à être immobilisées au niveau de l'aimant. De plus il semblerait que la perte en NPM soit plus importante lors des manipulations avec des NPM de tailles faibles (200 nm). Il est donc nécessaire de modifier les temps de capture en fonction des tailles de NPM utilisées.

Les résultats obtenus présentés dans la Figure 4.31, montrent une augmentation de l'intensité avec la diminution de la taille des nanoparticules. Cette augmentation semble un peu faible, ce qui est probablement dû à la perte de nanoparticules subie lors des différents lavages et mélanges pour les petites tailles. La réalisation de ces mêmes expériences en microfluidique avec un aimant de capture a donné des résultats assez similaires.

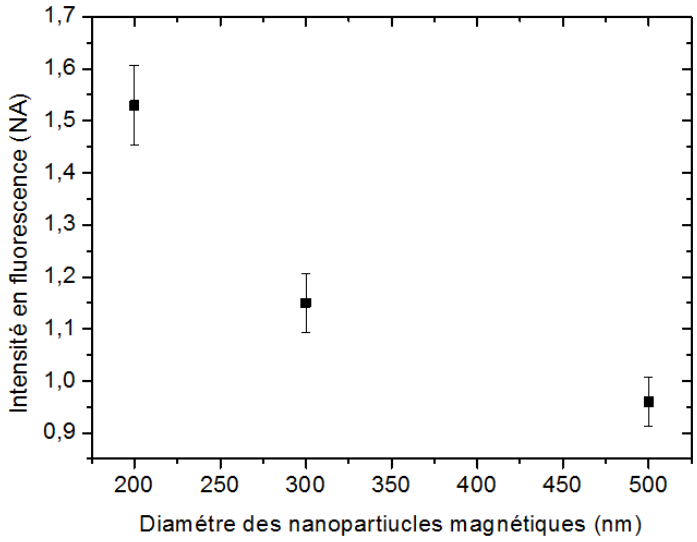


Figure 4.31: Variation de l'intensité de la réponse en fonction du diamètre des nanoparticules.

Les différentes expériences montrent une intensité plus importante lorsque le diamètre diminue, ce qui était attendu. Cependant comme il a été démontré dans le chapitre 2, pour capturer des NPM dans un fluide, il faut contrer la force de Drag par la force magnétique. Deux possibilités existent, ajuster soit la force fluidique (énergie cinétique du fluide) soit la force magnétique. Ce choix se fait en prenant en compte les différents éléments. Par exemple, dans le cas des circuits fluidiques ayant un aimant non intégré, la force magnétique définie par l'aimant est constante, il faut donc varier la force fluidique. Dans le cas des microbobines, la force magnétique peut varier en modifiant le courant tout comme la force fluidique quand le débit varie. Pour obtenir un champ magnétique suffisamment puissant pour contrôler des NPM de faible diamètre, il est nécessaire d'injecter un courant fort. L'augmentation du courant entraîne par effet Joule une augmentation de la température. Or, l'utilisation d'éléments biologiques dans le cadre du dispositif microfluidique nécessite un contrôle de la température en la maintenant en dessous de celle du corps humain (37°C). Par exemple, pour contrôler des NPM de 200 nm injectées à un débit de 20 µL/min, il est nécessaire d'utiliser un courant de 700 mA ce qui donne après un calcul approximatif une force magnétique de $1{,}215.10^{-13}$ N. La contrepartie de ce fort courant est une augmentation rapide de la température au-dessus de 40°C et une potentielle destruction des spires des microbobines.

Au vu des contraintes exposées et des bénéfices liés à la diminution du diamètre des NPM, il a été choisi d'utiliser les NPM de 300 nm pour la suite des expériences réalisées.

IV -Immunodosage dans les dispositifs microfluidiques

IV - 1 - Développement d'un immunodosage en conditions microfluidiques : application à la détection d'Ovalbumine.

Un des objectifs des immunodosages dans un circuit fluidique est de réduire le temps de réaction des différentes étapes. La première explication pour cet effet, est la réduction du volume du « dispositif ». En comparant le volume « utile » d'un microtube de 1,5 mL (V_{tube} = 1,5.10^{-6} m^3) à celui du plus grand circuit fluidique qui a été créé (50 µm de hauteur, 500 µm de largeur, et 7 cm de long soit $V_{fluidique}$ = 1,75.10^{-9} m^3), on observe une réduction du volume d'un facteur 1000. En réduisant le volume et pour une même concentration, les probabilités d'interactions entre deux particules vont augmenter. Ainsi, les réactions entre les différents éléments interviendront plus rapidement dans un circuit fluidique réduisant le temps de réaction. La deuxième explication est la réalisation d'un blocage permanent qui contrôle les NPM sur une zone précise.

La préparation des NPM est présentée dans l'annexe du chapitre 4. Les NPM étant nettoyées, un volume de la solution est prélevé et est injecté dans le circuit fluidique. A partir du moment où les NPM sont bloquées, la suite du protocole peut être réalisée.

Les solutions contenant un élément biologique ou chimique sont injectées à une vitesse de 10 µL par minute, ce qui nous permet d'injecter 300 µL en trente minutes. Le rinçage entre chaque étape peut être réalisé à un débit plus élevé en prenant en compte le blocage des NPM (la force fluidique ne doit pas dépasser la force magnétique).

Pour l'étape d'ajout de la solution d'anticorps de détection les précautions à prendre sont différentes. La manière la plus simple de protéger le circuit fluidique de la lumière à partir de cette étape est de réaliser l'ensemble du protocole dans une pièce obscure, en particulier à partir du moment où les anticorps de détection sont utilisés. Une autre façon est de construire une protection filtrant la lumière de la taille du dispositif et du pousse seringue et de la positionner avant la dernière étape.

Le deuxième point important est le contrôle de la température. Pour obtenir un protocole qui permet une comparaison entre les expériences en microtube et en circuit microfluidique, il est nécessaire de contrôler les températures. Pour contrôler la température au niveau du circuit microfluidique un module Peltier a été utilisé. Il permet de réaliser un refroidissement thermoélectrique à l'aide de l'effet Peltier. Le module Peltier permet donc de réguler la température au niveau du canal à l'aide d'un capteur de température préalablement implanté dans le PDMS, Figure 4.32.

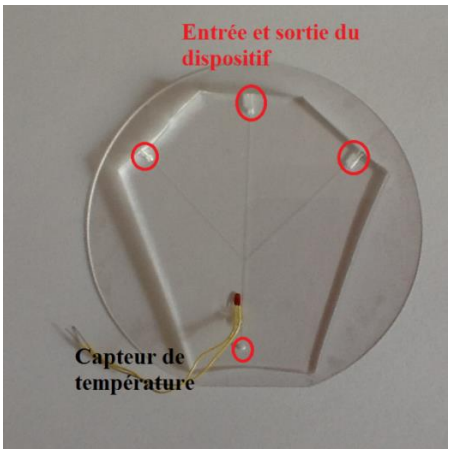


Figure 4.32 : Image d'un dispositif fluidique avec un capteur de température au plus près du canal.

La Figure 4.33 montre la différence des temps de réaction des protocoles en microtube et en microfluidique avec un aimant ou une microbobine. On observe une réduction de 17 heures grâce au passage dans un circuit fluidique par rapport au microtube.

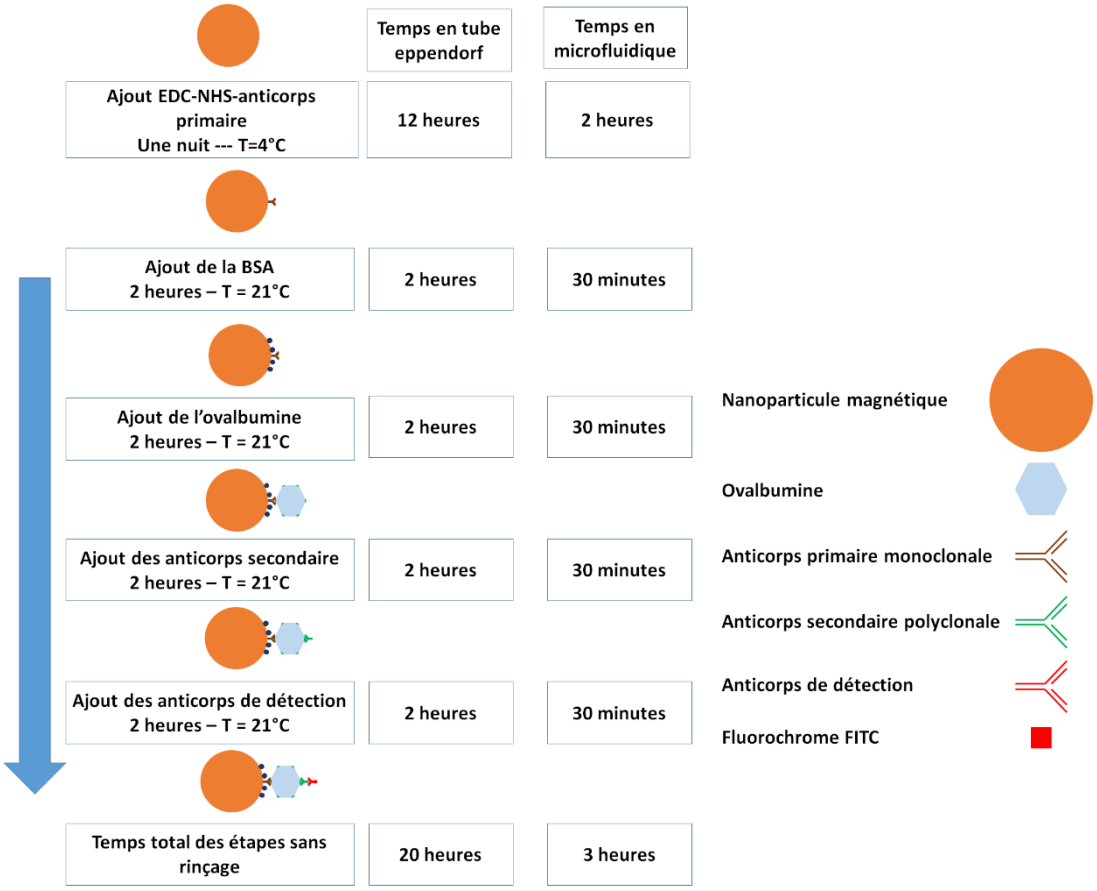


Figure 4.33: Comparaison des protocoles de réalisation du complexe biologique en microtube et en fluidique.

IV - 2 - Comparaison des immunodosages en microtube et en conditions fluidiques en utilisant un aimant permanent

Pour monter les avantages et les inconvénients des circuits fluidiques par rapport aux microtubes, une comparaison entre ces deux méthodes a été réalisée. Dans cet objectif, le moyen de comparaison quantitatif le plus évident est la limite de détection (L.D.D.) de l'expérience réalisée.

IV- 2 - a - Evaluation de l'immunodosage dédié à la détection de l'ovalbumine : Détermination de la limite de détection.

Pour caractériser la performance des deux méthodes, la « réponse » des immunodosages a été étudiée en fonction de la concentration d'ovalbumine. Ces résultats permettent d'extraire la L.D.D. du système étudié. La L.D.D. correspond à la valeur la plus basse en concentration détectable, c'est-à-dire la première valeur que l'on peut distinguer du bruit de l'expérience. La formule largement utilisée pour la limite de détection est (Mattarozzi et al. 2014; Neuilly 1998; Cucu et al. 2012):

$$\boldsymbol{L.D.D.} = \boldsymbol{I_0 + 3 * \sigma_D} \quad \textbf{(4-3)}$$

Avec σ_D : la déviation standard et I_0 : Intensité en présence d'une concentration nulle du marqueur cible.

IV- 2 - b - Immunodosage en microtube

Les immunodosages réalisés en en microtube ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans l'annexe du chapitre 4, en utilisant les NPM de 300 nm de chez Ademtech. Il a été choisi de faire varier la concentration d'ovalbumine de 0 à 15 µM. Les mesures ont été réalisées par fluorescence sur une lame de microscope.

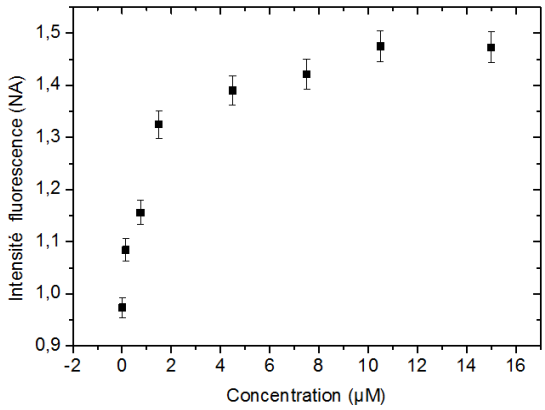


Figure 4.34 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'ovalbumine utilisant dans les microtubes avec des aimants permanents.

La courbe de la Figure 4.34 montre deux parties. La première va d'une concentration d'ovalbumine de 0 à 4 µM. Dans cette gamme de concentration la quantité de formation de complexe biologique à la surface des NPM est croissante, Figure 4.35. Elle permet de réaliser le calcul de la limite de détection. De 4 à 15 µM la quasi-totalité des sites de reconnaissance disponibles de l'ovalbumine sont occupés ce qui entraîne un effet plateau. Plus exactement un équilibre est atteint entre le nombre de complexes formés et le nombre de complexes qui se séparent. Le calcul de la limite de détection a permis de déterminer une valeur de L.D.D. de 1,2 nM pour cette expérience. La L.D.D. permet de

montrer que la sensibilité du protocole de capture de l'ovalbumine est dans la même gamme de valeur que celles trouvées dans la littérature.

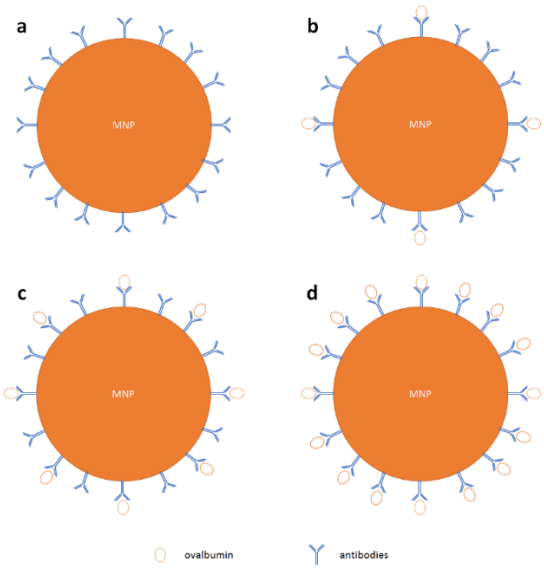


Figure 4.35: Progression de la quantité d'ovalbumine greffée à la surface des NPM pour (a) aucun site n'est occupé à (d) tous les sites sont occupés.

IV- 2 - c - Immunodosage en circuit microfluidique

Dans le cas du circuit microfluidique avec un aimant, le protocole de formation des complexes biologiques est celui décrit en IV – 1. Les mêmes concentrations d'ovalbumine ont été utilisées afin de pouvoir effectuer une comparaison. Tout comme pour la réalisation des complexes biologiques en tube du paragraphe précédent, la courbe de la Figure 4.36, montre deux parties. La première va d'une concentration d'ovalbumine de 0 à 4 µM. La deuxième partie de la courbe, correspondant au plateau, va d'une concentration de 4 à 15 µM. Le calcul de la limite de détection a permis de déterminer un L.D.D. de 0,3 nM.

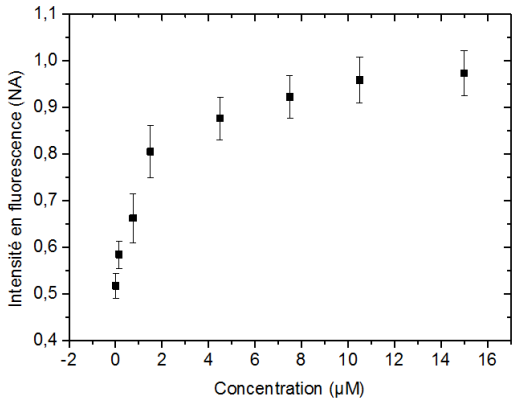


Figure 4.36: Intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'ovalbumine utilisant un circuit fluidique avec un aimant permanent externe.

IV- 2 - d - Conclusion de la comparaison des deux méthodes

La comparaison entre ces deux méthodes a mis en évidence plusieurs conclusions :

- Une optimisation du temps de manipulation a été obtenue, réduction de 17 heures en passant de l'expérience en microtube au circuit fluidique.
- L'évaluation des immunodosages par le calcul de la L.D.D. a permis de montrer l'avantage des expériences en circuit fluidique par rapport aux microtubes (La L.D.D. a été divisée par quatre entre les deux expériences).

Néanmoins des problèmes se posent lorsque les expériences sont réalisées en circuit fluidique avec un aimant permanent :

- L'aimant permanent n'est pas intégré.
- Il ne permet pas de contrôler le champ magnétique créé.
- Il ne peut pas être dimensionné en fonction de l'application visée.

C'est pourquoi, l'utilisation des microbobines permettant de contrôler l'injection de courant et donc le champ magnétique représente une alternative prometteuse. De plus, elles sont facilement intégrables et les étapes de simulation (Chapitre 2) et de microfabrication (Chapitre 3) permettent de les dimensionner en fonction de l'application visée.

IV - 3 - Comparaison des immunodosages en utilisant des microbobines centimétriques et millimétriques

IV- 3 - a - Le blocage des nanoparticules magnétiques par microbobine

Pour contrôler les NPM à l'aide de microbobines, il faut déterminer le courant nécessaire pour contrebalancer la force fluidique du flux injecté. Le courant injecté dans la microbobine et la température du canal peuvent être surveillés et contrôlés. Comme il a été énoncé précédemment, l'augmentation de la température due à l'effet Joule est proportionnelle au courant injecté. De plus le champ magnétique est proportionnel au courant injecté (Loi de Biot et Savart). Donc pour capturer les NPM il faut augmenter le courant injecté ce qui entraine une augmentation de la température.

L'objectif est de savoir à partir de quelle valeur de courant la température du canal devient trop haute pour les éléments biologiques (41°C). La conception des microbobines de capture dans le chapitre 2, a montré quels étaient les meilleurs paramètres pour contrôler l'augmentation de la température dans un premier temps, Figure 4.37.b. L'avantage des microbobines, qualifiées de millimétriques, simulées (Chapitre 2) et fabriquées (Chapitre 3) a été démontré lorsqu'elles sont comparées à des microbobines qualifiées de centimétriques (en raison de leurs dimensions externes) réalisées sur un seul niveau de microfabrication.

La Figure 4.38, présente le blocage des NPM de diamètre 300 nm pour des courants allant de 300 mA à 700 mA. Le débit du flux est de 5 µL par minute et la durée d'expérience est de 20 minutes.

Pour les microbobines centimétriques, la Figure 4.38.A montre que les NPM sont capturées en plus grand nombre avec l'augmentation du courant, de façon uniforme. Toutefois des mesures de températures ont été réalisées pour des courants de forte intensité (400 et 700 mA) et des températures supérieures à 37° (40°C et 45°C respectivement) ont été observées.

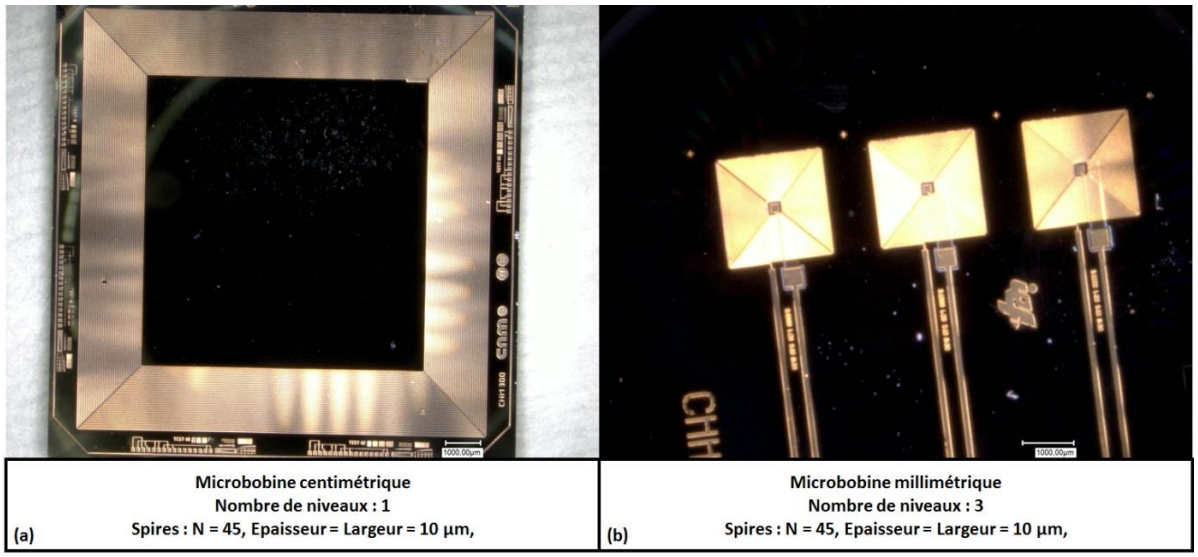


Figure 4.37 : Photographies des (a) microbobines centimétrique, (b) millimétriques.

Pour les microbobines millimétriques, la Figure 4.38.B montre les mêmes caractéristiques que les microbobines centimétriques, avec une préférence de capture sur les coins des spires. L'une des différences est que la capture des nanoparticules est plus facile à des courants faibles. Les températures mesurées montrent que les 37°C ne sont atteints que pour un courant de 500 mA. Il est important de noter que la température augmente faiblement tout au long des expériences lorsqu'un courant est injecté dans les microbobines.

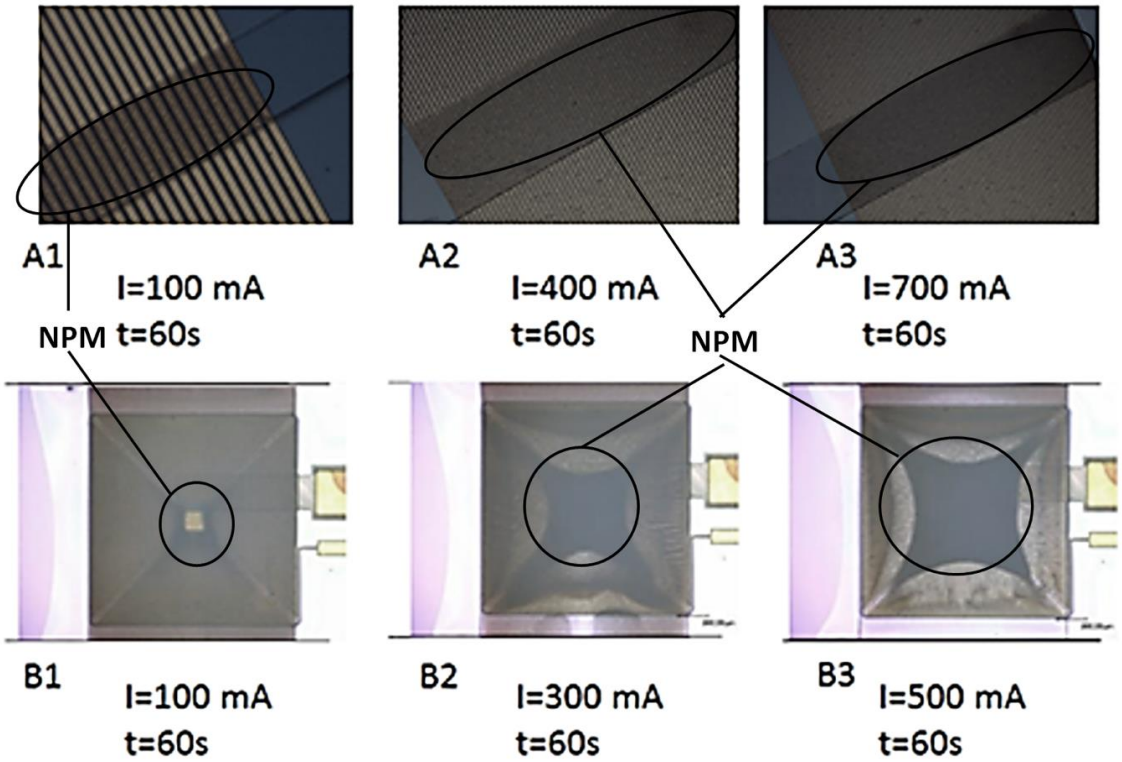


Figure 4.38: Résultats de la capture des NPM pour différents courants après une minute (A1,2&3) microbobines centimétriques, (B1,2&3) microbobines millimétriques.

Ces expériences ont permis d'étudier la capture des NPM à l'aide des deux types de microbobines utilisées. Dans le cas des microbobines centimétriques le courant nécessaire pour capturer les NPM entraine une évolution importante de la température. Pour limiter cet effet un module Peltier est utilisé ce qui permet de maintenir la température dans une gamme acceptable (<37°C) pour les éléments biologiques. Il est donc plus optimal d'utiliser les microbobines millimétriques dans le but de les utiliser dans un dispositif entièrement intégré.

IV- 3 - b - Etude de la cinétique de formation du complexe biologique utilisant les nanoparticules magnétiques

Lors de la formation du complexe biologique (Figure 4.39) il est intéressant d'étudier la cinétique de formation des complexes biologiques lors des expériences. Pour cela nous avons mesuré le temps d'occupation de tous les sites disponibles par les antigènes présents.

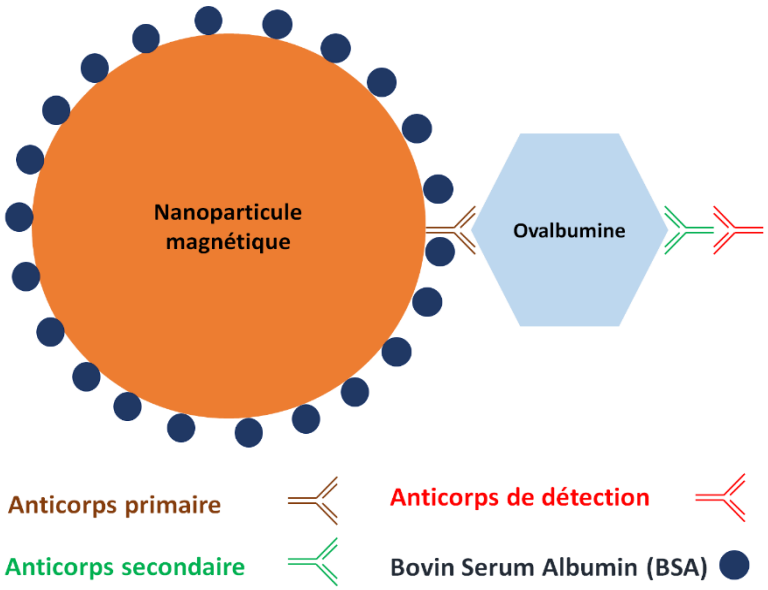


Figure 4.39 : Rappel de l'immunocomplexe biologique à base d'ovalbumine et de NPM.

Pour étudier cette cinétique, il faut réaliser les expériences d'immunodosage dans le circuit fluidique en faisant varier le temps de présence d'ovalbumine au contact des NPM. Pour cela, il faut fixer un débit constant (10 µL) et faire varier le temps d'injection de la solution d'ovalbumine. Ces expériences ont été réalisées sur les deux types de microbobines afin d'obtenir les meilleures conditions de formation des complexes biologiques dans chacun des cas. Pour ces expériences une concentration d'ovalbumine de 1,5 µM de référence a été choisie. Cette concentration a été déterminée par une expérience qui a permis d'évaluer un niveau de réponse en fluorescence dans le canal suffisante suite à la formation des complexes de détection d'ovalbumine.

IV - 3 - b - ii - Microbobines centimétriques : cinétique de formation du complexe biologique

Dans le cas des microbobines centimétriques, la courbe présentée en Figure 4.40, présente deux parties caractéristiques : la première allant de 0 à 60 minutes correspond au début de la formation du complexe biologique. L'ovalbumine n'a pas assez de temps pour occuper tous les sites disponibles. La

deuxième partie allant de 60 à 120 minutes correspond à un plateau où la plupart des sites présents sont occupés par l'ovalbumine et la dynamique de formation devient très lente.

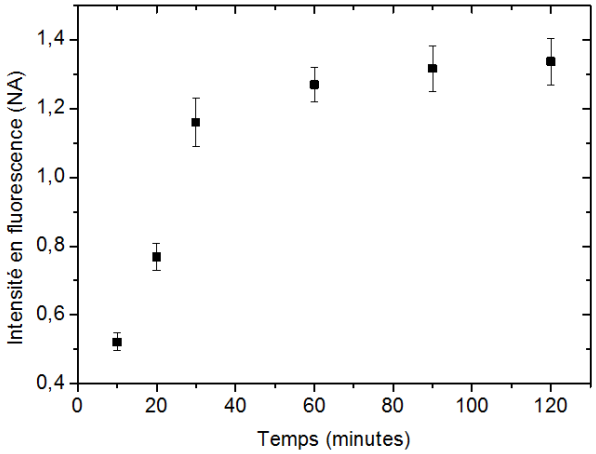


Figure 4.40 : Intensité en fluorescence en fonction du temps de réaction de l'ovalbumine dans les dispositifs de contrôle de NPM utilisant des microbobines centimétriques.

IV - 3 - b - iii - Microbobines millimétriques : cinétique de formation du complexe biologique

Dans le cas des microbobines millimétriques, la courbe présentée en Figure 4.41, présente le même comportement. La première phase va de 0 à 80 minutes et la seconde phase va de 80 à 120 minutes.

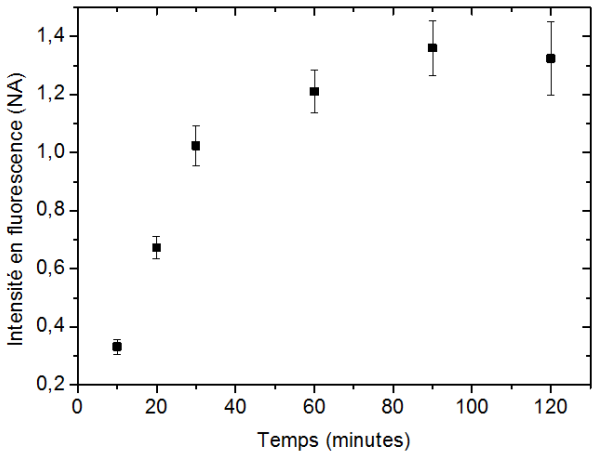


Figure 4.41 : Intensité en fluorescence en fonction du temps de réaction de l'ovalbumine dans les dispositifs de contrôle de NPM utilisant des microbobines millimétriques.

Ces expériences permettent de déterminer le temps minimum nécessaire pour atteindre la phase de plateau où la plupart des complexes biologiques sont créés. L'ovalbumine est donc présente sur l'ensemble des sites, la dynamique de formation des complexes diminue et environ 90% de la fluorescence est atteinte. Il a été choisi comme temps d'incubation pour l'ovalbumine 60 et 80 minutes respectivement pour les microbobines centimétriques et millimétriques.

La cinétique de formation a permis de déterminer le temps d'incubation le plus intéressant pour nos expériences pour chacun des types de microbobines. L'étude de la variation de la concentration de l'ovalbumine pour déterminer la limite de détection permet de comparer quantitativement les deux types de microbobines.

IV- 3 - c - Etude de la limite de détection des dispositifs intégrant des microbobines de contrôle

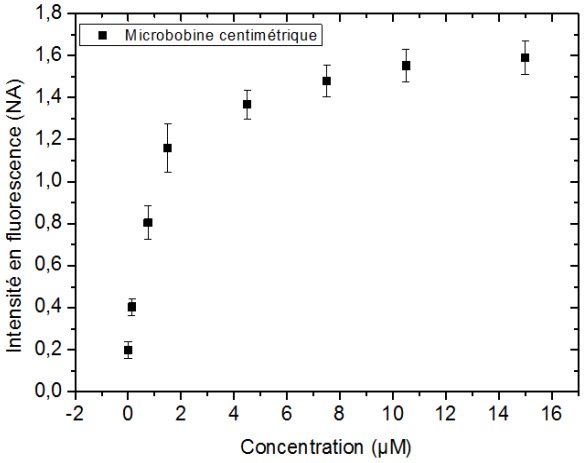


Figure 4.42 : Intensité en fluorescence en fonction de la concentration d'ovalbumine dans les dispositifs de contrôle de NPM utilisant des microbobines centimétriques.

Dans le but d'évaluer la sensibilité de détection des dispositifs intégrant des microbobines de contrôle des NPM, il est nécessaire de faire varier la concentration d'ovalbumine. Tout comme en IV – 3, la limite de détection va être calculée à partir de ces expériences.

L'immunodosage a été réalisé comme décrit en IV – 2, et nous avons fait varier les concentrations les concentrations d'ovalbumine de 0 à 15 µM. Dans le cas des microbobines centimétriques, les résultats sont présentés en Figure 4.43. Comme pour l'étude avec les aimants, la courbe présente deux parties. Dans la première allant de 0 à 6 µM l'ensemble des molécules d'ovalbumine présentes dans la solution occupe progressivement les sites de reconnaissance de l'ovalbumine. Dans la seconde partie allant de 6 à 15 µM, un plateau apparaît ce qui correspond au moment où tous les sites de reconnaissance de l'ovalbumine sont occupés. La dynamique de formation de complexes s'en retrouve fortement diminuée. La partie linéaire de la courbe obtenue à l'aide des microbobines millimétriques présente une pente plus « importante » caractéristique d'une meilleure détection de l'ovalbumine. Ceci est vérifié avec le calcul de la L.D.D. dans les deux cas, elle est de 0,2 nM pour les microbobines centimétriques et de 0,09 nM pour les microbobines millimétriques.

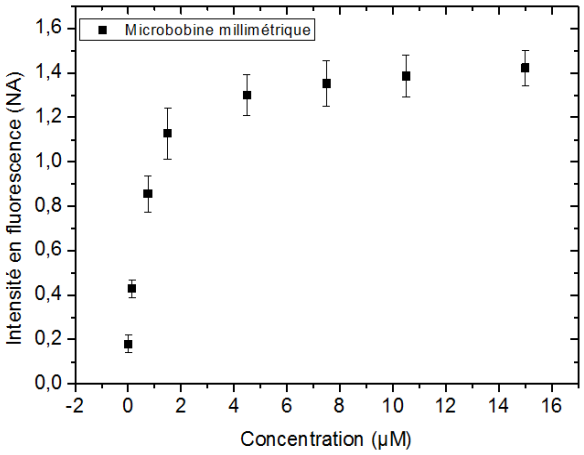


Figure 4.43: Intensité en fluorescence en fonction de la concentration d'ovalbumine dans les dispositifs de contrôle de NPM utilisant des microbobines millimétriques.

IV - 4 - Discussion des résultats obtenus du contrôle des nanoparticules magnétiques

En comparant les différents résultats obtenus au cours de cette partie, des tests d'immunodosage, plusieurs conclusions peuvent en être tirées.

L'utilité de la microfluidique a été démontrée par rapport aux tests réalisés en microtubes. Tout d'abord le temps de réalisation des expériences diminue fortement avec un gain de plusieurs heures dans le cas de la microfluidique. De plus, une limite de détection plus basse est atteinte, ce qui est très intéressant dans notre but d'aller vers un dispositif complètement intégré, transportable et sensible.

L'intégration de microbobines a permis de s'affranchir de l'usage d'un aimant permanent et de contrôler le champ magnétique en injectant du courant de façon contrôlée. La microbobine de contrôle qui a été simulée dans le chapitre 2 et fabriquée dans le chapitre 3 et dont les dimensions externes sont de l'ordre du millimètre a été comparée à une microbobine dont les dimensions externes sont de l'ordre du centimètre. L'étude de la cinétique de réaction du complexe biologique a été réalisée pour les deux types de microbobines afin de déterminer le temps idéal pour la reconnaissance de l'ovalbumine par les anticorps primaires.

La sensibilité des dispositifs intégrant les microbobines a été calculée à l'aide de la limite de détection en fluorescence. Dans le cas des microbobines centimétriques une limite de détection de 0,2 nM a été évaluée et pour les microbobines millimétriques une limite de détection de 0,09 nM. En plus d'améliorer cette caractéristique, le dimensionnement des microbobines millimétriques a permis d'obtenir un meilleur contrôle de la température lors de l'échauffement induit par l'effet Joule dans les spires.

La miniaturisation des microbobines permet une meilleure intégration, plus de zones de contrôle des NPM et pourra permettre une agitation magnétique par l'association de plusieurs microbobines (capture et relâchement des NPM).

V - Application à la capture de bactéries « E. Coli »

Comme énoncé dans la partie II -, le projet dont fait partie cette thèse a pour but de détecter des bactéries pathogènes. Une première approche utilisant des bactéries non-pathogènes a été réalisée avec l'aide du Dr. C. Galland, microbiologiste, lors de son post-doctorat dans notre équipe.

V - 1 - Réalisation du complexe « bactérie – nanoparticules magnétiques »

V- 1 - a - Présentation des produits utilisés

Pour réaliser le complexe « bactérie – NPM », il n'est pas possible d'utiliser des bactéries pathogènes sans autorisation et équipements adaptés. C'est pourquoi il a été décidé de travailler sur une bactérie non pathogène l'Escherichia Coli (E. Coli).

V - 1 - a - i - Bactéries E. Coli

Les bactéries E. Coli sont des bactéries connues et facilement manipulables. Escherichia coli (E. coli) est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches de E. coli sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches de E. coli dites entérohémorragiques (https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli).

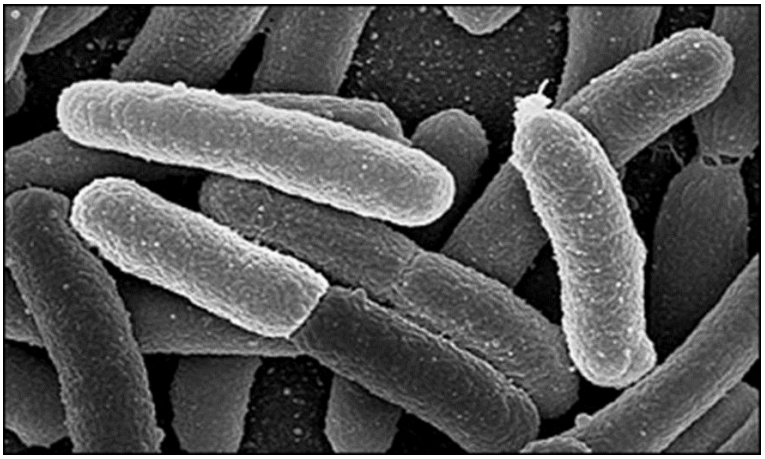


Figure 4.44 : Image au microscope électronique à balayage d'E. Coli (https://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=111019).

Dans notre cas, la souche choisie est la bactérie E. Coli K12. Elle peut être développée en solution ou en boîte de Pétri. Pour permettre sa détection par fluorescence un plasmide de GFP (Green Fluorescence Protein) lui a été injecté. De plus afin de favoriser la croissance de la bactérie contenant la GFP, un gène permettant la résistance à l'érythromycine (antibactérienne) a été ajouté.

Pour finir des anticorps anti E. Coli sont utilisés, ils permettent la reconnaissance spécifique des bactéries E. Coli.

V - 1 - a - ii - Choix des nanoparticules magnétiques pour les complexes à base de bactéries

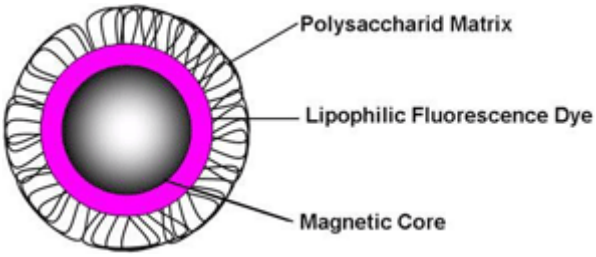


Figure 4.45 : Représentation schématique des NPM fluorescente http://www.chemicell.com/home/index.html.

Deux types de NPM ont été choisis. Le premier correspond aux NPM utilisées précédemment : les NPM Ademtech© de 200, 300 et 500 nm de diamètre. Le second correspond à des NPM de Chemicell© de 200 et 500 nm de diamètre (Figure 4.45). Ces dernières ont la particularité d'avoir des propriétés fluorescentes (Tableau 4.17), ce qui permet une détection des bactéries non transformées par la GFP.

	Vert	**Rouge**
Pic d'excitation	476 nm	490 nm
Pic d'émission maximale	578 nm	613 nm

Tableau 4.17: Caractéristiques des NPM fluorescentes utilisées pour la détection de bactéries.

V- 1 - b - Protocole de capture des bactéries par des nanoparticules magnétiques

V - 1 - b - i - Préparation des nanoparticules magnétiques

Le protocole de préparation des NPM est basé sur celui de Merck Millipore©. Les grandes lignes sont présentées ci-dessous et tous les détails sont présents dans l'annexe du chapitre 4.

Le principe de préparation des NPM est le même que celui présenté en III - 3 - d - i -. On y retrouve les étapes de nettoyage de la solution de NPM et de la préparation des solutions de EDC/NHS. La différence réside dans le changement de solution « buffer » qui est plus adaptée pour la manipulation de bactérie. Ainsi la solution tampon de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) à pH = 6,2 est préférée à la solution de PBS x1.

V - 1 - b - ii - Préparation des bactéries E. Coli

Les souches de bactéries sont gardées dans un congélateur à -80°C puis sorties lors de leur utilisation. Une fois décongelées, de nombreux cycles de préparation peuvent être réalisés. Le milieu de culture utilisé pour la préparation des bactéries E. Coli est le milieu Lysogeny Brothou Luria Bertani (Sezonov et al. 2007). Il s'agit d'un milieu de culture contenant les nutriments nécessaires au développement des bactéries.

Les bactéries sont mélangées dans la solution du milieu de culture pendant une nuit sur une roue, à une vitesse de 200 tours/min à une température de 37°C. Des tubes de 15 ou 50 mL peuvent être

utilisés. Le temps de réaction écoulé, 50 µL de la solution sont dilués dans 5 mL de solution du milieu permettant une dilution de la quantité de bactérie.

La dilution étant effectuée, le mélange avec les NPM préparées peut être réalisé. Le complexe « bactérie – NPM » est présenté en Figure 4.46. La taille des bactéries E. Coli pouvant aller jusqu'à quelques microns, l'hypothèse est que plusieurs NPM (500 nm) viendront entourer la bactérie.

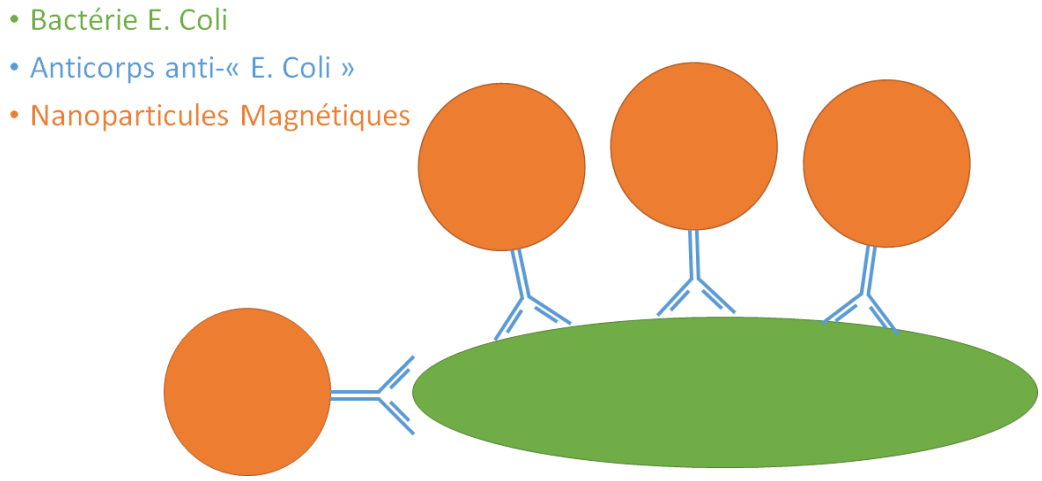


Figure 4.46 : Schéma du complexe « bactérie – NPM ».

V - 1 - b - iii - Techniques de dénombrement des bactéries

Pour connaitre le nombre de bactéries en solution, on peut les compter en milieu liquide ou solide.

♦ *Dénombrement en milieu liquide*

La seule manière de savoir si un micro-organisme est présent ou non dans l'inoculum par les techniques en milieu liquide sera de le mettre en évidence par un de ses caractères (par exemple : trouble et production de gaz en BLBVB). Un tube stérile est ensemencé par un volume d'inoculum (produit pur ou dilution). Après incubation, si le caractère recherché est apparu (trouble, virage, gaz) le résultat est positif. Dans le cas contraire, il est négatif.

♦ *Dénombrement en milieu solide*

Les bactéries à dénombrer présentent dans l'inoculum sont introduites soit à la surface, soit dans la masse d'un milieu gélosé. Chaque bactérie isolée donne naissance à une colonie ou UFC pour « unité formant colonie ». En effet, plusieurs bactéries peuvent être à l'origine de la formation d'une seule colonie qui ne peut plus être qualifiée de colonie (pas de clone) mais alors d'UFC.

La première étape est de couler dans une boîte de Pétri, de la gélose. Puis avec une pipette stérile une quantité de solution à dénombrer est prélevée. Si plusieurs solutions sont réalisées on peut soit utiliser plusieurs pipette stériles, soit en utiliser une seule mais en réalisant le prélèvement de la solution la plus concentrée vers la moins concentrée. Ensuite la solution est étalée sur la gélose à l'aide d'un étaleur stérile afin d'homogénéiser le dépôt. Enfin la boîte de Pétri est mise dans une étuve pour incubation (à 37°C) pour le développement des bactéries.

Pour dénombrer les colonies de bactéries, on utilise un microscope optique à lumière blanche et on compte le nombre de colonies présentes dans la boîte. En fonction de la dilution un facteur

multiplicatif sera appliqué au résultat du dénombrement pour obtenir le nombre de colonies présentes en solution.

Dans nos expériences, nous avons utilisé le dénombrement en milieu solide.

V - 2 - Étude du complexe « bactérie – nanoparticules »

V- 2 - a -Etude de l'agitation des éléments par ultrason

L'utilisation des NPM en solution et en microfluidique entraine la formation d'agrégats. Dans l'objectif d'obtenir une meilleure limite de détection, la désagrégation des NPM permettra d'obtenir une plus grande surface utile. Pour nous avons employé l'utilisation contrôlée d'ultrasons ou sonication.

V - 2 - a - i - Présentation de l'homogénéiseur à ultrasons

Les ultrasons sont produits par un équipement de Fisher Scientific (Figure 4.47). Les caractéristiques sont les suivantes : une puissance maximale de 500 Watts, un mode pulsé de 1 à 59 secondes, un caisson d'insonorisation, un affichage de la puissance et de la température en temps réel. Une option a été ajoutée : la sonde cup-horn de 14 cm pour accueillir un récipient dans lequel les microtubes sont entreposés. L'homogénéiseur à ultrasons est programmable et permet d'enregistrer et de modifier les séquences choisies.

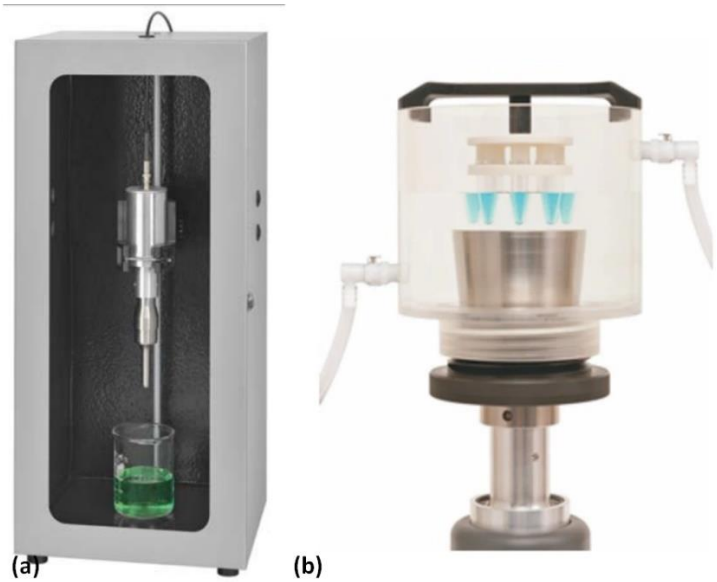


Figure 4.47 : Photographie de (a) l'homogénéiseur à ultrasons modèle 505 de chez Fisher Scientific, (b) du cup-horn de 14 cm permettant d'accueillir les microtubes.

V - 2 - a - ii - Effets des ultrasons sur les NPM et les complexes à base de bactéries

Pour caractériser l'apport de l'agitation par ultrason dans le protocole de capture des bactéries, il est nécessaire d'observer les effets des ultrasons sur chaque élément (bactérie, NPM et anticorps).

◊ *Effets des ultrasons sur les nanoparticules magnétiques*

La première étape a été de déterminer l'effet des ultrasons sur les NPM et en particulier sur les agrégats. L'étude a été réalisée à l'aide des nanoparticules magnétiques Ademtech (V - 1 - a - ii -). Ces particules présentent une couche de ligand à la surface avec des groupes fonctionnels. Lors de la sonication il est nécessaire de ne pas casser cette couche car elle est primordiale dans la formation de notre complexe.

Pour observer la désagrégation des NPM, différentes puissances et différents temps ont été testés. Un exemple, pour une puissance de 100 W et une durée d'une minute, est présenté dans la Figure 4.48.

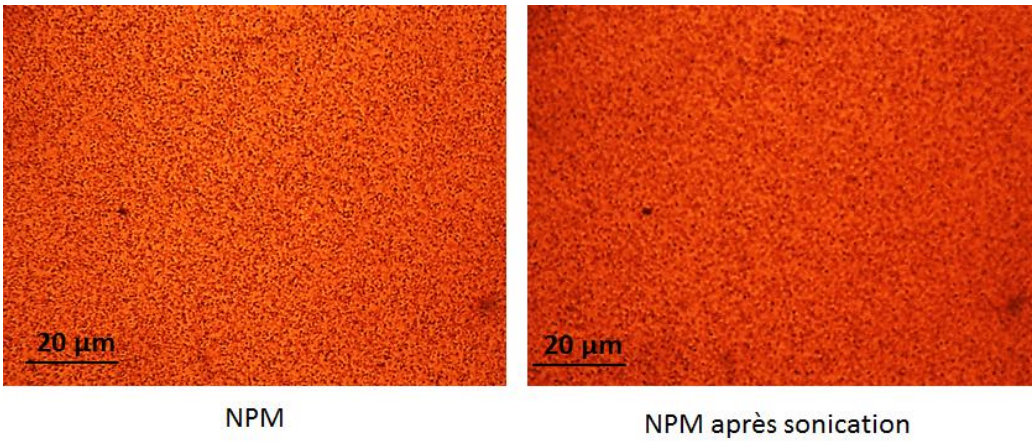


Figure 4.48 : Visualisation des NPM sur une lame de verre au microscope à lumière banche (a) sans sonication, (b) après sonication.

Différents tests en variant la puissance et le temps ont été réalisés (Tableau 4.18). En réalisant ces tests une remarque a été faite concernant le temps de d'utilisation des ultrasons. Tout d'abord un temps long entraîne une augmentation de la température du bain dans lequel est plongé le microtube contenant la solution. Les ultrasons entraînent une agitation des molécules d'eau, ce qui entraîne à son tour une augmentation de la température de la solution. Il est donc intéressant d'alterner des cycles de marche (Temps « on ») et d'arrêt (Temps « off ») des ultrasons, ce qui a pour effet de limiter l'augmentation de la température.

Puissance (W)	Temps « on » (s)	Temps « off » (s)	Etat des NPM
50	10	10	Absence d'agrégation
100	30	5	Absence d'agrégation mais élévation de la température
100	10	10	Absence d'agrégation
150	10	10	Absence d'agrégation mais élévation de la température

Tableau 4.18 : Présentation des différents tests sur l'utilisation des ultrasons pour limiter l'agrégation des NPM (volume de la cuve = 6,15E-3 m³ et volume de l'échantillon = 1E-6 m³).

Le Tableau 4.18, présente les différentes expériences réalisées en faisant varier la puissance ou les temps du cycle. On observe que dans tous les cas les agrégats disparaissent, mais en présence de cycles de marche long (>10s) ou une puissance trop élevé (150W) une élévation de la température est visible. Il a été conclu qu'il était préférable pour la sonication des NPM d'utiliser une puissance faible (P ≤

100W). De plus il est plus intéressant de réaliser des temps « on » courts afin d'éviter d'augmenter les agrégats de NPM.

◊ *Effets des ultrasons sur les complexes« bactéries – anticorps »*

Les études de puissance et de temps ont été réalisées pour les bactéries. Les anticorps ne peuvent être visualisés au microscope, seuls les agrégats y sont visibles. Pour connaitre l'effet des ultrasons sur les anticorps il faut réaliser le greffage des anticorps ayant subi les ultrasons sur les NPM. Si les anticorps n'ont pas été dégradés par les ultrasons alors la capture des bactéries sera possible.

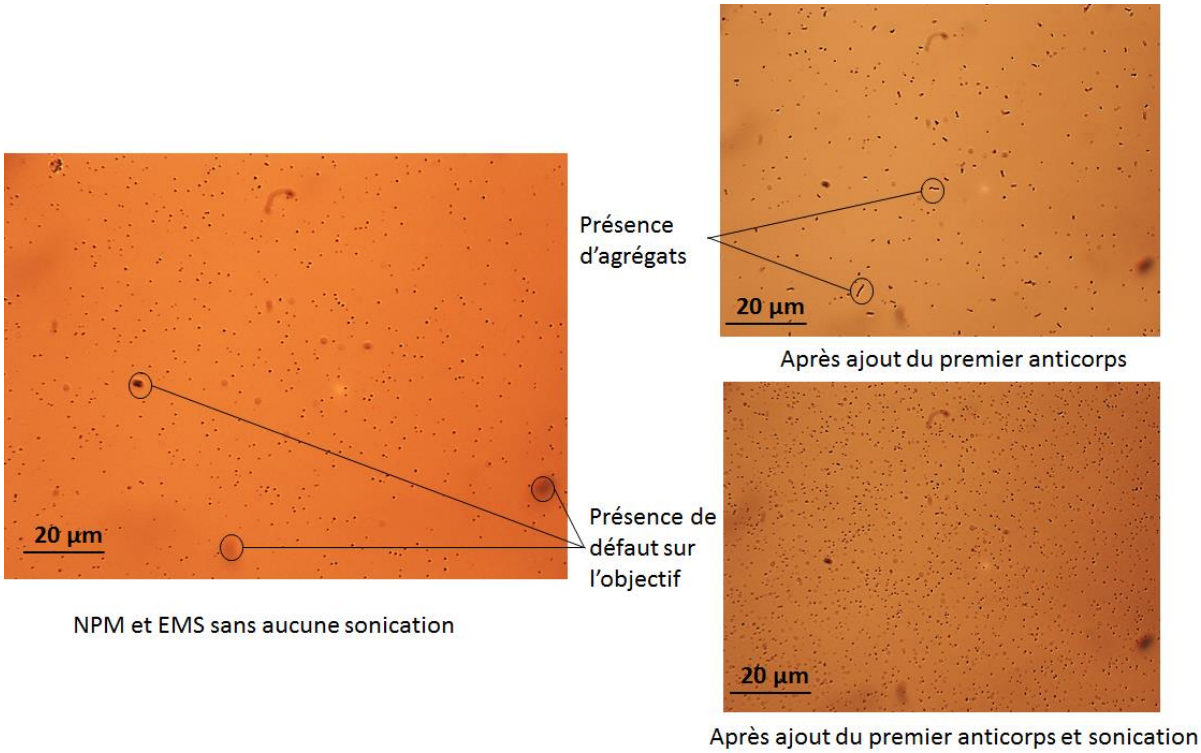


Figure 4.49 : Visualisation des nanoparticules au microscope en lumière banche des NPM (a) sans sonication, (b) après ajout du premier anticorps et (c) après ajout du premier anticorps et sonication.

D'après le Tableau 4.19, qui récapitule les expériences réalisées avec les bactéries et les anticorps plusieurs remarques peuvent être faites. Premièrement les ultrasons, même avec une faible puissance, dégradent fortement les bactéries. Deuxièmement dans le cas des NPM fonctionnalisées par des anticorps (Figure 4.49) une sonication légère permettait une désagrégation du complexe formé. Mais en augmentant davantage la puissance des ultrasons la capture des bactéries ne se réalise plus.

L'utilisation des ultrasons s'est révélée utile pour la désagrégation des NPM. Il est nécessaire de la réaliser avec une puissance optimisée, et d'inclure des intervalles d'arrêts pour ne pas abimer les éléments biologiques (bactéries et anticorps). Nos conditions de sonication pour la suite des travaux ont été fixées : une agitation d'une minute avec une alternance des cycles de marche et d'arrêt toutes les 10 secondes et une puissance de 50 W.

Puissance (W)	Temps « on » (s)	Temps « off » (s)	Etat du complexe « bactéries – anticorps »
50	10	10	Présence de complexes intacts
100	30	5	Complexes dégradés
100	10	10	Complexes dégradés
150	10	10	Complexes dégradés

Tableau 4.19 : Présentation des différents tests sur l'utilisation des ultrasons sur les bactéries et les anticorps pour un volume identique.

V- 2 - b -Étude de la capture du complexe « bactérie – nanoparticule»

V - 2 - b - i - Validation du greffage des nanoparticules magnétiques sur les bactéries en microtubes

La première étape de l'étude de la capture des bactéries par des NPM a été de démontrer sa faisabilité en utilisant le protocole présenté en V- 1 - b -. Les NPM utilisées sont les NPM fluorescentes (vert) de 500 nm présentées dans la partie V - 1 - a - ii -. La Figure 4.50 montre la capture de bactéries fluorescentes à l'aide de NPM (V - 1 - a - ii -). L'expérience a été réalisée plusieurs fois (>5), en conservant les mêmes conditions (protocole, température…), afin de vérifier la reproductibilité de la capture des bactéries. Il a été observé dans notre cas, que les bactéries étaient entourées par plusieurs NPM. La capture des bactéries grâce à un champ magnétique, demande une force magnétique moins importante. Par conséquent nous avons utilisé un aimant qui génère un champ plus faible que dans le cas de la capture de NPM pour la détection d'ovalbumine.

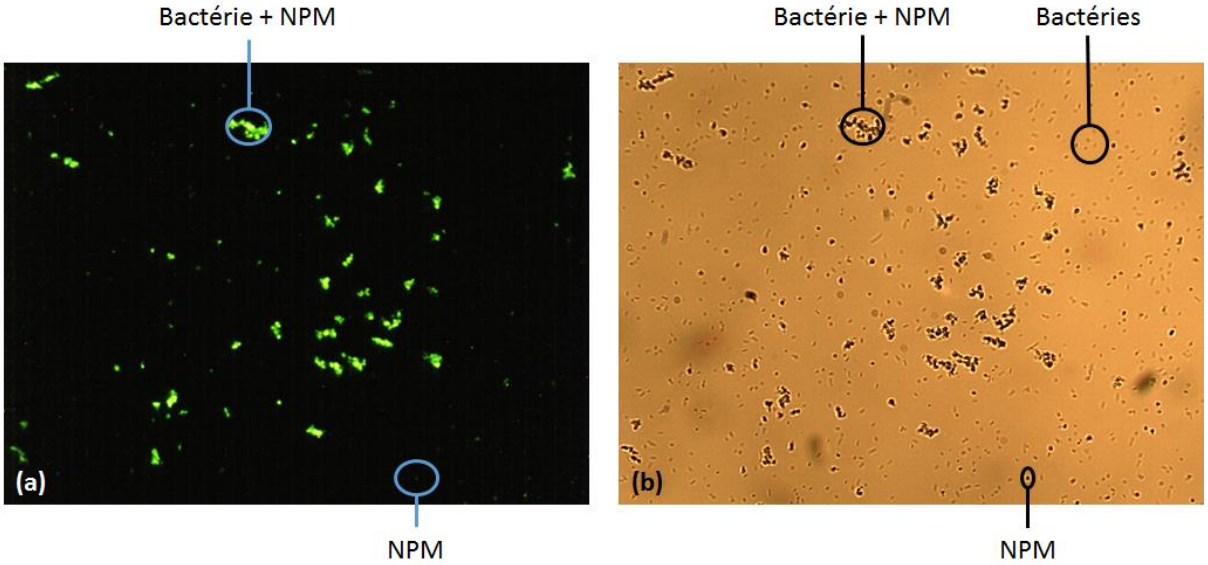


Figure 4.50 : Visualisation des complexes « bactéries – NPM » au (a) microscope à fluorescence et (b) au microscope optique (Keyence).

V - 2 - b - ii - Étude de l'encapsulation des bactéries par des nanoparticules magnétiques en fonction du nombre de celles injectées en conditions fluidiques

Dans la partie précédente, il a été démontré que les bactéries étaient capturées par des NPM. Une étude en faisant varier la concentration de bactéries, et en utilisant les mêmes NPM (500 nm), a été menée. Pour cela un dispositif fluidique avec un aimant externe a été utilisé. Le dispositif a été créé suivant les procédés développés au chapitre 2 et ses dimensions sont présentées dans la Figure 4.51.

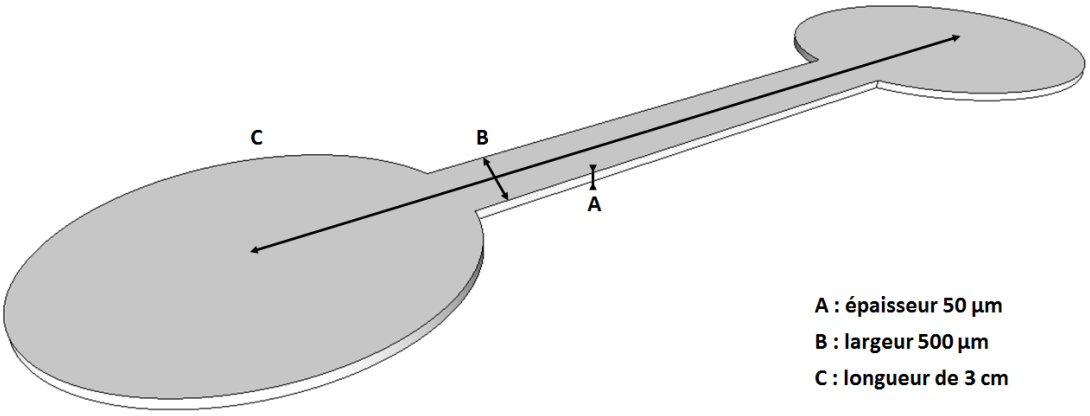


Figure 4.51 : Présentation schématique des dimensions du dispositif fluidique utilisé pour l'étude du greffage des bactéries par des NPM.

Pour faire varier la concentration de bactéries injectées il est nécessaire de calculer la concentration en bactéries de la solution « mère ». La concentration de bactéries en solution a été calculée en développant une culture à partir de la solution utilisée pour les expériences en suivant la technique de dénombrement présentée précédemment. A partir de la culture, le nombre de colonies apparues permet de déterminer une concentration en bactéries. La concentration en bactéries de la solution « mère » étant connue, cette dernière est diluée pour obtenir les concentrations voulues.

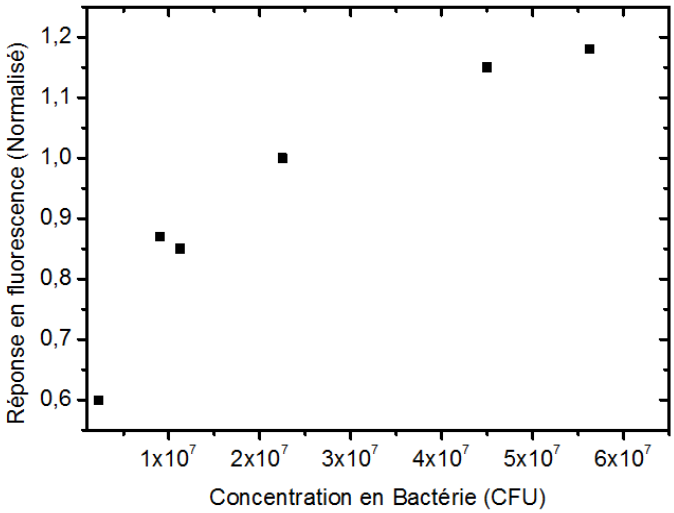


Figure 4.52 : Etude de la réponse fluorescente des bactéries greffées par des NPM de (500 nm) en fonction de la concentration en bactéries injectées.

Les résultats présentés en Figure 4.52 montrent le nombre de bactéries capturées en fonction du nombre de bactéries injectées dans le circuit fluidique. Pour cela les bactéries fluorescentes (V - 1 - a - i -) sont utilisées. Une fois les bactéries capturées par les NPM, elles sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence. La fluorescence permet de distinguer la différence entre les bactéries recouvertes de NPM et les agrégats de NPM.

La Figure 4.52 permet d'observer que la quantité de bactéries détectées augmente avec la quantité de bactéries injectées. La variation observée n'est pas linéaire mais ne présente pas de plateau correspondant à une saturation reflétant l'efficacité de capture. Une L.D.D. de $5x10^6$ CFU peut être estimée à partir de ces points. La limite obtenue est loin des L.D.D. qu'il est possible de trouver dans la littérature (Wu et al. 2017; Altintas et al. 2018).Des points supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la présence du plateau afin de réaliser correctement la partie de la courbe utile pour le calcul de la limite de détection. Ces expériences pourront être réalisées avec les microbobines millimétriques qui ont permis d'obtenir la meilleur L.D.D. dans le cas de la détection de l'ovalbumine.

VI -Étude des dispositifs microfluidiques de détection des nanoparticules magnétiques

VI - 1 - Rappel du contexte de la conception d'un circuit magnétique pour la détection de nanoparticules magnétiques

Dans cette dernière partie, nous nous intéressons à l'effet de l'adjonction du circuit magnétique dans un dispositif fluidique intégrant des microbobines pour la détection de NPM. La mesure est basée sur un relevé de l'inductance du circuit magnétique (microbobines + branches magnétiques en FeNi). Pour la détection de NPM, l'utilisation de microbobines seules entrainent une perte des lignes de champ magnétique (Figure 4.53). L'insertion d'un circuit magnétique va venir canaliser les lignes de champ magnétique en leur permettant de reboucler sur elles-mêmes (Figure 4.53). Le circuit magnétique permet donc d'optimiser la variation d'inductance du capteur magnétique.

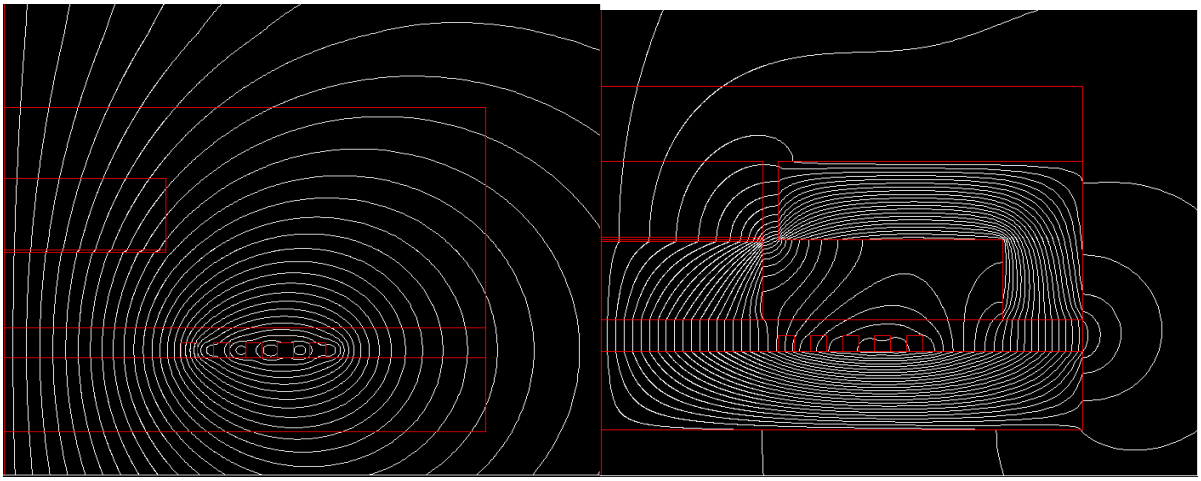


Figure 4.53 : Cartographie des lignes de champ pour (Gauche) des microbobines seules, et (Droite) des microbobines avec un circuit magnétique.

Le chapitre 2 a permis de simuler les différentes configurations du circuit magnétique, qui marquent aussi des étapes intermédiaires dans le procédé de fabrication présenté dans le chapitre 3. Ce sont ces étapes que nous caractérisons au cours de cette partie.

Le premier dispositif concerne des microbobines recouvertes de polyimide et un circuit fluidique (Figure 4.54.a). Le deuxième présente l'insertion de la base de FeNi qui permet de canaliser les lignes de champ magnétique présentes en-dessous des microbobines (Figure 4.54.b). Le troisième concerne l'insertion d'un plot de FeNi au centre des microbobines (Figure 4.54.c). Le quatrième dispositif est le dispositif final avec l'ensemble du circuit magnétique qui présente un seul entrefer que les NPM viendront partiellement refermer (Figure 4.54.d).

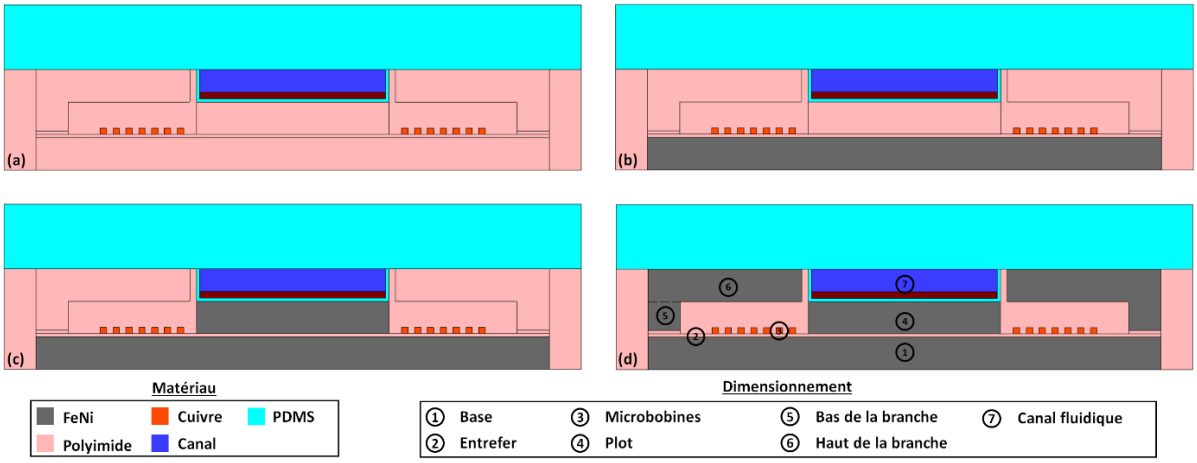


Figure 4.54 : Schéma des microbobines à des étapes clés de la fabrication. (a) les microbobines seules (Mbs), (b) les microbobines avec une base de FeNi (BMb), (c) les microbobines avec une base et un plot de FeNi (BMbP), (d) les microbobines avec une base, un plot et des branches de FeNi (BMbPB).

Il a été démontré par simulation, dans le chapitre 2, que l'insertion d'éléments magnétiques augmente la variation d'inductance de détection du dispositif magnétique (Figure 4.55).

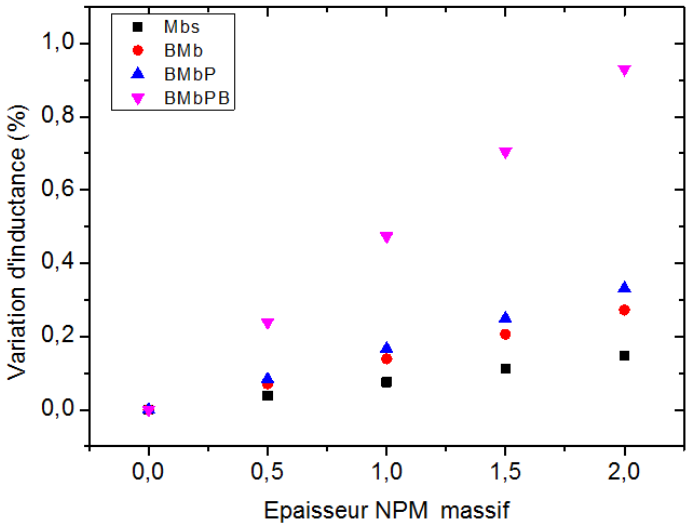


Figure 4.55 : Variation d'inductance des microbobines à différentes étapes de fabrication en fonction de l'épaisseur des NPM. Mbs : microbobines seules, BMb : microbobines avec une base de FeNi, BMbP : microbobines avec une base et un plot de FeNi, BMbPB : les microbobines avec une base, un plot et des branches de FeNi.

Les différents dispositifs ont été réalisés en suivant les protocoles présentés dans le chapitre 3 (Figure 4.56). Les dispositifs caractérisés dans cette partie ont été fabriqués avec les dimensions présentées dans la Figure 4.57.

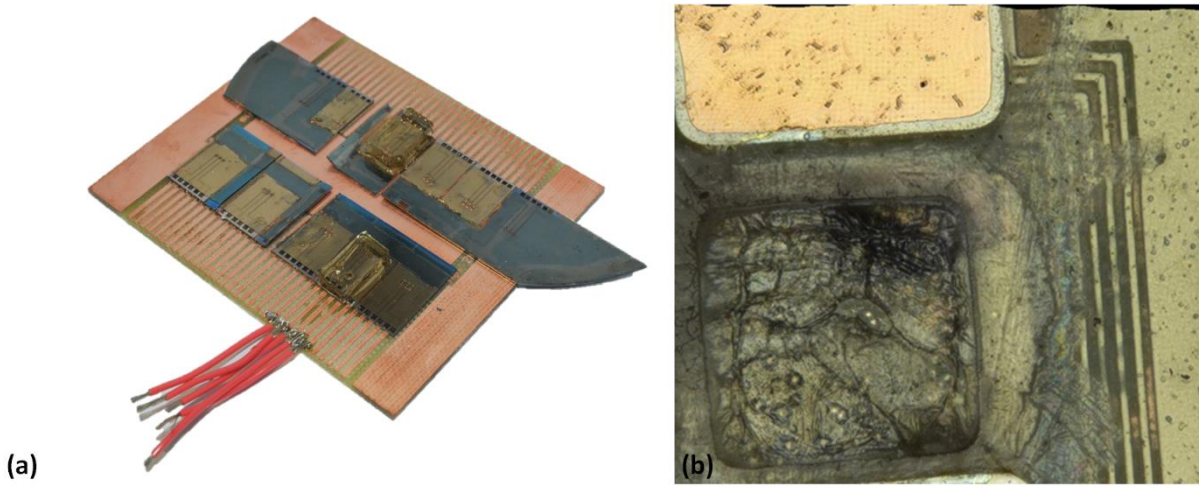


Figure 4.56 : Exemple des dispositifs fabriqués dans le chapitre 3 et caractérisés dans cette partie.

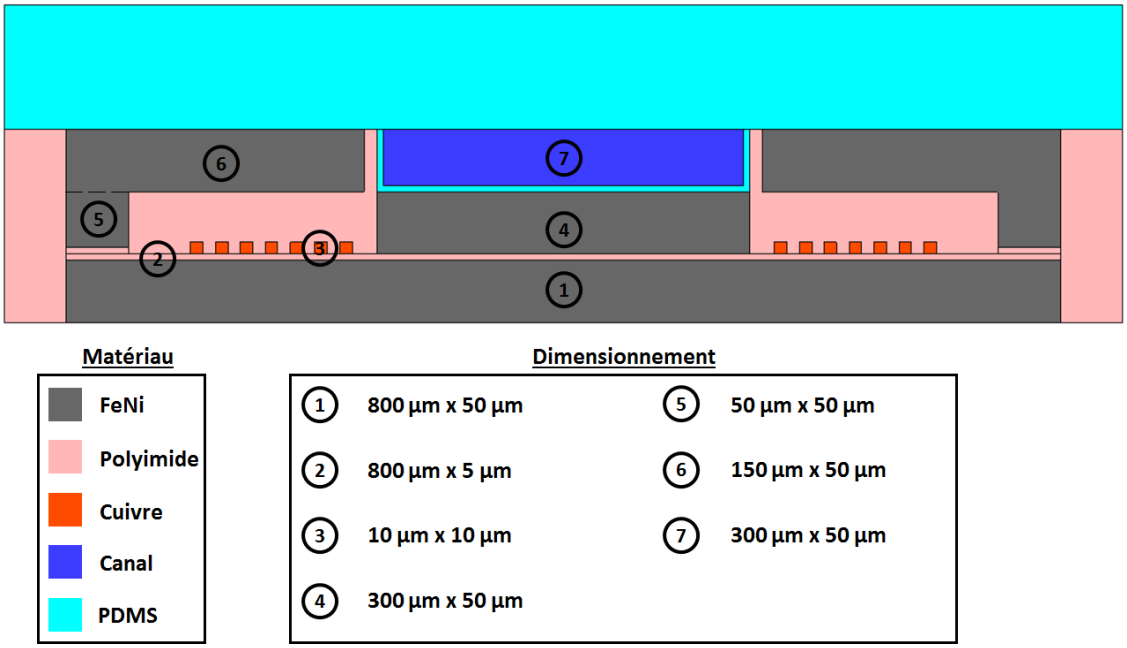


Figure 4.57 : Schéma du dimensionnement complet du dispositif de détection magnétique.

VI - 2 - Présentation de la plateforme microfluidique de test pour la caractérisation des dispositifs de détection magnétique

Pour caractériser les dispositifs présentés dans la partie VI - 1 -, un banc expérimental a été réalisé (Figure 4.58).Il se compose d'une partie fluidique comportant quatre éléments : un pousse-seringue permettant de régler le débit du fluide injecté dans le dispositif, une seringue contenant la solution à injecter, des capillaires permettant de se connecter au dispositif fluidique. Enfin, un microtube de 50 mL permet de récupérer la solution utilisée.

Le banc expérimental comprend aussi un microscope optique (Keyence) qui permet la visualisation des canaux fluidiques sur un écran et un impédancemètre (FLUKE PM6306) pour la visualisation des caractéristiques électriques (résistance, inductance…).

Le dernier élément est le dispositif de détection dont la fabrication est détaillée dans le chapitre 3. Ce dernier est connecté à la seringue grâce à un capillaire fluidique et à l'impédancemètre avec des connexions électriques.

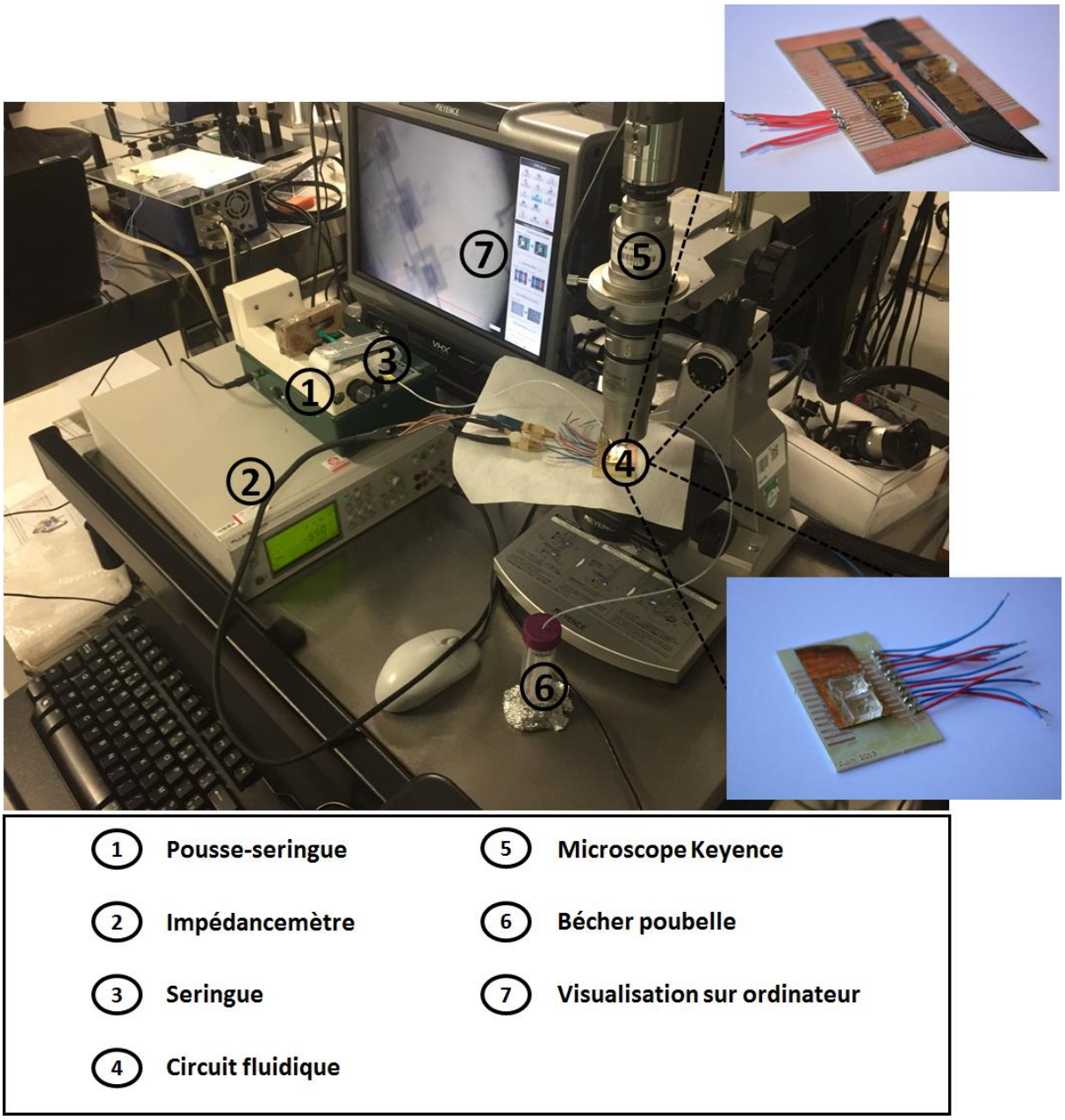


Figure 4.58 : Vue d'ensemble du banc expérimental pour la caractérisation des dispositifs de détection magnétique sur microscope optique (Keyence).

VI - 3 - Caractérisation de la résistivité des dispositifs de détection magnétique

Tous les dispositifs de détection magnétique comprennent des microbobines de cuivre. Elles sont nécessaires pour réaliser la détection des lignes de champ magnétique transitant dans le dispositif. Nous avons vu dans le chapitre 2, que l'inductance des microbobines sera notre paramètre pour

quantifier la présence de NPM. Dans le même chapitre, il a été montré que l'inductance varie de façon inversement proportionnelle à la reluctance du circuit magnétique (Chapitre 2 V - 3 – a).

VI- 3 - a - Caractérisation électrique des microbobines par leurs résistances

Pour les microbobines fabriquées, l'observation au microscope ne garantit pas la continuité électrique effective, ni des propriétés électriques qui permettent effectivement une mesure de la variation d'inductance avec précision. Ainsi, une piste présentant une inhomogénéité d'épaisseur peut être suffisamment petite pour ne pas être vue au microscope mais augmenter considérablement la valeur de la résistance. Dans ce cas, les dispositifs de mesure qui s'appuient sur la mise en résonance de la bobine perdent de leur précision. Il a été décidé que si un dispositif présente une résistance supérieure à la centaine d'ohm, il sera considéré comme inutilisable pour la détection de NPM.

Chaque microbobine doit être testée expérimentalement pour réaliser des statistiques dans les procédés de fabrication. La résistance des microbobines a été à la fois mesurée à l'aide d'un multimètre lors de la fabrication en salle blanche puis avec un impédancemètre une fois les dispositifs finis et sortis de la centrale technologique. Les caractérisations des dispositifs n'ont été réalisées qu'une fois les étapes de fabrication stabilisées permettant de produire un certain nombre de dispositifs. Le pourcentage de microbobines fonctionnelles par type de dispositifs est présenté Figure 4.59.

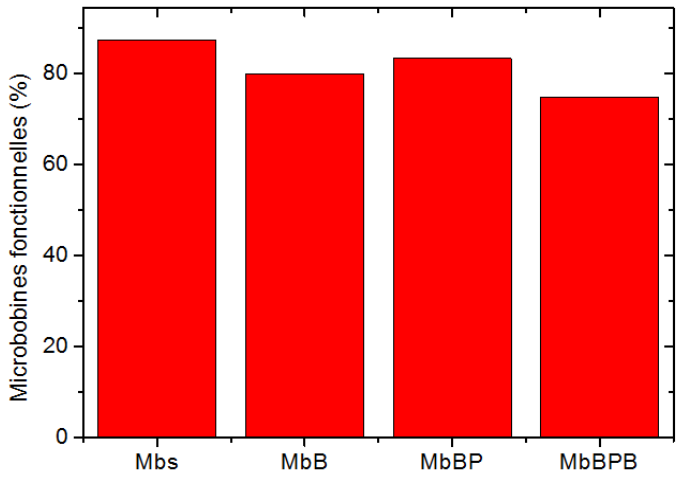


Figure 4.59 : Calcul du pourcentage de microbobines fonctionnelles en fonction des différents types de dispositifs :les microbobines seules (Mbs), les microbobines avec une base de FeNi (MbB), les microbobines avec une base et un plot de FeNi (MbBP), les microbobines avec une base, un plot et des branches de FeNi (MbBPB).

On peut observer que le pourcentage de microbobines fonctionnelles est plus élevé dans le cas des microbobines seules. Ceci s'explique par le fait que c'est un procédé plus simple (seulement trois niveaux) et avec très peu de variation d'épaisseur entre les composants.

L'introduction de la base de FeNi entraine une diminution du pourcentage de microbobines fonctionnelles. La principale cause est les défauts de planéité des bases de FeNi. En effet malgré les

techniques employées pour aplanir la surface, des reliefs persistent et peuvent entraîner des défauts dans la fabrication des microbobines.

L'insertion du plot de FeNi n'entraine pas de chute de rendement notable à la fin du procédé. La variation observée est due principalement au fait que les substrats présentant les meilleures microbobines sont choisis pour l'insertion du plot de FeNi, les autres étant utilisées en tant que microbobines avec une base de FeNi.

La diminution du nombre de microbobines fonctionnelles pour les microbobines avec une base, un plot et des branches de FeNi, peut être expliquée en partie par l'étape de transfert de films. Durant cette étape, la séparation du substrat donneur du substrat accepteur se fait par une méthode mécanique (à l'aide d'un scalpel). Cette séparation entraine des contraintes mécaniques qui peuvent abîmer les microbobines.

Parmi les défauts les plus récurrents quel que soit le type de dispositif, le plus facilement identifiable est la rupture des spires (Figure 4.60). Dans le cas où les spires sont intactes et ne semblent pas avoir de défaut physique, le défaut provient dans la plupart des cas de la couche de silice qui n'est pas suffisamment gravée. Cette couche permet de séparer électriquement la sous-couche de cuivre des spires des microbobines sauf à des endroits stratégiques permettant une connexion électrique. Si cette connexion n'est pas réalisée, alors le courant ne peut pas passer dans les spires et la résistance est infinie.

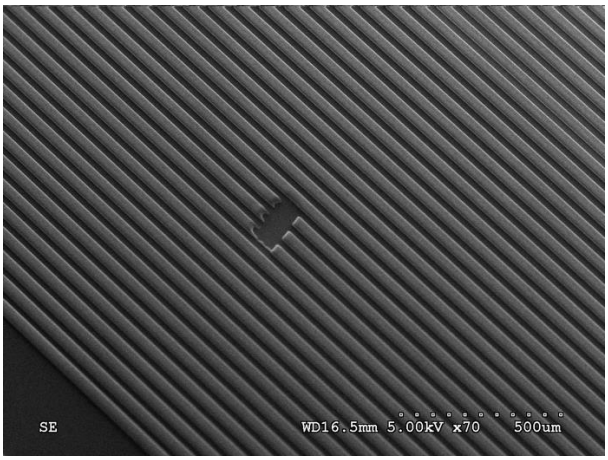


Figure 4.60 : Image MEB d'une rupture de spires provoquant une résistance infinie de la microbobine de détection.

VI- 3 - b - Caractérisation de la résistance des microbobines fonctionnelles

La résistance des microbobines fonctionnelles a été ensuite caractérisée de façon plus précise. Pour cela plusieurs mesures de résistance ont été réalisées, tout d'abord à la sortie de la salle blanche (correspondant à la fin du procédé de fabrication) puis quelques jours après. Le but de ces deux séries de mesures est de vérifier la stabilité des microbobines une fois sorties d'un environnement contrôlé en humidité et température.

Pour chaque mesure de résistance, un temps de stabilisation de 1 à 2 minutes est suffisant pour vérifier que la valeur obtenue est stable. La Figure 4.61 présente les valeurs obtenues pour les différents dispositifs caractérisés.

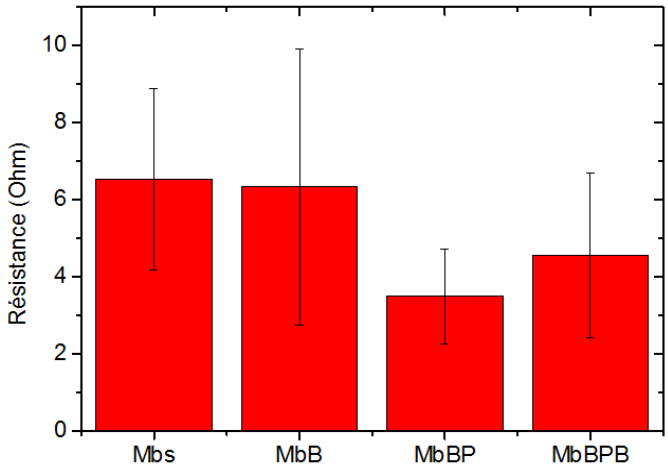


Figure 4.61 : Moyennes des mesures de résistance électrique pour les différents types de dispositifs fabriqués : les microbobines seules (Mbs), les microbobines avec une base de FeNi (BMb), les microbobines avec une base et un plot de FeNi (BMbP), les microbobines avec une base, un plot et des branches de FeNi (BMbPB).

On peut observer que les valeurs moyennes des résistances sont comprises entre 3 et 7 Ohms. La différence vient de la variation de la largeur et de l'épaisseur des spires en cuivre. On peut donc voir que dans notre cas, ces variations de l'ordre du micromètre ont un impact visible sur la résistance des microbobines.

Les dispositifs pour lesquels les microbobines ont été caractérisées et définies comme fonctionnelles peuvent être utilisés pour réaliser la détection de NPM dans un circuit microfluidique.

VI - 4 - Caractérisation des dispositifs de détection magnétique par variation d'inductance

Pour quantifier la présence de NPM dans la chambre microfluidique, nous avons caractérisé l'inductance des microbobines. Les simulations réalisées dans le chapitre 2, rappelées en Figure 4.55, montrent l'optimisation de la variation d'inductance du capteur à chaque insertion d'une partie du circuit magnétique.

Il est nécessaire pour ces mesures de connaître la quantité de NPM présentes dans le dispositif après leur injection. La première étape a été de calculer la quantité de NPM pouvant être contenue dans la chambre microfluidique.

VI- 4 - a - Calcul du nombre maximal de nanoparticules magnétiques que la chambre microfluidique peut contenir

La Figure 4.62 rappelle la vue en coupe du dispositif de détection magnétique ainsi que les dimensions de la chambre microfluidique. A partir de ces dimensions, il est possible de calculer la quantité maximale de NPM nécessaire pour remplir la chambre. Ce calcul considère que les NPM sont bien stabilisées (absence de mouvement des NPM) dans la chambre, cela pourrait se faire à l'aide d'un greffage de complexe au fond de la chambre.

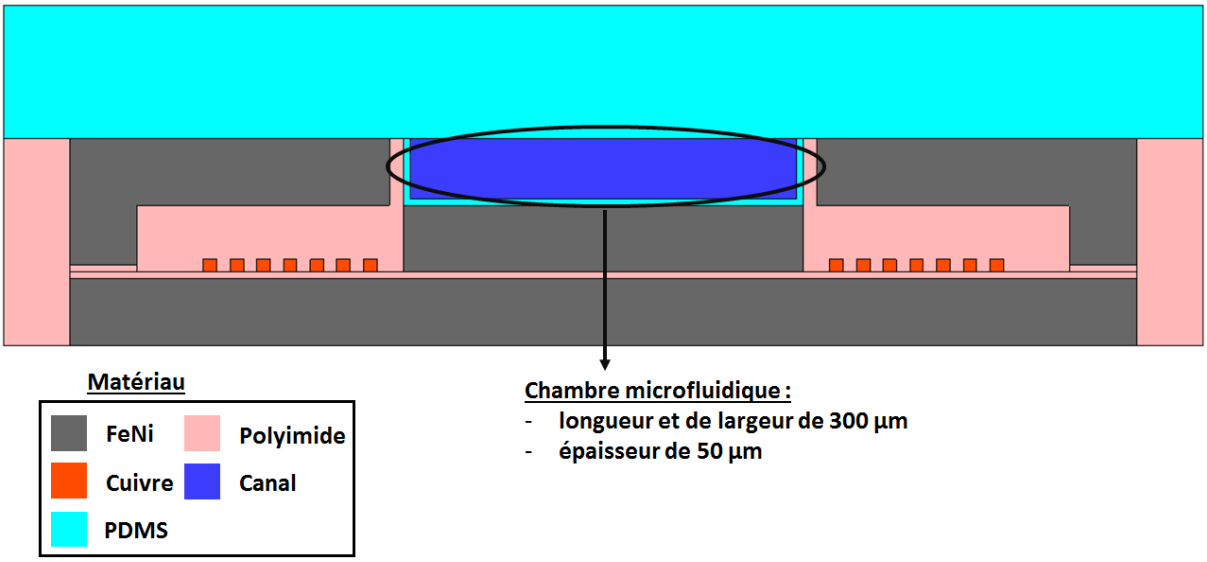


Figure 4.62 : Représentation schématique d'une vue en coupe du dispositif de détection magnétique.

Le volume de la chambre microfluidique calculé est de 4.5 nL, le Tableau 4.20 présente le calcul du nombre de particules magnétiques pouvant être contenues dans un tel volume. Les données utilisées sont tirées de la base de données des NPM d'Ademtech (https://www.ademtech.com/magnetic-particles/in-vitro-diagnostic/standard-adembeads/). Le calcul du volume des nanoparticules repose sur l'hypothèse que ces dernières sont sphériques.

Diamètre particule	Volume particule	Volume chambre microfluidique	Nombre particules maximales
m	m³	m³	
5,00E-07	6,54498E-20	4,50E-12	6,88E+07
3,00E-07	1,41372E-20	4,50E-12	3,18E+08
2,00E-07	4,18879E-21	4,50E-12	1,07E+09

Tableau 4.20 : Calcul du nombre de particules magnétiques pouvant être contenues dans la chambre microfluidique.

Le résultat des calculs montre que plus le diamètre des NPM diminuent, plus leur nombre est important dans la chambre fluidique. Le résultat est parfaitement logique et nous permet d'avoir une base de réflexion pour estimer le nombre de particules magnétiques dans la chambre fluidique lors des expériences. En effet, nous pourrons déterminer si la chambre fluidique est plus ou moins remplie en fonction de la quantité de NPM injectée dans le circuit fluidique.

VI- 4 - b - Mesure de l'inductance dans les différents types de dispositifs de détection sans nanoparticules magnétiques

La première étape consiste à mesurer l'inductance des dispositifs en l'absence de NPM. Cette mesure permet de calculer la variation d'inductance du dispositif étudié suivant la méthode utilisée dans le chapitre 2.

La variation d'inductance $\sigma_{sensibilité}$ de l'inductance à la présence de nanoparticules est la différence entre l'inductance en présence de NPM $L(NPM \neq 0)$ et l'inductance en l'absence de NPM $L(NPM = 0)$ divisée par l'inductance de la microbobine en l'absence de NPM :

$$\boldsymbol{\sigma_{sensibilité}} = \frac{L(NPM \neq 0) - L(NPM = 0)}{L(NPM = 0)} \quad \textbf{(4-4)}$$

La Figure 4.63.a rappelle l'inductance calculée à l'aide du logiciel de simulation ANSYS pour les différents dispositifs étudiés : microbobines seules (Mbs), microbobines sur une base de FeNi (BMb), microbobines sur une base de FeNi avec un plot de FeNi (BMbP) et microbobines sur une base de FeNi avec un plot et des branches de FeNi (BMbPB). La Figure 4.63.b montre l'inductance mesurée expérimentalement à l'aide d'un impédancemètre pour ces mêmes dispositifs étudiés.

Pour chaque dispositif, l'inductance est mesurée plusieurs fois (au minimum trois fois). Les mesures sont effectuées en statique et la fréquence utilisée dans nos expériences est de 200 Hz. Nous cherchons une fréquence basse car à plus hautes fréquences des phénomènes apparaissent ou s'amplifient : la résistance ohmique s'accroit du fait de l'effet de peau dans le bobinage à partir de quelques centaines de kHz ; l'effet de peau dans le matériau magnétique apparaît pour des fréquences plus basses et empêche la pénétration du champ magnétique, et donc en réduit la section utile . Ces phénomènes peuvent en outre induire l'échauffement des complexes biologiques à base de NPM et donc entraîner leur dégradation. Chaque mesure est réalisée pendant un temps suffisamment long (dans notre cas il est nécessaire de dépasser 5 minutes) pour garantir une stabilité de la mesure.

On peut observer que dans le cas des microbobines seules, l'inductance mesurée est de 0,29 µH avec une erreur de 0,05 µH. Pour les microbobines avec une base de FeNi, l'inductance mesurée est de 0,33 µH avec une erreur de 0,04 µH. L'insertion du plot donne une inductance expérimentale de 0,34 µH avec une erreur de 0,09 µH. Enfin pour un circuit magnétique complet l'inductance mesurée est de 0,38 µH avec une erreur de 0,06 µH.

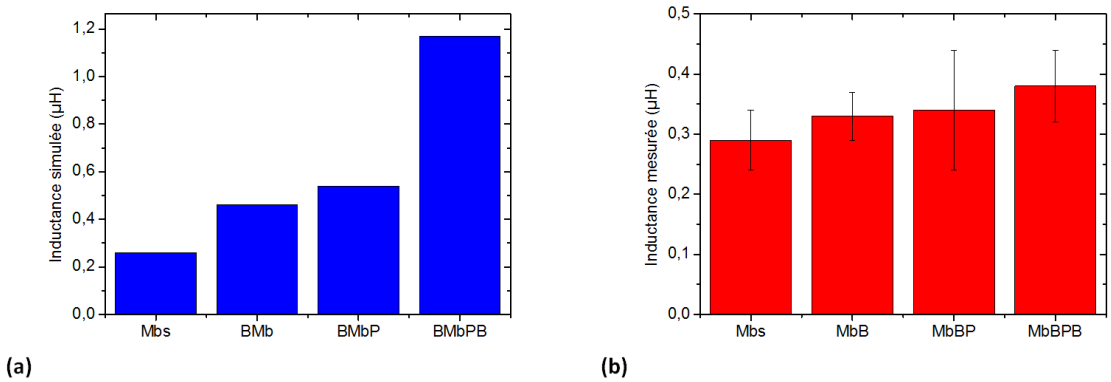


Figure 4.63 : Valeurs des inductances (a) simulées et (b) expérimentales en absence des NPM dans les différents dispositifs. Mbs : Microbobine seule ; BMb : Base de FeNi et Microbobine ; BMbP : Base de FeNi, Microbobine et Plot de FeNi ; BMbPB : Base de FeNi, Microbobine, Plot de FeNi et Branche de FeNi.

En comparant avec les valeurs obtenues par simulation, on observe que pour les microbobines seules, les inductances sont proches. Puis une différence de plus en plus importante apparaît avec l'intégration des éléments du circuit magnétique entourant la microbobine. Dans le cas des microbobines seules, la différence est de 10%, pour les microbobines avec une base en FeNi elle augmente à 40%, pour les microbobines avec une base et un plot en FeNi elle atteint à 60%. La plus grande différence culmine à 200% pour le dispositif complet. Cette différence est probablement due aux défauts de fabrication qui s'additionnant entraînent une divergence avec les valeurs d'inductance simulées. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour connaître précisément la ou les causes exactes de cette divergence, on peut remarquer que la valeur d'inductance est très sensible à la valeur de l'entrefer introduit notamment lors de la fabrication du plot et des branches.

VI- 4 - c - Caractérisation de l'inductance mesurée dans les dispositifs de détection en présence de nanoparticules magnétiques

Pour réaliser l'étude expérimentale pour la détection de NPM, différentes dilutions sont réalisées pour obtenir des concentrations en NPM (Ademtech, 500 nm) de plus en plus faibles (Figure 4.64). Pour cela une quantité de solution stock est prélevée puis diluée dans une solution « buffer » de PBS x1. A partir de la solution stock (https://www.ademtech.com/magnetic-particles/in-vitro-diagnostic/standard-adembeads), les solutions ont été diluées par un facteur dix à chaque fois. La solution utilisée avec la plus grande concentration de NPM en contenait 10^{11}. Il a été estimé que cette concentration permettait de remplir complètement la chambre fluidique en prenant en compte l'ensemble du circuit fluidique.

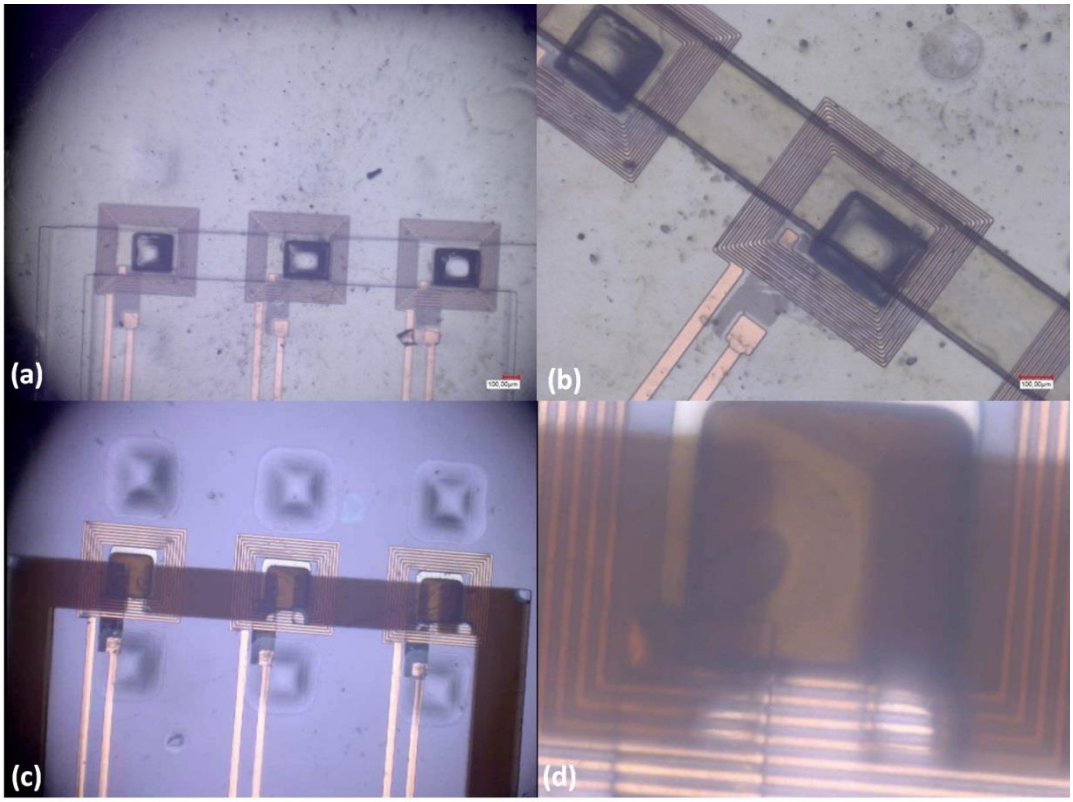


Figure 4.64 : Images du microscope optique (Keyence) des canaux de détection pour différentes concentrations de solution de NPM. (a) en absence de NPM, (b) en présence d'une faible quantité de NPM (10^3) (c) en présence d'une large quantité de NPM (10^9) par rapport au volume théorique de la chambre (d) zoom sur la chambre microfluidique en présence d'une large quantité de NPM (10^9).

Par la suite les solutions contenant différentes concentrations de nanoparticules ont été injectées dans les dispositifs de détection fabriqués. Les solutions sont injectées avec un débit de 10 µL/min puis le débit est fortement diminué pour stabiliser les NPM dans la chambre fluidique pour réaliser les mesures. En effet, le but final pour ce capteur est de réaliser une silanisation pour capturer les NPM au niveau de la zone de détection (annexe du chapitre 4). La Figure 4.65 montre les différents résultats obtenus pour ces expériences.

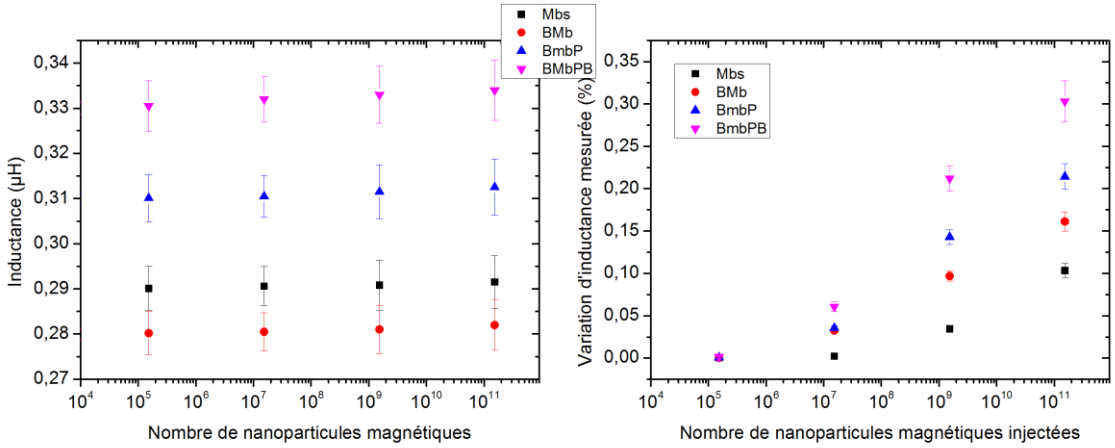


Figure 4.65 : (a) Inductance et (b) variation d'inductance des dispositifs de détection fabriqués en fonction de la quantité de NPM. Mbs : Microbobine seule, BMb : Base de FeNi et Microbobine, BMbP : Base de FeNi et Microbobine et Plot de FeNi, BMbPB : Base de FeNi et Microbobine et Plot de FeNi et Branche de FeNi.

Pour chaque type de dispositif une légère augmentation de l'inductance est visible avec l'augmentation du nombre de NPM injectées (Figure 4.65.a).

En se basant sur une quantité de 10^{11} NPM qui correspondrait à la chambre microfluidique remplie en large excès, pour les microbobines seules l'augmentation de l'inductance est assez faible, le calcul de la variation d'inductance (+0,1%) confirme cette observation. Avec l'insertion de la base de FeNi, l'inductance présente une augmentation plus importante de la variation d'inductance (+0,15%). L'apparition du plot entraine un gain de variation d'inductance de 0,2 % et lorsque le circuit magnétique est complet le gain passe à 0,3%.

L'augmentation de la variation d'inductance due à l'insertion des différents éléments du circuit magnétique est conforme à nos attentes par rapport aux simulations présentées dans le chapitre 2. Toutefois il est intéressant de comparer les valeurs simulées et expérimentales.

VI- 4 - d - Discussions des résultats expérimentaux obtenus par rapport aux résultats simulés

VI - 4 - d - i - Quantité de nanoparticules magnétiques présente dans la chambre microfluidique

La Figure 4.66.b présente la simulation réalisée pour une couche de NPM de 0 à 2 µm d'épaisseur. On peut observer que pour une couche d'épaisseur de 2 µm de nanoparticules magnétiques la variation d'inductance simulée du dispositif avec le circuit magnétique complet est de 0,93%. Dans le cas de la variation d'inductance expérimentale (Figure 4.66.a) pour une quantité de 10^{11}NPM elle est de 0,31%. Pour cette quantité de nanoparticule on devrait remplir la totalité de la chambre microfluidique. Il existe donc une grande différence entre les simulations réalisées (Chapitre 2) et les expériences en termes de variation d'inductance.

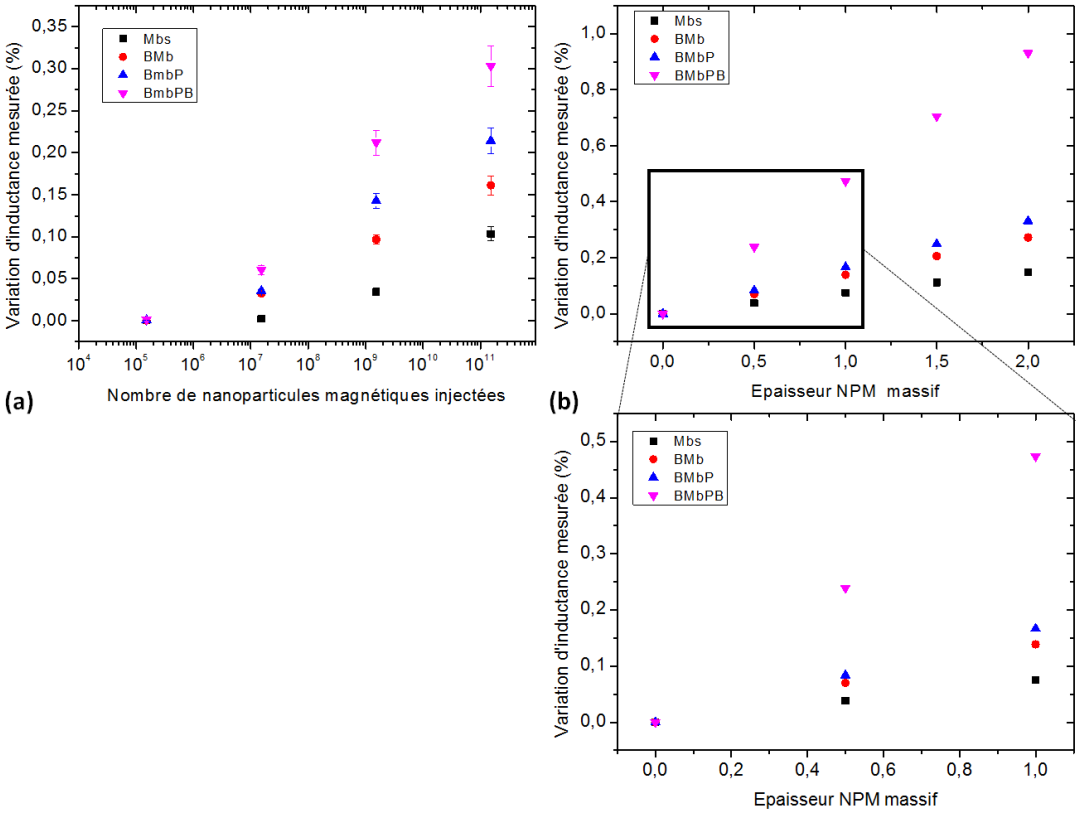


Figure 4.66 : Résultats de la variation d'inductance (a) expérimentale et (b) simulée pour les différents types de dispositif de détection magnétique. Mbs : Microbobine seule, BMb : Base de FeNi et Microbobine, BMbP : Base de FeNi et Microbobine et Plot de FeNi, BMbPB : Base de FeNi et Microbobine et Plot de FeNi et Branche de FeNi.

On peut constater une différence entre les variations d'inductance expérimentale et simulée. Au vu des résultats obtenus, une hypothèse concernant la répartition des NPM dans la chambre microfluidique a été émise. Une monocouche de NPM se regrouperait de manière quasi-statique au niveau de la paroi de la chambre fluidique, tandis que l'autre partie serait en mouvement dans le centre de la chambre. Les lignes de champ préféreront passer par cette monocouche plutôt que dans l'ensemble de la chambre fluidique (Figure 4.67), ce qui nous rapprocherait de la simulation d'une épaisseur à 0,5 µm.

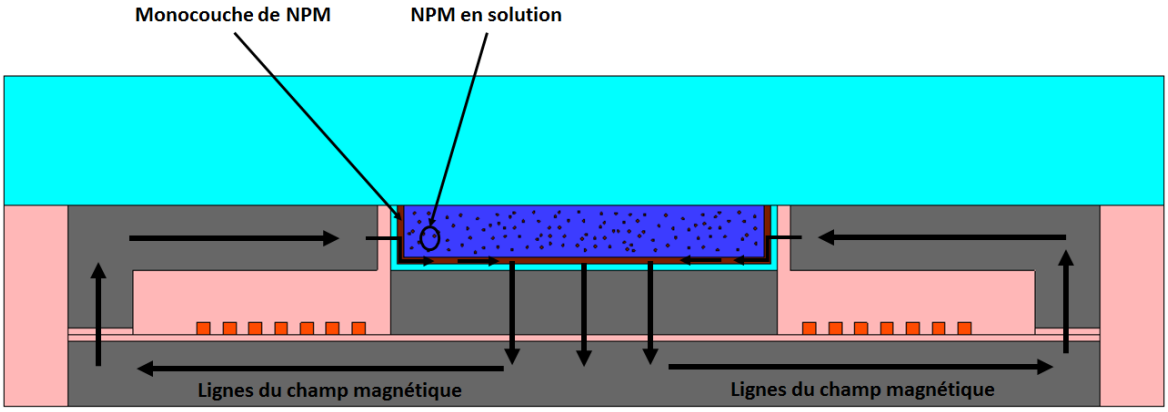


Figure 4.67 : Représentation schématique de notre hypothèse pour le placement des NPM dans la chambre microfluidique.

Pour expliquer cette différence, plusieurs hypothèses concernant les NPM peuvent être avancées. Tout d'abord la simulation prend en compte un bloc « massif » dont les propriétés sont identiques avec les NPM. Expérimentalement, les NPM utilisés sont constituées d'un cœur magnétique et d'une coquille servant de protection et contenant des groupements carboxyles. Il est donc normal de ne pas obtenir une variation d'inductance équivalente mais la différence obtenue est bien supérieure et ne peut être imputée seulement à cette hypothèse.

Un deuxième point à aborder est le fait que les NPM peuvent être présentes en dehors de la chambre microfluidique de façon limitée mais possible. Ces dernières vont entrainer un potentiel élargissement des lignes de champ et donc contribuer à une diminution de la variation d'inductance expérimentale.

Le troisième point à explorer est la présence d'agrégats et non de NPM dispersées. Il est difficile de connaître le comportement des lignes de champ magnétique en présence d'agrégats car selon leur forme ces dernières vont être plus ou moins déviées. Il devient donc difficile d'estimer une quantité réelle de NPM présentes dans le chambre microfluidique.

Pour discuter de la différence de variation d'inductance un autre point doit être abordé, celui de la fabrication des dispositifs en salle blanche.

VI - 4 - d - ii - Discussion autour des conditions de micro fabrication des dispositifs de détection

La différence de variation d'inductance observée dans la Figure 4.66 peut aussi trouver son explication dans les étapes de fabrication des dispositifs. En effet lors de la simulation l'ensemble des éléments du dispositif sont associés de façon précise. Lors de l'assemblage expérimental l'alignement des éléments ne peut pas atteindre une telle précision. Une autre différence réside dans la forme des éléments, parallélépipédiques parfaits en simulation mais pas en fabrication.

Nous pouvons étudier les éléments en prenant l'ordre de fabrication des dispositifs. Le premier élément est la base de FeNi, nous avons vu dans le chapitre 3, la difficulté de réaliser un parallélépipède de 50 µm en ayant peu ou pas de surépaisseur sur les bords. Malgré les solutions proposées, il existe toujours une surépaisseur au niveau des bords de la base de FeNi. Ce défaut a une conséquence sur l'épaisseur de la couche intermédiaire de polyimide, et donc sur l'entrefer effectif fabriqué.

Pour l'insertion du plot de FeNi, en plus de problèmes similaires à ceux rencontrés avec la base de FeNi, l'alignement entre en compte. Un défaut d'alignement entraîne une diminution de la section du circuit magnétique, voire la croissance du plot sur une partie des spires de la microbobine. Ce défaut entraîne une variation de l'inductance et donc de la variation relative d'inductance lors de la détection de NPM.

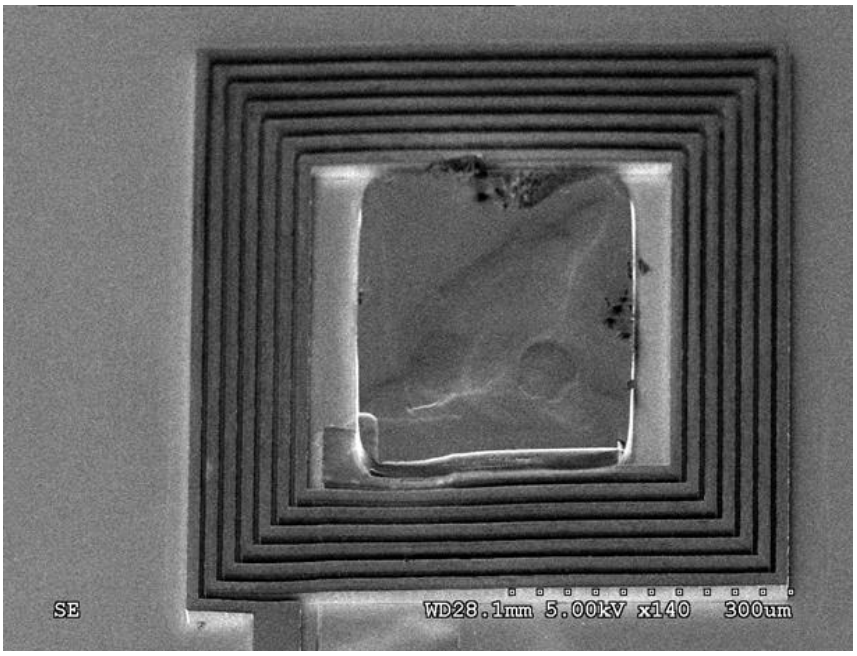


Figure 4.68 : Image MEB montrant un mauvais alignement entre les microbobines de cuivre et le plot en FeNi

Le transfert de branches de FeNi est une étape critique pour l'alignement des éléments du dispositif. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 3 il s'agit de faire croitre les branches de FeNi sur un substrat puis d'aligner ce substrat avec le substrat contenant le reste du dispositif pour réaliser le transfert. Il est évident que la probabilité d'un mauvais alignement est possible entrainant un défaut sur l'ensemble du circuit magnétique, y compris sur le circuit fluidique.

Pour valider ou invalider chaque hypothèse émise pour expliquer les différences entre expérience et simulation, une étude approfondie est nécessaire d'une part à l'aide du logiciel de simulation ANSYS qui permettra de prendre en considération les différents défauts mais également en recherchant des outils qui permettent d'effectuer des sections des dispositifs sans les détruire.

VI - 4 - d - iii - Influence des paramètres extrinsèques au dispositif de détection

Les conditions de fabrication du dispositif et de la disposition des NPM ont été étudiées pour expliquer la différence entre la variation d'inductance simulée et expérimentale. D'autres paramètres « extérieurs » peuvent aussi intervenir.

Par exemple, il est nécessaire de tenir compte des connexions électriques et de la technique de mesure de l'inductance qui demande une électronique de conditionnement intégrée à très faible bruit sur la mesure. En effet le dispositif n'est pas relié directement à l'instrument de mesure. Deux connexions sont réalisées, tout d'abord entre le dispositif et la plaque de PCB et ensuite entre la plaque de PCB et l'instrument de mesure. Ces connexions peuvent générer une résistance supplémentaire qui va venir perturber la mesure d'inductance du dispositif.

VII - Conclusion du chapitre 4

Dans le cas du dispositif de contrôle de NPM, nous avons mis au point un immunodosage complet et novateur entièrement intégré à savoir un laboratoire sur puce afin de détecter un biomarqueur. L'ovalbumine a été utilisée comme biomarqueur en tant que modèle pour la Biodéfense, et les NPM fonctionnalisées pour effectuer le dosage immunologique. Nous avons démontré la valeur ajoutée des microbobines qui, avec un design approprié, a donné de meilleurs résultats que l'utilisation de microtubes et l'utilisation d'un aimant permanent dans un circuit fluidique. La limite de détection utilisant les microbobines millimétriques met en évidence une capture plus efficace (et donc une détection en fluorescence plus précise) que celle utilisant les microbobines centimétriques. De plus, nous avons stabilisé le contrôle des NPM, avec une température biocompatible (<37 ° C), conduisant à une puce microfluidique intégrée optimisée. La limite de détection obtenue (<0,09 nM) avec les microbobines millimétriques reste très compétitive et dans plusieurs cas significativement meilleure que les aux autres techniques standard à l'état de l'art.

Une première approche de la capture de bactéries a été réalisée. L'utilisation des NPM ont permis la capture des bactéries dans un circuit fluidique avec un aimant. Des études de capture de bactéries par des microbobines doivent être réalisées.

Dans le cas du dispositif de détection magnétique, il a été démontré expérimentalement que l'insertion d'un circuit magnétique améliore la détection des NPM. Mais il a été constaté une différence entre les variations d'inductance expérimentale et simulée. Au vu des résultats obtenus, une hypothèse concernant la répartition des NPM dans la chambre microfluidique a été avancée. Une partie des NPM se regrouperait de manière quasi-statique au niveau de la paroi de la chambre fluidique, tandis que l'autre partie serait en mouvement dans le centre de la chambre. En outre différentes hypothèses ont été émises pour expliquer la différence de variation d'inductance. Ces hypothèses ont été réparties en trois groupes, celles concernant les NPM, celles concernant la fabrication du dispositif et celles extérieures au dispositif. Ces hypothèses ont pour certaines montré les limites de la simulation réalisée, qui ne prend pas en compte l'ensemble des contraintes expérimentales. Par exemple, les NPM sont associées à un matériau massif et non à des entités individuelles. Pour déterminer quelles sont les hypothèses impactant le plus fortement la variation d'inductance expérimentale, des simulations et des expériences plus poussées devront être réalisées. Lorsque ces hypothèses auront été validées ou non, des solutions pourront être trouvées afin d'optimiser le dispositif où il sera possible de déterminer la quantité minimale de NPM pouvant être détectée (limite de détection). Le fait de greffer les complexes au fond de la chambre fluidique va nous rapprocher d'avantage de la situation de la monocouche de complexes magnétiques (Figure 4.67). Enfin, des circuits électroniques de mesure peuvent également tirer profit plus efficacement de la variation d'inductance que les appareils utilisés pour ces travaux.

-

VIII - Références

Altintas, Z. et al., 2018. A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, pp.541–548. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.046.

Baglio, S. et al., 2007. Microinductive Signal Conditioning With Resonant Differential Filters : High-Sensitivity Biodetection Applications. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, 56(5), pp.1590–1595.

Barnes, T.J. & Prestidge, C.A., 2000. PEO - PPO - PEO Block Copolymers at the Emulsion Droplet - Water Interface. *Langmuir*, (9), pp.4116–4121.

Belamarche, E. et al., 1997. Patterned Delivery of Immunoglobulins to Surfaces Using Microfluidic Networks. *Science*, pp.1–3.

Boxshall, K. et al., 2006. Simple surface treatments to modify protein adsorption and cell attachment properties within a poly (dimethylsiloxane) micro-bioreactor. , 20, pp.198–201.

Chen, H. et al., 2005. Protein repellant silicone surfaces by covalent immobilization of poly (ethylene oxide). *Biomaterials*, 26, pp.2391–2399.

Cucu, T. et al., 2012. Related to the Detectability in Processed Foodstuffs. *Journal of AOAC international*, (16), pp.149–157.

Delamarche, E. et al., 1998. Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates : Design and Application to Bioassays. *Journal of American Chemical Society*, 7863(2), pp.500–508.

Esipova, N.E., Itskov, S. V & Churaev, N. V, 2002. Stability of Wetting Films of F108 Triblock Copolymer Aqueous Solutions on Quartz. *Colloid Journal*, 64(6), pp.699–705.

Giang, T.P.L., 2013. Support immunologique pour biocapteur : caractérisations physico-chimiques et biologiques.

Hong Ha, C., 2016. *The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications Hong Ha Cao To cite this version : Discipline : physique Microsystèmes pour Biomédical Thèse de doctorat*. Université Paris Saclay.

Iki, N. & Yeung, E.S., 1996. Non-bonded poly (ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 731, pp.273–282.

Ishiguro, R. et al., 2005. Modes of conformational changes of proteins adsorbed on a planar hydrophobic polymer surface reflecting their adsorption behaviors. *Journal of colloid and interface science*, 290, pp.91–101.

Jiang, X. et al., 2011. Evaluation of different micro / nanobeads used as amplifiers in QCM immunosensor for more sensitive detection of E . coli O157 : H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 29(1), pp.23–28. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.059.

Lee, H. et al., 2008. Molecular Dynamics Studies of Polyethylene Oxide and Polyethylene Glycol : Hydrodynamic Radius and Shape Anisotropy. *Biophysical Journal*, 95(4), pp.1590–1599. Available at: http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.133025.

Mattarozzi, M. et al., 2014. Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography e tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in forti fi ed red wine. *Food Control*, 38, pp.82–87. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.015.

Moudgil, B.M. & Prakash, T.S., 1998. Competitive adsorption of polymer and surfactants on solid substrates. *COLLOIDS SURFACES*, 133, pp.93–97.

Neuilly, M., 1998. Limite de détection Limite de détection. In *Techniques de l'ingénieur*.

Nikcevic, I. et al., 2005. Adsorption of Fluorescently Labeled Microbeads on PDMS Surfaces. , 5718, pp.159–167.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R., 2007. *Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth*.

Sugio, S. et al., 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2 . 5 Å resolution. *Protein Engineering*, 12(6), pp.439–446.

Wu, R. et al., 2017. Rapid Killing and Ultrasensitive Detection of Bacteria by a Nano-Decorated Multi-Functional Electrode Sensor. *Biosensors and Bioelectronic*. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.003.

Conclusion générale

Les travaux de thèse rapportés dans ce manuscrit portent sur le développement d'un microdispositif électromagnétique pour la manipulation et la détection ultrasensible de biomarqueurs dans les tests immunologiques.

L'objectif est de créer un laboratoire sur puce qui aura pour but d'intégrer des fonctions de base (contrôle et détection magnétique), pour avoir des mesures sensibles, stables et reproductibles. Les deux fonctions ont été étudiées séparément en réalisant un dispositif de capture et un dispositif de détection. Le dispositif de capture a pour rôle de contrôler le déplacement des nanoparticules magnétiques(NPM) pour les fonctionnaliser afin de créer un complexe biologique encapsulant une molécule cible. La thèse étant rattachée à des applications Défense (Projet AMMIB ANR-DGA), la molécule cible est une molécule modèle pour le domaine de la biodéfense : l'ovalbumine. L'un des moyens les plus fréquents pour contrôler les NPM est l'utilisation de microbobines. Ces dernières peuvent être dimensionnées pour créer le champ magnétique le plus adapté pour manipuler les NPM. Pour détecter un élément biologique, la fluorescence est largement utilisée, mais cette technique ne permet pas une intégration complète du dispositif. Pour cela nous nous sommes tournés vers la variation de l'inductance de microbobines dédiées à la détection.

Dans un premier temps, dans le chapitre 2,nous avons étudié et effectué des simulations par le logiciel ANSYS© du champ magnétique créé par des microbobines dans le but d'étudier la capture des NPM. De nombreuses règles de conception ont pu être déterminées à l'aide de ces résultats. La famille de géométries les plus efficaces pour la capture est composée des bobines. Les géométries de type méandres sont peu efficaces pour la création de champ magnétique. L'utilisation du facteur de mérite permet de conclure qu'il n'existe pas de géométrie « originale ». Les règles « de bon sens » s'appliquent : par exemple, la surface du wafer doit être au maximum remplie avec des spires de cuivre, il ne doit pas y avoir d'espace sans spires au centre de la microbobine. D'autre part, l'espace entre deux spires doit être minimisé : le facteur de remplissage (coefficient de foisonnement pour les enroulements macroscopiques) doit être rendu aussi proche de un que possible.

Dans un second temps, l'étude du dispositif de détection a été réalisée. L'un des objectifs est de chercher à détecter la plus faible quantité de NPM possible. Pour ce faire il a été décidé de s'appuyer sur la variation de l'inductance des microbobines de détection et afin de comprendre facilement les résultats, sur la sensibilité du capteur. Une structure de microbobine originale a été proposée : elle inclut un circuit magnétique quasiment fermé et une chambre microfluidique dans la zone d'entrefer. Une telle géométrie est inédite dans la littérature. Les résultats ont permis d'optimiser la variation d'inductance et définir les dimensions des microbobines. Ces dimensions définies, les étapes clés de fabrication du circuit magnétique ont été simulées et les résultats ont montré pour chaque étape un gain en sensibilité des microbobines.

Dans le chapitre 3 un cheminement de procédés de fabrication a été présenté pour la conception de dispositifs de contrôle du déplacement des NPM et de détection magnétique. Dans cette démarche l'objectif était de respecter au mieux les paramètres obtenus par simulation présentés dans le chapitre précédent.

La fabrication de ces deux dispositifs peut être décrite en trois parties : la fabrication du circuit fluidique qui est présent dans les deux dispositifs, la microbobine de contrôle du déplacement des NPM et le circuit de détection. La fabrication des circuits fluidiques a été rapidement maîtrisée ainsi que les intégrations avec les autres parties du microsystème. La réalisation des microbobines de contrôle des NPM se fait sur trois niveaux. Ces différents niveaux ont permis de fabriquer une microbobine qui en son centre a un maximum de surface de cuivre.

Dans le cas du circuit de détection la principale difficulté fut la réalisation du circuit magnétique. Il a donc été nécessaire de réaliser une étude sur la croissance du FeNi et d'adapter le procédé afin de répondre aux différentes questions posées par cet usage. L'utilisation de leurres a permis de réduire les surépaisseurs présentes sur les bords des bases en FeNi. Le deuxième avantage a été le gain en planéité sur l'ensemble de la base ce qui a permis de réaliser plus facilement les microbobines de détection. Pour améliorer la planéité et protéger électriquement la base en FeNi, le polyimide qui est un polymère photosensible a été utilisé. Pour les étapes de fabrication des microbobines les étapes ont été étudiées pour que le procédé ne conduise jamais à une température maximale de 150°C afin de préserver l'intégrité des couches de FeNi.

La réalisation des branches en FeNi a été largement discutée. L'utilisation d'une méthode de transfert a été choisie en fonction des connaissances présentes et du matériel disponible. Une couche de faible adhérence a été utilisée pour faire croitre les branches en FeNi avant de réaliser le transfert des motifs. Le polyimide a été utilisé une dernière fois pour réaliser des puits au centre des microbobines de détection avant d'ajouter une fine couche de PDMS pour permettre l'assemblage du circuit fluidique.

Dans le chapitre 4, les deux dispositifs fabriqués ont été caractérisés et étudiés. Pour le dispositif de contrôle de NPM, nous avons mis au point un immunoessai complet et novateur entièrement intégré sur un laboratoire sur puce afin de détecter un biomarqueur. Nous avons démontré la valeur ajoutée des microbobines qui, avec un dimensionnement approprié, ont donné de meilleurs résultats que l'utilisation de microtubes et l'utilisation d'un aimant externe au circuit fluidique. La limite de détection(<0,09 nM) utilisant les microbobines millimétriques met en évidence une détection en fluorescence plus sensible que celle utilisant les microbobines centimétriques. De plus, nous avons stabilisé le contrôle de NPM, avec une température biocompatible (<37 °C), conduisant à une puce microfluidique intégrée optimisée.

Une première approche de la capture de bactéries a été réalisée. L'utilisation des NPM a permis de démontrer la capture des bactéries dans un circuit fluidique avec un aimant. Des études de capture de bactéries par des microbobines doivent être réalisées.

Dans le cas du dispositif de détection magnétique, il a été démontré expérimentalement que l'insertion d'un circuit magnétique améliore la détection de NPM. Mais il a été constaté que la différence entre les variations d'inductances expérimentale et simulée est importante. Au vu des résultats obtenus, une hypothèse concernant la répartition des NPM dans la chambre microfluidique été réalisée. Une partie des NPM se regrouperait de manière quasi-statique au niveau de la paroi de la chambre fluidique, tandis que l'autre partie serait en mouvement dans le centre de la chambre. En outre différentes hypothèses ont été émises pour expliquer la différence de variation d'inductance. Ces hypothèses ont pour certaines montré les limites de la simulation réalisée, qui ne prend pas en compte l'ensemble des contraintes et défauts expérimentaux. Par exemple les NPM sont associées à

un matériau massif et non à des entités individuelles. Pour déterminer quelles sont les hypothèses impactant significativement la sensibilité expérimentale du capteur, des simulations et des expériences plus poussées devront être réalisées tenant compte de ces aspects.

Afin d'optimiser les performances du démonstrateur sur puce, il est nécessaire d'identifier les perspectives d'évolution de ce travail.

Pour le dispositif de capture, deux axes peuvent être travaillés, le premier est la fabrication des microbobines de capture entourées d'un circuit magnétique. Le second est l'utilisation de plusieurs microbobines pour réaliser un mélange des NPM (une agitation magnétique locale) au cours des différentes étapes de biofonctionnalisation.

Concernant le dispositif de détection, son optimisation passe essentiellement par une considération des hypothèses discutées dans le chapitre 4, lors de la phase de conception. La validation de ces hypothèses donnera un axe d'amélioration de la sensibilité de détection. Par ailleurs, la fonctionnalisation de la zone de détection permettra de greffer les complexes biologiques à base de NPM. Leur stabilisation spatiale garantira de meilleures conditions de détection.

La dernière perspective pour ce travail concerne la réalisation d'un démonstrateur complet de type laboratoire sur puce qui intégrera les deux fonctions de capture et de détection des nanoparticules magnétiques.

Annexes

I - Annexes du chapitre 2

I - 1 - Simulation des nanoparticules magnétiques

I- 1 - a - Variation de la distance de la couche de nanoparticules magnétiques

La première étude a porté sur l'effet de la distance entre les NPM et le bas du canal. La Figure 5.1 montre que la sensibilité de la microbobine étudiée part de 0.23% lorsque les NPM sont collées à la paroi, à 0.20% lorsqu'elles se situent à 2 µm de la paroi. Une diminution de la sensibilité est observée ce qui est logique car les lignes de champ vont suivre le chemin le plus court pour rejoindre les branches de FeNi. Toutefois il est important de noter que la variation de sensibilité est assez faible 0.03%.

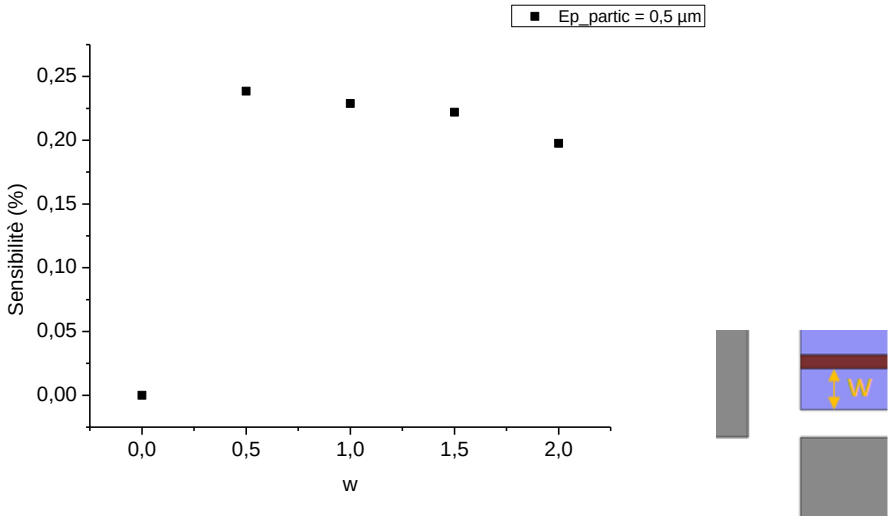


Figure 5.1 : Variation de la sensibilité de la microbobine en fonction de la distance des NPM avec le fond du canal.

I- 1 - b - Différence de sensibilité entre les poutres de section droite et de section inclinée

La suite a été de remplir le canal de NPM afin d'observer la variation de sensibilité pour les deux cas de microbobines (section droite et inclinée). Il est évident que la probabilité que le canal se remplisse de cette manière en microfluidique est infime mais cela permet de connaitre la sensibilité maximale qu'il est possible d'atteindre.

Les résultats sont présentés en Figure 5.2, et lorsque le canal est entièrement rempli la sensibilité atteint les 10 % pour la poutre à section droite et 12 % pour la section à poutre inclinée. La différence entre la poutre à section inclinée et la section droite se fait ressentir de manière plus importante lorsque le canal se remplit.

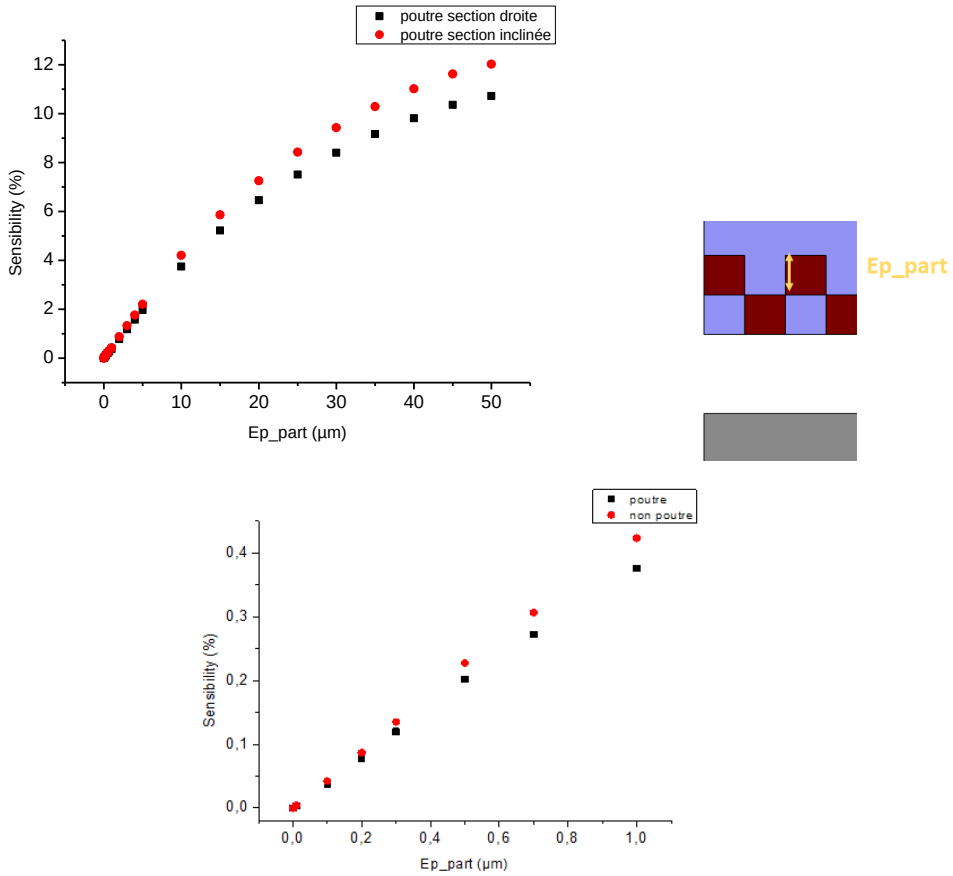


Figure 5.2 : Variation de la sensibilité de la microbobine en fonction de l'épaisseur des NPM pour la poutre en section droite et section inclinée.

I- 1 - c - Sensibilité en fonction des agglomérations des nanoparticules magnétiques

Le point suivant a été de regarder le cas où les NPM se disposeraient d'une manière particulière. Pour des raisons de facilité, les NPM et les espaces vides ont la même largeur et la même épaisseur dans ces simulations. Quatre cas sont présentés :

- Une particule pour deux espaces vide,
- Une particule pour un espace vide,
- Deux particules pour un espace vide,
- Tous les espaces sont considérés comme des NPM.

Les résultats sont présentés en Figure 5.3, il est facile d'observer que plus les NPM sont présentes ou épaisses plus la sensibilité augmente. Il est donc certain qu'il sera possible de différencier la quantité de NPM présentes.

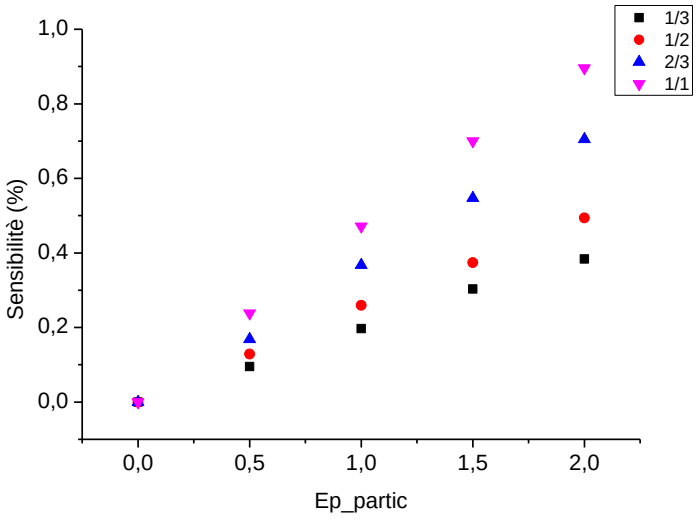


Figure 5.3 : Variation de la sensibilité de la microbobine en fonction de l'épaisseur des NPM pour différentes dispositions des NPM.

Par la suite deux autres modèles ont été simulés pour la croissance des NPM: la croissance en ligne et la croissance en plot, Figure 5.4.

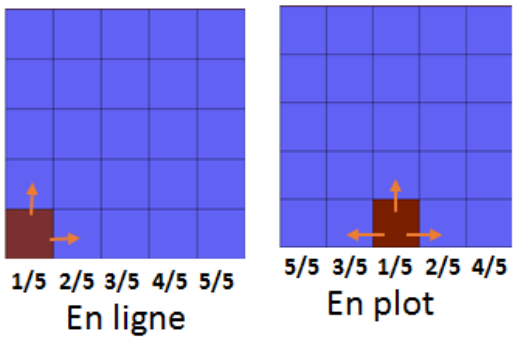


Figure 5.4 : Principe de croissance de NPM en ligne et en plot.

Les résultats présentent une différence relativement faible pour ces deux modèles (Figure 5.5). Toutefois d'un point de vue expérimental, la croissance en plot à la plus grande probabilité de se réaliser. Il a donc été choisi de réaliser l'étude de la croissance en plot avec des particules de différentes tailles, Figure 5.5.

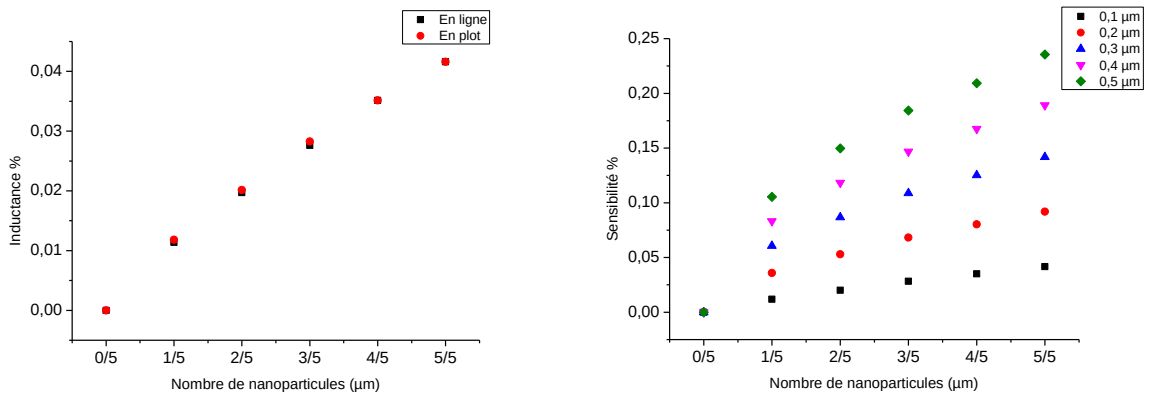


Figure 5.5 : Sensibilité en fonction de la croissance des NPM (A) différence entre la croissance en ligne et en plot (B) différence entre les différentes épaisseurs de NPM.

I- 1 - d - Conclusion

L'étude de la simulation des NPM a permis de calculer la différence de sensibilité pour différents cas de croissance. Bien qu'il soit impossible de prédire comment les NPM vont se comporter dans la zone de détection, ces simulations peuvent servir de base pour l'étude de la détection de NPM à l'aide d'un greffage spécifique sur la surface.

II - Annexes du chapitre 3

II - 1 - Détails des procédés

II- 1 - a - Microbobines de contrôle du déplacement des nanoparticules magnétiques

II - 1 - a - i - Lift-off

Les détails du procédé sont :

- Une déshydratation du substrat sur plaque chauffante à 115°C pendant cinq minutes.
- Une enduction du substrat avec la résine S1818 de MicroChem© à une vitesse de 2500 tours par minute pendant trente secondes pour obtenir une épaisseur de 2,5 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante à une température de 115°C pendant soixante secondes
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 150 mJ/cm².
- La résine insolée est enlever à l'aide du « developer » MF-319 de MicroChem© pendant quarante secondes.
- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le dépôt d'une couche de Titane (10 nm) puis d'une couche de Cuivre (800 nm) est réalisé à l'aide d'un bâti Denton sous les conditions présenté dans le Tableau 5.1 suivant :

	Titane	Cuivre
Pression en Argon (µbar)	8	8
Courant (mA)	200	400
Temps de décapage (s)	600	250
Temps de dépôt (s)	200	1600

Tableau 5.1 : Paramètres de dépôt des couches de titane (10 nm) et de cuivre (800 nm).

- Le « lift-off » est réalisé en plongeant le substrat dans de l'acétone pendant deux heures
- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le substrat est ensuite pongé dans une solution de « chrome etch » diluée dans de l'eau désionisée en proportion un pour quatre pendant cinq secondes.

II - 1 - a - ii - Couche isolante

Les détails du procédé sont :

- Le dépôt de 500 nm silice est réalisé par PECVD, Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition. Les conditions sont : un débit d'azote de 170 sccm, un débit de 2% SiH4/N2 de 399 sccm, un débit de N2O de 1420 sccm, une pression de 550 mT, pendant sept min et trente secondes en basse fréquence (380 kHz/60W).
- Le substrat est ensuite enduit d'une résine TI35ES MicroChem© avec une vitesse de 3000 tours par minute pour une durée de trente secondes pour atteindre une épaisseur de 4 µm.

- Le recuit du substrat se fait sur plaque chauffante à 100°C pendant trois minutes.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 200 mJ/cm².
- La résine insolée est enlever à l'aide du mélange « developer » AZ400K (MicroChem©) et eau désionisée en proportion un pour quatre pendant une minute.
- La couche de silice est gravé par RIE, Reactive Ionic Etching. Les conditions sont un débit de CF4 de 12 sccm et de CHF3 de 50 sccm. La durée de réaction a été étudiée pour obtenir un procédé stable et répétable.
- Finalement, la résine restante est supprimée par un bain d'acétone pendant deux heures.

II - 1 - a - iii - Croissance des microbobines

L'ensemble des détails du procédé sont les suivants :

- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le dépôt d'une couche de Titane (10 nm) puis d'une couche de Cuivre (100 nm) est réalisé à l'aide d'un bâti Denton sous les conditions présenté dans le Tableau 5.2 suivant :

	Titane	**Cuivre**
Pression en Argon (µbar)	8	8
Courant (mA)	200	400
Temps de décapage (s)	600	250
Temps de dépôt (s)	200	200

Tableau 5.2 : Paramètres de dépôt des couches de titane (10 nm) et de cuivre (100 nm).

- Une enduction du substrat avec la résine AZ4562 à une vitesse de 2000 tours par minute (accélération de 6000 tours par minute par seconde) pendant cinq secondes pour obtenir une épaisseur de 20 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante avec une rampe de température de T_{amb} à 90°C pendant une heure.
- Le substrat est laissé au repos à T_{amb} pendant quatre heures.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 350 mJ/cm².
- La résine insolée est enlevée à l'aide du mélange « developer » AZ400K (MicroChem©) et eau désionisée en proportion un pour quatre pendant deux fois deux minutes.
- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- La croissance du cuivre est réalisé à un courant par cm² de -30 mA pour une durée de 30 min avec une agitation du bain de 200 tours par minute et une distance entre électrode de 12 cm.
- Finalement, la résine restante est supprimée par un bain d'acétone pendant deux minutes.

II- 1 - b - Circuit de détection

II - 1 - b - i - Paramètres d'enduction de la résine AZ 40XT

Les paramètres choisis pour l'enduction de la résine AZ 40XT sont :

- Une enduction du substrat à une vitesse de 1000 tours par minute pendant vingt secondes pour obtenir une épaisseur de 60 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant deux minutes puis à 95°C pendant sept minutes.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 850 mJ/cm².
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 75°C pendant vingt secondes puis à 95°C pendant deux minutes quarante.
- La résine insolée est enlevée à l'aide de la solution MIF 326 MicroChem© pendant quatre fois une minute.

II - 1 - b - ii - Lift-off

Les détails du procédé sont :

- Une déshydratation du substrat sur plaque chauffante à 115°C pendant cinq minutes.
- Une enduction du substrat avec la résine S1818 de MicroChem© à une vitesse de 2500 tours par minute pendant trente secondes pour obtenir une épaisseur de 2,5 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante à une température de 115°C pendant soixante secondes
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 150 mJ/cm².
- La résine insolée est enlever à l'aide du « developer » MF-319 de MicroChem© pendant quarante secondes.
- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le dépôt d'une couche de Titane (10 nm) puis d'une couche de Cuivre (800 nm) est réalisé à l'aide d'un bâti Denton sous les conditions présenté dans le Tableau 5.3 suivant :

	Titane	**Cuivre**
Pression en Argon (µbar)	8	8
Courant (mA)	200	400
Temps de décapage (s)	600	250
Temps de dépôt (s)	200	1600

Tableau 5.3 : Paramètres de dépôt des couches de titane (10 nm) et de cuivre (800 nm).

- Le « lift-off » est réalisé en plongeant le substrat dans de l'acétone pendant deux heures
- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le substrat est ensuite pongé dans une solution de « chrome etch » diluée dans de l'eau désionisée en proportion un pour quatre pendant cinq secondes.

II - 1 - b - iii - Couche isolante

Les détails du procédé sont :

- Le dépôt de 500 nm silice est réalisé par PECVD, Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition. Les conditions sont : un débit d'azote de 170 sccm, un débit de 2% SiH4/N2 de 399 sccm, un débit de N2O de 1420 sccm, une pression de 550 mT, pendant sept min et trente secondes en basse fréquence (380 kHz/60W).
- Le substrat est ensuite enduit d'une résine TI35ES MicroChem© avec une vitesse de 3000 tours par minute pour une durée de trente secondes pour atteindre une épaisseur de 4 µm.
- Le recuit du substrat se fait sur plaque chauffante à 100°C pendant trois minutes.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 200 mJ/cm².
- La résine insolée est enlevée à l'aide du mélange « developer » AZ400K (MicroChem©) et eau désionisée en proportion un pour quatre pendant une minute.
- La couche de silice est gravée par RIE, Reactive Ionic Etching. Les conditions sont un débit de CF4 de 12 sccm et de CHF3 de 50 sccm. La durée de réaction a été étudiée pour obtenir un procédé stable et répétable.
- Finalement, la résine restante est supprimée par un bain d'acétone pendant deux heures.

II - 1 - b - iv - Croissance des microbobines

L'ensemble des détails du procédé sont les suivants :

- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,.4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- Le dépôt d'une couche de Titane (10 nm) puis d'une couche de Cuivre (100 nm) est réalisé à l'aide d'un bâti Denton sous les conditions présenté dans le Tableau 5.4 suivant :

	Titane	**Cuivre**
Pression en Argon (µbar)	8	8
Courant (mA)	200	400
Temps de décapage (s)	600	250
Temps de dépôt (s)	200	200

Tableau 5.4 : Paramètres de dépôt des couches de titane (10 nm) et de cuivre (100 nm).

- Une enduction du substrat avec la résine AZ4562 à une vitesse de 2000 tours par minute (accélération de 6000 tours par minute par seconde) pendant cinq secondes pour obtenir une épaisseur de 20 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante avec une rampe de température de T_{amb} à 90°C pendant une heure.
- Le substrat est laissé au repos à T_{amb} pendant quatre heures.
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 350 mJ/cm².
- La résine insolée est enlevée à l'aide du mélange « developer » AZ400K (MicroChem©) et eau désionisée en proportion un pour quatre pendant deux fois deux minutes.

- Un traitement par plasma O_2 est effectué avec comme conditions : une pression de 0,4 mbar, une puissance de 160 Watts et une durée d'une minute.
- La croissance du cuivre est réalisé à un courant par cm² de -30 mA pour une durée de 30 min avec une agitation du bain de 200 tours par minute et une distance entre électrode de 12 cm.
- Finalement, la résine restante est supprimée par un bain d'acétone pendant deux minutes.

II - 1 - b - v - Mise à niveau du polyimide

Les paramètres pour l'enduction du polyimide sont :

- Une enduction du substrat à une vitesse de 1500 tours par minute pendant 30 secondes pour obtenir une épaisseur de 25 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante à 100°C pendant quatre minutes
- Une seconde enduction du substrat à une vitesse de 1500 tours par minute pendant 30 secondes pour obtenir une épaisseur totale de 50 µm.
- Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante à 100°C pendant six minutes
- Les motifs sont obtenus à l'aide de la photolithographie double face EVG 620 avec une dose de 400 mJ/cm².
- Le substrat est ensuite recuit sur plaques chauffantes à 50°C pendant une minute
- La résine insolée est enlevée à l'aide des solutions : HTRD2 pendant 2 minutes et 20 secondes, puis un mélange HTRD2 : RER 600 en proportion 1 :1 pendant 40 secondes et enfin RER 600 pendant une minute.

II - 2 - Etude complémentaire du polyimide LTC 9310

II- 2 - a - État de surface, mesure de l'angle de contact

En mesurant l'angle de contact que font plusieurs liquides avec un surface d'un matériau il est possible d'en calculer son énergie de surface (Figure 5.6)**.** Lorsque le liquide utilisé est l'eau, plus l'angle de contact est faible et plus la surface du matériau est hydrophile.

Il est important de connaitre la mouillabilité du polyimide afin d'envisager son utilisation avec d'autres matériaux. En effet une surface offrant une grande mouillabilité va permettre une meilleure adhérence.

Nous avons donc réalisé des prises d'angles de contact dans différentes conditions en déposant une goutte d'eau distillée sur des échantillons de polyimide « pleine plaque » d'une épaisseur de 12µm. Nous avons notamment comparé l'angle de contact avant et après un traitement au plasma d'oxygène. Les résultats sont reportés dans le Tableau 5.5Tableau 5.5. La mesure des angles de contact a été réalisée une dizaine de fois, puis nous avons pris la moyenne arithmétique.

Angle de contact avant traitement plasma O_2	Angle de contact après traitement plasma O_2	Angle de contact 3 jours après le traitement
65,4	19,8	Angles : 35,7

Tableau 5.5 : Résultats des mesures d'angle de contact avant un après un plasma d'oxygène au délaqueur Pico (Diener) pendant 1 min à 160 W et 0,6 mbar.

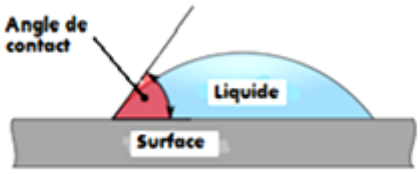


Figure 5.6 : Schéma représentant l'angle de contact entre une goutte de liquide et une surface.

Les plasmas réalisés avec du dioxygène conduisent à la formation de groupements oxydés à la surface du de l'échantillon. La création de ces groupements permet d'augmenter la mouillabilité et en théorie l'adhérence d'autres matériaux avec le polyimide.

On a pu observer que l'angle de contact diminue fortement après le traitement par plasma. On note aussi que le phénomène est réversible, exposé à l'air la couche oxydée va se dégrader et la surface devenir moins hydrophile.

II- 2 - b - Mesure du module d'Young et de la dureté du film de polyimide par micro- indentation

La micro-indentation permet d'obtenir des informations sur propriétés mécaniques d'un matériau dont l'adhérence [9], la dureté ou encore le module d'Young. C'est ces deux derniers paramètres que nous allons tenter de déterminer par cette méthode.

Pour les mesures expérimentales, nous utilisons un indenteur Berkovich de forme pyramide à base triangulaire en diamant. Le système d'acquisition nous permet d'enregistrer les courbes de charge et de décharge en relevant en continu la profondeur de pénétration de la pointe en fonction de la charge appliquée. L'exploitation de ces courbes en utilisant le modèle d'Olivier et Pharr nous permet de déterminer la dureté et le module d'Young du film de polyimide. Les mesures ont été réalisées sur un film de polyimide pleine plaque de 12 µm d'épaisseur (voir les paramètres de mesures Tableau 5.6).

Réglages du matériel :	Paramètre de mesures :
☑ Contact Fn : 25 mN ☑ Vitesse d'approche : 10 µm/min ☑ Dz en gamme fine ☑ Charge dans la gamme standard	☑ Taux d'acquisition : 10,0 [Hz] ☑ Chargement linéaire ☑ Charge maximale : 50,00 mN ☑ Vitesse de charge : 500,00 mN/min ☑ Vitesse de décharge : 500,00 mN/min ☑ Pause : 5,0 s

Tableau 5.6 : Paramètres d'indentation de l'instrument MHTX S/N 01-03494.

Nous avons réalisé 30 indentations successives (Figure 5.7) afin d'obtenir une valeur moyenne du module d'Young et de la dureté. En supposant un coefficient de Poisson de 0,3 (s.u), on obtient en moyenne un module d'Young égal à 15,6 GPa et une dureté de 125 Vikers. Par comparaison, le polyimide Kapton qui est le polyimide le plus connu, possède un module d'Young d'environ 3 GPa.

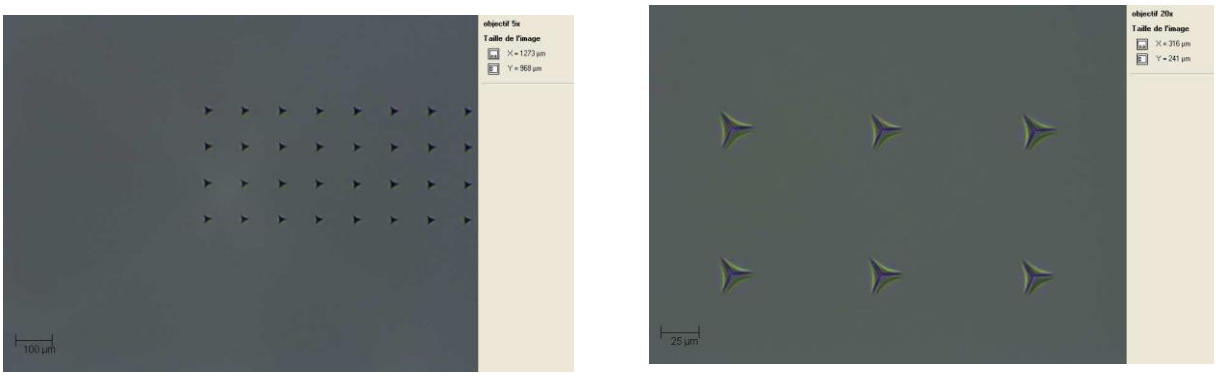


Figure 5.7 : Photos représentant les marques laissées après indentation sur le film de polyimide.

II- 2 - c - Test d'adhérence polyimide/silicium - test de scotch

Le test de scotch est un moyen rapide et simple à mettre en place pour évaluer l'adhérence entre deux matériaux. L'échantillon est préalablement fixé sur une plaque en plexiglas. On colle un morceau de scotch sur la surface à caractériser et on le décolle d'un coup un maintenant un angle d'arrachement de 90°.

Nous avons cherché ici à caractériser qualitativement l'adhérence du film de polyimide à un substrat de silicium poli. L'épaisseur du film est de 12 µm, il a été enduit « pleine plaque » sans traitement préalable du wafer de silicium. Le test a été réalisé avec des scotchs (double et simple face de différentes marques). Pour chacune des mesures, le film est resté intact, on en déduit que l'adhérence entre les scotchs (scotch Crystal 3M simple face, scotch 3M double face) et le polyimide est inférieure à l'adhérence polyimide/silicium.

II - 3 - Rapide explication de l'EDX

La rencontre entre le faisceau électronique incident et les atomes de la surface de l'objet génère des photons X, captés par un détecteur. Un élément donné émet des photons X caractérisés par leur énergie (et par leurs couches électroniques) car chaque émission correspond à une transition électronique entre niveaux de cœur de l'atome. Le traitement des signaux permet de trier les photons par énergie, d'attribuer chaque photon détecté à un élément chimique (analyse qualitative) mais aussi de compter les photons en fonction de leur énergie (en eV). Il est donc possible de procéder à une analyse chimique quantitative localisée de la surface d'un échantillon.

III - Annexes du chapitre 4

III - 1 - Préparation des solutions de Polyéthylène oxyde et de sérum d'albumine bovin

III- 1 - a - Solution de Polyéthylène oxyde (0,2%)

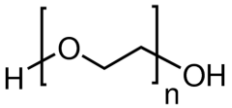


Figure 5.8 : Représentation du Polyéthylène oxyde.

D'un point de vue structurel, la chaine du polymère est représentée par la formule : $(—CH2CH2O—)_n$. En solution le PEO elle est aussi connue comme le Polyéthylène glycol (PEG) ou le Polyoxyéthylène (POE) (Alcantar, Aydil, & Israelachvili, 2000).

Une solution stock de PEO est préparée en ajoutant progressivement 0,1 gramme de poudre de PEO (de Sigma Aldrich) dans 45 mL d'eau désionisée dans un erlenmeyer. L'eau est préchauffée à 40-50°C et est mélangée à l'aide d'un barreau aimanté. Une fois l'ensemble du PEO ajouté, l'erlenmeyer est fermé et est chauffé à 80°C pour quinze minutes. Une solution de PEO acide ou neutre peut être préparée en ajoutant 0,5 mL d'une solution de 1M d'HCl ou d'eau dans 4,5 mL de solution stock de PEO. La solution de PEO acide peut être utilisée pendant deux jours mais il est plus intéressant de l'utiliser dans les minutes ou heures suivantes. Après deux jours en solution, la solution devient moins visqueuse. Cela est probablement dû à la formation de courtes chaines de polymère à cause de l'hydrolyse acide du PEO (Preisler & Yeung, 1996).

III- 1 - b - Solution de sérum d'albumine bovin

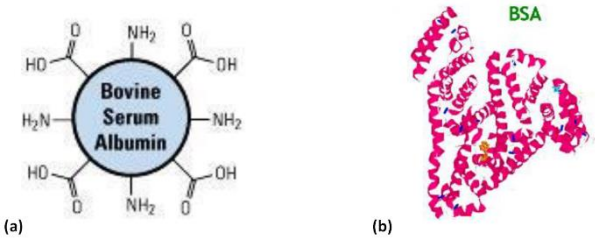


Figure 5.9 : (a) Représentation schématique et (b) structure quaternaire de la BSA.

La BSA est une chaine polypeptidique simple qui est composée de 583 acides aminés sans glucides et un poids moléculaire de 66 kDa (Sugio et al., 1999). La solution stock de BSA 2% est préparée en dissolvant 2 grammes de poudre de BSA (Sigma Aldrich) dans 98 mL d'eau désionisée ou d'une solution PBS 1x (pH 7,4). Dans le cas général, la BSA produit de la mousse, il est nécessaire de mouiller la BSA correctement juste avant le mélange doux de la solution. La solution stock de BSA peut être conservée au maximum six mois au réfrigérateur à 4°C, mais il est préférable de l'utiliser dans le premier ou deuxième mois après fabrication.

III - 2 - Détails du protocole de la création d'un complexe d'immunodosage de type ELISA

III- 2 - a - Nettoyage des nanoparticules magnétiques avec une solution de soude

La première étape est de nettoyer : il faut prendre une faible quantité (10 µL) de solution de NPM de leur solution stock et de la mélanger à une solution de soude (1 mL) dans un microtube de 1,.5 mL. Cette étape permet de rincer la solution des éléments permettant la stabilité et la non-agrégation des NPM. Le mélange est laissé sur une plaque à agitation dans un réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures permettant une agitation continue de la solution.

III- 2 - b - Principe de l'étape de rinçage

A la fin du temps écoulé, le tube est placé contre une barre aimantée permettant de séparer les nanoparticules de la solution. Le temps nécessaire pour capter l'ensemble des NPM présentes en solution dépend de la puissance de l'aimant et de la taille des nanoparticules. Une fois les NPM bloquées la solution est enlevée et une étape de rinçage est réalisée à l'aide de la solution de PBS 1x. Le rinçage est réalisé trois fois au minimum afin d'éliminer les risques de produits non voulus sur les étapes suivantes. Ces étapes de rinçage sont très importantes et sont réalisées après chaque étape ayant pour but l'ajout d'un élément.

III- 2 - c - Greffage des anticorps primaires à l'aide des solutions de EDC/NHS

L'étape suivante est le greffage des anticorps primaires sur les nanoparticules magnétiques pour cela des solutions d'EDC et de NHS sont préparées. Pour chacune des solutions, 2 mg de poudre sont pesés puis mélangés avec 200 µL de solution de PBS 1x. Les deux solutions sont ajoutées à l'Eppendorf contenant les NPM. Puis la solution d'anticorps primaires (10 µL) est ajoutée. L'ensemble est placé sur une plaque à agitation dans un réfrigérateur à 4°C pendant toute une nuit (environ 12 heures). Cette étape terminée les étapes de rinçage sont effectuées.

III- 2 - d - Protection des espaces libres sur les nanoparticules magnétiques par la solution de BSA 2%

Ensuite la solution de BSA 2% décrite dans l'annexe III- 1 - b - est utilisée, un volume de 500 µL est prélevé et est ajouté à l'Eppendorf. La solution est placée dans une roue tournante pendant 2 heures pour assurer une bonne agitation. Le temps d'incubation terminé, les étapes de rinçage sont réalisées.

III- 2 - e - Ajout du biomarqueur : l'ovalbumine

La quatrième étape est l'ajout d'ovalbumine. Cette étape est importante car c'est ici que l'on va déterminer la quantité de biomarqueur à doser. Plus la concentration d'ovalbumine sera importante, plus il sera simple de créer des complexes, et inversement. Dans le but de valider le complexe d'immunodosage de type ELISA, il est logique d'utiliser une concentration élevée, sans toutefois viser une concentration trop importante. La concentration d'ovalbumine est calculée à partir de la masse

d'ovalbumine prélevée et de la dilution utilisée à l'aide de la solution de PBS 1x. La solution est placée dans une roue tournante pendant 2 heures pour assurer une bonne agitation. Le temps d'incubation terminé, les étapes de rinçage sont réalisées.

III- 2 - f - Ajout des anticorps secondaires pour l'encapsulation de l'ovalbumine

La quatrième étape est l'ajout de l'anticorps secondaire qui vient encapsuler l'ovalbumine. Pour cela 10 µL de solution d'anticorps secondaires sont prélevés et mélangés à 190 µL de solution de PBS 1x. L'ensemble de la solution est ajoutée à l'Eppendorf et la solution est placée dans une roue tournante pendant 2 heures. Le temps d'incubation terminé, les étapes de rinçage sont réalisées.

III- 2 - g - Ajout des anticorps de détection

La dernière étape est l'ajout de l'anticorps de détection. Comme énoncé précédemment un fluorochrome est présent sur cet anticorps. De par la présence de ce dernier, il est nécessaire d'effectuer cette étape en protégeant au maximum la solution contenant les anticorps. En effet en laissant les anticorps à la lumière du jour, la fluorescence va être activée et diminuer en intensité voire s'éteindre. Il ne sera donc plus possible de l'observer au microscope à fluorescence. Un volume de 10 µL est prélevé dans la solution stock et est mélangé à 190 µL de solution de PBS 1x. Une fois ce mélange ajouté à l'Eppendorf, ce dernier est recouvert d'aluminium afin de bloquer la lumière. La solution est placée dans une roue tournante pendant 2 heures.

Le temps d'incubation effectué, les étapes de rinçage sont effectuées. Dans ce cas le nombre d'étapes passe de trois à six ~~fois~~ afin de supprimer tout anticorps fluorescent n'appartenant pas à un complexe biologique. Cette précaution est réalisée afin de pouvoir interpréter les résultats de façon sûre et certaine.

III - 3 - Préparation des nanoparticules magnétiques pour le protocole de capture des bactéries

III- 3 - a - Nettoyage des nanoparticules magnétiques

La première étape est de nettoyer : il faut prendre une faible quantité (10 µL) de solution de NPM de leur- solution stock et de la mélanger à une solution de soude (1 mL) dans un microtube de 1,5 mL. Cette étape permet de rincer la solution des éléments permettant la stabilité et la non-agrégation des NPM. Le mélange est laissé sur une plaque à agitation dans un réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures permettant une agitation continue de la solution.

III- 3 - b - Principe de l'étape de rinçage

L'étape précédente finie, le tube est placé contre une barre aimantée permettant de séparer les nanoparticules de la solution. Le temps nécessaire pour capter l'ensemble des NPM présentent en solution dépend de la puissance de l'aimant et de la taille des nanoparticules.

A partir du moment où les NPM sont bloquées, la solution surnageante est enlevée et une étape de rinçage est réalisée à l'aide de la solution de MES (pH = 6.2). Le rinçage est réalisé trois fois au

minimum afin de d'éliminer les risques de produits non voulue sur les étapes suivantes. Ces étapes de rinçages sont très importantes et sont réalisées après chaque étape.

Pour être sûr d'obtenir une solution avec des NPM disperse, une étape de sonication peut être réalisée.

III- 3 - c - Ajout des solutions de EDC/NHS

L'étape suivante est l'ajout des solutions d'EDC et de NHS. Pour chacune des solutions, 2 mg de poudre sont pesés puis mélangés avec 200 µL de solution de PBS 1x. Les deux solutions sont ajoutées à l'Eppendorf contenant les NPM. Une fois les solutions ajoutées, l'Eppendorf est positionnée sur une roue tournante pendant trente minutes permettant un mélange de la solution.

III- 3 - d - Ajout des anticorps anti-E. Coli

Après les étapes de rinçage, la solution d'anticorps anti-E. Coli (10 µL) est ajoutée. L'Eppendorf est à nouveau placé sur la roue tournante pendant 2h30. Cette étape terminée les étapes de rinçage sont effectuées et les NPM sont prêtes à être utilisées.

III - 4 - Rapide présentation de l'intérêt du greffage par silanisation

Pour réaliser la détection de NPM, il est nécessaire de les bloquer dans une zone de détection. En effet si le complexe créé n'est pas fixé, il sera impossible de différencier les NPM attachées au complexe et celles libres.

Pour greffer les complexes à base de NPM sur la surface du biocapteur, un des principes qui peut être utilisé est la silanisation. Elle permet, en effet de greffer des anticorps à une surface de silicium, afin de construire un complexe immunologique de capture de NPM (Figure 5.10).

La réalisation de la silanisation sur PDMS est un travail à réaliser pour intégrer cette partie dans le dispositif de détection.

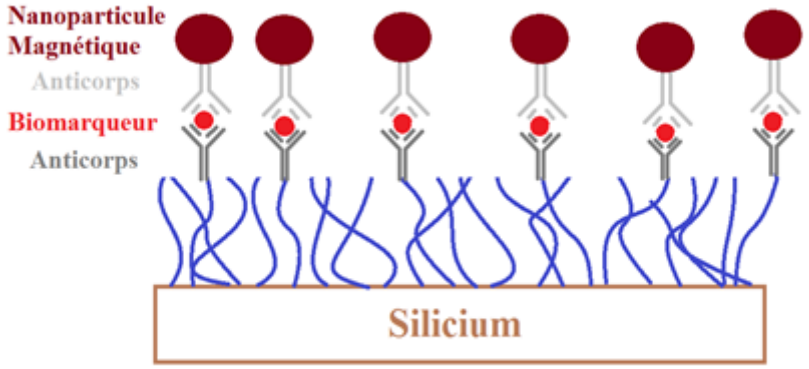


Figure 5.10 : Silanisation d'un substrat de silicium suivi d'un immunocomplexe pour réaliser une détection magnétique.