



HAL
open science

Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique grâce à la microscopie non-linéaire

Théo Travers

► **To cite this version:**

Théo Travers. Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique grâce à la microscopie non-linéaire. Physique mathématique [math-ph]. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0075 . tel-04096191

HAL Id: tel-04096191

<https://theses.hal.science/tel-04096191>

Submitted on 12 May 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Physique

Par

Théo TRAVERS

**Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique
grâce à la microscopie non-linéaire**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 12 décembre 2022
Unité de recherche : Laboratoire MOLTECH-Anjou UMR CNRS 6200

Jury :

Président	Guillaume BROTONS	Professeur des Universités - Le Mans Université
Rapporteurs	Jérôme PLAIN	Professeur des Universités - Université de Technologie de
	Martinus WERTS	Chargé de Recherche HDR - ENS Rennes
Examineur	Abdel Illah EL ABED	Maître de conférences HDR - Université Paris-Saclay
Directeur de thèse	Denis GINDRE	Professeur des Universités - Université d'Angers
Co-directeur de thèse	Matthieu LOUMAIGNE	Maître de conférences HDR - Université d'Angers



Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique grâce à la microscopie non-linéaire

Auteur :

Théo TRAVERS

Equipe SAMSON, Lab. MOLTECH-Anjou UMR CNRS 6200, Université d'Angers.

Directeurs de thèse :

Denis GINDRE, Matthieu LOUMAIGNE

Equipe SAMSON, Lab. MOLTECH-Anjou UMR CNRS 6200, Université d'Angers.

Date de soutenance : Lundi 12 décembre 2022



Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique grâce à la microscopie non-linéaire

Auteur :

Théo TRAVERS (Equipe SAMSON, Lab. MOLTECH-Anjou UMR CNRS 6200, Université d'Angers.)

Superviseurs :

Denis GINDRE, Matthieu LOUMAIGNE (Equipe SAMSON, Lab. MOLTECH-Anjou UMR CNRS 6200, Université d'Angers.)

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mes deux directeurs de thèse : Denis Gindre, pour cette opportunité de thèse, mais également de m'avoir fait confiance durant ces trois ans. Il a également fait preuve d'une grande ouverture d'esprit face aux nouveaux sujets abordés en y ajoutant son expertise remarquable, notamment dans le système de microscopie non-linéaire qu'il a développé depuis plusieurs années. Matthieu Loumagne, pour avoir fait naître chez moi une vocation dans la recherche depuis mes années de licence jusqu'à maintenant. Je me dois également de mentionner qu'il a été et reste pour moi un esprit remarquable pour sa vision novatrice et humble en même temps permettant d'aller de l'avant efficacement même dans la difficulté. Le fait d'avoir deux directeurs investis et qui m'ont toujours placé au centre des réflexions durant ces trois années représente beaucoup pour le travail réalisé. Durant ces trois années, je peux remercier plusieurs collègues qui se sont démarqués grâce à leur pédagogie et leur méthodologie. Notamment Vincent Colin, ancien doctorant doté d'une qualité scientifique théorique remarquable qui m'a souvent aidé à appréhender des problèmes complexes. Également Henry Piel pour sa rigueur scientifique et sa persévérance qui représentent deux qualités indispensables en recherche.

De manière générale, je souhaite remercier de nombreux professeurs que j'ai rencontrés durant mon cursus débuté à l'IUT de Carquefou puis terminé à l'université d'Angers au sein du Master Photonique, Signal, Imagerie. En particulier Stéphane Chaussedent pour ses qualités pédagogiques et humaines qui lui permettent reconnaître le potentiel des étudiants. Je tiens également à remercier l'équipe de chimistes du laboratoire pour avoir permis des collaborations, mais également de m'avoir aidé dans certaines réflexions. Également, un grand merci aux équipes techniques et administratives qui réalisent toujours un travail de l'ombre indispensable. L'équipe de techniciens s'est montrée d'une grande aide pour concevoir les supports d'expériences durant ces trois ans, pour cela, je les remercie. Mes remerciements vont finalement à l'ensemble du laboratoire MOLTECH-Anjou et notamment à Régis Barillé pour m'avoir accueilli dans l'équipe Samson.

Je suis très reconnaissant envers Valentina Emiliani, directrice de recherche CNRS à l'Institut de la Vision avec qui j'ai pu discuter au cours de deux conférences et dont les conseils ont toujours été très pertinents et efficaces.

Une mention spéciale est attribuée aux membres du jury envers qui je suis reconnaissant d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Pour finir, je voudrais remercier mes proches et amis qui ont permis de maintenir une bonne humeur et calmer les mauvaises quand il le fallait. Concernant le laboratoire, merci à Julien Billon, Clément Drou, Aline Makhoutah et Slava Shkirskiy d'être des personnes sur qui on peut compter. En dehors du laboratoire, c'est notamment au travers du kayak que j'ai pu compter sur des personnes qui m'ont toujours permis de relativiser et embellir mon quotidien : un grand merci à la Team Remi Peté, Pauline Freslon et Phantom. Merci également à ma famille proche qui m'a aidé à atteindre

CHAPITRE 0. REMERCIEMENTS

mes objectifs et plus particulièrement à Pam, ma compagne, qui m'a beaucoup soutenu pendant ces trois ans et qui a même déménagé depuis les Pays-Bas pour venir vivre avec moi.

Table des matières

Remerciements	iii
Liste des symboles	vii
Introduction	xi
1 La microscopie non-linéaire au service du suivi de nano-objets en conditions maîtrisées	1
1.1 L'outil microfluidique (utilisation et fabrication)	1
1.1.1 Origine et principe de la microfluidique	2
1.1.2 Théorie des écoulements microfluidiques	3
1.1.3 Applications	8
1.1.4 La microfabrication de systèmes microfluidiques	12
1.2 Suivi de mouvements de particules	17
1.2.1 Mouvement brownien	18
1.2.2 Nanoparticle tracking analysis	21
1.2.3 Redistribution de fluorescence après photoblanchiment	25
1.2.4 Profil de diffusion	26
1.2.5 Diffusion dynamique de la lumière	26
1.2.6 Microscopie dynamique différentielle	31
1.2.7 Spectroscopie de corrélation des fluctuations	34
1.3 Microscopie non-linéaire	35
1.3.1 Brève histoire de la microscopie	35
1.3.2 Microscopie de fluorescence à un photon	36
1.3.3 Les effets optiques non-linéaires	37
2 Présentation du montage expérimental	45
2.1 Montage optique en champ clair et SHG/TPEF	45
2.1.1 Le laser	45
2.1.2 Système de balayage	47
2.1.3 Détection	47
2.1.4 Cohabitation du dispositif de fluorescence et de SHG	47
2.1.5 Lentille de scan	49
2.1.6 Contrôle de la polarisation	51
2.2 Interface commandée avec LabVIEW	52

TABLE DES MATIÈRES

2.2.1	Paramètres de scan	52
2.2.2	Accumulation d'images	54
2.3	Système microfluidique	55
2.3.1	Support de puces microfluidiques	55
2.3.2	Connections pneumatiques et fluidiques	56
2.3.3	Système de contrôle des flux	59
3	Conception de puces microfluidiques	61
3.1	Procédé de fabrication accessible	61
3.2	Méthode de microfabrication	62
3.2.1	Modèles numériques	62
3.2.2	Préparation des substrats et des films photosensibles	64
3.2.3	Processus d'insolation par écran LCD monochromatique programmable	66
3.2.4	Développement d'un moule	67
3.2.5	Création d'une puce microfluidique	68
3.3	Résultats et applications	69
3.3.1	Résolution de microfabrication et formes	69
3.3.2	Applications	72
4	Suivi individuel de particules en solution grâce à la microscopie non-linéaire	75
4.1	La microscopie non-linéaire pour des études dynamiques	75
4.2	Optimisation des méthodes pratiques et techniques pour une étude dynamique	77
4.2.1	Optimisation du balayage des miroirs de scan	77
4.2.2	Optimisation de l'enregistrement des données en temps réel	78
4.2.3	Choix de l'objectif du microscope	79
4.2.4	Cadence d'acquisition et résolution des images	81
4.3	Les outils d'analyse d'images et estimateurs de coefficient de diffusion	85
4.3.1	Logiciel de traitement des images	86
4.3.2	Adaptation de l'estimation du coefficient de diffusion	91
4.4	Résultats	96
4.4.1	Mesures de l'erreur de localisation et du rapport signal/bruit	96
4.4.2	Mesures des coefficients de diffusion/rayon des particules fluorescentes	97
4.4.3	Mesures du coefficient de diffusion/rayon des cristaux émetteurs de SHG	100
5	Microscopie à feuille de lumière en canal microfluidique	103
5.1	Apport de la microscopie à feuille de lumière	103
5.2	Microscopie à feuille de lumière intégrée à une puce microfluidique	105
5.2.1	Champ sombre en canaux microfluidiques	105
5.2.2	Utilisation d'une fibre optique comme micro-lentille cylindrique	105
5.2.3	Mise en place manuelle du système fibre/lentille	106
5.2.4	Profils de la feuille de lumière	107
5.2.5	Calculs d'optique matricielle	109
5.3	Caractérisation des feuilles de lumière	114
5.3.1	Caractérisation par le nombre de particules	116
5.3.2	Caractérisation par la moyenne des intensités pondérées	117
5.3.3	Résultats en configuration sans saut d'indice	120
5.3.4	Résultats en configuration avec saut d'indice	123

TABLE DES MATIÈRES

5.4	Application au suivi de particules en diffusion	124
5.4.1	Profondeur du champ de détection	125
5.4.2	Méthode de la somme des gaussiennes normalisées	126
5.4.3	Résultats	127
5.5	Perspectives d'améliorations	128
6	Étude du phénomène d'agrégation en régime microfluidique	131
6.1	Dynamique d'agrégation et de cristallisation	131
6.1.1	L'état cristallin	131
6.1.2	Processus de cristallisation	133
6.1.3	L'agrégation	138
6.2	Étude du phénomène AIE en régime microfluidique	141
6.2.1	Résultats qualitatifs du <i>flow-focusing</i>	142
6.2.2	Réalisations pratiques de conditions microfluidiques stables	143
6.3	Le "zero-flow" au service du suivi de particules	145
6.3.1	Vanne de coupure On/Off	146
6.3.2	Boucle de retour	147
6.3.3	<i>Zero-flow</i>	149
	Conclusion et perspectives	151
	Annexe 1 : Algorithme de traitement des données de TrackMate	163
	Annexe 2 : Tracé de faisceaux gaussiens dans l'approximation paraxiale	165
	Annexe 3 : Articles publiés	169

Liste des abréviations

3D	Trois dimensions
ACQ	Aggregation-Caused Quenching - Extinction causée par agrégation
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIE	Aggregation-Induced Emission - Émission induite par agrégation
BBO	Béta Borate de Baryum
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor - Semiconducteur d'oxyde de métal complémentaire
CVE	Covariance based Estimator - Estimateur de covariance
DDM	Differential Dynamic Microscopy - Microscopie dynamique différentielle
DFG	Difference Frequency Generation - Génération de la fréquence différence
DLS	Dynamic Light Scattering - Diffusion dynamique de la lumière
DLW	Direct Laser Writing - Écriture directe par laser
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOF	Depth Of Field - Profondeur de champ
FWHM	Full Width at Half Maximum - Largeur à mi-hauteur
GPC	Gas Phase Chromatography - Chromatographie en phase gazeuse
HPS	Hexaphenylsilole
KTP	Titanyl phosphate de potassium
LAP	Linear Assignment Problem - Problème d'assignement linéaire
LCD	Liquid Crystal Display - Écran à cristaux liquides
LED	Light Emitting Diode - Diode électroluminescente
LSM	Light Sheet Microscopy
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
MSD	Mean Squared Displacement
ON	Ouverture Numérique

LISTE DES ABRÉVIATIONS

OPM	Oblique Plane Microscopy
PCI	Peripheral Component Interconnect
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEEK	Polyétheréthercétone
PEG	Polyethylene glycol
PET	Polytéraphtate d'éthylène
PM	Photomultiplicateur
PSF	Point Spread Function - Fonction d'étalement du point
RTSI	Real-Time System Integration
RVB	Rouge Vert Bleu
SFG	Sum Frequency Generation - Génération de la fréquence somme
SHG	Second Harmonic Generation - Génération de second harmonique
SNR	Signal-Noise Ratio
SPIM	Selective Plane Illumination Microscopy - Microscopie à plan d'illumination sélectif
SPT	Single Particle Tracking
TPA	Two-Photon Absorption - Absorption à deux photons
TPFE	Two-Photon Excitation Fluorescence - Excitation de fluorescence à deux photons
TTL	Transistor-Transistor Logic
UV	UltraViolet
WPM	Wave Propagation Method

Introduction

Dans l'histoire de l'homme moderne, les outils et les technologies subissent depuis longtemps des miniaturisations et permettent d'observer des échelles de tailles de plus en plus petites afin d'améliorer la compréhension du monde qui nous entoure. Cette motivation nous mène malgré nous toujours plus loin dans les échelles d'observations d'un côté ou de l'autre du spectre. L'étude de ces échelles de grandeurs nous amène à un constat général qui est que tout semble fonctionner en harmonie sans que ces différentes échelles soient sensibles aux mêmes forces physiques. Afin d'appréhender ces grandeurs, l'optique a su depuis des années se faire une place d'excellence pour expliquer et étudier de nombreux phénomènes physiques, avant même que la nature propre de la lumière soit découverte. Elle fut dans un premier temps considérée comme un flux de particules qui a permis d'expliquer les phénomènes d'optique géométrique. Ce modèle s'est néanmoins heurté à des difficultés pour expliquer les effets d'interférences. Ce n'est qu'avec les travaux de Maxwell en 1873 que la nature électromagnétique de la lumière a été révélée, puis vérifiée avec les expériences de Hertz en 1888, pour donner naissance à l'optique ondulatoire. Finalement, Louis de Broglie a unifié l'aspect corpusculaire et ondulatoire de la matière (s'appliquant également à la lumière) en 1924 pour former la théorie de la mécanique ondulatoire. Ces découvertes ont alimenté en parallèle le domaine de la microscopie optique. Cet outil, utilisant la lumière comme source d'énergie, vise à rendre visible ce qui ne l'est pas pour l'œil nu, autrement dit, il permet de réaliser une image grossie et nette de l'objet d'étude, permettant ainsi de s'affranchir de la limite de résolution de l'œil. Néanmoins, la microscopie optique est inlassablement confrontée à la limite de diffraction qui empêche d'observer directement un objet dont la taille avoisine la longueur d'onde d'excitation. Ce n'est qu'à l'avènement de la physique quantique que la lumière est étudiée sous un nouvel aspect qui permet de comprendre son interaction avec la matière. Ceci explique les phénomènes de fluorescence et engendre également l'invention du laser qui est un faisceau de lumière cohérente et amplifiée. Cette découverte a révolutionné de nombreux domaines grâce à sa puissance confinée sur de très petits volumes, notamment la microscopie avec l'arrivée des microscopes à balayage laser qui utilisent des impulsions ultra-courtes pour générer de très fortes intensités permettant d'accéder aux effets non-linéaires de certains matériaux. Avec l'apparition de la microscopie non-linéaire, la résolution axiale a été largement améliorée, mais apporte aussi une meilleure biocompatibilité pour beaucoup d'échantillons vivants en utilisant une source d'excitation beaucoup moins énergétique ($\lambda > 700 \mu m$). Pour certains types de matériaux appelés harmonophores, l'utilisation de la microscopie non-linéaire est indispensable pour exciter le phénomène de génération de second harmonique. Toujours dans un esprit de réduction de l'échelle d'étude des phénomènes physiques, la microfabrication de systèmes complexes s'est largement développée en même temps que les résolutions des outils de mesures et d'observation s'amélioraient. C'est notamment le cas de la microfluidique qui est une discipline apparue aux alentours de 1990 qui permet la manipulation de fluides au travers

de canaux mesurant d'une dizaine à plusieurs centaines de micromètres. Grâce à ces dimensions réduites, de nombreux phénomènes physiques, comportant des dépendances fortes avec le volume de fluide, deviennent inférieurs, voire négligeables face aux phénomènes dépendants de la surface. L'outil microfluidique offre alors des conditions d'expériences qui ouvrent la porte sur l'étude de nombreux phénomènes chimiques, biologiques ou physiques qui jusqu'ici étaient impossibles ou très complexes à étudier. C'est notamment le cas des processus d'agrégation ou de cristallisation qui sont deux phénomènes encore mal compris pour lesquels la microfluidique donne lieu à une approche nouvelle qui s'appuie sur son régime d'écoulement pour permettre de localiser, reproduire et suivre les réactions dans le temps. Malgré le développement d'outils de mesure de grande résolution spatiale tels que la microscopie non-linéaire, l'observation de phénomènes dynamiques dans le temps ne permet pas toujours de résoudre les entités étudiées. Pour pallier cela, de nombreuses méthodes indirectes existent afin de s'affranchir du besoin de résolution pour caractériser les objets en mouvement.

Ce travail de thèse s'intéresse à l'adaptation de la microscopie non-linéaire pour l'étude de nano-objets lumineux en diffusion dans un liquide afin de déterminer leurs dimensions grâce à leur mouvement brownien. L'utilisation de la microscopie à balayage pour étudier des échantillons en mouvement nécessite un ensemble d'optimisations et de compromis qui permettent d'atteindre des cadences d'acquisition élevées pour un système à balayage. Cette méthode de caractérisation est couplée à l'utilisation de l'outil microfluidique qui est développé et fabriqué dans notre laboratoire afin d'élaborer les géométries souhaitées. L'association de la microscopie non-linéaire avec l'élaboration d'une expérience microfluidique comportant des géométries spécifiques permet d'étudier l'effet d'agrégation de molécules grâce à leur signal de fluorescence.

Afin de décrire le travail réalisé, le manuscrit est organisé en six chapitres pour graduellement présenter les tenants et les aboutissants des nombreux domaines menant à la finalité de cette étude. Le premier chapitre passe en revue l'historique ainsi que les approches théoriques associées à chaque domaine physique que les expériences regroupent.

Ce premier chapitre aborde l'utilisation de la microfluidique en tant qu'outil expérimental, justifié par ses propriétés d'écoulements laminaires et reproductibles qui rendent beaucoup plus simples de nombreuses expériences habituellement complexes à des échelles macroscopiques. Une partie détaille également la microfabrication de puces microfluidiques qui intéresse de nombreux laboratoires afin d'être indépendant et autonome dans l'optimisation des configurations géométriques. Afin de se rendre compte des capacités de cet outil, un certain nombre d'applications sont présentées pour conclure cette partie. La partie suivante de ce chapitre s'intéresse aux différentes méthodes de caractérisation existantes qui permettent d'estimer le coefficient de diffusion d'une espèce en suspension au sein d'un fluide. Le mouvement brownien étant le support de ces méthodes pour estimer le coefficient de diffusion, une attention particulière lui est apportée afin d'appréhender le phénomène pour comprendre la manière dont on peut enregistrer son comportement. Pour finir ce chapitre théorique, la microscopie et particulièrement la microscopie non-linéaire sont présentées afin d'introduire l'outil de mesure utilisé pour les différentes expériences. Une approche générale de la microscopie est tout d'abord présentée afin d'établir les bases qui servent à la présentation de la microscopie non-linéaire qui suit. Cette section est importante pour comprendre la problématique de ce travail de thèse autour de l'approche contre-intuitive d'imager des effets dynamiques à une cadence vidéo alors que la microscopie non-linéaire utilise un système de balayage.

Le deuxième chapitre est plus descriptif et présente le montage expérimental. Celui-ci est compartimenté en plusieurs modules, chacun permettant de contrôler une étape de l'expérience. La première partie présente la cohabitation du microscope à balayage avec le microscope à champ clair

en prenant soin de détailler les composants permettant le fonctionnement des différents types de microscopie. La deuxième partie détaille l'interface utilisée afin de contrôler les séquences d'acquisitions liées au système de balayage du laser et pour l'enregistrement des données provenant du détecteur pour former des images. Une troisième partie détaille le système microfluidique qui est constitué d'une multitude de composants nécessitant une attention particulière quant à leur adaptation aux matériels externes. Le fonctionnement du système microfluidique nécessite également un contrôle muni d'une interface agissant sur les pressions, débit, vannes, etc qui est décrite dans cette même partie.

Le troisième chapitre détaille la procédure de microfabrication des puces microfluidiques au sein du laboratoire grâce à la méthode de photolithographie assistée par écran programmable. Une première partie explique les raisons qui nous ont mené à développer une nouvelle méthode accessible, rapide et relativement peu coûteuse pour faire des puces microfluidiques au sein du laboratoire. La nouvelle méthode de microfabrication est ensuite présentée en détail pour suivre la procédure étape par étape, de la création du moule en résine jusqu'au collage de la puce sur son support en verre. Pour finir, les résultats obtenus sont présentés et permettent de conclure quant à l'efficacité de la méthode, mais également d'évaluer la qualité des canaux produits en fonction de l'application souhaitée.

Le quatrième chapitre décrit la première brique de base de l'étude finale, à savoir l'adaptation de la méthode de balayage laser pour faire de la microscopie non-linéaire en vue de suivre les trajectoires de nano-particules agitées d'un mouvement brownien en solution. La première partie de ce chapitre traite de la problématique du balayage pour suivre des nano-émetteurs en mouvement. On y retrouve les nombreux paramètres d'acquisition tels que la résolution en pixel, le temps d'exposition ou encore le volume d'excitation qui doivent être optimisés ou adaptés pour atteindre les vitesses de balayage souhaitées. Ce sont ensuite les outils numériques d'analyse des images pour construire les trajectoires qui sont détaillées et adaptées aux types d'images obtenues en microscopie non-linéaire. Pour finir, les résultats de la méthode de suivi du mouvement brownien par microscopie non-linéaire sont présentés dans le cas de l'excitation de fluorescence à deux photons et de la génération de second harmonique pour différentes tailles de particules connues afin de vérifier la fiabilité de la méthode.

Le cinquième chapitre est consacré à la mise au point d'une feuille de lumière formée au sein d'un canal microfluidique au moyen de deux fibres optiques. Ce chapitre représente une étape intermédiaire entre le chapitre précédent utilisant la microscopie non-linéaire pour caractériser des nano-particules en mouvement et l'étape finale qui doit réaliser une expérience d'agrégation ou de cristallisation en configuration microfluidique. Cette partie détaille dans un premier temps l'avantage d'utiliser la microscopie à feuille de lumière pour simplifier l'étude en régime microfluidique puisqu'il est difficile d'élaborer un nouvel outil de mesure en même temps qu'une nouvelle expérience. La deuxième partie décrit la mise au point d'un système de micro-optique intégrée au sein d'une puce microfluidique afin de former une feuille de lumière avec très peu de moyens techniques. Ce nouveau système de formation d'une feuille de lumière mène à une troisième partie qui vise à caractériser la feuille de lumière selon des critères d'épaisseur, d'homogénéité et de contraste afin de la comparer aux méthodes existantes.

Le sixième et dernier chapitre constitue les premiers pas de l'étude finale qui doit permettre d'étudier l'agrégation ou la cristallisation de matériaux au sein de canaux microfluidiques grâce à la microscopie à feuille de lumière ou la microscopie non-linéaire. Une première partie aborde la théorie qui décrit les phénomènes de cristallisation et d'agrégation sachant que ces deux phénomènes font toujours l'objet de débat en raison des différents modèles existant pour décrire la dynamique de formation des cristaux et agrégats. Le but étant seulement de comprendre qualitativement les processus

en vue d'orienter les expériences, cette partie se contente de décrire les différents modèles théoriques existants. En vue d'établir une méthode d'étude des phénomènes présentés précédemment, la suite de ce chapitre reproduit une technique basée sur la microfluidique afin de forcer le phénomène d'agrégation de molécules fluorescentes grâce à leurs propriétés hydrophobes. Dans la continuité, une dernière partie est consacrée à l'élaboration d'une méthode permettant de stopper le flux au sein d'une puce microfluidique afin d'étudier la croissance d'agrégats grâce à leurs mouvements browniens. Pour finir ce chapitre et ce travail en général, une dernière partie fait état des perspectives envisagées pour poursuivre les expériences engagées.

Chapitre 1

La microscopie non-linéaire au service du suivi de nano-objets en conditions maîtrisées

Ce premier chapitre de thèse sert de brique de base pour comprendre les enjeux et les mécanismes physiques intervenant dans ce travail. Le sujet comprend plusieurs domaines qui pourraient être pour chacun des axes d'étude de thèse à eux seuls. C'est pour cela que ce premier chapitre est relativement long et détaille de nombreux aspects qui se révéleront pertinents par la suite. Le but ici est donc de fournir une approche théorique non-exhaustive de chaque sujet en s'appuyant sur les découvertes majeures qui ont permis d'aboutir aux outils théoriques, techniques ou technologiques utilisés pour ce travail.

Le but final de ce travail est pouvoir étudier des phénomènes d'agrégation et de cristallisation dans des conditions contrôlées permettant d'améliorer la résolution temporelle des processus. En revanche, ces derniers n'ayant pas pu faire l'objet d'expérimentations en raison du temps imparti pour cette thèse, les mécanismes théoriques associés sont présentés en début du dernier chapitre. Néanmoins, pour faire évoluer les expériences vers un contrôle plus approfondi, les écoulements microfluidiques sont de très bons candidats et font l'objet d'une étude dans une première partie. Étant une technologie plutôt récente, un effort particulier est apporté, après une description théorique, aux applications possibles afin de démontrer le potentiel cet outil novateur. L'objectif étant d'extraire des informations sur les dynamiques de formations de cristaux ou d'agrégats, la deuxième partie s'intéresse aux outils théoriques et techniques permettant de caractériser, principalement en taille, des micro/nano objets émetteurs de lumière en suspension dans des fluides. Enfin, la troisième partie détaille le fonctionnement des effets d'optique linéaire et non-linéaire utilisés pour la microscopie de génération de second harmonique et la microscopie de fluorescence excitée à un et deux photons qui sont les processus principalement utilisés pour ce travail.

1.1 L'outil microfluidique (utilisation et fabrication)

Cette partie traite de la microfluidique comme un outil mis au service d'un autre domaine plutôt qu'un développement des possibilités de la microfluidique sur le plan théorique. Ici, seule

une partie théorique générale permettant de présenter les principes de mécanique des fluides est abordée afin de se focaliser sur l'utilisation d'outils et ce qu'il est possible d'en faire pour notre application. L'essence de cette partie de la rédaction s'est inspirée de l'ouvrage *Introduction à la microfluidique* de Patrick Tabeling [1] qui explique remarquablement l'histoire et la physique autour de la microfluidique. Enfin, sur un plan plus pratique, une section traite de la fabrication des puces microfluidiques afin d'expliquer les raisons qui ont poussé à investir du temps dans cette voie.

1.1.1 Origine et principe de la microfluidique

La nature maîtrise déjà l'utilisation de la microfluidique depuis des millions d'années au travers du monde vivant en général, alors que l'humain commence seulement à s'y intéresser depuis peu. C'est au travers d'exemples comme le réseau de circulation de la sève d'un arbre illustré figure 1.1 que l'on peut retrouver un système microfluidique gérant les milliers de microcapillaires qui permettent l'acheminement de la sève allant des racines jusqu'au bout des feuilles sans interruption. L'araignée dispose également d'un microréacteur dans son abdomen mettant en œuvre un système microfluidique afin de façonner la soie à partir du mélange d'une protéine et d'une solution.

L'humain ne s'intéresse à ce genre d'écoulements par mimétisme que depuis quelques dizaines d'années [1] en raison d'une limite technologique permettant d'atteindre la précision nécessaire à la réalisation de systèmes microfluidiques. C'est donc vers 1990 que l'intérêt pour la microfluidique a su faire sa place dans les laboratoires afin de miniaturiser de nombreuses expériences telles que l'électrophorèse [2], des systèmes de pompage électro-osmotique [3] ou encore des systèmes d'amplification de l'ADN [4]. La physique fondamentale a su également tirer parti de ces avancées en réalisant les premières expériences sur l'étirement de l'ADN en 1993 par *Chu et al* [5] et par la même occasion a permis au domaine d'étude de la molécule unique de voir le jour.



FIGURE 1.1 – Image d'un arbre en hiver et d'une feuille en haut à droite, illustrant le réseau de microcapillaires qui se répète à une autre échelle dans chaque feuille.

La microfluidique est donc une science qui s'intéresse aux écoulements de fluides pour une échelle allant du micromètre à plusieurs dizaines de micromètres. Grâce à ces dimensions réduites, les propriétés physiques des écoulements changent radicalement et ne sont plus sensibles aux mêmes forces pour la simple raison qu'une force dépendante de la surface varie en L^2 alors qu'une force liée au volume évolue en L^3 (L représente la dimension d'une distance). Habituellement, à l'échelle macroscopique, le volume d'un fluide est la grandeur d'importance, mais lorsque des canaux sont

1.1. L'OUTIL MICROFLUIDIQUE (UTILISATION ET FABRICATION)

réduits à une centaine de micromètres de large, les effets de surface l'emportent, car des phénomènes tels que la capillarité ou encore la tension de surface deviennent prépondérantes face à d'autres grandeurs. Mais ce qui rend cet outil très favorable à de nombreuses expériences est son régime d'écoulement laminaire, c'est-à-dire sans turbulences. Cet aspect est tellement présent à cette échelle que certaines équipes cherchent à contrer cet effet et à établir des turbulences, difficiles à générer en conditions standard [6]. Grâce à cet écoulement laminaire, la diffusion ou plus simplement dit, le mélange de deux espèces dans un canal est effectué grâce à l'agitation thermique des molécules et par conséquent se fait lentement. Ainsi, comme cela est représenté sur la figure 1.2, en imaginant une géométrie dans laquelle deux espèces chimiques différentes se rencontrent puis circulent dans un même canal, il est possible d'avoir un historique permanent de l'expérience en cours sous réserve que les conditions en entrée ne changent pas. Pour résumer, l'outil microfluidique permet une maîtrise précise d'effets difficilement contrôlables à l'échelle macroscopique tels que la propagation des effets thermiques, la capillarité, la mouillabilité, les effets électro-cinétiques ou encore le régime d'écoulement et tout ceci de manière reproductible.

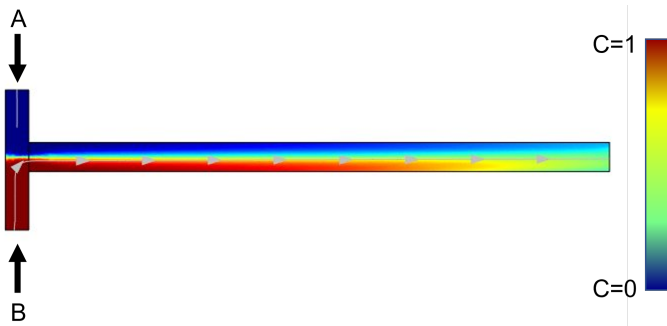


FIGURE 1.2 – Schéma illustrant le mélange de deux espèces chimiques dans un canal microfluidique. Le gradient de couleur représente la concentration de l'espèce B par rapport à A. Simulation numérique par la méthode des éléments finis MEF.

1.1.2 Théorie des écoulements microfluidiques

Tout d'abord, lorsqu'un objet d'étude est miniaturisé, que ce soit un prototype d'avion ou de sous-marin, les forces en action n'ont pas le même impact en fonction de la taille du système. Ce domaine d'étude appelé similitudes et analyses dimensionnelles a permis de décrire les lois d'échelles et ainsi de transposer certains problèmes difficiles à mettre en œuvre à taille réelle. Quelques exemples dans la nature permettent de comprendre parfaitement le problème d'échelle que pourraient rencontrer certains animaux ou insectes s'ils étaient beaucoup plus grands. Au risque de casser un mythe, l'exemple du fameux T-Rex de 8 tonnes pour 13 mètres de long et 4 mètres de haut, pouvant poursuivre une voiture à pleine vitesse, semble peut-être embelli pour les besoins des films. En effet, certaines études suggèrent qu'un animal de cette taille ne devait pas pouvoir excéder 19 km/h en raison des contraintes exercées par son poids qui briseraient les os de ses pattes [7]. On ne peut donc pas transposer directement les capacités athlétiques d'une autruche de 120 kg courant à 90 km/h à celle d'un T-Rex en considérant une masse musculaire proportionnelle. Le problème est le même lorsque l'on étudie un système microfluidique où les forces impliquées n'ont

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU
SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

pas la même importance par rapport à un écoulement macroscopique.

Pour évaluer l'importance des effets physiques en jeu (inertie, diffusion, tension interfaciale, etc) lors d'un écoulement microfluidique, plusieurs nombres sans dimensions existent et vont nous servir à comprendre les forces en jeu [8]. Pour brièvement revoir les principes de base des fluides, l'équation de Navier-Stokes décrit le champ de vitesse d'un fluide Newtonien de la façon suivante :

$$\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u} \wedge \vec{\nabla}) \vec{u} = -\frac{1}{\rho} \vec{\nabla} p + \nu \nabla^2 \vec{u} + \vec{f} \quad (1.1.1)$$

Avec \vec{u} la vitesse eulerienne d'une particule de fluide en $[m/s]$, t le temps en secondes, ρ la masse volumique du fluide en $[kg/m^3]$, p la pression en Pa , \vec{f} la résultante des forces massiques s'exerçant sur le fluide en $[N/kg]$ et ν la viscosité cinématique du fluide en $[m^2/s]$.

Lorsque les effets de forces inertielles sont petites devant les forces visqueuses, ce qui est souvent le cas en microfluidique, alors le terme non-linéaire disparaît et l'équation (1.1.1) devient alors :

$$\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\frac{1}{\rho} \vec{\nabla} p + \nu \nabla^2 \vec{u} + \vec{f} \quad (1.1.2)$$

Plus l'échelle des systèmes se réduit, plus il est nécessaire de réfléchir à l'échelle de particule de fluide. Étant donné que nous utiliserons largement cette notion, il est important de définir cet état de la matière. Une particule de fluide est donc un grand nombre de molécules contenu dans un volume défini très petit devant la taille du microsystème. Cette notion est toujours sensible puisque pour un liquide, une particule de fluide est de l'ordre de quelques nanomètres jusqu'au micromètre, mais pour un gaz, les molécules étant trop agitées, c'est la notion de libre parcours moyen [9] qui sert de définition de particule de fluide. Mais nous ne développerons pas les notions associées au comportement des gaz ici, car nous nous limitons à l'étude des liquides en microfluidique.

Pour comprendre comment un grand ensemble de particules de liquide interagissent ensemble face à un écoulement, il faut s'intéresser à la notion de viscosité qui est en fait présente dans un grand nombre d'équations en mécanique des fluides. Si l'on doit décrire la viscosité de façon qualitative, on peut dire que la résistance d'un fluide face à son écoulement est proportionnelle à sa viscosité. De manière plus précise, la viscosité dynamique notée μ , différente de la viscosité cinématique $\nu = \mu/\rho$, est le rapport entre les contraintes de cisaillement et le gradient de vitesse. L'étude de ce phénomène a été pour la première fois réalisée par Hagen et Poiseuille dans des écoulements laminaires [10] et ensuite examiné et vérifié par de nombreux autres travaux. Dans un liquide, un grand nombre de molécules interagissent entre elles, parmi elles, des sites libres existent et permettent les déplacements de ces molécules grâce à leur agitation thermique. Cette probabilité de déplacement vers un site libre a été décrite par H. Eyring [11] au travers de l'équation simplifiée suivante :

$$p = A \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \quad (1.1.3)$$

Avec A une constante, E l'énergie de barrière de potentiel en $[J]$, k_B la constante de Boltzmann en $[m^2 kg/s^2 K]$ et T la température en $[K]$. Il faut comprendre, grâce à cette équation, que les molécules doivent vaincre une barrière d'énergie créée par leurs proches voisins afin de migrer vers un site libre et ainsi d'échanger une partie de leur quantité de mouvement avec une couche de fluide différente.

Les effets inertiels

L'importance des effets inertiels d'un écoulement est évaluée grâce au nombre de Reynolds. Ce nombre sans dimension décrit donc un écoulement au travers d'un ratio (équation 1.1.4) comparant la vitesse de l'écoulement couplé avec sa longueur caractéristique par rapport à la viscosité du fluide. En se référant à une échelle de valeurs dépendante de la géométrie du support, il est alors possible d'évaluer les régimes d'écoulement présentés figure 1.3 selon trois catégories. Le plus chaotique, appelé régime turbulent, caractérisé par un $Re > 4000$, décrit des lignes de courant qui se croisent le long de l'écoulement et ainsi favorise les mélanges dans un fluide. À l'inverse, le plus ordonné et celui qui nous intéresse ici est l'écoulement laminaire, représenté par un $Re < 2300$ et des lignes de courant toujours parallèles qui limitent le mélange des particules de fluide à la diffusion. Le dernier régime d'écoulement est dit transitoire puisqu'il se situe entre les deux valeurs précédentes de Re . En fonction des géométries et des conditions d'expérience, l'écoulement peut passer d'un régime à l'autre à cause de turbulences localisées et ainsi rendre le débit instable.

$$Re = \frac{U_c L_c}{\nu} \quad (1.1.4)$$

Avec U_c la vitesse caractéristique de l'écoulement en $[\text{m s}^{-1}]$, L_c la longueur caractéristique de l'écoulement (diamètre de tube, longueur de plaque, etc) et ν la viscosité cinématique en $[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$.

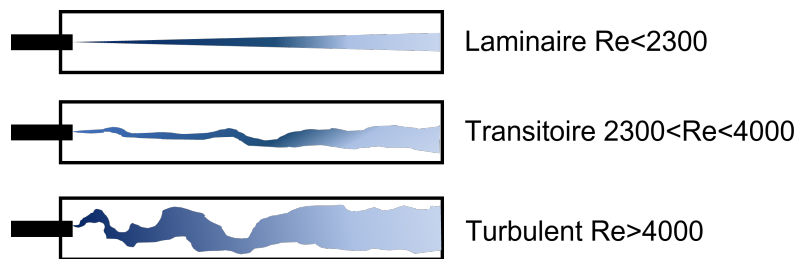


FIGURE 1.3 – Schéma illustrant l'expérience connue du mélange d'encre dans un canal où circule de l'eau, pour différents régimes d'écoulements.

La formulation du nombre de Reynolds peut être obtenue grâce à la forme sans dimension des équations de Navier-Stokes pour un fluide newtonien et incompressible.

Malgré l'importance du nombre de Reynolds pour comprendre le comportement des régimes d'écoulement, celui-ci est souvent attaché aux problèmes liés aux turbulences puisque que les effets d'inertie sont la cause principale. Lorsque des écoulements sont confinés dans des canaux microfluidiques, le nombre de Reynold devient très petit et la conception physique que l'on a des écoulements doit changer, comme E. M. Purcell a su le dire :

"I want to take you into the world of very low Reynolds number, a world which is inhabited by the overwhelming majority of the organisms in this room. This world is quite different from the one that we have developed our intuition in."[12].

Pour avoir quelques références de ce nombre sans dimension, un canal microfluidique où le diamètre du canal $L = 100 \mu\text{m}$ et sa vitesse d'écoulement $U = 1 \text{ cm s}^{-1}$ alors $Re = 1$, ce qui correspond à un régime d'écoulement laminaire. Alors que dans un conduit de plus grande taille,

$L = 10 \text{ cm}$ et $U = 10 \text{ cm s}^{-1}$ et malgré un écoulement très lent, $Re = 5000$ et passe dans la catégorie des écoulements turbulents. Il faut comprendre ici que de nombreux phénomènes fonctionnant à l'échelle macroscopique ne le pourraient pas à faible nombre de Reynolds. Par exemple, une coquille de mer se déplace grâce au mouvement de ses deux faces selon un seul degré de liberté en s'ouvrant doucement et se fermant rapidement afin de se propulser. Cela ne serait pas possible en régime laminaire (faible nombre de Reynolds) en raison du mouvement réciproque qui, indépendamment de la vitesse, condamnerait alors cette coquille à faire sans cesse des mouvements qui se compensent et ainsi n'avancerait pas.

Les effets de convection/diffusion

Les effets de convection et de diffusion appartiennent à la grande famille des phénomènes de transports qui sont nombreux et qui ont et continuent de façonner notre univers [13]. On peut notamment énoncer trois grands principes via le transport de quantité de mouvement, de masse ou d'énergie. Le transport de quantité de mouvement, décrit par la loi de Newton (équation 1.1.5A), peut être représenté par une goutte d'eau tombant du ciel, celle-ci transmet une partie de sa quantité de mouvement à son entourage par stress visqueux et ainsi décélère. Le transport de masse décrit par l'équation 1.1.5B grâce à la loi de Fick [14] intervient par exemple lors de la diffusion d'odeurs qui parviennent à notre nez, souvent de façon forcée par une action mécanique, comme lorsqu'une personne passe en marchant à côté de nous en portant un parfum. Le transfert d'énergie basé sur la première loi de la thermodynamique (équation 1.1.5C) est sûrement le plus connu puisqu'il traite des échanges de chaleur, qu'ils soient forcés par convection mécanique ou naturelle.

$$A] \quad \tau = -\mu \frac{\partial v}{\partial x} \qquad B] \quad J = -D \frac{\partial \phi}{\partial x} \qquad C] \quad q = -k \frac{dT}{dx} \qquad (1.1.5)$$

A] La loi de Newton : μ la viscosité dynamique en [Pa s], v la vitesse en [m s^{-1}] et x la distance de transport en [m].

B] La loi de Fick : D le coefficient de diffusion en [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$], ρ la masse volumique en [kg m^{-3}] et x la dimension de l'échange.

C] La loi de Fourier : avec k la conductivité thermique en [$\text{W K}^{-1} \text{m}^{-1}$], T la température en [K] et x la position en [m].

À l'échelle macroscopique, nous sommes familiers aux phénomènes de convection/advection qui décrivent le transport massif de particules de fluide dû à un gradient de pression entre deux endroits. Lorsque que ce transfert a lieu verticalement, on parle de convection comme le cas d'un radiateur qui chauffe l'air plus froid devant une fenêtre, les molécules chaudes ont tendance à s'élever alors que les plus froides descendent. Le terme d'advection se réfère au même phénomène de transport, mais sur un plan horizontal et qui peut se retrouver dans de nombreux phénomènes météorologiques sur Terre tels que les courants marins ou aériens conservant un équilibre [15]. Les deux effets cités précédemment sont d'ordre thermique et naturel, mais peuvent également se produire de façon forcée grâce à des pompes ou ventilateurs qui surpassent les effets naturels et dans ce cas, la convection est dite forcée.

Si maintenant, on réduit l'échelle d'observation à un ensemble de molécules, on peut regarder le phénomène d'échange à l'échelle des déplacements de molécules dans leur milieu. Lorsque qu'un fluide est au repos (c'est-à-dire sans action extérieure), le phénomène de diffusion est observable et devient le mécanisme de transport. Comme Jean Perrin l'a évoqué en 1900 [16] :

"Brownian motion is the link between microscopic and macroscopic world"

Le phénomène de diffusion est détaillé plus précisément dans une partie suivante, mais pour des raisons de contexte, une explication brève est réalisée ici. Le mouvement Brownien n'est donc qu'une somme de déplacements aléatoires de particules/molécules dues à l'agitation thermique qui provoque le mélange d'espèces chimiques. Cet effet de diffusion est beaucoup plus lent que ceux présentés précédemment en raison des faibles distances qu'une particule réalise à chaque instant. Si cet effet était le seul phénomène de transport des odeurs par exemple, le plat de lasagne qui brûle au four mettrait plusieurs dizaines de minutes avant de parvenir à notre nez et il serait alors trop tard. Mais des effets lents ne sont pas toujours néfastes, dans de nombreuses situations les effets de mélanges dans les fluides sont très importants, qu'ils soient souhaités ou non. Pour cela, une mesure des phénomènes de transport aléatoire au sein d'un fluide peut être réalisée au moyen du nombre de Péclet (Pe). La version massique de ce nombre sans dimension utilise le rapport entre le transport par convection et le transport par diffusion. Le rapport de ces deux phénomènes permet alors de connaître l'effet prépondérant dans la configuration étudiée. L'équation (1.1.6) donne la formulation du nombre de Péclet massique et nous permet de dire qu'une valeur de Pe qui tend vers 1 signifie que les effets de diffusion sont prépondérants face à la convection et inversement pour Pe qui tend vers l'infini.

$$Pe = \frac{U_c L_c}{D} \tag{1.1.6}$$

Avec U_c la vitesse de l'écoulement en $[m\ s^{-1}]$, L_c la longueur caractéristique de l'écoulement en $[m]$ et D le coefficient de diffusion en $[m^2\ s^{-1}]$. Quelques valeurs de coefficients de diffusion pour différentes particules dans de l'eau sont regroupées dans le tableau 1.1. Cela permet d'estimer l'intervalle de valeurs du nombre de Péclet et notamment de se rendre compte que lorsque des particules sont trop grosses comme pour une cellule humaine (taille $> 1\ \mu m$), même dans un système microfluidique, l'effet de diffusion de ces particules est négligeable face à la convection/advection.

Entité	Taille	D	Pe ($L_c = 100\ \mu m, U_c = 1\ mm\ s^{-1}$)
Petite protéine	5 nm	$40\ \mu m^2\ s^{-1}$	250
Virus	100 nm	$2\ \mu m^2\ s^{-1}$	5000
Cellule humaine	10 μm	$0.02\ \mu m^2\ s^{-1}$	50000

TABLE 1.1 – Tableau de valeurs typiques de coefficients de diffusion, pour des entités composant des fluides.

Afin de comprendre l'effet de diffusion, celui-ci peut être vu simplement grâce au phénomène d'étalement d'une tâche (c'est-à-dire un grand ensemble de molécules d'espèce différente de la solution) dans un fluide au repos. Soit l'équation d'advection/diffusion (1.1.7)[17], en prenant les conditions initiales telles que $C(t = 0) = C_0\delta(x)$ où $\delta(x)$ est la fonction de Dirac :

$$C(x, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \tag{1.1.7}$$

Avec C, la concentration massique en $[kg/m^3]$, D le coefficient de diffusion $[m^2\ s^{-1}]$, t le temps d'étude en [s] et x la coordonnée spatiale. Lorsqu'un fluide ne subit aucune action, le seul phénomène

de transport est alors la diffusion. En considérant maintenant l la taille de la tâche dans le fluide au repos, il est possible d'estimer cette taille grâce à l'écart-type de la distribution de la fonction gaussienne de l'équation (1.1.7) :

$$l \approx 2\sqrt{Dt} \quad (1.1.8)$$

La taille de la tâche s'étale donc proportionnellement à la racine carrée du temps, ce qui traduit un effet lent et non-linéaire contrairement à ce que l'on peut penser intuitivement.

1.1.3 Applications

Grâce à ces forces et phénomènes physiques prépondérants à l'échelle d'écoulements micro-métriques, de nouvelles possibilités s'offrent pour diverses applications. La biologie, par exemple, se sert d'enzymes mélangés à un échantillon inconnu pour fragmenter les protéines afin de les étudier a posteriori [18], cette science est appelée la protéomique. Grâce aux sections précédentes, il est difficile d'imaginer que la microfluidique puisse aider à mélanger efficacement deux fluides alors que nous avons évoqué un nombre de Reynolds très faible limitant le mélange à la diffusion. Le mélange lent n'est pas toujours néfaste en fonction de la taille du système et du résultat souhaité. D'autres méthodes utilisent la microfluidique pour séparer et trier des bio-particules, rendant le processus rapide, efficace et peu coûteux [19].

Mélange

Pour comprendre l'effet de mélange par diffusion, il est intéressant de prendre le problème à l'envers. L'étude d'une configuration microfluidique appelée jonction en T, illustrée figure 1.4, permet de mesurer le coefficient de diffusion grâce à une mesure de la concentration le long de l'écoulement. Puisque que le régime d'écoulement est laminaire ($Re \approx 1$), les deux produits injectés s'écoulent dans une même direction x sans turbulences et leur mélange forme une zone de diffusion conique qui peut être décrite par une analyse du champ de concentration $C(x, y)$ grâce à l'équation (1.1.9).

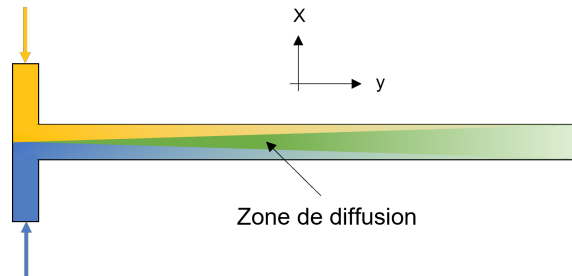


FIGURE 1.4 – Schéma d'une jonction en T permettant de mélanger uniquement par diffusion deux réactifs. Pour simplifier le schéma, uniquement le mélange des deux espèces est représenté par un gradient de couleur verte symbolisant le mélange d'un produit bleu et jaune.

$$C(x, y) = \frac{1}{2}C_0 \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{y\sqrt{U}}{2\sqrt{Dx}} \right) \right] \quad (1.1.9)$$

1.1. L'OUTIL MICROFLUIDIQUE (UTILISATION ET FABRICATION)

Avec x et y les coordonnées dans l'écoulement, C_0 la concentration initiale, U la vitesse moyenne dans le canal central, D le coefficient de diffusion et la fonction d'erreur de Gauss notée $erf(z)$ et définie de la façon suivante :

$$erf(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z \exp(-v^2) dv \quad (1.1.10)$$

Cette expérience a été réalisée en 2001 en utilisant des molécules fluorescentes comme marqueur afin de mesurer l'intensité du signal en fonction de la position dans le canal [20]. Les résultats ont montré une très bonne cohérence entre l'expérience et la théorie.

Grâce à cette propriété de mélange contrôlé en canal microfluidique, des procédures telles que la purification de protéines se développent pour surmonter des difficultés et pour en étudier les propriétés. Les méthodes conventionnelles dans des micro-puits demandent des étapes de chromatographie ou de centrifugation qui sont fastidieuses et peu efficaces en termes de productivité [21]. En revanche, la microfluidique utilise de petits volumes de fluide avec un contrôle bien plus grand des débits et pressions. Un autre avantage est celui de pouvoir paralléliser plusieurs opérations pour ensuite les faire converger ou encore réaliser plusieurs conditions de test pour un même composé de base. Le modèle de puce microfluidique de type générateur de gradient de concentration est un bon exemple d'une expérience qui peut être réalisée pour différentes concentrations de réactif par rapport au produit de base. Une expérience, représentée figure 1.5, permet de quantifier les interactions protéine-protéine non-covalentes grâce à la spectrométrie de masse via une multitude de canaux en parallèle, a été réalisé en 2014 [22]. Lorsque que les géométries des puces microfluidiques se complexifient, la plupart du temps le coût de production n'est que très peu affecté. Néanmoins, ce genre de géométrie demande une grande qualité de fabrication des puces puisque ce sont les résistances hydrodynamiques des canaux qui permettent le bon fonctionnement du procédé.

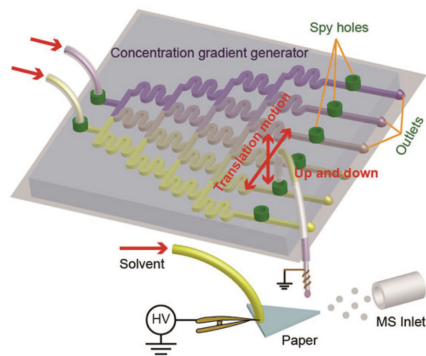


FIGURE 1.5 – Schéma (extrait de la référence [22]) d'une puce microfluidique multi-canaux couplée avec une mesure de spectrométrie de masse afin de quantifier des interactions entre protéines.

D'autres applications des effets de diffusion se servent de la lenteur intrinsèque de ce phénomène de transport pour obtenir une grande résolution temporelle de la cristallisation. Ainsi la méthode de contre-diffusion adaptée à la microfluidique [23] permet, sans circulation de fluide lors de la réaction, d'opérer de façon maîtrisée la cristallisation de protéines comme cela est présenté figure 1.6. Étant donné que le précipitant possède des molécules de plus petites tailles que les protéines, celui-ci se

diffuse plus rapidement au travers de la solution de protéines que l'inverse et ainsi engendre un processus de cristallisation dépendant du gradient de sursaturation de la solution de protéines.

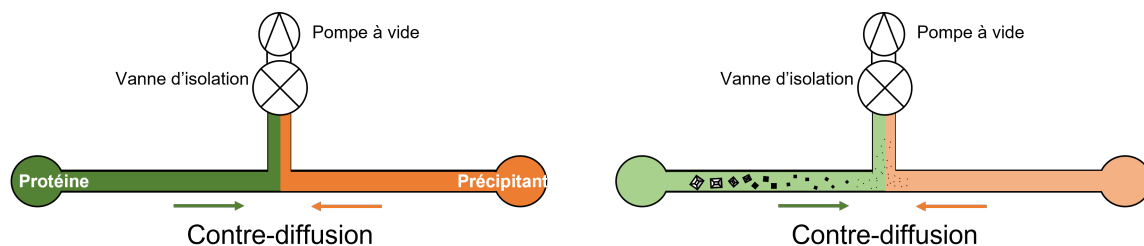


FIGURE 1.6 – Schéma présentant un montage microfluidique permettant de faire cristalliser des protéines au moyen d'un mélange par diffusion avec un précipitant. La valve et la pompe à vide permettent de mettre en contact les deux fluides pour ensuite couper le flux afin d'amorcer la diffusion.

Ces deux exemples de mélanges illustrent l'utilisation de la diffusion comme un outil permettant d'améliorer la résolution temporelle des cinétiques de réactions chimiques. Ainsi, la géométrie de la puce microfluidique représente un paramètre permettant d'influencer les mélanges de façon maîtrisée et adaptable.

Séparation

Le mélange par diffusion n'est pas le seul phénomène utilisé pour réaliser des tâches complexes à l'échelle microscopique. Lorsque des solutions contiennent des éléments néfastes ou non souhaités, il est nécessaire de trier les différentes espèces afin de récupérer un produit final sans impuretés. Cette étape est souvent accomplie par chromatographie [24] car elle est largement maîtrisée dans les laboratoires et relativement simple, même si son principe théorique l'est beaucoup moins. Cette opération de séparation est donc réalisée grâce à une colonne chromatographique remplie d'une matrice ou autrement dit une solution constituée d'un ensemble de particules dont les interactions sont connues. Cette matrice constitue la phase stationnaire alors que la phase mobile, placée au sommet de la colonne, est le produit que l'on veut trier. Le phénomène d'adsorption, à ne pas confondre avec l'absorption, décrit la capacité de la matrice de retenir des molécules à sa surface puis les relâcher en partie due à l'agitation thermique. Cet effet d'adsorption/désorption est décrit par un coefficient de partage qui diffère selon les espèces moléculaires et va donc produire un flux de migration des molécules le long de la colonne. En fonction des coefficients de partage, des bandes distinctes apparaissent comme représenté sur la figure 1.7 et permettent de séparer/identifier les molécules. L'avantage de miniaturiser les systèmes de chromatographie réside principalement dans l'économie de solvant et de produit pour réaliser une séparation des espèces. De plus, à l'échelle microfluidique, l'efficacité du système est amplifiée grâce à sa résolution d'analyse, mais aussi par des traitements en continu qui produisent des analyses/séparation rapides [25].

D'autres modèles de puces microfluidiques permettent la séparation de différentes espèces au sein d'une même solution en se servant de la diffusion. L'exemple de la purification des protéines est largement utilisé dans de nombreux laboratoires pour extraire les protéines pures et rejeter celles qui ne conviennent pas à la suite de l'expérience. La figure 1.8 permet de comprendre le fonctionnement

1.1. L'OUTIL MICROFLUIDIQUE (UTILISATION ET FABRICATION)

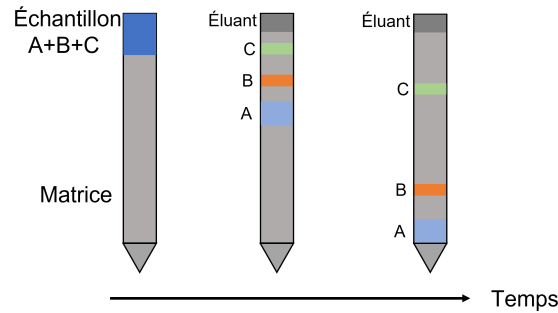


FIGURE 1.7 – Schéma d'une colonne chromatographique permettant de séparer trois espèces par leur coefficient de partage.

de cette technique de séparation en se servant de deux solutions comportant des propriétés de solubilité opposées pour les composés A et B en sachant que la protéine A est génétiquement modifiée par recombinaison pour permettre d'être détectée par fluorescence. Une solution de PEG (Polyéthylène Glycol) permet de rendre la protéine cible (A) plus soluble et ainsi de faciliter la diffusion de la protéine souhaitée. Dans la section (1) du canal, la solution contenant la protéine d'intérêt A forme un flux central qui est lui-même cerné par les deux solutions riches en PEG et sels. Ensuite (section (2) du schéma), les affinités de solubilité et la diffusion provoquent donc une propagation de la protéine A au sein de la partie supérieure du canal. Après une longueur suffisante de canal (section (3) du schéma), la diffusion permet d'obtenir un profil d'écoulement à deux phases non solubles permettant de parfaitement les séparer spatialement.

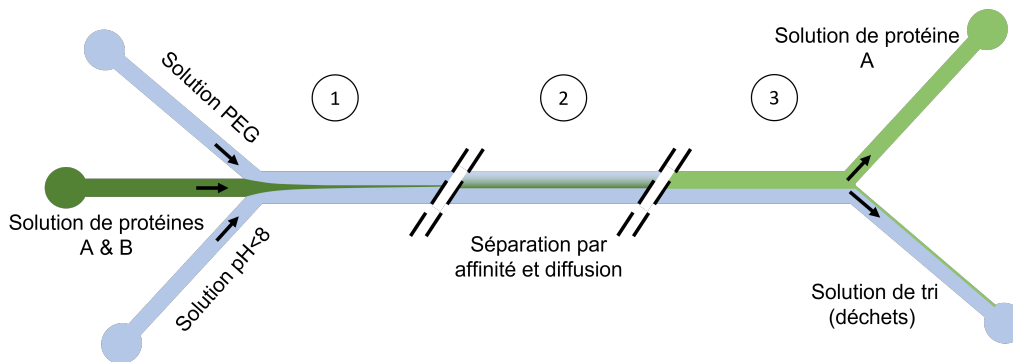


FIGURE 1.8 – Schéma d'un modèle de puce microfluidique permettant de séparer les protéines pures et impures grâce au phénomène de diffusion et de solubilité.

Gouttes et bulles

Les exemples précédents utilisent les propriétés laminaires ou de diffusion des configurations microfluidiques et ceci provoque des gradients de concentration. Mais ceci n'est pas toujours souhaitable si l'on veut étudier des réactions avec une quantité limitée et définie de réactif. Pour cela,

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

une méthode de générateur de gouttes a vu le jour dès 1959 [26] pour étudier le taux de nucléation du nitrate de potassium. Pour ce genre d'expérience, un nouveau nombre sans dimension est utilisé et appelé le nombre Capillaire défini de la façon suivante :

$$Ca = \frac{\mu v}{\sigma} \quad (1.1.11)$$

Avec μ la viscosité dynamique en [Pa.s], v la vitesse d'écoulement en [m s^{-1}] et σ le tension superficielle en [J m^{-2}]. Le but étant de se servir de l'écoulement laminaire et d'un faible nombre Capillaire (Ca) pour former des interfaces liquide-liquide sphériques et stables dans lesquelles une réaction peut être confinée et étudiée. Comme détaillé précédemment, lorsque deux fluides non miscibles se rencontrent avec un certain angle et selon la vitesse et la viscosité, alors il est possible d'établir des conditions pour lesquelles des gouttes de taille déterminée se forment. La fréquence d'arrachement de ces gouttes est également contrôlable. La figure 1.9 illustre l'effet du générateur microfluidique de micro-gouttes avec quatre entrées pour injecter les différents produits. R1 et R2 représentent les deux réactifs qui se rencontrent uniquement au sein de la goutte grâce au fluide séparateur neutre (S) permettant d'éviter un mélange en amont. L'huile sert de fluide faisant la séparation des gouttes et permettant d'arracher des portions de l'ensemble R1+S+R2. Cette configuration peut être vue comme un générateur de micro-expériences confinées dans lesquelles il est possible de changer les conditions initiales (concentration, taille des gouttes, débit) et d'observer les résultats sans considérer des influences extérieures non maîtrisées.

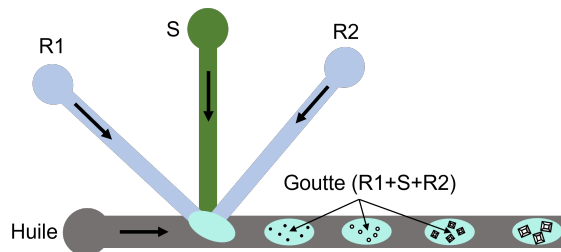


FIGURE 1.9 – Schéma d'un modèle de puce microfluidique permettant de générer des gouttes de réactif au sein d'un liquide non miscible.

1.1.4 La microfabrication de systèmes microfluidiques

Cette partie se limitera à la fabrication de microsystèmes pour des applications microfluidiques, car la microfabrication en général est très vaste et couvre beaucoup de domaines, notamment l'électronique et l'optique. La microfabrication, comme son nom l'indique, traite du façonnage de la matière avec une résolution de l'ordre de la dizaine de micromètres jusqu'au nanomètre.

L'origine

Pour comprendre l'origine de la fabrication de systèmes microfluidiques, il faut remonter dans le temps et s'intéresser à d'autres domaines d'étude qui ont permis son avènement et son développement. La fabrication de circuits intégrés à base de semi-conducteur pour l'électronique et la méthode de

1.1. L'OUTIL MICROFLUIDIQUE (UTILISATION ET FABRICATION)

photolithographie peut être vue comme les fondations de la microfabrication en général. Un historique des inventions depuis le premier transistor en 1947 jusqu'à maintenant est représenté figure 1.10 et permet de situer la place de la microfluidique dans le domaine de la microfabrication.

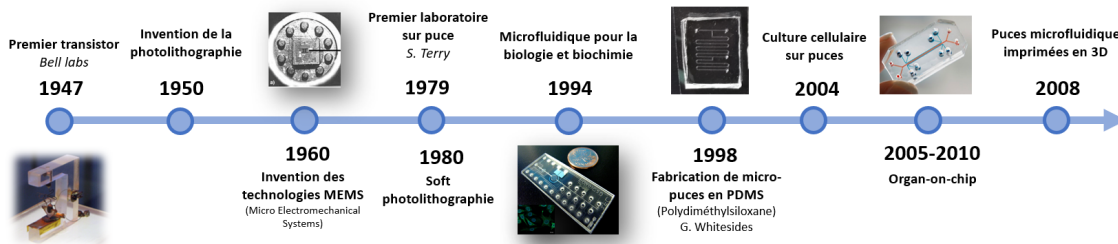


FIGURE 1.10 – Résumé de l'historique des technologies ayant mené à la fabrication de puces microfluidiques.

La photolithographie constitue le pilier central de la microfabrication puisque depuis sa première utilisation pour réaliser des circuits électroniques, cette méthode est toujours largement utilisée de nos jours. La première application de la photolithographie était dédiée à la production à grande échelle de transistors sur des films de silicium (Si) avec une résolution de $5\ \mu\text{m}$ [27]. Maintenant, cette même méthode atteint une résolution pouvant aller jusqu'à $5\ \text{nm}$. Les premières puces microfluidiques [28] ont fait leur apparition grâce à la biologie et l'analyse moléculaire avec des premiers modèles de chromatographie en phase gazeuse (GPC) [29] et d'électrophorèse capillaire (CE) où la séparation de produits chimiques se fait par circulation de faibles volumes de fluide au travers de tubes très étroits afin d'augmenter la sensibilité et la résolution [30]. Le développement de moyens de détection d'armes chimiques et biologiques a également participé à la miniaturisation de laboratoires sur puce facilement utilisables et transportables. Ensuite, l'arrivée de puces microfluidique en PDMS a permis une meilleure bio-compatibilité avec les micro-organismes et la culture cellulaire. Comme évoqué dans une section précédente, les expériences mettant en œuvre l'étude de protéines s'adaptent très bien avec les micro-systèmes qui donne la possibilité de moduler l'organisation spatiale et ainsi reproduire artificiellement des microstructures cellulaires [31].

Avec l'amélioration des moyens de fabrication et de contrôle, l'organe sur puce a fait son apparition pour des raisons d'évolution des pratiques biologiques. Grâce à la microfluidique, l'organe sur puce représente une avancée considérable puisque qu'en 2010, a été réalisée par D. Huh et al, une reproduction d'une interface alvéole-capillaire des poumons sur le plan structural, fonctionnel et mécanique [32]. Mais depuis 2010 et avec l'arrivée de l'impression 3D, la microfabrication de géométries complexes sur trois dimensions s'est développée pour ressembler au mieux à des situations in-vivo telles que des connexions inter-organes.

Photolithographie

La technique de photolithographie, à l'origine développée pour l'impression de circuit électronique, est parfaitement adaptée pour créer des moules permettant la fabrication de puces microfluidiques. La première étape de la photolithographie est le dépôt de la résine photosensible qui s'achève grâce à trois méthodes majeures. La première utilise un polymère photosensible sous forme liquide déposé

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

finement sur un substrat souvent en verre. Une étape de spin-coating permet d'étaler le polymère de façon homogène et avec une épaisseur h prévisible suivant l'équation empirique (1.1.12). Cette technique utilise une plaque tournant de 2000 à 8000 tours/min afin d'étaler le liquide par force centrifuge sous toute la surface [33].

$$h = kC \frac{\mu}{\omega^2}^{1/3} \quad (1.1.12)$$

Avec C la concentration du polymère, k une constante, ω la vitesse de rotation angulaire et μ la viscosité.

Une autre méthode utilise une vaporisation de micro gouttes du polymère sur une plaque tournant entre 30 et 60 tours/min, mais nécessite un processus automatisé et optimisé pour avoir un état de surface convenable [34]. La troisième méthode s'appuie sur l'application sur le substrat d'un film photosensible homogène et de taille connue [35].

Ensuite, pour l'étape d'insolation, la plupart du temps, une source lumineuse avec une bande spectrale allant de 300 à 450 nm est utilisée pour photopolymériser la résine photosensible. Un masque comportant le motif géométrique est disposé au contact de la résine afin de photopolymériser uniquement les zones désirées comme représenté sur la figure 1.11.A. En fonction de la résolution souhaitée, plusieurs types de masques sont disponibles. Par écriture à faisceau d'électrons, la résolution atteinte est inférieure à une fraction de micron. Les masques sont le plus souvent des plaques de quartz ou de verre sur lesquelles un film de chrome est déposé pour former le motif souhaité [36]. Il est également possible pour des raisons de coût et de précision d'utiliser des masques d'impression haute précision ($> 5 \mu\text{m}$) en matière plastique qui ont l'avantage d'être moins fragiles. La figure 1.11.C représente le même principe d'insolation, mais avec une technique sans masque qui utilise un motif réalisé par une image formée sur un écran LCD (Liquid Crystal Display) [37]. La figure 1.11.B montre une technique utilisant un projecteur commercial afin d'insoler un motif grâce au dessin numérique projeté sur la résine [38]. Une autre technologie existe lorsque la géométrie de la puce nécessite d'être en 3D. Cette méthode d'écriture propose une procédure sans masque et qui utilise le phénomène d'absorption multiphotonique (TPA¹) via l'écriture laser directe (DLW²).

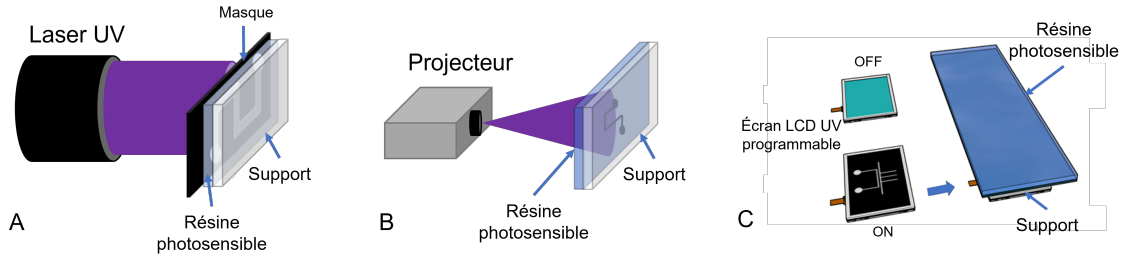


FIGURE 1.11 – Trois méthodes de photolithographie, A] Insolation grâce à un laser et un masque devant la résine, B] Insolation grâce à un projecteur et d'un motif dessiné numériquement, C] Insolation grâce à un écran LCD UV programmable.

Pour que la microfabrication soit la plus précise possible, certains paramètres sont à prendre en

1. Two-Photon Absorption
 2. Direct Laser Writing

compte, notamment le type de résine photosensible et l'environnement de travail. Pour la résine, le seuil de photosensibilité va jouer un rôle important pour la définition des motifs puisque la polymérisation doit s'effectuer uniquement si l'énergie déposée atteint un seuil caractéristique. Si cela n'est pas le cas, la forme des canaux est dégradée lors de la phase de développement. Lors de la phase où la partie non insolée doit être retirée chimiquement, la solubilité entre les zones exposées et non exposées doit posséder un fort contraste. Cette différence de solubilité s'explique par une ramification des chaînes de polymère induite par l'absorption des photons UV par les groupes réticulant [39]. Un exemple de résine photosensible très utilisée est la SU8, développée par IBM [40]. Elle possède une très grande photosensibilité et peu d'opacité, ce qui la rend très intéressante lorsque l'application nécessite des couches de résine de plusieurs dizaines de microns. L'opacité de la résine est un facteur limitant si les photons ne parviennent pas à pénétrer en quantité suffisante sur toute l'épaisseur de la résine. L'étape finale de la microfabrication consiste à retirer du substrat toute la résine non insolée afin de ne garder que les motifs souhaités. Cette étape de développement se fait par réaction chimique entre le solvant et la résine non insolée en maîtrisant le temps d'immersion de l'échantillon ainsi que la température.

Réplique en PDMS

Lorsque le moule est fabriqué, les applications en microfluidique ont besoin de récupérer la forme inverse du moule pour créer des canaux creux. Dans beaucoup d'expériences, le matériau utilisé est du PDMS [41] (Polydiméthylsiloxane) dont la formule chimique est donnée figure 1.12.

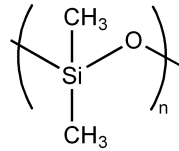


FIGURE 1.12 – Formule chimique du PDMS.

Le PDMS possède de nombreuses propriétés qui s'adaptent aux expériences avec une transparence optique dans une large gamme de longueur d'onde (300 nm à 2200 nm). En revanche, il ne convient pas à tous les solvants en raison de sa perméabilité. Le PDMS est souvent associé à un réticulant permettant de le polymériser et donc passer à l'état solide. Ce rapport réticulant/PDMS va influencer l'élasticité du matériau et ainsi changer les propriétés d'adhérence et donc d'étanchéité. Cette élasticité peut être mise à profit pour concevoir des pompes ou vannes grâce à l'effet de déformation des surfaces sous la pression [42]. La résolution théorique du PDMS est sub-micrométrique mais s'avère légèrement supérieure en réalité à cause des propriétés élastométriques du matériau et se situe au mieux aux alentours de 5 μm . Le tableau 1.2 regroupe quelques propriétés typiques du PDMS dans les conditions les plus couramment utilisées en laboratoire de nos jours.

Pour évoquer quelques propriétés du tableau, on peut comprendre que l'étude d'écoulements est facilitée avec une transparence dans toute la gamme du spectre visible. Le PDMS est de nature hydrophobe lorsqu'il n'est pas traité, mais l'utilisation d'un traitement de surface de type plasma oxygène permet de le rendre hydrophile. Ce traitement est d'ailleurs souvent utilisé pour améliorer l'adhérence et rendre étanche des modules en PDMS sur des surfaces de types verre, silicium, polyéthylène ou sur lui-même. La faible énergie de surface lui confère un profil intéressant pour la manipulation lors du démoulage en évitant de détériorer le moule. La perméabilité au gaz peut être

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

Propriété	Caractéristiques
Mécanique	Module de Young $\approx 750 \text{ kPa}$
Toxicité	Aucune connue
Réactivité	Inerte, oxydable par plasma
Perméabilité	Perméable aux gaz, solvant organique apolaires, imperméable à l'eau
Interfaciale	Faible énergie de surface $\approx 20 \text{ mN/m}$
Densité	≈ 0.9
Thermique	Isolant, conductivité thermique $\approx 0.2 \text{ W/m/K}$
Optique	Transparent de 300 à 2200 nm
Électrique	Isolant, champ de rupture $\approx 20 \text{ kV/cm}$

TABLE 1.2 – Tableau de valeurs typiques de propriétés du PDMS réticulé.

vue comme un avantage pour certaines expériences qui nécessitent de remplir de liquide un volume en utilisant la porosité du matériau pour expulser l'air au travers des parois [43]. Ces puces en PDMS doivent être vues comme des consommables, car il est difficile de les nettoyer et elles ne sont pas stables dans le temps. Sur le plan pratique, la procédure de fabrication de la réplique inverse du moule est assez simple comme représenté figure 1.13. Le mélange de PDMS/réticulant est versé sur le moule décrit précédemment puis est placé dans un four entre 40 et 70°C en fonction de la résistance du moule. Lorsque le PDMS est parfaitement solide, il doit être démoulé du support afin d'isoler la partie qui contient le négatif du moule. Pour achever la conception d'une puce microfluidique, le module de PDMS démoulé doit être scellé à un support pour assurer l'étanchéité de l'ensemble. Cette étape se fait le plus souvent par traitement plasma des deux surfaces et permet ainsi de coller par la création de liaisons covalentes [44]. Lorsque le plasma est mis en contact avec le PDMS et le verre, cela retire un électron aux atomes à leur surface pour ensuite se recombiner en liaisons covalentes SI-O-SI (Silicium-Oxygène-Silicium). Ce genre de collage n'ajoute pas de matière et peut résister à des pressions allant jusqu'à environ 5 bars. Il faut également noter que le traitement plasma change la mouillabilité du verre et du PDMS temporairement (quelques heures).

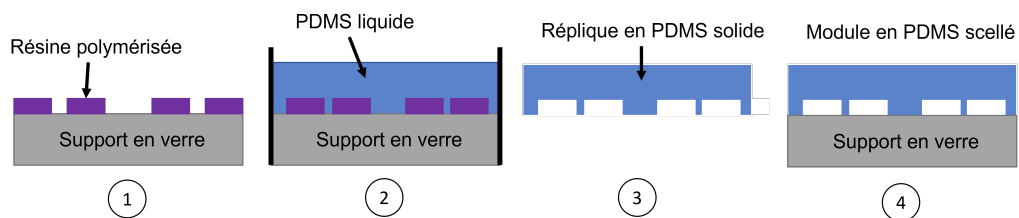


FIGURE 1.13 – Procédure pour répliquer en PDMS la forme d'un moule. 1] Création du moule en résine photosensible, 2] dépôt du PDMS liquide sur le moule dans un récipient + chauffage, 3] Démoulage du PDMS solide de son support, 4] Collage du module en PDMS par traitement plasma sur un support en verre.

Réplique en verre

Lorsque que le PDMS n'est pas un matériau adapté aux besoins pour des raisons techniques (pression, température, réaction chimique), le besoin peut se faire d'utiliser des puces microfluidiques en silicium/verre. D'autres avantages se présentent grâce à l'utilisation du verre, notamment la précision sub-micrométrique, la possibilité de former des canaux de formes originales (cylindrique, pyramidale) ou encore sa neutralité chimique. Le principe de gravure du verre ou silicium est similaire à la fabrication des moules pour le PDMS. La méthode utilise également un film photosensible aux UV pour former un motif sur un support en verre. Ensuite, durant l'étape de développement, les parties non insolées du film photosensible sont retirées. Les zones libres du film photosensible sont ensuite attaquées chimiquement pour creuser les cavités, avec par exemple, de l'acide fluorhydrique pour le verre. La géométrie des canaux dépend du temps de gravure chimique qui est une donnée largement répertoriée et varie de 1 à 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ [45]. Le processus de gravure peut être isotrope ou anisotrope selon les besoins géométriques des canaux (voir figure 1.14). La première option (isotrope), réalise une attaque chimique du support de façon indifférente à la direction et tend à former des cavités cylindriques. En revanche, pour d'autres matériaux que le verre (structure amorphe), la gravure anisotrope utilise des attaques chimiques qui ont tendance à se développer selon un plan cristallin préférentiel et ainsi former des canaux comportant des faces.

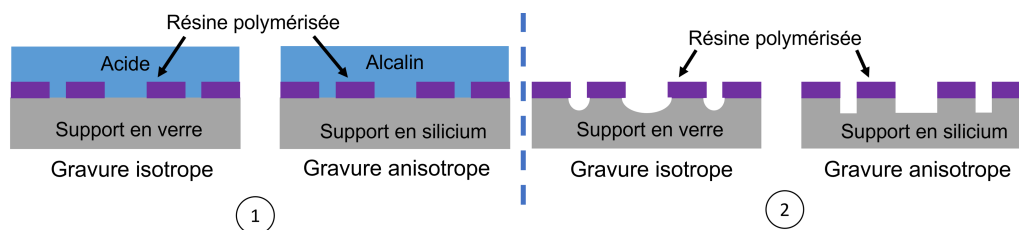


FIGURE 1.14 – Procédure pour répliquer en verre ou silicium l'inverse de la forme du motif en résine polymérisée. 1] Déposition des solutions acides pour le verre et alcalines pour le silicium sur le support protégé par la résine photosensible à certains endroits. 2] Résultat de la gravure chimique en fonction du type de gravure.

Cette partie permet de passer en revue les méthodes majeures de fabrication de systèmes microfluidiques. Mais la microfluidique est le plus souvent utilisée comme outil de contrôle des conditions d'expériences, c'est pourquoi la partie suivante s'intéresse à une méthode de suivi du mouvement de nano-particules qui peut être utilisée en régime microfluidique afin de caractériser les processus en action au sein de la puce.

1.2 Suivi de mouvements de particules

L'analyse quantitative d'images en microscopie suscite depuis longtemps de l'intérêt dans de multiples disciplines et d'autant plus en biologie. Lorsque l'un des pionniers de l'utilisation du microscope, Robert Brown, fait l'observation en 1827 d'un grain de pollen [46] dans de l'eau, il remarque qu'à l'intérieur de celui-ci, de plus petites particules en mouvement semblent "vivantes". L'étude de ces mêmes particules provenant d'une plante morte depuis longtemps lui a permis de comprendre que celles-ci étaient en mouvement désordonné en raison d'un autre phénomène. Ce

n'est alors que des années plus tard, qu'Albert Einstein explique que ce comportement, plus tard appelé mouvement brownien, est en fait provoqué par les collisions aléatoires des molécules d'eau sur ces particules [47]. Cette théorie est alors étendue à tous les liquides, mais s'applique également aux gaz et permet de comprendre que des molécules invisibles au microscope se heurtent constamment à cause de l'agitation thermique et peuvent donner l'impression que des plus grosses particules se toutes seules. En 1910, Jean Perrin, prix Nobel à l'origine de la démonstration de l'existence des atomes, réalise la première expérience montrant le mouvement brownien de grains de mastic de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre en suspension dans l'eau. Réalisant l'enregistrement à la main, chaque position était annotée toutes les 30 secondes sur un papier quadrillé avec une précision de $50\ \mu\text{m}$ pour 16 divisions comme illustré sur la figure 1.15 issue de son article d'origine [48].

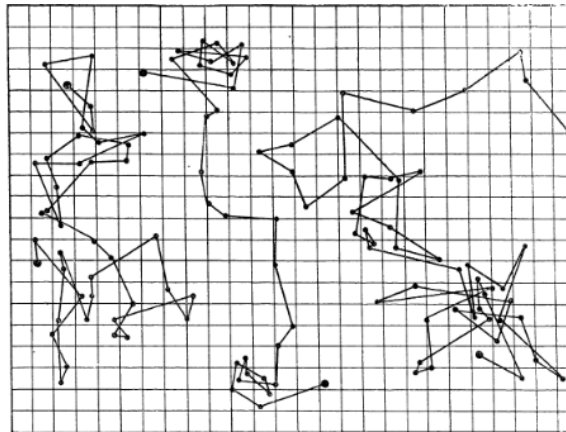


FIGURE 1.15 – Image du support qui a servi à Jean Perrin en 1910 à enregistrer toutes les 30 secondes les positions de grains de mastic.

1.2.1 Mouvement brownien

Le phénomène décrit précédemment peut se comprendre comme une particule allant à une vitesse constante et en ligne droite jusqu'à ce qu'une particule du solvant vienne à sa rencontre et la dévie en raison du choc (régime balistique). De ce fait, les trajectoires des particules sont très aléatoires et ne possèdent pas de mouvement d'ensemble tendant vers une direction. Le physicien, Louis-Georges Gouy réalise en 1888 des observations importantes pour la compréhension du phénomène lorsque l'on se place du point de vue de la particule [49] :

- Les mouvements sont irréguliers.
- Deux particules proches ont des mouvements indépendants.
- Plus la taille des particules est réduite, plus le mouvement est rapide.
- La température rend leurs mouvements plus véloces.
- Pas d'amortissement dans le temps du mouvement.
- La vitesse de déplacement dépend de la viscosité du fluide.

Une métaphore de ce phénomène, est celle de la "marche de l'ivrogne" où une personne alcoolisée possède la même probabilité de se déplacer devant, derrière, à gauche ou à droite. Dans le cas du

mouvement brownien, la taille des pas augmente dans le temps, mais en moyenne la personne reste à la même position. Ce n'est qu'en faisant la somme des déplacements au carré, que l'on obtient la distance parcourue par l'ivrogne. Pour reprendre une approche plus physique, la considération statistique d'un grand échantillon de particules, à un instant t , donne un résultat nul pour la somme des vecteurs vitesse de chacune d'entre elles. Louis Bachelier démontre en 1900 que la moyenne quadratique $\langle \Delta x^2 \rangle$ des variations de positions d'une particule permet de caractériser son mouvement, et non la moyenne arithmétique $\langle \Delta x \rangle$ qui elle, donne un résultat nul pour toute particule [50].

Équation de Stokes-Einstein

Grâce à deux théories principales qui sont, d'une part la théorie de l'hydrodynamique de Stokes et d'autre part la théorie osmotique de Van't Hoff, Einstein propose un point de vue qui considère les deux principes en simultané. Nous passons le développement complet, pour se focaliser sur la réflexion qui a permis d'aboutir à la formule de Stokes-Einstein [47]. Le constat de base traite de la pression osmotique exercée par une substance dissoute dans un solvant. Admettons qu'une membrane, perméable uniquement au solvant sépare une phase contenant solvant + soluté et une phase de solvant seul. La thermodynamique classique prédit donc une pression osmotique exercée entre les deux phases pour une raison d'équilibre de concentration. Néanmoins, cette théorie prédit que pour des particules microscopiques (plus grande taille) ce phénomène de pression sur la membrane n'existe pas. Ce constat amène Einstein à développer cette théorie du point de vue de la théorie moléculaire de la chaleur et parvient à démontrer que pour des particules microscopiques et à forte dilution, l'effet de pression osmotique existe également de façon similaire au soluté. Partant de la considération que chaque particule subit donc une force $F(x)$, la pression osmotique peut être reliée à cette forme par l'expression suivante :

$$F(x)n_p(x) - \frac{\partial p(x)}{\partial x} = 0 \quad (1.2.1)$$

Où $n_p(x)$ est la concentration en particules et $p(x)$ la pression osmotique. En considérant la situation où l'on étudie une tranche contenant $n(x)dx$ particules dans une colonne de solution ayant un gradient de concentration, deux phénomènes sont en concurrence. Dans cette situation, maintenant les particules en suspension, un phénomène est la poussée d'Archimède et l'autre est la différence de pression osmotique entre les faces de la tranche dx . Cela peut donc être vu comme l'existence de deux flux opposés et d'intensités équivalentes. Un flux ascendant, dû à la pression osmotique induite par le gradient de concentration et qui peut s'exprimer dans l'hypothèse de forte dilution de la façon suivante (loi des gaz parfaits) :

$$p = nk_B T \quad (1.2.2)$$

Avec n le nombre de molécules/volume k_B le constante de Boltzmann en $[J/k]$ et T la température en Kelvin. Le flux descendant causé par la force F peut se formuler en prenant en compte la vitesse des particules v et le coefficient de friction f :

$$J_c = nv = nF(x)/f \quad (1.2.3)$$

Ce coefficient de friction peut également être défini par la loi de Stokes :

$$f = 6\pi\eta r \quad (1.2.4)$$

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

Avec η la viscosité dynamique en [Pa.s], r le rayon hydrodynamique en [m]. En reprenant la loi de Fick (eq 1.1.5B) qui représente le flux de diffusion, il est possible de l'assimiler au flux descendant puisque la diffusion se fait d'une région à forte concentration vers une zone à faible concentration. On peut alors écrire :

$$\frac{nF(x)}{6\pi\eta r} - D \frac{\partial n}{\partial x} = 0 \quad (1.2.5)$$

Finalement, grâce aux équations (1.2.1), (1.2.2) et (1.2.5) on retrouve la formulation finale suivante, menant au coefficient de diffusion relié à la taille des particules dans l'hypothèse sphérique :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1.2.6)$$

Cette équation permet, à partir de la théorie de la thermodynamique classique, de relier le comportement de la diffusion aux conditions physiques et tailles des particules contenues dans le fluide.

La probabilité de saut

Pour aborder le mouvement brownien d'un point de vue plus probabiliste, il est possible de s'intéresser à la probabilité d'une particule d'effectuer un déplacement. La probabilité $P(x, t)$ de saut, aussi appelée probabilité de transition conditionnelle, est la probabilité de trouver la particule à l'abscisse x au temps t alors qu'elle était en $x = 0$ au temps $t = 0$. Elle s'obtient à partir de l'équation de diffusion (eq 1.1.5) que l'on résout en prenant la transformée de Fourier pour obtenir [51] :

$$P(x; t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (1.2.7)$$

C'est-à-dire une gaussienne centrée sur la position $x = 0$ et de variance $\sigma^2 = \langle \Delta x^2 \rangle = 2Dt$. À 3 dimensions, toujours si la particule se trouve à l'instant $t = 0$ au centre du repère en $x = y = z = 0$, on a³ :

$$P(x, y, z; t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2 + z^2}{4Dt}\right) \quad (1.2.8)$$

Caractérisation du mouvement brownien par son déplacement quadratique moyen

Comme montré dans l'équation 1.2.7, il est facile de relier le déplacement quadratique moyen (MSD⁴) $\langle \Delta x^2 \rangle$ au coefficient de diffusion par :

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = 2dDt \quad (1.2.9)$$

d représente le nombre de dimensions sur lesquelles est étudié le mouvement de la particule, pour un mouvement linéaire ($d = 1$), dans un plan ($d = 2$) et dans l'espace ($d = 3$). Grâce à cette formule, il est possible de remonter aux rayons des particules à condition d'avoir accès à leurs trajectoires. Mathématiquement, le déplacement quadratique moyen s'obtient via :

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = \frac{1}{t} \int_0^t x^2(\tau) d\tau \quad (1.2.10)$$

3. On retrouve la probabilité selon l'axe x de l'équation 1.2.7 en intégrant sur tout l'espace selon x et y .

4. MSD pour Mean square displacement en anglais

Ces outils théoriques qui décrivent le mouvement brownien depuis plusieurs points de vue tels que le déplacement carré moyen ou la probabilité de saut permettent à de nombreuses applications de se développer pour tirer parti du suivi dynamique d'objets en suspension dans des fluides au moyen de la microscopie ou de l'imagerie en général. En fonction de la dynamique des observations et les contraintes expérimentales, plusieurs méthodes de suivi existent et permettent de répondre à besoins différents. Les sections suivantes abordent de manière non exhaustive des méthodes permettant d'extraire des informations sur le comportement dynamique microscopique ou macroscopique d'objets en suspension dans des fluides.

1.2.2 Nanoparticle tracking analysis

Lorsque des images ou vidéos des effets dynamiques sont réalisées, le défi est d'élaborer un outil automatique qui permet d'extraire des informations grâce aux déplacements des espèces observées. On a vu, grâce au mouvement brownien, qu'il est possible de retrouver la taille des particules dans l'hypothèse sphérique. De manière réciproque, il est possible, connaissant la taille de l'espèce diffusante, d'estimer quel libre parcours moyen est attendu et ainsi déceler des réductions ou accentuation de mobilités. Le principe des mesures de déplacement se base sur la distance effectuée par une particule entre deux images successives séparées d'un temps Δt . Statistiquement, la longueur des déplacements effectués entre deux images suit une distribution gaussienne qu'il est possible d'exploiter afin d'extraire le coefficient de diffusion grâce à des estimateurs appropriés. Deux approches statistiques peuvent être alors adoptées suivant l'hypothèse ergodique : Pour un système contenant un grand nombre de particules, mesurer un grand nombre de déplacements pour une particule est équivalent à mesurer les déplacements d'un grand nombre de particules à un instant donné.

Courbe du déplacement carré moyen

La méthode d'estimation du coefficient de diffusion la plus connue est celle de la courbe du déplacement carré moyen (MSD) pour différents intervalles de temps Δt . Lorsque que ce temps augmente, la distance parcourue augmente également et permet ainsi de tracer l'évolution du MSD en fonction du temps d'intervalle. La courbe obtenue peut alors être approchée par un modèle et ainsi déterminer le coefficient de diffusion. Soit ρ_n le déplacement carré moyen pour un intervalle de temps $n\Delta t$ ⁵ :

$$\langle \rho_n^2 \rangle = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (\vec{r}_{i+n} - \vec{r}_i)^2, \quad n = 1, \dots, N-1 \quad (1.2.11)$$

Avec \vec{r}_i , $i \in (1, \dots, N)$ les positions de la particule mesurées pour l'image i . Lorsque la diffusion est libre dans toutes les d directions, le MSD croît linéairement avec l'intervalle de temps Δt de la façon suivante [52] :

$$\rho_{n\Delta t} = 2dD\Delta t(n - 2R) + 2d\sigma^2 \quad (1.2.12)$$

Avec R le coefficient de flou de mouvement et σ l'erreur de localisation. Le coefficient de flou de mouvement R représente le rapport de temps entre le temps d'exposition de la caméra pour prendre une image et le temps entre deux images successives [53] :

5. Le temps est discrétisé et Δt est le temps minimal entre deux images

$$R = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} S(t)(1 - S(t))dt \quad (1.2.13)$$

Avec $S(t)$ la fraction d'illumination totale de la caméra, $S(t) = \int_0^t \zeta(t')dt'$. R vaut zéro si la fonction d'ouverture de la caméra est un delta de Dirac et ne provoque aucun flou de mouvement. Dans le cas commun d'une illumination uniforme dans le temps, $s(t) = 1/\Delta t$ donne un coefficient $R = 1/6$. Dans le cas théorique, l'approche d'une courbe de MSD doit fournir une bonne estimation du coefficient de diffusion. Une problématique s'installe lorsque des intervalles de temps longs sont utilisés et augmentent la variance et la corrélation du MSD [54]. Intuitivement, en statistique, lorsque le nombre de données augmente, la précision s'améliore également. Ceci se vérifie lorsque les données sont indépendantes entre elles, mais ce n'est pas le cas du MSD qui est fortement corrélé aux temps long et ainsi l'information apportée par les points supplémentaires peut être supplantée par le bruit de mesure [53]. La figure 1.16 illustre le tracé des multiples trajectoires browniennes analysées par la méthode de l'approche de la courbe du MSD pour différent temps d'intervalles. On peut remarquer que cette méthode souffre de biais, même pour les trajectoires simulées numériquement puisque la plupart dévient fortement du comportement théorique.

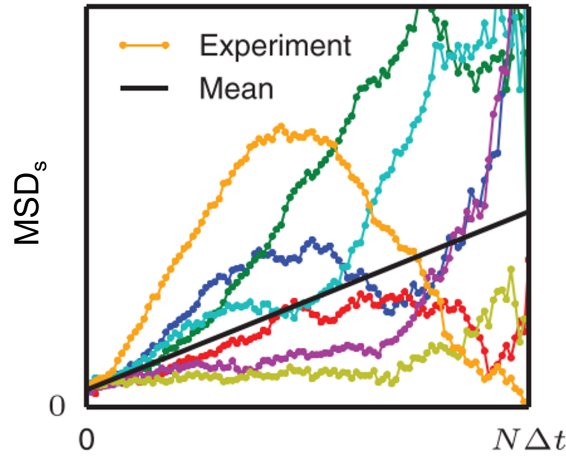


FIGURE 1.16 – Graphique regroupant de multiples tracés de déplacements carrés moyen en fonction du temps d'intervalles Δt . En couleurs, des simulations numériques des diffusions de particules et en noir, la courbe théorique moyenne.[55]

Approche de la distribution des déplacements par une gaussienne

En reprenant l'expression de la probabilité de saut (équation 1.2.7,) il apparaît que celle-ci possède une forme gaussienne lorsqu'un grand nombre d'évènements sont observés. Une méthode consiste à approcher par une gaussienne la distribution formée par tous les déplacements. L'histogramme obtenu contient les informations nécessaires à l'estimation du coefficient de diffusion au moyen des paramètres d'écart-type σ et de moyenne μ [56]. On sait que :

$$var(x) = \sigma^2 \quad (1.2.14)$$

et que la variance des déplacements entre deux positions x_n et x_{n+1} est la suivante (théorème de König-Huygens) :

$$\text{var}(\Delta x) = \langle \Delta x^2 \rangle - \langle \Delta x \rangle^2 \quad (1.2.15)$$

où $\langle \Delta x^2 \rangle$ est la moyenne quadratique des déplacements et $\langle \Delta x \rangle^2 = \mu^2$ qui doit tendre vers zéro dans une expérience de diffusion libre, c'est-à-dire sans mouvement de dérive, souvent appelé *drift*. Grâce aux informations données par la courbe approchée d'un histogramme comme présenté figure 1.17, nous avons accès à la variance ainsi qu'au paramètre μ^2 qui représente $\langle \Delta x \rangle^2$.

$$\langle \Delta x^2 \rangle = \sigma^2 + \mu^2 \quad (1.2.16)$$

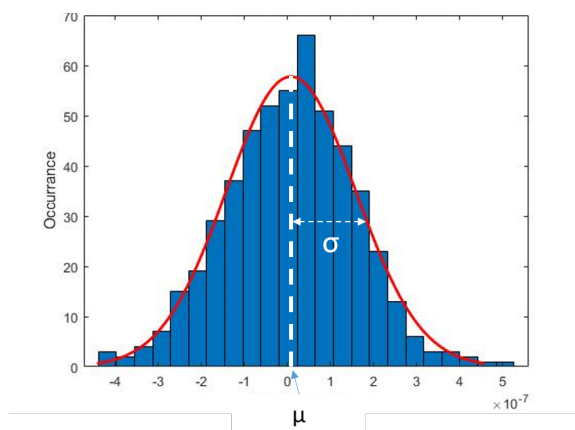


FIGURE 1.17 – Histogramme des déplacements 1D d'une particule agitée d'un mouvement brownien. Avec σ l'écart-type et μ la moyenne de la distribution.

Ces informations permettent de calculer le coefficient de diffusion de l'objet étudié grâce au déplacement carré moyen estimé par le modèle de distribution gaussienne.

$$D = \frac{\langle \Delta x^2 \rangle}{2\Delta t} \quad (1.2.17)$$

Estimateur de covariance

Lorsque l'étude des déplacements est réduite à une seule trajectoire, la méthode du MSD n'est pas du tout souhaitable en raison du biais qu'elle possède. Pour obtenir un estimateur non biaisé, reprenons le raisonnement à partir de la mesure de la position d'une particule selon un axe à un temps $t_n = n\Delta t$ pour simplifier [55] :

$$x_n = \int_{t_n - \Delta t}^{t_n} x_{true}(t_n - t)\zeta(t)dt + \sigma\xi_n \quad (1.2.18)$$

Avec x_{true} la position vraie de la particule, l'intégrale sur le temps décrit le flu de mouvement dû à un temps d'exposition fini. L'autre terme, décrit l'erreur de localisation, constitué de l'écart type

de l'erreur de localisation σ et ξ du bruit blanc gaussien de moyenne nulle, variance unitaire et une autocovariance nulle.

Grâce à l'équation (1.2.18), la matrice de covariance des déplacements mesurés $\Delta x_1, \dots, \Delta x_N$ d'une particule qui se diffuse est la suivante :

$$\langle (\Delta x_n)^2 \rangle = 2D\Delta t + 2(\sigma^2 - 2DR\Delta t) \quad (1.2.19)$$

$$\langle (\Delta x_n \Delta x_{n+1}) \rangle = (2DR\Delta t - \sigma^2) \quad (1.2.20)$$

$$\langle (\Delta x_n \Delta x_m) \rangle = 0, \quad \text{pour } |n - m| > 1 \quad (1.2.21)$$

Les équations (1.2.19) et (1.2.20) montrent comment construire des estimateurs non biaisés de D et σ^2 . Soit \hat{D} et $\hat{\sigma}^2$ deux estimateurs de covariance :

$$\hat{D} = \frac{\langle (\Delta x_n)^2 \rangle}{2\Delta t} + \frac{\langle (\Delta x_n \Delta x_{n+1}) \rangle}{\Delta t} \quad (1.2.22)$$

$$\hat{\sigma}^2 = R \langle (\Delta x_n)^2 \rangle + (2R + 1) \langle (\Delta x_n \Delta x_{n+1}) \rangle \quad (1.2.23)$$

Si l'expérience donne accès à la valeur de σ^2 en amont grâce à une mesure de l'incertitude sur la localisation, il est possible d'exprimer \hat{D} de la façon suivante :

$$\widehat{D}_R = \frac{\langle (\Delta x_n)^2 \rangle - 2\sigma^2}{2(1 - 2R)\Delta t} \quad (1.2.24)$$

Ces deux formes de l'estimateur de covariance du coefficient de diffusion sont garanties non biaisées et optimales [55] tant que le rapport signal sur bruit (SNR) est plus grand que 1. Le rapport signal sur bruit ici est défini par rapport à l'écart-type de l'erreur de localisation et le coefficient de diffusion. Nous définirons ce ratio de la façon suivante :

$$\text{SNR}_D = \frac{\sqrt{D\Delta t}}{\sigma} \quad (1.2.25)$$

Ce rapport signal sur bruit est à différencier de la définition habituelle associée SNR dans des images. Ici, c'est le saut moyen d'une particule pendant un temps Δt qui est comparé à l'écart-type de l'erreur de localisation. Ces deux estimateurs possèdent de très bonnes performances dès que le $\text{SNR}_D > 1$ et rejoignent pratiquement la limite de Cramer-Rao [55] mais sont fortement dépendants du nombre de points N comme on peut le voir dans l'expression des variances associées :

$$\text{var}(\hat{D}) = D^2 \left[\frac{6 + 4\epsilon + 2\epsilon^2}{N} + \frac{4(1 + \epsilon)^2}{N^2} \right] \quad (1.2.26)$$

$$\text{var}(\widehat{D}_R) = \frac{D^2(2 + 4\epsilon + 3\epsilon^2)}{2(1 - 2R)^2} + \frac{\text{var}(\hat{\sigma}^2)}{(1 - 2R)^2 \Delta t^2} \quad (1.2.27)$$

Avec $\epsilon = \sigma^2 / (D\Delta t) - 2R$.

Ces différentes caractéristiques de l'estimateur de covariance (CVE) permettent de dire qu'il présente les qualités d'un estimateur optimal, spécifiquement dans des cas pratiques où le rapport signal sur bruit est à peine supérieur à 1 et le nombre de points de mesures sont compris entre 10 et 100.

1.2.3 Redistribution de fluorescence après photoblanchiment

Parmi les premières méthodes de caractérisation de la mobilité d'espèce en solution, la redistribution de fluorescence après photoblanchiment se présente comme un excellent outil pour la biologie. Des expériences ont permis de décrire la mobilité de protéines marquées par fluorescence au travers de membranes cellulaires [57]. Cette technique se base sur l'annihilation de la capacité d'une molécule à émettre de la fluorescence. Lorsqu'une molécule fluorescente absorbe un photon, elle passe de l'état fondamental à l'état singulet excité. Elle dissipe une fraction de l'énergie au travers d'une conversion interne non radiative. S'en suit, soit une émission de fluorescence avec retour à l'état fondamental ou une conversion intersystème vers un état triplet. Les états excités, triplets ou singulets peuvent subir des changements structurels irréversibles en réagissant avec l'oxygène ou d'autres molécules et ainsi rendre impossible le processus de fluorescence [58]. Lorsqu'un ensemble de molécules fluorescentes est disposé au sein d'une zone d'intérêt, il est possible d'étudier les phénomènes de transport. Le phénomène de photoblanchiment peut être mis à profit pour éteindre la fluorescence d'une zone avec un laser de haute intensité afin d'étudier la vitesse à laquelle cet espace restaure sa fluorescence. Cet effet traduit le déplacement de nouvelles molécules fluorescentes vers la zone qui a subi le photoblanchiment.

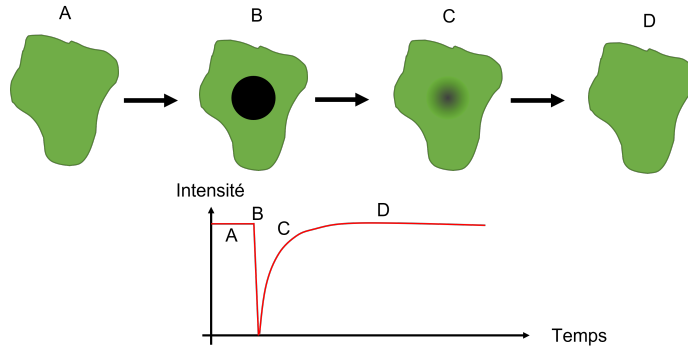


FIGURE 1.18 – Schéma présentant les étapes de la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment ainsi que le graphique de l'intensité de fluorescence dans le temps correspondant à chaque étape. A] Support d'étude muni de marqueurs fluorescents en solution. B] Photoblanchiment d'une zone circulaire grâce à un faisceau laser. C] Restauration de la fluorescence de la zone par migration des molécules non insolées. D] Retour du signal de fluorescence de base.

En pratique, cette technique, illustrée figure 1.18, est mise en œuvre par microscopie de fluorescence en injectant une population homogène de molécules fluorescentes dans la région souhaitée. Au sein de cette dernière, une zone restreinte subit un flash lumineux intense afin de s'assurer de la destruction de la fluorescence des molécules illuminées. En fonction de la taille des molécules et des contraintes biologiques, le signal de fluorescence va revenir plus ou moins rapidement par diffusion depuis les zones non photoblanchies. Ce retour du signal de fluorescence de la zone qui a subi le flash peut être mesuré dans le temps afin d'en extraire une constante de temps caractéristique τ_D . Grâce à ce temps caractéristique, le coefficient de diffusion peut donc être établi par la formule suivante [57] :

$$D = \frac{w^2}{4\tau_D} \tag{1.2.28}$$

Avec w le rayon du faisceau de photoblanchiment et le facteur 4 provenant du facteur $2d$ de l'équation 1.2.9. Connaissant les propriétés initiales des supports des marqueurs fluorescents telles que le coefficient de diffusion, concentration, solvant, il est possible d'estimer si des phénomènes intrinsèques au milieu d'étude entravent ou accélèrent le processus de déplacement des objets d'étude. Ce genre d'expériences peut être réalisé à des échelles de cellules (*de* 10 à 100 μm) pour étudier les phénomènes de transports généraux, mais d'autres études se sont intéressées à améliorer la résolution de cette méthode en illuminant des zones bien plus petites ($\approx 0.5\mu\text{m}$) pour observer la cinétique d'une région précise d'une membrane de protéine afin d'en déterminer les différentes sous-couches [59].

1.2.4 Profil de diffusion

Comme évoqué précédemment dans la section 1.1.3, l'utilisation d'un flux laminaire grâce à des puces microfluidiques restreint le processus de mélange à de la diffusion. En observant le profil de diffusion d'un marqueur fluorescent dans une jonction en T ou en H [60], il est possible de retrouver le coefficient de diffusion de l'entité étudiée [61]. L'intérêt d'une telle mesure peut se trouver dans le besoin de connaître la taille ou la cinétique d'une protéine ayant été formée en amont dans la puce microfluidique. Lorsque l'on s'intéresse aux écoulements microfluidiques et pour reprendre le cas du mélange de deux espèces chimiques grâce à une jonction en T, l'effet mélange par diffusion tend à homogénéiser le canal en termes de concentration. Considérant une largeur de canal L_0 et une vitesse d'écoulement U_0 , le temps nécessaire aux espèces d'envahir la largeur totale du canal vaut $\tau_D = w^2/4D$ et donc la longueur de canal microfluidique pour rendre homogène l'écoulement après une jonction en T est $Z = U_0.L_0^2/4D$. Lors de l'utilisation de cette méthode, une attention particulière doit être portée quant au moyen de mesurer l'intensité du signal de fluorescence si l'on veut la relier à la concentration. La loi de Beer-Lambert stipule que l'intensité lumineuse détectée n'est pas linéaire par rapport à l'épaisseur de solvant absorbant qu'elle traverse, mais possède une loi exponentielle décroissante de la forme suivante :

$$L = L_0 \exp(-\kappa x) \tag{1.2.29}$$

Avec L la luminance, L_0 la luminance de la solution non diluée, κ le coefficient d'absorption [m^{-1}] et x la position spatiale [m].

1.2.5 Diffusion dynamique de la lumière

Les méthodes précédentes sont régulièrement utilisées dans la caractérisation des coefficients de diffusion pour des expériences qui demandent des conditions particulières (in-vitro, dynamique, milieu confiné, etc) mais restent peu développées sous forme de systèmes compacts commercialisables. Certaines options compactes existent tout de même, mais réduisent les degrés de liberté autour des expériences. En revanche, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique de caractérisation du coefficient de diffusion qui est très répandue et largement commercialisée sous forme d'appareils prêts à l'emploi. La notion de diffusion⁶ en optique est un phénomène où un rayonnement est dévié dans différentes directions à cause d'une interaction électromagnétique avec des particules. On peut trouver deux types de diffusion, élastique ou inélastique. La première est une diffusion où la fréquence est conservée alors que la deuxième modifie la fréquence de l'onde diffusée.

6. scattering en anglais, qui permet de la différencier de la diffusion dans des fluides.

La polarisation peut également subir des changements au cours d'une diffusion. La compréhension de ce phénomène peut s'interpréter grâce à différentes théories en fonction de la taille des particules impliquées par rapport à la longueur d'onde du rayonnement. L'une des premières expériences de diffusion de la lumière fut menée par John Tyndall en 1868 en caractérisant l'effet de diffusion d'un aérosol dont les particules en suspension sont plus grandes que la longueur d'onde [62]. Quelque temps après, Rayleigh établit le comportement de la diffusion de la lumière lorsque les particules sont plus petites que la longueur d'onde [63]. Brièvement, la théorie de Mie intervient lorsque la taille des particules est comparable ou supérieure à la longueur d'onde. C'est le cas des gouttes d'eau contenues dans les nuages qui leur donne une couleur blanche. Dans ce modèle, c'est une diffusion élastique quasi anisotrope qui apparaît et dont la direction préférentielle s'accroît avec la taille de la particule. En revanche, la couleur bleue du ciel est due aux tailles des particules qui composent l'atmosphère qui sont très petites devant la longueur d'onde. Pour ce cas, c'est la théorie de Rayleigh qui s'applique et celle-ci prévoit un profil de diffusion isotrope dont l'intensité I dépend de manière inversement proportionnelle à la longueur d'onde à la puissance 4.

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2(\theta)}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6 \quad (1.2.30)$$

Avec I_0 l'intensité du rayon incident en $[W/m^2]$, θ l'angle de diffusion en [rad], R la distance de l'observation à la particule en $[m]$, λ la longueur d'onde en $[m]$, n l'indice de réfraction et d le diamètre de la particule en $[m]$. Cette diffusion provient de la formation d'un dipôle, induit par la déformation du nuage électronique de la particule, elle-même engendrée par les oscillations de l'onde incidente. Cette déformation déplace le barycentre chargé négativement et ainsi forme le dipôle avec le noyau chargé positivement. La figure 1.19 illustre les deux théories de la diffusion en fonction de la taille de la particule subissant l'onde incidente.

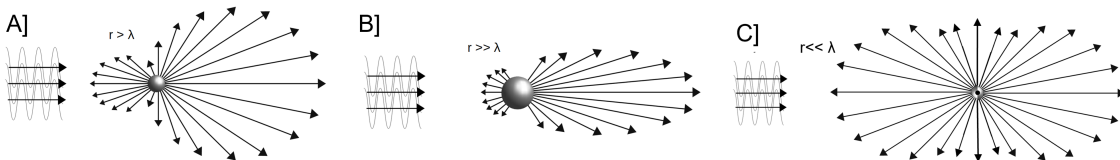


FIGURE 1.19 – Profil de diffusion de la lumière en fonction de la taille de la particule par rapport à la longueur d'onde d'excitation. A] Diffusion de Mie pour une particule de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde. B] Diffusion de Mie pour une particule grande devant de la longueur d'onde. C] Diffusion de Rayleigh pour une particule petite devant la longueur d'onde.

La méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une méthode de spectroscopie qui a déjà fait ses preuves depuis plus de 60 ans. Elle permet de décrire le profil de distribution de taille de petites particules au sein d'une solution. La caractérisation des particules est réalisée au moyen d'une analyse des fluctuations temporelles de l'intensité d'un laser diffusée par des particules en suspension au travers de l'échantillon. Après un traitement du signal par une méthode d'autocorrélation, on obtient, grâce au profil de la courbe, une constante de temps qui caractérise les particules et nous permet de remonter à leur taille. Lorsqu'une source de lumière cohérente rencontre des particules au sein d'une solution, celle-ci réémettent un champ électrique sous forme,

en première approximation, d'une onde sphérique par un processus de diffusion de la lumière. En raison de l'agitation thermique, les particules se déplacent selon un mouvement brownien comme évoqué précédemment. Ce mouvement chaotique produit, par l'intermédiaire de la diffusion, des interférences provenant de chacune des particules agissant comme des émetteurs. Ainsi, en se plaçant en un point particulier dans l'espace (comme peut le faire un capteur), il est possible d'observer ces figures d'interférences que l'on appelle *speckle*. Comme représenté sur la figure 1.20, l'origine d'un tel phénomène provient d'un déphasage induit par la différence de chemin optique parcouru par les champs électriques diffusés pour arriver au détecteur. Lorsque la longueur d'onde est très petite devant la distance jusqu'au capteur, alors on peut utiliser l'approximation de l'onde plane et ainsi exprimer le déphasage entre deux particules.

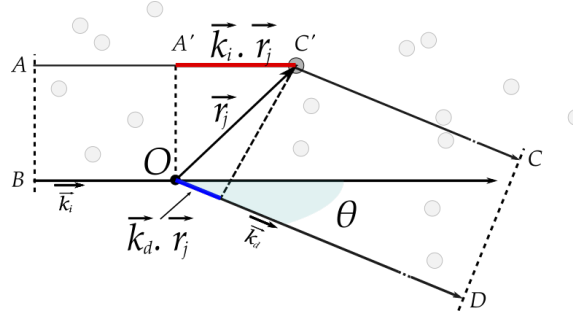


FIGURE 1.20 – Déphasage dû à l'onde incidente et la position de la particule (sphères grises). En pointillés sont représentés les plans où les phases des ondes sont les mêmes, c'est-à-dire que les rayons lumineux sont orthogonaux aux fronts d'ondes selon le théorème de Malus. Avec θ l'angle de diffusion, O l'origine du repère et k_i et k_d respectivement les vecteurs de l'onde incidente et diffusée.

Soit $\Delta\Phi$ le déphasage entre deux particules qui peut être décomposé en $\Delta\Phi_1$ et $\Delta\Phi_2$ et \vec{k}_d le vecteur de l'onde diffusée :

$$\Delta\Phi_1 = \vec{k}_d \cdot (\vec{r}_2 - \vec{r}_1) \quad (1.2.31)$$

Avec $k_{i,d} = \frac{2\pi n}{\lambda}$, la direction du vecteur d'onde k est la même quelle que soit la particule diffusante car le détecteur est placé dans la zone de rayonnement de champ lointain (les ondes sphériques peuvent être considérées comme des ondes planes).

En prenant O , l'origine du repère :

$$\Delta\Phi_{1j} = \vec{k}_d \cdot \vec{r}_j \quad (1.2.32)$$

Une autre source de déphasage se situe dans la phase de l'onde incidente lorsqu'elle rencontre une particule. Celle-ci ne sera pas la même pour toutes les particules en raison du décalage spatial le long de l'axe défini par le vecteur k_i , soit :

$$\Delta\Phi_{2j} = \vec{k}_i \cdot \vec{r}_j \quad (1.2.33)$$

Nous pouvons maintenant écrire le déphasage total pour une particule j :

$$\Delta\Phi_j = \Delta\Phi_{2j} + \Delta\Phi_{1j} = \vec{q} \cdot \vec{r}_j \quad (1.2.34)$$

où

$$\vec{q} = \vec{k}_d - \vec{k}_i$$

Les interférences observées peuvent se justifier grâce à l'interprétation du vecteur de diffusion \vec{q} . Ce vecteur possède une norme qui représente l'écart spatial qui fait passer d'interférence constructive à destructive, en d'autres termes en raisonnant du point de vue physique, il représente l'espace entre deux plans de Bragg⁷. La norme du vecteur de diffusion est obtenue en calculant $q = k_d - k_i$ et du fait que la diffusion soit élastique $k_d = k_i = k$. Nous obtenons un triangle isocèle qui nous permet de dire que $q/2 = k \sin \theta/2$.

$$q = \frac{4\pi n \sin \theta/2}{\lambda}$$

La direction du vecteur de diffusion est un paramètre important, car il indique une direction préférentielle des plans sur lesquels les particules doivent se trouver pour mener à une diffusion de la lumière incidente vers le détecteur. Lorsque les particules se trouvent sur des plans faisant un angle $\theta/2$ avec la direction de la lumière incidente, tout en étant espacées d'une distance $\Lambda = 2\pi/q$, l'interférence de la lumière diffusée par ces particules ne conduit à des interférences constructives que dans une seule direction faisant un angle θ avec la direction de la lumière incidente. Ces plans, qui amènent à une diffusion, sont appelés plans de Bragg et se retrouvent dans de nombreux domaines de la physique. L'acquisition de l'intensité $I(t, \mathbf{q})$ se base donc sur le temps moyen pour que les particules agitées se positionnent à la manière d'un miroir de Bragg dont les plans sont séparés d'un pas de $\Lambda = 2\pi/q$ muni d'une direction donnée par le vecteur \vec{q} jusqu'à ce que ce plan ne soit plus aligné. Pour résumer le processus, nous avons une multitude de particules en mouvement aléatoire éclairée par un laser, lorsque cet ensemble de particules forme à un temps donné un plan de Bragg pour une direction précise, nous détectons un signal, puis celui-ci s'estompe lorsque le miroir disparaît. Le signal reçu sur le capteur peut donc comporter des zones illuminées ou non en fonction de l'aspect constructif ou destructif de la lumière en ce point. En utilisant un outil qui compare la ressemblance du signal à différents temps de l'acquisition, il est alors possible de récupérer des informations sur les particules diffusantes. Pour cela, l'outil d'autocorrélation d'un signal est utilisé et permet de comparer un temps t et $t + \tau$ d'un même signal et d'en évaluer leur ressemblance. Dans un signal fortement bruité, ce genre d'analyse s'avère très puissant pour extraire les informations utiles aux traitements. L'autocorrélation $G_s^{(1)}(\tau)$ d'un signal $S(t)$ et son conjugué $S^*(t)$ est défini par :

$$G_s^{(1)}(\tau) = \langle S(t)S^*(t + \tau) \rangle \quad (1.2.35)$$

Un développement théorique[64], qui ne sera pas présenté ici, conduit à une expression pour la fonction de corrélation du *champ électrique* $g^{(1)}(\tau)$ diffusé par des particules sphériques lors de leur diffusion :

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{G^{(1)}(\tau)}{\langle I_d \rangle} = e^{-Dq^2\tau} e^{-i\omega_0\tau} \quad (1.2.36)$$

Avec D le coefficient de diffusion, ω_0 la fréquence caractéristique des fluctuations et q le vecteur de diffusion. Cependant, les détecteurs ne mesurent pas l'amplitude du champ électrique, mais son intensité, donnée par $I = EE^*$, avec E l'amplitude du champ électrique et son conjugué E^* . Ainsi ce n'est pas la fonction de corrélation $G^{(1)}(\tau)$ qui est accessible via l'expérience, mais la fonction :

7. La loi de Bragg stipule qu'un rayon lumineux arrivant sur de la matière organisée en plans atomiques périodiques séparés d'une distance d , est en partie réfléchi alors qu'une partie poursuit son chemin.

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I_d(0)I_d(\tau) \rangle \quad (1.2.37)$$

Il faut alors pouvoir relier ces deux fonctions d'autocorrélation au moyen d'une forme phénoménologique adaptée aux résultats expérimentaux :

$$\frac{G^{(2)}(\tau)}{\langle I_d \rangle^2} = 1 + \beta |G^{(1)}(\tau)|^2 \quad (1.2.38)$$

Avec β un coefficient d'expérience ou autrement appelé facteur de cohérence qui doit tendre vers 1 lorsque l'expérience est bien calibrée. Dans le cas d'une solution contenant une seule espèce de taille monodisperse, un seul déclin exponentiel apparaît et la fonction de corrélation théorique du champ électrique $G^1(\tau)$ s'écrit :

$$G^{(2)}(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (1.2.39)$$

avec, dans le cas le plus simple, mais le plus représentatif, des particules sphériques en translation brownienne :

$$\Gamma = 2Dq^2$$

Il est alors possible de relier le coefficient de diffusion au rayon hydrodynamique r de la particule via la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1.2.40)$$

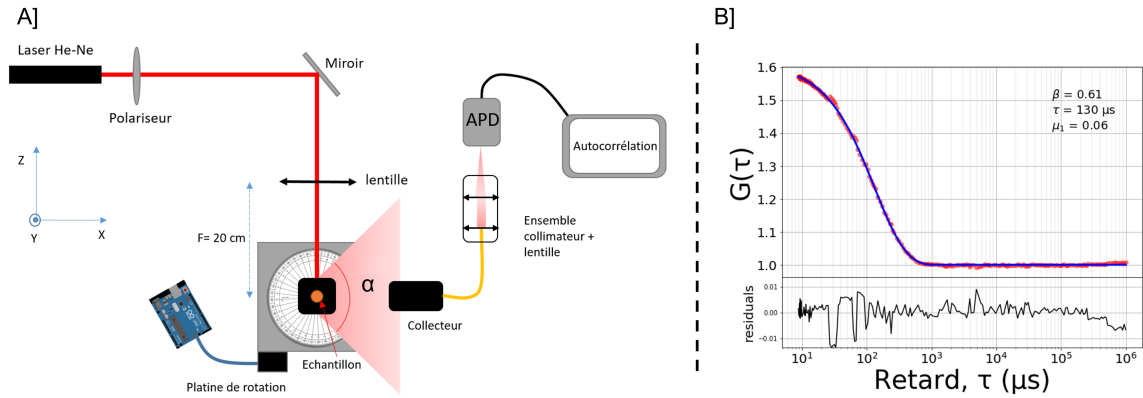


FIGURE 1.21 – A] Schéma général d'une expérience de DLS réalisé en stage de master 1 B] Exemple d'une courbe d'autocorrélation obtenue par la méthode de DLS pour une solution de particules d'or de 80 nm de diamètre.

Sur le plan de la réalisation pratique (voir le schéma de l'expérience que nous avons mise en place figure 1.21), le plus souvent un laser He-Ne est très légèrement focalisé sur un échantillon liquide. On mesure alors l'intensité de la lumière diffusée par les particules selon différents angles. Le signal diffusé est collecté et envoyé sur une photodiode à avalanche qui réalise la mesure du temps d'arrivée de chaque photon. La précision du temps d'arrivée des photons est primordiale puisque les fluctuations du signal sont directement liées au coefficient de diffusion des particules. Les différents

angles de diffusion à mesurer sont établis grâce à une platine de rotation qui permet la collection du signal autour de l'échantillon. Les données doivent être enregistrées par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition avec une très bonne résolution temporelle. Cette technique de DLS présente l'avantage d'être largement commercialisée sous forme de systèmes compacts permettant d'automatiser la procédure de mesures de tailles de particules en suspension dans un fluide. C'est également une méthode très connue et reconnue qui permet en quelques minutes d'obtenir un résultat fiable et reproductible. En revanche, elle présente l'inconvénient d'une baisse de fiabilité et de performance lorsque l'échantillon possède plusieurs tailles de particules, ce qui impose de devoir déceler plusieurs déclin exponentiels dans l'analyse de la courbe de corrélation.

1.2.6 Microscopie dynamique différentielle

Depuis quelques années, une autre approche particulièrement séduisante a été mise en place pour accéder au coefficient de diffusion. Il s'agit de la microscopie dynamique différentielle (DDM)[65],[66]. Comme pour la DLS, il s'agit d'étudier la ressemblance du signal à différents instants de l'acquisition et d'accéder ainsi à la fonction d'autocorrélation. L'astuce de cette méthode consiste à utiliser toutes les images d'une vidéo comportant le mouvement des particules au cours du temps et à observer les variations entre deux images, pour des temps variables entre ces deux images. Par transformée de Fourier de l'image différence, le domaine fréquentiel est exploré, et il est ainsi possible d'accéder à des données encodées au sein de l'ensemble des images tout en conservant les informations apportées par le domaine temporel. La DDM comble de nombreuses limitations induites par les méthodes de suivi conventionnelles telles que la segmentation⁸ ou encore le suivi individuel de particules. Ces méthodes souffrent de la limite de résolution due à la longueur d'onde lorsque la taille des particules est plusieurs ordres de grandeurs inférieurs. Nos yeux sont donc souvent de bons guides pour estimer certains phénomènes au sein d'images, mais certaines informations leur sont inaccessibles. Néanmoins, pour que cette méthode soit efficace, il est préférable que l'échantillon ne possède qu'une seule espèce et que le phénomène de transport ne change pas rapidement durant l'observation puisque l'approche est amplement basée sur l'analyse statistique. L'idée générale de cette méthode repose sur le changement induit par le mouvement brownien entre deux images successives séparées d'un temps Δt . En fonction de l'intervalle de temps entre deux images et de la vitesse des particules (c'est-à-dire la taille), l'information commune varie. Ainsi, en réalisant la différence de deux images successives, il est possible d'évaluer les pixels qui ont changé d'état signifiant un déplacement des particules. Afin de s'affranchir de valeurs négatives, la variance est calculée à partir de la différence des deux images est élevée au carré. Comme cela est présenté sur la figure 1.22, plus l'intervalle de temps est grand entre deux images successives, moins l'on retrouve d'information commune.

Soit $I(x, y, t)$ une image qui peut être prise à différents instants ($t = t_1, t_2, t_3 \dots$) lors de l'expérience. De façon similaire à la DLS présentée précédemment, ces images peuvent être décrites comme la somme d'un signal de bruit de fond (I_{BG}) qui est indépendant du temps et d'un terme de fluctuation ($\delta i(x, t)$) dépendant du temps qui représente les micro-déplacements de chaque particule :

$$I(x, y, t) = I_{BG} + \delta i(x, y, t) \tag{1.2.41}$$

Pour isoler les termes de fluctuations, il suffit alors de soustraire deux images séparées par un temps Δt :

8. Opération de traitement d'image qui regroupe des pixels selon des critères spécifiques.

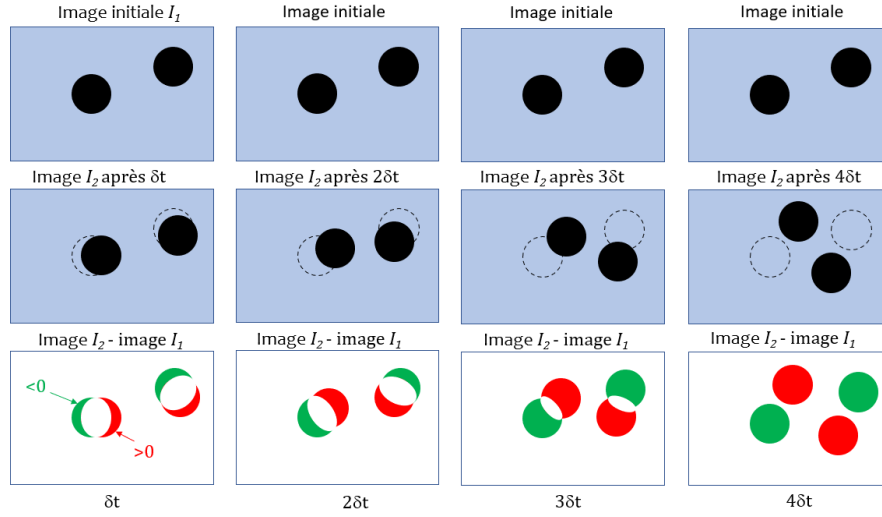


FIGURE 1.22 – Schéma présentant, pour plusieurs intervalles de temps, la différence de deux images successives pour des particules en diffusion libre. La première ligne représente les particules (sphères noires) dans l'image initiale. La deuxième ligne montre ces mêmes particules, mais après un temps $n\Delta t$ en noir avec les positions précédentes en pointillés noir. La troisième ligne représente la différence entre la deuxième ligne et la première avec en vert les pixels positifs et en rouge les pixels négatifs.

$$\Delta I_n(x, y, \Delta t) = I(x, y, t_n + \Delta t) - I(x, y, t_n) = \delta i(x, y, t_n + \Delta t) - \delta i(x, y, t_n) \quad (1.2.42)$$

La variance spatiale entre deux images peut ainsi être calculée avec :

$$\sigma^2 = \int |\Delta I_n(x, y, \Delta t)|^2 dx dy \quad (1.2.43)$$

Le théorème de Parseval indique que l'énergie totale dans l'espace réel des images est la même que celle qui est calculée dans l'espace de Fourier associé. Mais plutôt que de calculer la variance spatiale dans l'espace de Fourier, la DDM permet d'obtenir la fonction d'autocorrélation à partir d'une collection d'images. Chaque différence d'images est passée dans le domaine fréquentiel au moyen d'une transformée de Fourier 2D ($x, y \rightarrow \vec{q}$), où le vecteur \vec{q} permet de décrire l'espace réciproque du plan de Fourier. Dans l'hypothèse de particules monodisperses ayant un mouvement brownien sans phénomène de transport supplémentaire, la figure obtenue dans le plan de Fourier présente une symétrie radiale et peut être décrite par le scalaire q , qui représente la fréquence spatiale.

$$\Delta \hat{I}_n(q, \Delta t) = TF_{2D}(\Delta I_n(x, y, \Delta t)) \quad (1.2.44)$$

Lorsque les conditions d'expériences ne changent pas durant l'acquisition, il est d'obtenir la fonction de la structure d'image $D(q, \Delta t)$ en réalisant la moyenne des différences d'images à différents temps t_n mais en conservant le même Δt séparant deux images consécutives.

$$D(q, \Delta t) = \langle |\hat{I}(q, \Delta t)|^2 \rangle \quad (1.2.45)$$

Cette fonction de structure de l'image peut être décomposée en une somme de trois sous-fonctions [67] :

$$D(q, \Delta t) = A(q)[1 - g(q, \Delta t)] + B(q) \quad (1.2.46)$$

$A(q)$ est une fonction qui rassemble la convolution du signal de diffusion des particules, la fonction de transfert du système optique et également le facteur de structure du matériau. $B(q)$ est lié au bruit généré dans l'image ainsi que toute diffusion incohérente et prend souvent une valeur constante lorsque le bruit est non-corrélé. Enfin, $g(q, \Delta t)$ est la fonction d'autocorrélation, qui est similaire à celle rencontrée dans le paragraphe précédent sur la diffusion dynamique de la lumière :

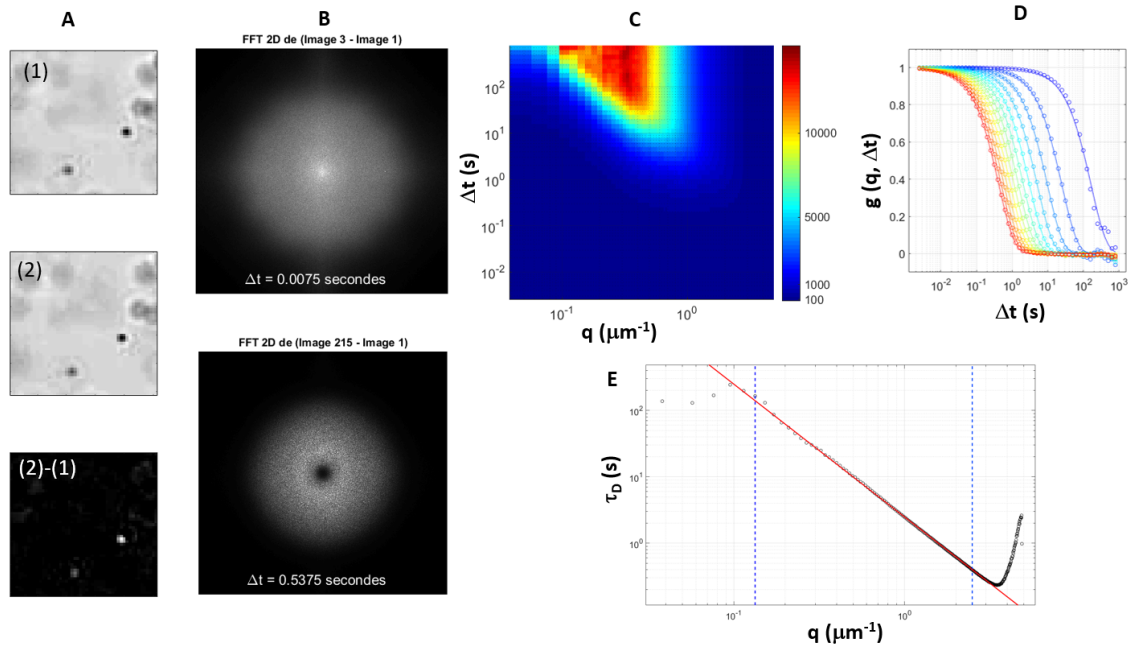


FIGURE 1.23 – A] Zoom sur une partie des images de la vidéo explorée : (1) positions initiales des particules (2) positions des particules après un temps Δt et (3) image différence. B] Transformée de Fourier d'images différence obtenues pour 2 écarts temporels différents, C] Représentation de la structure d'image $D(q, \Delta t)$ en échelle logarithmique de couleur, D] Évolution de la fonction d'autocorrélation en fonction de l'écart temporel Δt (points) et courbes d'ajustement obtenues à partir de l'équation (1.2.47) pour accéder aux valeurs numériques de $\tau_D(q)$, E] Tracé des temps caractéristiques τ_D en fonction de la fréquence spatiale q et de la droite d'ajustement calculée à partir de l'équation (1.2.48). On vérifie qu'en représentation log/log, la pente est de -2.

$$g(q, \Delta t) = e^{-\Delta t / \tau_D(q)} \quad (1.2.47)$$

Grâce à ce temps caractéristique $\tau_D(q)$ il est possible dans un premier temps d'accéder au coefficient de diffusion D des particules imagées :

$$\tau_D(q) = \frac{1}{q^2 D} \quad (1.2.48)$$

Puis, dans un second temps et à partir de l'équation de Stokes-Einstein (équation (1.2.48)), la taille des particules peut être calculée. Une représentation pratique de cette méthode est illustrée sur la figure 1.23 dans le cas d'une diffusion libre (mouvement brownien) de nanoparticules.

1.2.7 Spectroscopie de corrélation des fluctuations

Une autre méthode permettant de caractériser des dynamiques moléculaires est la spectroscopie de corrélation de fluorescence [68]. Celle-ci s'appuie également sur le mouvement brownien puisqu'elle utilise les fluctuations de signal de fluorescence émises par des particules dans un très petit volume de solution. Ce genre d'approche permet de déterminer un coefficient de diffusion moyen, mais également la concentration de l'entité étudiée. Plus précisément, un laser d'excitation est focalisé dans un volume de quelques femtolitres afin d'exciter les particules fluorescentes. Le plus souvent, ceci est réalisé en microscopie d'excitation à deux photons ou en microscopie confocale, qui possèdent les deux un très bon confinement spatial. Comme présenté figure 1.24 lorsque les particules passent dans le volume d'excitation, elles émettent un signal de fluorescence sous forme de flashes d'intensité dus au mouvement brownien qui les fait passer un bref instant au sein du volume d'excitation. En fonction de la taille, mais également de la concentration, les pics de signaux sont plus ou moins réguliers et intenses. Au moyen d'un traitement par auto-corrélation d'un signal, il est possible de retrouver le coefficient de diffusion moyen et la concentration locale dans l'échantillon. Cette méthode a l'avantage d'être très précise en raison du confinement du volume d'excitation.

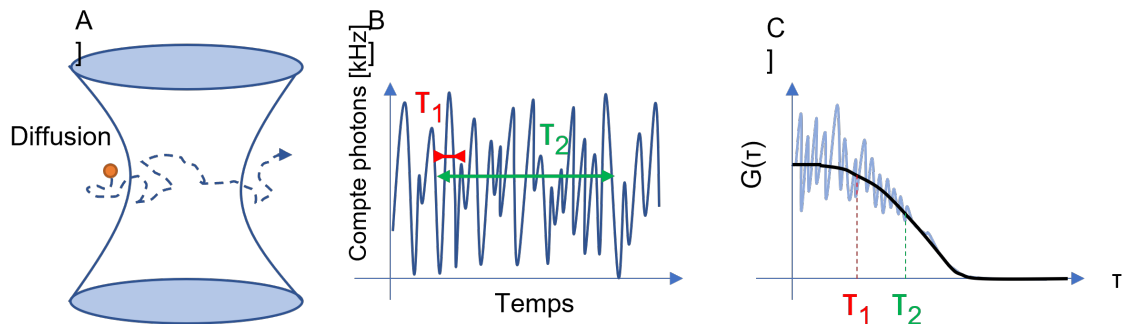


FIGURE 1.24 – A] Schéma d'une particule passant dans le volume d'excitation grâce à la diffusion. B] Enregistrement des flashes d'intensités de fluorescence. C] Courbe d'autocorrélation permettant d'obtenir le temps de résidence moyen τ_D au sein du le volume d'excitation

En considérant $F(t)$ le signal de fluorescence au cours du temps, la fonction d'auto-corrélation s'exprime de la façon suivante :

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1.2.49)$$

Avec τ le décalage temporel pour comparer la fonction de l'intensité du signal avec elle-même. Avec les approximations adaptées non détaillées ici, le volume d'excitation est une gaussienne 3D et ainsi la fonction d'auto-corrélation peut être approchée grâce un modèle de diffusion en 3D :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau \cdot r_0^2}{\tau_D \cdot z_0^2}\right)^{1/2} \quad (1.2.50)$$

Avec N le nombre moyen de particules dans le volume d'excitation, τ_D le temps moyen de diffusion des particules au sein du volume de détection, r_0 et z_0 les distances radiale et axiale pour lesquelles l'intensité est réduite de $1/e^2$. De manière analogue aux autres méthodes liées au mouvement brownien, le temps de diffusion τ_D permet de retrouver le coefficient de diffusion D .

$$D = \frac{r_0^2}{4\tau_D} \quad (1.2.51)$$

1.3 Microscopie non-linéaire

Dans cette partie, nous détaillons les notions théoriques et pratiques de la microscopie non-linéaire permettant de comprendre le principe de la microscopie de fluorescence à deux photons et de génération de second harmonique. La première section détaille rapidement les bases de la microscopie pour situer le contexte qui a amené la microscopie non-linéaire à voir le jour. Ensuite, la deuxième section s'intéresse aux processus physiques particuliers en microscopie non-linéaire.

1.3.1 Brève histoire de la microscopie

Il est difficile de situer le commencement de la microscopie puisque qu'elle fait partie d'un ensemble d'innovations qui ont mené aux technologies actuelles. Depuis l'époque où les hommes des cavernes atteint de myopies devaient plisser les yeux⁹ afin de voir leurs propres dessins sur les murs, jusqu'à aujourd'hui où l'on veut imager les structures moléculaires, une motivation commune apparaît, celle d'améliorer directement ou indirectement la résolution de notre œil. Néanmoins, l'invention de la microscopie est majoritairement attribuée au Hollandais Antoni Van Leeuwenhoek vers 1668 qui mit au point le premier microscope qui a permis d'observer des bactéries ou encore des globules de sang. Depuis cette date et motivés par la biologie principalement, les progrès n'ont jamais cessé.

Depuis le développement de la bio-ingénierie, la recherche porte une importance considérable aux méthodes non invasive permettant d'étudier efficacement des tissus vivants. Pour répondre à cela, de nombreuses microscopies ont été inventées, telles que la microscopie en champ clair, la plus simple, mais peu contrastée ou encore la microscopie à contraste de phase. Mais celles-ci souffrent de limitations dues à un apport d'information limitée à des études qualitatives. De ce fait, l'invention de la microscopie de fluorescence a permis d'accéder aux phénomènes physiologiques des cellules vivantes avec de meilleures résolutions que les techniques précédentes. C'est par le greffage de molécules fluorescentes sur des cibles biologiques que des processus vivants ont pu être étudiés.

9. Plisser les yeux, diaphragme la lumière entrante et augmente la profondeur de champ.

Néanmoins, un facteur limitant de cette technique est l'énergie apportée par la lumière d'excitation des molécules fluorescentes. Le plus souvent, les longueurs d'ondes proches des Ultra-violet (UV) ont tendance à détruire les cellules vivantes et rendent la technique phototoxique. De ce fait, des méthodes de microscopie utilisant des interactions non-linéaires ont été développées pour contourner ces limites en utilisant des longueurs d'onde non nocives pour le vivant. Dans les parties suivantes, nous allons nous focaliser sur la fluorescence à deux photons et la génération de second harmonique qui sont deux méthodes largement utilisées en biologie.

1.3.2 Microscopie de fluorescence à un photon

Avant d'introduire les effets non-linéaires, il est intéressant de comprendre les mécanismes qui sont utiles à la microscopie de fluorescence [69]. De manière générale, la fluorescence est la capacité de certaines molécules à absorber la lumière et d'en émettre en réponse, mais avec une longueur d'onde plus grande que l'excitation. Cet effet de changement de longueur d'onde appelé déplacement de Stokes est propre au type de fluorophore. La figure 1.25 permet de comprendre les trois étapes principales du processus de fluorescence du point de vue des états d'énergie d'une molécule. Dans le cadre de la microscopie et en s'appuyant sur le principe de déplacement de Stokes, il est possible, grâce à des filtres/miroirs dichroïques [70], de sélectionner uniquement le signal de fluorescence émis par la molécule. Ces filtres possèdent des propriétés de réflexion et transmission fortement dépendantes de la longueur d'onde, ainsi le signal d'excitation peut être renvoyé vers l'échantillon alors que la fluorescence est transmise jusqu'au détecteur/caméra. Le contraste des images formées est alors bien supérieur aux techniques par champ clair en raison d'un signal uniquement situé dans les zones d'intérêt.

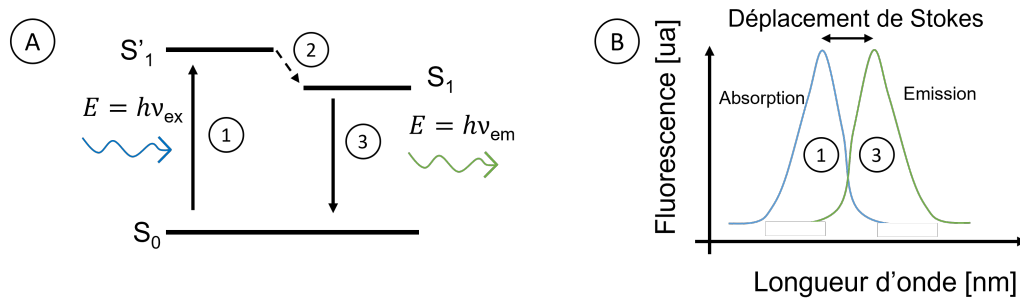


FIGURE 1.25 – A] Diagramme de Jablonski du processus de fluorescence d'absorption à un photon. L'étape 1 est l'absorption d'un photon incident d'énergie $h\nu_{ex}$ qui fait passer de l'état d'énergie S_0 à S'_1 puis, par relaxation vibrationnelle non radiative vers S_1 pour enfin retourner au niveau d'énergie le plus bas S_0 en libérant un photon d'énergie plus basse $h\nu_{em}$. B] Représentation du phénomène de déplacement de Stokes grâce aux spectres d'absorption et d'émission.

La résolution des techniques conventionnelles en microscopie de fluorescence à un photon est définie par la fonction d'étalement du point (PSF)¹⁰ du microscope qui dépend elle-même des paramètres d'expérience. Cette PSF est caractérisée par sa largeur radiale Δr et longueur axiale Δz :

10. *Point Spread Function* en anglais.

$$\Delta r = 0.61 \frac{\lambda}{\text{ON}} \quad (1.3.1)$$

$$\Delta z = 1.4 \frac{\lambda}{\text{ON}^2} \quad (1.3.2)$$

Avec λ la longueur d'onde en $[m]$ et ON l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. La résolution axiale de la microscopie de fluorescence à un photon est l'un des aspects négatifs de la méthode pour beaucoup d'expériences. Dans un souci de contraste et de sélection du plan d'étude dans l'échantillon, la fluorescence à un photon excite un volume trop grand, ou plutôt tout signal de fluorescence provenant des plans hors de la focalisation sont également détectés. Cela engendre des sources de fluorescences hors du plan focal qui brulent l'image et réduit considérablement le contraste. Un second effet non désiré, observé dans beaucoup de cas est le phénomène de photoblanchiment, déjà évoqué dans la section 1.2.3. En plus de détériorer les molécules dans le plan focal, le photoblanchiment s'exerce également sur les molécules hors du plan focal et ainsi provoque une réduction de l'intensité du signal sur des zones encore non étudiées et peu biaiser des mesures ultérieures basées sur l'intensité.

1.3.3 Les effets optiques non-linéaires

Le premier effet non-linéaire est attribué en 1875 à John Kerr pour sa découverte de l'effet électro-optique quadratique dans le verre [71]. C'est ensuite en 1931 que Maria Goeppert-Mayer prédit théoriquement l'existence du phénomène non-linéaire d'absorption à deux photons [72]. Pour accéder aux effets non-linéaire dans l'interaction lumière-matière, il faut que l'onde d'excitation ait une intensité proche de l'ordre de grandeur du champ de cohésion de la matière qui lie les électrons au noyau. Pour cette raison, ce n'est qu'en 1961, avec l'arrivée des lasers qu'il est possible d'observer pour la première fois l'effet non-linéaire de la génération de second harmonique dans un cristal de quartz par l'équipe de Franken [73].

La polarisation

Lorsqu'un champ électrique incident déforme le nuage électronique d'une molécule, un moment dipolaire est induit par le déplacement du barycentre des charges négatives par rapport au noyau. On peut alors écrire l'expression du moment dipolaire \vec{P} d'une molécule :

$$\vec{P} = \chi^{(1)} \vec{E} + \chi^{(2)} \vec{E} \vec{E} + \chi^{(3)} \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots \quad (1.3.3)$$

$\chi^{(1)}$ représente la susceptibilité linéaire, \vec{E} le champ électromagnétique incident, $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ les susceptibilités non-linéaires du deuxième et troisième ordre. Chaque degré ordre de polarisation correspond à des effets spécifiques tels que l'indice de réfraction pour l'ordre 1, la génération de second harmonique pour l'ordre 2. L'absorption à deux photons est attribuée à la partie imaginaire de l'ordre 3.

Absorption à deux photons

En supposant que la susceptibilité non-linéaire d'ordre 3 $\chi^{(3)}$ possède une partie imaginaire non-nulle et que la partie imaginaire de $\chi^{(1)}$ qui correspond à l'absorption à un photon, soit nulle, alors l'absorption à deux photons peut se produire. De manière analogue au processus d'absorption à 1

CHAPITRE 1. LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE AU SERVICE DU
SUIVI DE NANO-OBJETS EN CONDITIONS MAÎTRISÉES

photon vu précédemment, une molécule possède une probabilité d'absorber deux photons d'énergie $E/2 = h\nu_{ex}$ et ainsi atteindre l'état d'énergie excité E équivalent à l'absorption d'un seul photon d'énergie $E = 2h\nu_{ex}$. Cette probabilité d'absorption peut être exprimée par unité de temps de la façon suivante :

$$w^{(2)} = \frac{\sigma^{(2)} I^2(\omega)}{\hbar^2 \omega^2} \quad [s^{-1}] \quad (1.3.4)$$

Avec $I(\omega)$ l'intensité du rayon incident en $[Watt/cm^2]$, ω sa pulsation et h la constante de Planck où $\hbar = h/2\pi$. Cette probabilité d'absorption est reliée à $\sigma^{(2)}$, la section efficace d'absorption à deux photons qui dépend de la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité d'ordre 2, $\chi^{(2)}$:

$$\sigma^{(2)} = \frac{4\pi^2 \hbar \omega^2}{n^2 c^2} \chi^{(2)} \quad [GM] \quad (1.3.5)$$

Avec n l'indice de réfraction du matériau et c la vitesse de la lumière. On peut comprendre grâce à l'expression de la probabilité d'absorption à deux photons que celle-ci dépend de l'intensité de l'onde incidente de façon non-linéaire. De ce fait, l'excitation de fluorescence à deux photons a besoin de lasers avec de très hautes puissances instantanées et majoritairement pulsées pour s'assurer que la molécule puisse absorber deux photons de façon simultanée. Pour comprendre la sensibilité du phénomène d'absorption à deux photons et l'avantage d'utiliser des lasers à impulsions, il faut comparer quelques ordres de grandeurs entre l'absorption à un et à deux photons. Prenons le cas d'une source laser dont la longueur d'onde est $1 \mu m$ et l'intensité d'environ $1 GW/cm^2$, alors la probabilité d'absorption à un photon $\sigma^{(1)}$ et à deux photons $\sigma^{(2)} I / \hbar \omega$ possèdent un rapport de l'ordre de 10^{-5} . En raison du temps de cohérence τ_{co} entre l'état fondamental et excité ($\sigma^{(2)} \propto \sigma^{(1)} \tau_{co}$), deux photons doivent arriver dans un intervalle de temps inférieur à 10 fs pour être absorbés de façon simultanée par la même molécule. Ceci explique que la largeur temporelle des pulsations laser utilisées en microscopie non-linéaire se situe entre 10 et 100 fs. La suite du processus détaillé figure 1.26 selon lequel l'état excité se relaxe en libérant un photon n'est pas un phénomène non-linéaire et suit le même processus que celui détaillé pour la fluorescence à un photon. Néanmoins, pour plus de précisions, le processus d'émission d'un photon possède également une probabilité notée η , souvent appelé rendement quantique de fluorescence. Celui-ci est défini grâce au temps caractéristique d'émission d'un photon τ_{fluo} et au temps caractéristique de désexcitation non radiatif τ_{nr} .

$$\eta = \frac{1}{1 + \frac{\tau_{fluo}}{\tau_{nr}}} \quad (1.3.6)$$

On peut alors définir la puissance de rayonnement de fluorescence à deux photons grâce aux paramètres établis jusqu'ici ainsi que le nombre de fluorophores N :

$$P = \frac{1}{2} N \eta \sigma^{(2)} I^2(\omega) \quad [Photons/s] \quad (1.3.7)$$

Les processus liés à la fluorescence d'excitation à deux photons étant décrits, le lien avec la microscopie se servant de ce phénomène est décrit plus tard afin de comprendre les améliorations apportées par les effets non-linéaires lors de l'absorption.

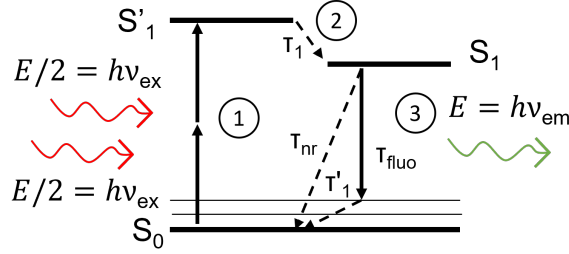


FIGURE 1.26 – Diagramme de Jablonski du processus de fluorescence d'absorption à deux photons. L'étape 1 est l'absorption simultanée de deux photons incidents d'énergie $h\nu_{ex}$ qui fait passer de l'état d'énergie S_0 à S'_1 puis par relaxation non radiative après un temps τ_1 vers S_1 pour enfin retourner à l'état d'énergie le plus bas S_0 en libérant un photon d'énergie plus basse $h\nu_{em}$ après un temps τ_{fluo} .

Génération de second harmonique

En se reportant à l'équation (1.3.3), le terme d'ordre 2 nous permet de nous intéresser au phénomène de doublage de fréquence ou plus communément appelé génération de second harmonique (SHG¹¹). Soit $P^{(2)}$ la polarisation d'ordre 2 :

$$P^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} E(t)^2 \quad (1.3.8)$$

Cette formulation nous permet également de remarquer que ce terme d'ordre 2 n'existe que dans les matériaux possédant un $\chi^{(2)}$ non-nul, c'est-à-dire les matériaux non-centrosymétriques comme représenté sur la figure 1.27. Cet effet peut se retrouver dans des cristaux ou des tissus biologiques tels que le collagène [74]. On peut exprimer $\chi^{(2)}$ comme étant un tenseur permettant de retranscrire les propriétés volumiques d'un matériau. Un matériau est dit un bon émetteur de SHG lorsque les molécules qui le composent présentent une forte hyperpolarisabilité β ainsi qu'une orientation favorable :

$$\chi^{(2)} = N_s \langle \beta \rangle \quad (1.3.9)$$

N_s représente la densité moléculaire dans le matériau et $\langle \beta \rangle$ l'orientation moyenne des molécules. On comprend grâce à cette formule que le phénomène de SHG est très dépendant de la direction d'observation ainsi que la polarisation de l'onde incidente.

Pour les mêmes raisons que l'absorption à deux photons vue précédemment, ce phénomène non-linéaire peut être généré si l'onde incidente possède une très haute intensité afin d'avoir deux photons de fréquence ω arrivent dans une fenêtre temporelle assez courte pour que les deux ondes incidentes interfèrent entre-elles. Le doublage en fréquence (SHG, $\omega + \omega$) n'est pas le seul phénomène possible prévu par cette théorie, il existe également l'addition de fréquences (SFG, $\omega_1 + \omega_2$), la différence de fréquences (DFG, $\omega_1 - \omega_2$) mais qui demandent l'utilisation de deux lasers à des longueurs d'ondes différentes. Soit $E(t)$ l'onde électrique incidente résultante de deux ondes planes monochromatiques :

$$E(t) = \frac{\epsilon_1 e^{-i\omega_1 t} + \epsilon_1^* e^{i\omega_1 t}}{2} + \frac{\epsilon_2 e^{-i\omega_2 t} + \epsilon_2^* e^{i\omega_2 t}}{2} \quad (1.3.10)$$

11. Second harmonic generation

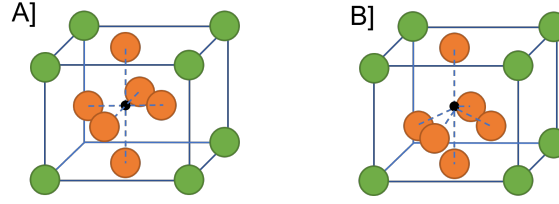


FIGURE 1.27 – Comparaison d’une structure A] centrosymétrique et B] non centrosymétrique. Lorsqu’un matériau ne possède pas de centre d’inversion, il est alors qualifié de non centrosymétrique et inversement.

En élevant au carré ce champ électrique, de nombreux termes apparaissent, mais seulement quelques-uns nous sont utiles pour comprendre les mécanismes résultants. Le doublage en fréquence provient de la contribution des termes au carré :

$$SHG \rightarrow \frac{\epsilon_1^2 e^{-i2\omega_1 t}}{4} \quad (1.3.11)$$

Également, avec le double produit, un terme de somme des fréquences apparaît :

$$SFG \rightarrow \frac{\epsilon_1 \epsilon_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t}}{2} \quad (1.3.12)$$

Le dernier effet représente la différence des fréquences provenant du double produit avec la forme complexe conjuguée :

$$DFG \rightarrow \frac{\epsilon_1 \epsilon_2^* e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{2} \quad (1.3.13)$$

Dans notre cas, nous nous intéresserons seulement au cas particulier de la SHG lorsque les photons incidents possèdent la même fréquence ω . Évidemment, cet effet ne convertit pas chaque paire de photons incidents en une onde de fréquence double et possède un rendement qui est appelé taux de conversion qui quantifie la part de signal converti par rapport au faisceau incident. Ainsi, lorsqu’il y a accord de phase, il est possible d’atteindre des taux de conversion allant au-delà de 50%. Pour simplifier le raisonnement, la figure 1.28 présente l’exemple de la génération de second harmonique dans le cas d’un faible taux de conversion.

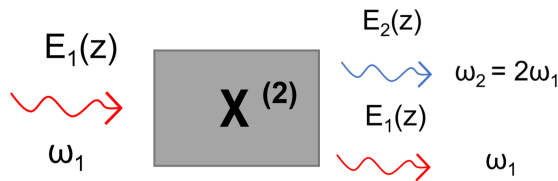


FIGURE 1.28 – Phénomène de doublage de fréquence d’une onde incidente $E_1(t)$ de fréquence ω_1 passant à travers un matériau non-centrosymétrique de susceptibilité $\chi^{(2)}$. L’onde rayonnée possède alors une fréquence $\omega_2 = 2\omega_1$.

Soit, $E_1(z)$ un champ électrique incident composé du produit d’une enveloppe $A_1(z)$ et d’une porteuse :

$$E_1(z) = A_1(z)e^{(ik_1z)} \quad (1.3.14)$$

Cette onde incidente va alors induire une polarisation d'ordre 2 sous la forme d'un champ $E_2(z)$ à la fréquence double :

$$E_2(z) = A_2(z)e^{(ik_2z)} \quad (1.3.15)$$

En raison de l'approximation d'un champ rayonné très faible devant l'onde incidente dû au faible taux de conversion, on peut alors écrire $|A_2| \ll |A_1|$. L'enveloppe de l'onde incidente n'est plus considérée comme dépendante de z et cela va ainsi simplifier les calculs. La polarisation d'ordre 2 peut alors s'écrire en prenant en compte uniquement l'onde incidente :

$$P^{(2)} = \epsilon_0\chi^{(2)}E_1(z)^2 = \epsilon_0\chi^{(2)}\left(\frac{E_1 + E_1^*}{2}\right)^2 = \frac{\epsilon_0\chi^{(2)}}{4}(E_1^2 + E_1^{*2} + 2E_1E_1^*) \quad (1.3.16)$$

Le terme $2E_1E_1^*$ représente un terme de redressement optique que nous négligeons pour la suite, car il ne nous intéresse pas pour la compréhension du phénomène de SHG. En prenant la notation complexe de $P^{(2)} = (\mathcal{P}^{(2)} + \mathcal{P}^{(2)*})/2$ on peut identifier les termes suivants :

$$\mathcal{P}_2(z) = \frac{\epsilon_0\chi^{(2)}}{2}E_1^2 = A_1^2e^{(i2k_1z)} \quad (1.3.17)$$

Ensuite, on peut écrire l'équation de propagation d'une onde plane monochromatique en y intégrant le terme $\mathcal{P}_2(z)$:

$$\frac{dA_2}{dz} = \frac{i\omega_2}{2n_2\epsilon_0c}\mathcal{P}_2(z)e^{(-ik_2z)} = \frac{i\omega_2}{2n_2\epsilon_0c}A_1^2e^{-i(k_2-2k_1)z} \quad (1.3.18)$$

Sachant que $k = n\omega/c$, le terme de désaccord de phase Δk apparaît :

$$\Delta k = (n_2 - n_1)\frac{\omega_2}{c} \quad (1.3.19)$$

On peut comprendre ce terme par l'interaction de l'onde induite et l'onde rayonnée dès la première couche du matériau. En raison de l'effet de dispersion dans un matériau transparent, l'indice de réfraction n'est pas le même en fonction de la fréquence. Le but est donc de minimiser ce terme de désaccord de phase afin de maximiser le signal de SHG.

Microscopie non-linéaire

Les deux phénomènes d'excitation de fluorescence à deux photons (TPEF¹²) et de génération de second harmonique sont intrinsèquement confinés à de très faibles volumes puisque l'intensité émise dépend de manière quadratique de l'intensité incidente. De ce fait, ces deux méthodes possèdent des propriétés très intéressantes pour la microscopie puisqu'elles sont capables de sélectionner une coupe de l'échantillon et ainsi améliorer la résolution axiale du microscope sans utiliser de filtre spatial, comme c'est le cas de la microscopie confocale. À l'image de la figure 1.29, le profil gaussien d'un faisceau laser confine les effets non-linéaires à un volume fortement restreint comparé à la fluorescence à un photon par exemple.

12. Two-photon excitation fluorescence

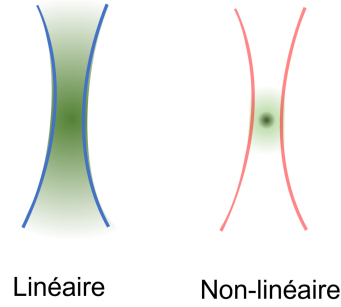


FIGURE 1.29 – Schéma comparant le volume excité par des effets linéaires face au confinement des effets non-linéaires. Les lignes extérieures représentent approximativement la longueur d'onde d'excitation et au centre le signal provenant de l'échantillon.

La nécessité de maximiser l'intensité du signal d'excitation en microscopie non-linéaire encourage donc l'utilisation de lasers pulsés comme évoqué précédemment. La largeur de l'impulsion laser n'est pas le seul paramètre pouvant influencer l'intensité, puisqu'en réduisant la surface d'excitation, autrement dit en focalisant très fortement le faisceau, l'intensité augmente fortement aussi. Par conséquent, l'utilisation d'objectif à grande ouverture numérique (ON¹³) apparaît comme un paramètre d'importance pour générer des effets non-linéaires en microscopie. Sachant cela, il est possible d'estimer la taille radiale $w_{x,y}$ et axiale w_z du volume d'excitation générée par un faisceau laser focalisé de longueur d'onde λ passant à travers un objectif d'ouverture numérique ON [75] :

$$w_{x,y} = \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2}\text{ON}^{0.91}} \quad \text{ON} > 0.7 \quad (1.3.20)$$

$$w_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - \text{ON}^2}} \right] \quad (1.3.21)$$

En comparaison avec la résolution latérale en fluorescence à un photon (équation 1.3.1) on peut voir que pour un même λ la résolution s'améliore. Mais en microscopie non-linéaire, la longueur d'onde d'excitation est doublée, ce qui globalement équivaut à une résolution latérale comparable à celle à un photon. Néanmoins, le fait de pouvoir sélectionner la coupe d'excitation par le confinement du faisceau dans la direction axiale est un avantage pour la résolution et le contraste des images. Mais cela ne permet pas d'imager une large zone dans le plan de l'échantillon. En effet, le faisceau laser est tellement confiné que pour former une image d'un échantillon, une méthode de balayage doit être employée afin de construire l'image en excitant point par point la zone. Le signal provenant de la réponse de l'échantillon est ensuite reconstruit pour former l'image complète. Ce processus est souvent accompli grâce à des miroirs de balayage sur lesquels le faisceau laser est envoyé afin de contrôler la position du laser focalisé à la sortie de l'objectif. L'image résultante est alors caractérisée par deux paramètres principaux, la résolution induite par le nombre de points d'excitations sur la zone d'étude (c'est-à-dire nombre de pixels), et la dynamique de l'image provenant du temps de résidence du faisceau laser sur chaque point (c.-à-d. nombre de photons reçus). Il faut donc considérer que le temps de balayage pour construire une image complète dépend du

13. NA : Numerical aperture en anglais.

produit du nombre de points/pixels par image par le temps de résidence du laser sur chaque pixel. Les intensités d'excitation étant bien plus grande qu'en fluorescence à 1 photon, et parfois un signal d'émission faible (surtout en SHG), une attention particulière doit être portée à la suppression du signal d'excitation résiduel sur l'appareil de détection afin de garantir une image contrastée. Une description complète d'un montage optique permettant de faire de la microscopie SHG et TPEF est réalisée dans le chapitre suivant. L'un des avantages majeurs de la microscopie non-linéaire est sa pénétration dans les tissus vivants puisqu'à des longueurs d'onde comprises entre 700 et 1200 *nm*, les tissus sont le plus souvent transparents. Également, grâce au confinement optique de l'excitation, les effets de photo-toxicité et photo-blanchiment sont limités puisque seul le plan étudié subit les effets néfastes qui peuvent se produire.

Chapitre 2

Présentation du montage expérimental

Ce chapitre présente les différents systèmes mis en place pour réaliser les expériences détaillées dans les chapitres suivants. La première partie décrit le montage de microscopie non-linéaire ainsi que la cohabitation du système permettant de faire de l'imagerie en champ clair, mais également en fluorescence à deux photons et génération de second harmonique. La deuxième partie présente le système microfluidique allant du support de la micro-puce au sein du microscope jusqu'au système de gestion des débits et des vannes permettant d'acheminer de manière contrôlée les produits jusqu'aux micro-canaux. Pour finir, la troisième section détaille le système de commande grâce au logiciel LabVIEW permettant d'automatiser et de synchroniser l'ensemble de l'expérience depuis une interface graphique interactive.

2.1 Montage optique en champ clair et SHG/TPEF

Pour comprendre la nécessité d'avoir la cohabitation des deux types de microscopies SHG et TPEF, il faut se rappeler que chacune d'elles possède des propriétés différentes pouvant jouer en faveur ou en défaveur de l'effet à observer. Un signal de fluorescence émet de façon isotrope lorsqu'il est observé à l'échelle d'un ensemble de molécules, mais il est limité en intensité d'excitation à cause de l'effet de photoblanchiment qui peut annihiler la capacité d'une particule à émettre de la fluorescence. En revanche, bien que souvent plus faible en intensité, les émetteurs de SHG ne subissent pas cet effet (la SHG n'utilise pas une bande d'absorption du matériau) mais sont très sensibles à la polarisation de la lumière incidente et dépendent donc de l'orientation de l'échantillon.

Le dispositif utilisé [76] pour étudier les échantillons est un microscope inversé à balayage dont le montage expérimental est détaillé sur la figure 2.1.

2.1.1 Le laser

La source est un laser femtoseconde Titane :Saphir (Tsunami, Spectra-Physics) pompé par un laser YAG :Nd continu de 10 W doublé en fréquence, à la longueur d'onde 532 nm. (Millenia, Spectra-Physics). Le laser dispose de miroirs à large bande, ce qui permet de faire varier la longueur

d'onde d'émission entre 700 nm et 1000 nm.

Le maximum de gain est obtenu pour $\lambda = 750$ nm (puissance moyenne d'émission égale à 1.4 W). Le balayage en longueur d'onde est très aisé entre 700 et 800 nm, mais s'avère plus délicat au-delà, car il nécessite une purge de la cavité afin d'extraire la vapeur d'eau (forte absorption de l'eau vers 940 nm).

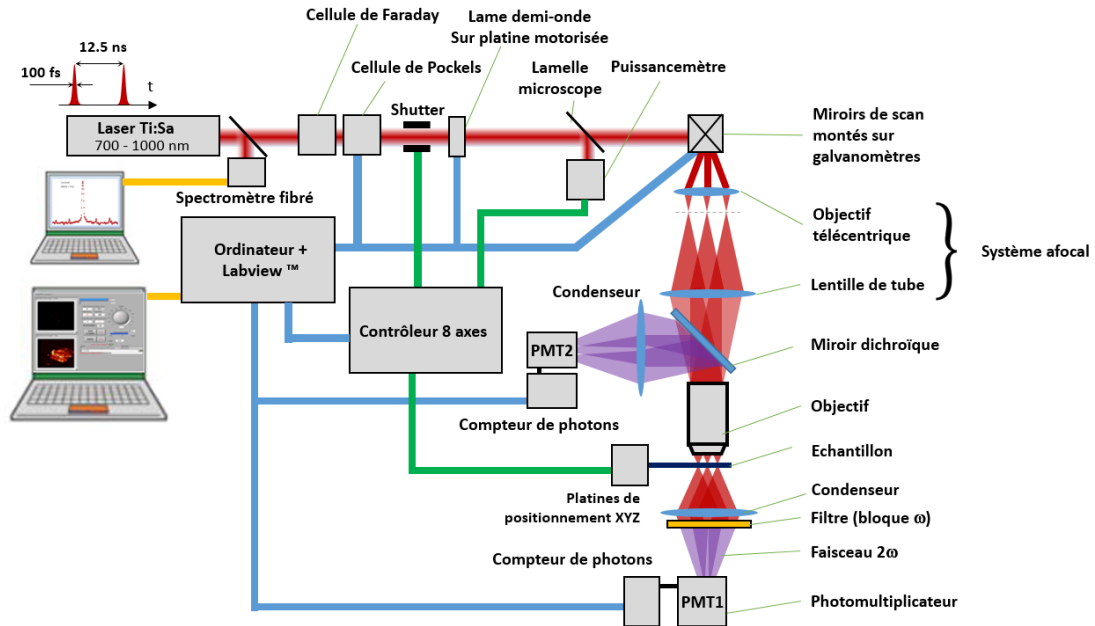


FIGURE 2.1 – Schéma du dispositif de microscope multiphoton à balayage. Possibilité d'acquisition en microscopie en champ clair, en fluorescence à deux photons ou SHG.

Le montage ne comprend pas d'autocorrélateur optique, mais la durée d'une impulsion est d'environ 80 fs à la sortie du laser. Après traversée des différents éléments dioptriques, la dispersion chromatique élargit chaque impulsion dont la largeur effective δt est estimée à 100 fs au niveau de l'échantillon.

Le taux de récurrence de ce laser est de 80 MHz, ce qui correspond à un temps mort $\Delta t = 12.5$ ns entre chaque impulsion. En première approximation, le taux de remplissage temporel de ce laser est de 1 :125 000. Autrement dit, ce laser est presque tout le temps "OFF".

C'est cette particularité qui permet d'obtenir les puissances crêtes très élevées, nécessaires pour générer les effets non linéaires recherchés. En effet, une puissance moyenne P de 1W correspond à une énergie E par impulsion ($E = P \times \delta t$) de 12.5 nJ. Concentrée sur l'impulsion de durée δt cette énergie correspond à une puissance crête $P_c = E/\delta t$ d'environ 125 kW.

Pour l'étude, la longueur d'onde du laser est réglée à $\lambda = 800$ nm pour que l'absorption à deux photons se fasse à $\lambda/2 = 400$ nm, ce qui correspond à une longueur d'onde d'excitation proche de celle des billes fluorescentes utilisées.

2.1.2 Système de balayage

Le balayage de la zone à étudier est réalisé au moyen de deux miroirs galvanométriques (6210H, Cambridge Technology Inc.) pilotés par un driver à deux axes (MicroMax, Cambridge Technology Inc.). Ces drivers sont commandés en tension à travers un signal délivré par une carte analogique à la cadence maximale de 1 MHz et codé sur une dynamique de 12 bits (NI PCI-6711, National Instrument). L'espace angulaire balayé à la sortie des miroirs, et par extension la surface balayée sur l'échantillon dans le plan focal de l'objectif de microscope est directement liée à l'amplitude de cette tension. Les différentes ouvertures rencontrées dans le microscope limitent fortement cette amplitude, qui doit être limitée à 2V crête à crête afin d'obtenir une distribution uniforme de l'intensité du laser sur toute la surface scannée. La tension nominale maximale pouvant être délivrée par la sortie analogique de la carte PCI-6711 est de +/- 10 V, ce qui correspond à une quantification en tension de $20/212 = 4.88$ mV. Cette valeur est trop faible, car pour une tension limitée à 2V crête à crête, seulement 409 points peuvent être adressés dans une direction de balayage. Dans le plan focal d'un objectif de microscope X10, ces limitations correspondent à une zone balayée maximale de $650 \times 650 \mu\text{m}^2$ soit un pixel de taille $6.5 \mu\text{m}$ pour une image 100×100 pixels. Une amélioration importante de la résolution spatiale a été obtenue sur le montage en utilisant une autre sortie analogique de la carte PCI-6711 comme tension de référence qui joue le rôle de calibre en tension. Ainsi, la dynamique de 12bits est intégralement dédiée à l'intervalle de tension nécessaire pour le balayage. Il est ainsi possible d'obtenir des images de grande dimension (typiquement 400×400 pixels) sur une surface si petite que le quantum en tension correspond dans le plan focal du microscope à une résolution inférieure à celle imposée par la diffraction.

2.1.3 Détection

Le signal SHG ou de fluorescence, obtenu en réflexion sur l'échantillon, est dirigé sur un photomultiplicateur (PM) ultra-rapide (H7422P-40, Hamamatsu) avec un temps de montée de 1 ns et une réponse spectrale allant de 300 nm à 720 nm, le maximum de sensibilité étant à 580 nm pour un rendement quantique de 40%. Le gain varie de 5×10^4 à 4×10^6 et est réglé manuellement. Le signal numérisé (impulsions TTL) est ensuite dirigé sur un module de comptage de photons (C9744, Hamamatsu) avec une fréquence de comptage pouvant aller jusqu'à 10 MHz. Ce module est connecté sur l'un des 8 compteurs 32 bits d'une carte PCI haut débit (PCI-6602, National Instrument). Le cadencement du comptage est synchronisé au signal électronique de commande des miroirs de scan par un bus spécifique haute cadence RTSI (Real-Time System Integration, National Instrument) à travers un câble qui relie directement les deux cartes PCI entre elles.

2.1.4 Cohabitation du dispositif de fluorescence et de SHG

Le microscope utilisé est de type inversé commercial (IX71, Olympus), conçu pour l'imagerie de fluorescence en biologie mais aussi bien adapté aux besoins de la microscopie non-linéaire. Ce microscope dispose de nombreuses entrées possibles, ce qui fait de cet instrument le cœur du montage puisqu'il est un véritable banc optique de développement. Le choix initial a été d'utiliser l'entrée latérale comme port d'entrée du laser. Cette entrée n'est pas collimatée à cause de la présence de la lentille de tube représentée en (3) sur la figure 2.2. Lorsque le microscope est en position d'observation binoculaire, c'est le prisme (2) qui est traversé par la lumière provenant de l'échantillon. Le prisme (1) en réflexion totale utilisé comme miroir est inactif, rendant impossible l'entrée du laser dans le microscope (sécurité oculaire). Le miroir dichroïque (4) est amovible et permet de

réaliser une imagerie en réflexion (correspond au faisceau (7)). La lame semi-réfléchissante (5) est également amovible. Elle est utilisée pour réaliser des images de l'échantillon en champ clair et en réflexion, en utilisant une source verte collimatée à LED (Modèle MTN005303, Thorlabs) qui correspond au faisceau (6). L'oculaire (8) a été enlevé pour être remplacé par une caméra monochrome CMOS à haute sensibilité (UI-3240ML, Stemmer Imaging). La platine (10) a également été enlevée et le porte-échantillon est remplacé la plupart du temps par une simple lame de microscope (sur laquelle est déposé l'échantillon à étudier) placée sur une platine de positionnement motorisée (XYZ 562-ULTRALIGN et 3 vérins motorisés TRA12CC, Newport Corp.). En mode transmission, le faisceau est collecté par un condenseur puis dirigé vers la chaîne de détection (11). Une seconde chaîne de détection en réflexion a été également implantée sur le microscope avec un autre photomultiplicateur, mais ne figure pas sur ce schéma d'ensemble.

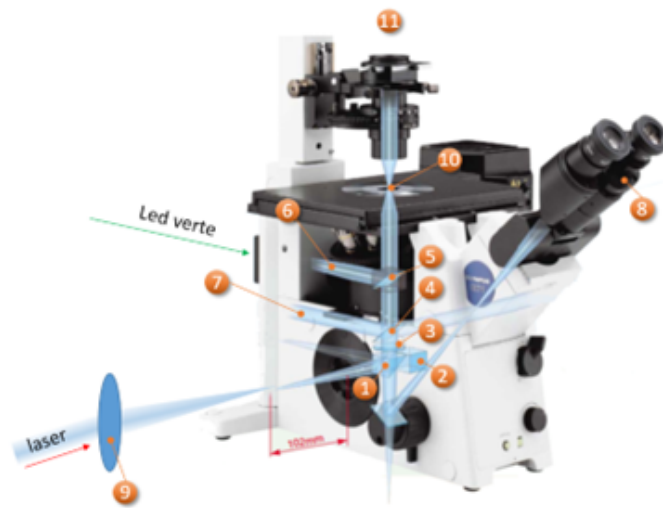


FIGURE 2.2 – Schéma d'ensemble du microscope.

Plus particulièrement pour les expériences détaillées plus tard et pour que le microscope soit polyvalent, la disposition des éléments optiques tels que les miroirs dichroïques et les filtres d'excitation et d'émission doit être optimisée afin de réaliser des mesures en fluorescence ou en SHG sans avoir besoin de changer les équipements optiques. En agissant simplement sur une cassette comportant plusieurs cubes, chacun d'eux comporte deux filtres et un miroir dichroïque, tous deux adaptés au domaine d'étude en longueur d'onde.

Pour que ces deux méthodes de mesure (en transmission et en réflexion) puissent cohabiter tout en conservant la possibilité d'utiliser la microscopie en champ clair comme illustré sur la figure 2.3A, il a été nécessaire de disposer un miroir dichroïque passe-haut (DMLP490R, Thorlabs) pour permettre de transmettre uniquement les longueurs d'ondes supérieures à 490 nm (voir figure 2.3B). De cette façon, en étudiant l'échantillon en réflexion, il est possible de collecter le signal issu de la fluorescence biphotonique ou de la SHG dans une gamme de longueurs d'ondes inférieure à celle utilisée pour l'excitation.

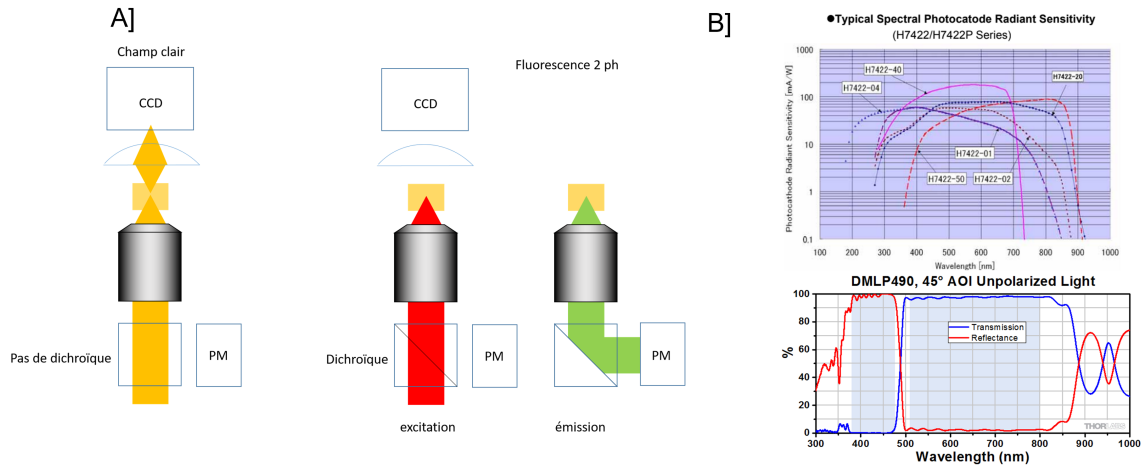


FIGURE 2.3 – A] Schéma illustrant la cohabitation de la microscopie non-linéaire et en champ clair. B] Réponse spectrale du photomultiplicateur et courbe de transmission du miroir dichroïque ajouté.

Plusieurs pièces conçues et imprimées en 3D permettent d'adapter le microscope à une nouvelle disposition des éléments optiques. Le photomultiplicateur (PM) est placé vers une nouvelle sortie du microscope non adaptée au niveau support. Pour remédier à cela, une pièce d'impression 3D réalise l'adaptation et prévoit également l'accueil de multiples filtres en amont comme présenté sur la photo de la figure 2.4B.

Le photomultiplicateur est très sensible à un large spectre de longueur d'onde (voir figure 2.3B), il est donc nécessaire de prendre des précautions de filtrage spectral en amont de celui-ci afin d'éliminer tous les photons issus de la source d'excitation. Un filtre spécifique (377/50 Bandpass Filter, Semrock) à haute densité optique (OD7) est utilisé pour stopper le signal résiduel provenant du laser et réfléchi par le miroir dichroïque. La situation optimale utilise un détecteur qui possède une sensibilité presque nulle à la longueur d'onde d'excitation, mais très forte à la longueur d'onde de fluorescence ou de doublage en fréquence.

2.1.5 Lentille de scan

L'utilisation de la microscopie non-linéaire contraint à utiliser une méthode de balayage pour réaliser des images des échantillons. En formant un faisceau très focalisé et au moyen de miroirs contrôlés, il est possible de balayer une zone que l'on souhaite imager. Chaque pixel de l'image est alors un point où le faisceau laser s'est arrêté quelques microsecondes pour finalement reconstruire une image qui représente une carte de réponses non-linéaire de l'échantillon. Habituellement, les montages optiques conventionnels respectent les conditions de Gauss lors de l'utilisation de lentilles. Autrement dit, le faisceau lumineux doit être centré sur la lentille avec un faible angle d'incidence. Lorsque la microscopie nécessite un balayage du faisceau laser grâce à l'utilisation de miroirs galvanométriques, les conditions de Gauss ne peuvent pas être respectées pour des lentilles conventionnelles. Le non-respect de ces conditions provoque des images très inhomogènes en intensité qui comportent également de nombreuses aberrations.

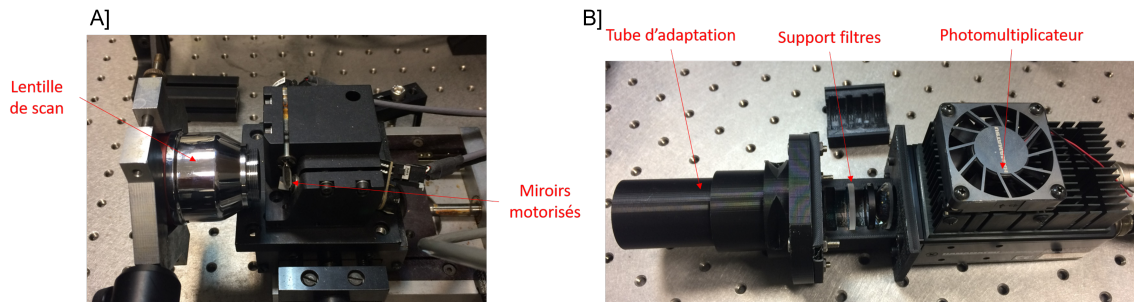


FIGURE 2.4 – A] Photo du système permettant le balayage du faisceau laser. Les miroirs sont motorisés et contrôlés en tension pour ajuster leur amplitude. B] Photo de la pièce d'adaptation du PM au microscope. Le tube à gauche permet de réduire le bruit de mesure et également de pouvoir insérer la pièce dans le support du microscope. L'emplacement des filtres permet facilement de changer les composants sans démonter le système.

Pour remédier à ce problème des conditions de Gauss, une lentille de type F-Théta (LSM54-850, Thorlabs) est implantée. Elle a pour avantage de posséder des propriétés optiques identiques dans tout le plan de balayage et ainsi permet d'obtenir des images homogènes et sans aberrations. Cette lentille, spécialement conçue pour les systèmes à balayage, présente une focale équivalente de sortie de 64 mm et une focale équivalente d'entrée de 17.5 mm. L'association de la lentille de scan et de la lentille de tube implantée dans le microscope (focale de 180 mm pour les microscopes Olympus) doit i) être un montage afocal, ii) permettre d'élargir le faisceau issu du laser pour couvrir complètement l'entrée de l'objectif de microscope (afin d'obtenir la résolution optique maximale) et iii) conjuguer le plan moyen des deux miroirs de balayage avec le plan de l'échantillon. Le positionnement spatial de la lentille, d'un point de vue optique géométrique, est une partie délicate pour le montage utilisé car, comme on peut le voir sur le schéma optique figure 2.5, l'incertitude de positionnement de la lentille après les miroirs peut facilement induire une sortie de la zone de scan du faisceau en entrée de l'objectif. Ne pouvant pas accéder à la documentation technique des composants présents à l'intérieur de la lentille de scan, il a été choisi de la représenter géométriquement par un système afocal de trois lentilles convergentes.

Pour mettre en œuvre une zone de scan contrôlée et précise, il faut réaliser une étude du système entier sous un aspect optique géométrique. Le faisceau issu du laser est donc dirigé vers un système de miroirs contrôlés permettant le balayage du faisceau dans le plan de la lentille de scan. Cette lentille permet de former un système afocal avec la lentille de tube du microscope et ainsi d'obtenir un faisceau collimaté avant de pénétrer dans l'objectif. De cette façon, le plan formé par le balayage entrant dans l'objectif représente une surface fixe dans l'espace, mais qui permet le balayage en sortie vers l'échantillon. En calculant le grandissement, cela permet de connaître la taille réelle de la zone de scan qu'il est possible d'observer sur les images. En se référant au schéma de la figure 2.5 il est possible de calculer le grandissement théorique qui permet de connaître la taille du faisceau en entrée de l'objectif :

$$\gamma_2 = \frac{f_2}{f_1} = 2.81$$

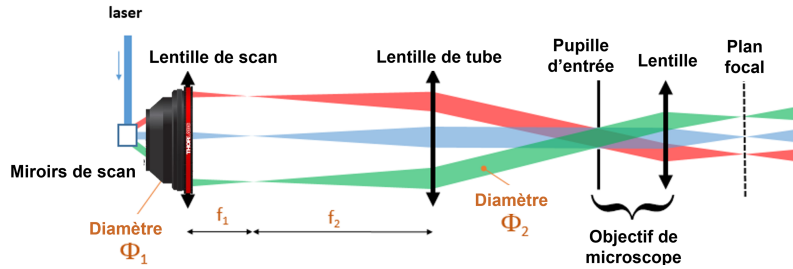


FIGURE 2.5 – Schéma du point de vue optique géométrique. Représentation de la lentille de scan par une lentille convergente. Ce point de vue géométrique permet de comprendre que le faisceau en entrée de l’objectif est fixe lorsque le balayage s’opère. Une erreur de positionnement de la lentille de scan par rapport aux miroirs provoque rapidement une sortie du faisceau à l’entrée de l’objectif. Ce problème rend une image très inhomogène, car les points de mesures sur les extrémités sont hors de l’entrée de l’objectif.

2.1.6 Contrôle de la polarisation

Le faisceau laser rencontre d’abord un coupe-faisceau (shutter électromécanique à commande automatisée, Uniblitz). Une fibre optique permet de prélever une partie du faisceau diffusé sur le shutter et de le diriger sur un spectromètre compact (OceanOptics) afin de visualiser le spectre d’émission sur un ordinateur dédié, via le logiciel OOIBase32. La largeur spectrale et la longueur d’onde d’émission sont ainsi contrôlées. Une fois le shutter ouvert, le faisceau laser traverse successivement deux cellules : un isolateur de Faraday (IO-3-780-HP, Thorlabs) et une cellule de Pockels ultra-rapide (350-80LA, Conoptics). La première cellule est destinée à éviter le retour d’une réflexion dans la cavité laser. La cellule électrooptique de Pockels, commandée électriquement, est utilisée comme modulateur d’intensité. Les temps de bascule très brefs ($1 \mu s$) permettent une utilisation spécifique en faisant varier l’intensité du laser pour chaque zone balayée de l’échantillon. Ce dispositif est utilisé notamment pour les applications de stockage d’images dans des matériaux polymères, par effets non linéaires [77]. Une lame demi-onde $\lambda/2$ achromatique (700 – 1000 nm, Edmund Optics) placée sur une platine de rotation motorisée (PR50, Newport) permet de contrôler la polarisation du faisceau. Cette platine est connectée à l’une des huit commandes de puissance d’un contrôleur universel (XPS, Newport). Une lamelle couvre-objet de microscope est placée à 45° de l’axe de propagation du faisceau laser. La réflexion (environ 4% de l’intensité incidente) est dirigée vers un wattmètre (Modèle 1815-C, Newport) dont la mesure est numérisée par une carte d’acquisition (NI-6009, National Instrument). Après calibration, ce dispositif permet d’enregistrer la puissance moyenne du laser utilisée pour chaque image enregistrée.

Lors de l’utilisation de la microscopie SHG, la polarisation de l’onde incidente peut faire passer le signal utile d’un maximum à une extinction totale. Une lame quart d’onde (lame achromatique 700-1000 nm, modèle 46-560, Edmund Optics) est également utilisée pour changer l’état de polarisation lorsque l’on veut passer d’une onde polarisée rectilignement vers une onde polarisée elliptiquement (circulairement pour $\theta = \pm\pi/4$). Grâce à cela, il est possible de sonder la polarisation rectiligne qui génère le plus de signal. Mais également, pour éviter l’extinction du signal SHG si l’objet à observer est en mouvement, il est intéressant d’utiliser une polarisation circulaire ou elliptique pour éviter une modulation du signal par le mouvement de l’objet.

2.2 Interface commandée avec LabVIEW

L'interface de commande a été développée avant le début de cette thèse avec la plateforme de conception Labview (LabVIEW 2010, National Instrument). Elle permet de contrôler les platines de positionnement, l'intensité et la polarisation du laser, les paramètres de scan. Elle génère également les signaux de balayage, génère une image SHG/TPEF à partir du signal obtenu par le compteur, réalise la synchronisation entre ces deux événements (scan et détection). Son utilité ne s'arrête pas là puisqu'elle permet aussi de sauvegarder les images obtenues ainsi que tous les paramètres utilisés pour l'acquisition. La figure 2.6 montre l'interface permettant de contrôler chaque paramètre lors d'une acquisition.

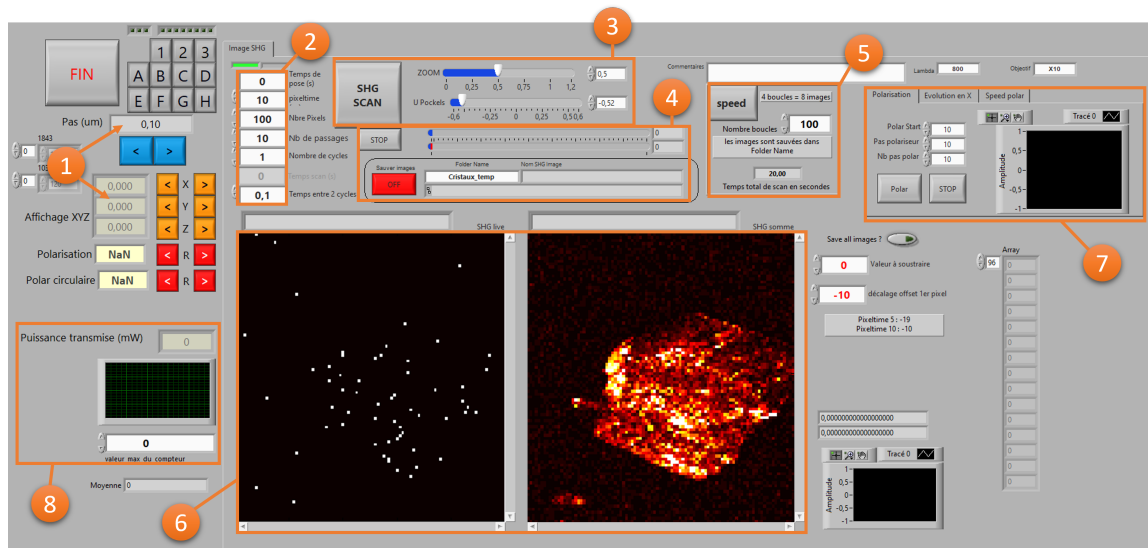


FIGURE 2.6 – Interface de commande LabVIEW des différents organes de l'expérience. 1] Contrôle de la platine XYZ et de la polarisation. 2] Paramètres de scan. 3] Facteur de zoom et intensité du laser. 4] Chemin d'enregistrement des images et nom des fichiers. 5] Scan rapide d'un stack d'images via la méthode sans temps mort détaillée chapitre 1.2 6] A gauche image instantanée et à droite l'accumulation des x images. 7] Module d'acquisition de la réponse en polarisation de l'échantillon. 8] Compteur de photons reçus sur le capteur sur chaque image.

2.2.1 Paramètres de scan

L'interface de commande permet de régler directement les paramètres qui gouvernent le balayage de l'échantillon par le laser. Ces différents paramètres sont :

Taille de l'image : Le programme a été développé pour générer des images carrées. Par conséquent, le choix de n points (pixels) pour une ligne génère une image de $n \times n = n^2$ pixels.

Facteur de zoom : Il s'agit de la tension maximale appliquée aux miroirs de scan, ce qui détermine la taille physique de la zone balayée de l'échantillon.

Temps de pose : C'est le "pixeltime", aussi appelé "dwell time", c'est-à-dire le temps d'intégration pendant lequel le comptage s'effectue. Ce temps correspond au temps d'exposition au laser de chaque zone balayée de l'échantillon. La valeur minimale du temps de pose, imposée par le déplacement mécanique des miroirs, est de $1 \mu s$ ce qui correspond à 80 impulsions femtosecondes. En général, le signal est trop faible pour cette valeur minimale de temps de pose.

Type de scan : Les signaux électriques qui alimentent les miroirs de balayage sont de type raster scan. La manière la plus simple de balayer la surface consiste à générer le signal représenté sur la figure 2.7A. La cadence imposée au signal de balayage correspond au pixeltime, défini dans l'interface. La première ligne est balayée par le premier miroir commandé par une tension en forme de marches d'escaliers. A la fin de la ligne, un intervalle de temps est utilisé pour que ce miroir ramène le laser au début de la ligne tandis que le deuxième miroir permet de passer sur la colonne suivante. L'image est ainsi construite ligne par ligne. Cette approche présente un inconvénient lié à la technique de mesure du signal. En effet, le comptage de photons est une mesure qui consiste à relever à intervalles réguliers la valeur d'un registre accumulateur avec une période égale au pixeltime. Lorsque que le miroir revient en début de ligne, le comptage continue et génère un signal parasite qui est visible sur l'image finale (les pixels de la première colonne de l'image correspondent alors à la valeur moyenne des pixels de chaque ligne). De plus, cet effet est encore plus gênant lorsque la zone balayée est grande avec un pixeltime très court. Dans ce cas, le temps mécanique pris par le miroir pour revenir en début de ligne peut couvrir plusieurs quanta temporels (pixeltime). C'est alors plusieurs colonnes de l'image qui représente une sorte de "ghost" parasite. Cet effet gênant ayant une amplitude liée à la valeur des paramètres, elle est difficilement corrigeable par programmation. La solution finalement retenue est la génération de signaux de type raster scan bidirectionnel, comme l'illustre la figure 2.7B. Avec cette approche, il n'y a plus de temps mort, lorsque le premier miroir atteint la fin de la première ligne, le deuxième miroir passe à la ligne suivante. Le miroir "ligne" revient à sa position d'origine en balayant la colonne suivante dans l'autre sens. Cette approche nécessite d'inverser une ligne sur deux dans l'image obtenue, ce qui est réalisé très simplement avec LabVIEW.

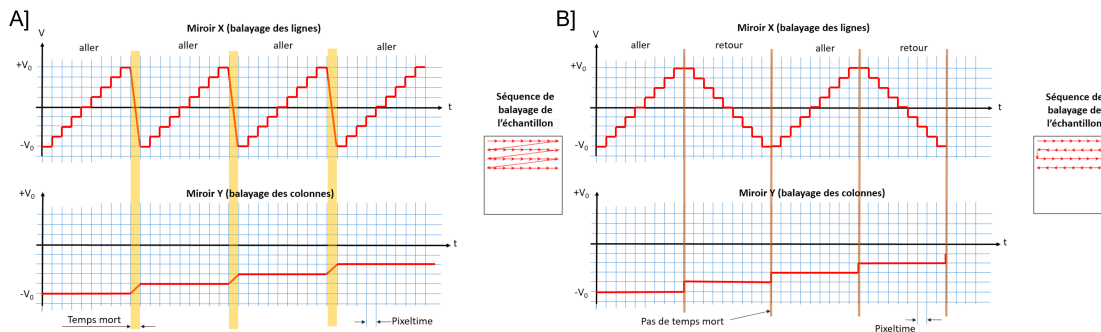


FIGURE 2.7 – Graphique des signaux de tension envoyés aux miroirs de scan.

2.2.2 Accumulation d'images

Dans l'objectif d'obtenir des images SHG très contrastées, les paramètres expérimentaux doivent être choisis pour utiliser toute la dynamique de l'image. Codé sur 8 bits, la valeur maximale mesurée sur un pixel est donc de 255. En supposant qu'un matériau soit suffisamment efficace en réponse non-linéaire d'ordre 2 pour obtenir une telle valeur en une microseconde (valeur de pixeltime la plus petite possible sur le montage), il faudrait alors que 255 photons soient générés avec les 80 impulsions disponibles pendant une microseconde, soit environ 3 photons SHG par impulsion. Ces conditions peuvent être obtenues avec des cristaux spécifiquement conçus pour la génération de second harmonique (BBO, par exemple). Mais les matériaux couramment utilisés ont des réponses SHG beaucoup plus faibles. Typiquement, le laser étant à la puissance maximale, des pixeltime de plusieurs dizaines de microsecondes sont nécessaires pour obtenir une image dont la dynamique couvre 5 à 6 bits (hypothèse que pour les pixels les plus intenses, un photon SHG soit généré pour chaîne impulsion laser). Or, avec des intensités d'excitation aussi élevées, une faible absorption du matériau, où la présence d'impuretés peuvent générer un fort échauffement local menant d'une part à la destruction locale du matériau et d'autre part à la saturation du détecteur (la "combustion" locale se caractérise par un éclair blanc, comportant un nombre suffisant de photons dans la plage spectrale du filtre passe bande qui sélectionne les photons SHG).

Nous avons ainsi développé une nouvelle approche, visant à construire une image au moyen de passages multiples et par addition pixel par pixel de chacune des images obtenues. Il est à noter que chaque image prise individuellement ne contient pas d'informations exploitables, alors qu'en sommant un grand nombre d'images, ce qui revient à avoir une cartographie de la probabilité de présence d'un photon par pixel, une image exploitable peut être obtenue. Pour illustrer cette approche, la figure 2.8 montre plusieurs images obtenues suivant différents paramètres d'acquisition. Pour les 3 premières images, seules une cinquantaine de "coups", c'est-à-dire de photons SHG, sont détectés sur l'image. Le temps d'acquisition étant très faible pour une image 100×100 pixels avec un pixeltime d'une microseconde ($t = 100 \times 100 \times 10^{-6} = 10^{-2} = 10ms$), un grand nombre de balayages est possible. Le nombre total de coups augmente linéairement avec le nombre de passages.

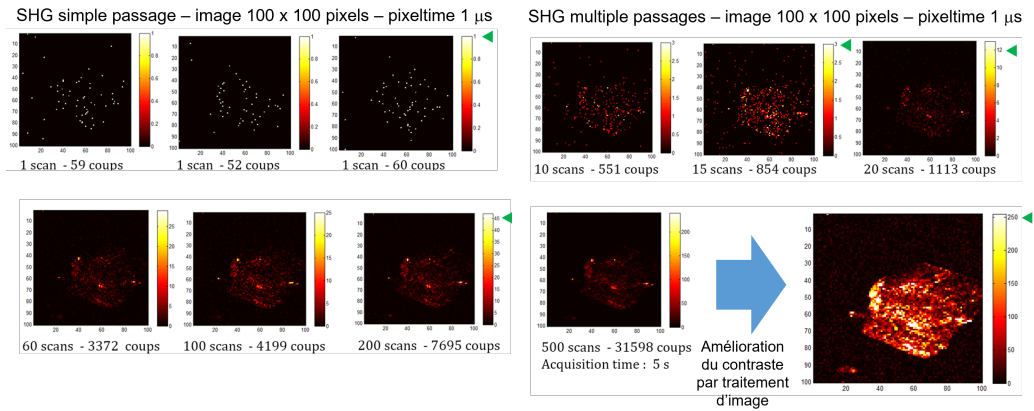


FIGURE 2.8 – Comparaison du signal SHG émis par un cristal en fonction du nombre de passages successifs et pour un temps de résidence (pixeltime) de $1 \mu s$.

2.3 Système microfluidique

En se référant au chapitre 1 sur la partie liée à la microfluidique, on sait que l'organe principal est un petit module appelé puce, réalisée le plus souvent en PDMS¹. L'ensemble fait souvent entre 2 et 6 cm de long. Il est collé sur un support qui peut être une lame de microscope (1x26x76 mm) ou une lamelle d'épaisseur 170 microns et de longueur variable. Pour faire circuler les fluides au sein des canaux micrométriques, un système de connectique précis et spécifique est nécessaire afin d'assurer une étanchéité parfaite. Plus notre système est réduit en taille, plus il est sensible aux variations de pressions. Pour cela, la commande en pression est réalisée par un contrôleur de pression pneumatique qui agit sur un volume d'air présent dans les réservoirs de solutions. Grâce à la compressibilité de l'air, il est possible de créer des variations de pression très faibles. Pour une vision globale et simplifiée du système, la figure 2.9 montre les différentes parties du montage de microfluidique intégrées à une observation sous un microscope.

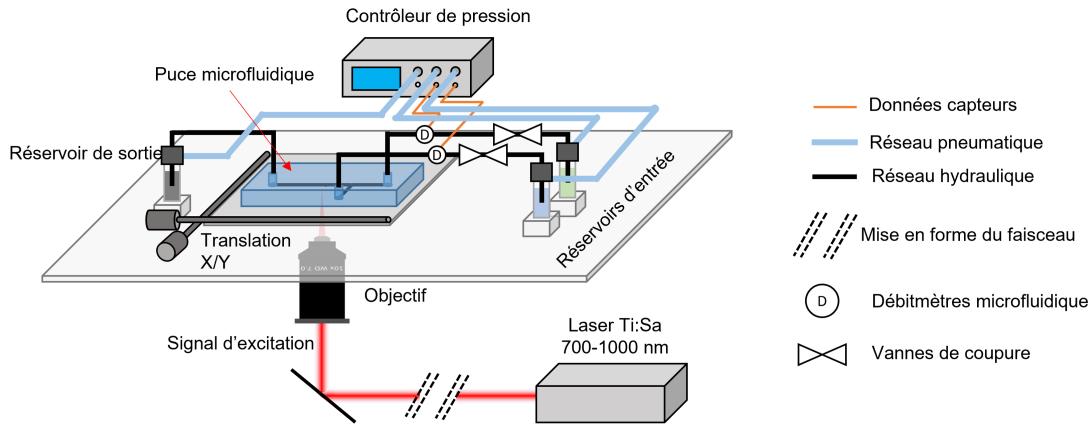


FIGURE 2.9 – Schéma simplifié du système microfluidique lorsqu'il est intégré à un microscope.

2.3.1 Support de puces microfluidiques

Le module de PDMS étant collé sur une lamelle de verre d'environ 170 microns pour pouvoir utiliser des objectifs à courte focale, le problème de la stabilité peut se poser. En effet, les lamelles sont très légères et ne permettent pas de rendre la puce statique uniquement par leur poids. De plus, les connections hydrauliques vers la puce exercent des contraintes qui ont tendance à faire bouger l'ensemble puce-lamelle et gênent l'observation au microscope. Pour remédier à cela, un simple porte-échantillon en impression 3D permet de maintenir la lamelle statique sur ce support couplé à une platine de translation. Le modèle 3D du support est représenté figure 2.10 et possède également quelques caractéristiques adaptées au passage de fibres optiques intégrées à la puce microfluidique, mais cela est détaillé dans un autre chapitre.

1. Polydiméthylsiloxane, composé de caoutchouc silicone qui rend le matériau mou

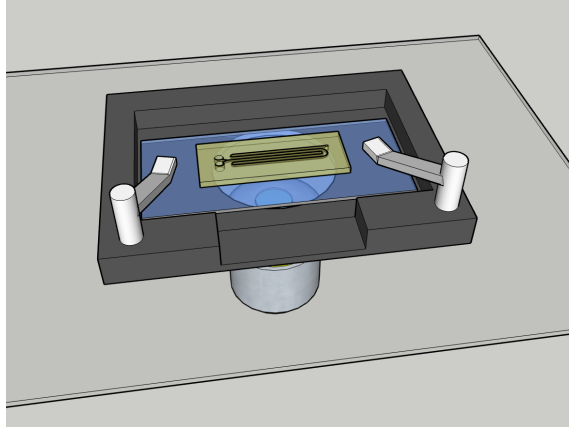


FIGURE 2.10 – Modèle de la pièce imprimée en 3D pour supporter la puce microfluidique.

2.3.2 Connexions pneumatiques et fluidiques

Pour que le système microfluidique soit le plus performant possible, les connexions pneumatiques et hydrauliques doivent être les plus étanches possibles. Pour cela, un ensemble d'équipements adaptés à la microfluidique sont utilisés afin d'assurer la compatibilité de chaque composant. Pour commencer, la commande en pression est assurée par un système pneumatique détaillé dans la partie suivante.

Des tubes pneumatiques (Tygon S3 E-Lab (E-3603) Tubing, Darwin microfluidics) flexibles en Tygon sont utilisés pour relier le module de commande en pression vers les réservoirs de fluides. Ces tubes ont l'avantage d'être flexibles et faciles à mettre en place et ne présentent pas de problèmes de compatibilité puisque seul de l'air y circule. De plus, pour éviter les mauvaises surprises lors d'expériences, il est important de disposer des filtres anti-retours de liquide (Microfluidic Backflow Blocker Kit, ELVEFLOW) à la sortie du contrôleur de pression et qui par la même occasion servent d'adaptateurs pour la connexion entre le module pneumatique et le tube.

Les tubes pneumatiques sont reliés à des réservoirs spécifiques permettant de réguler la circulation du liquide par surpression dans l'air présent dans le conteneur (figure 2.12 [n°1]). Ces réservoirs (Microfluidic Reservoir for 1.5 mL Eppendorf®-XS, ELVEFLOW) utilisent deux modules qui se vissent l'un dans l'autre afin de rendre étanche un support de type Eppendorf. Comme représenté sur la figure 2.11, une arrivée pneumatique agit sur la pression dans le réservoir, alors que la sortie est fluidique et prend sa source au fond du réservoir pour ne pas envoyer d'air dans le circuit. Ce réservoir ne doit donc jamais être rempli trop proche de l'arrivée pneumatique pour éviter d'éventuels retours de liquide.

La connexion entre le tube d'arrivée pneumatique et le réservoir est effectuée avec un adaptateur étanche par un raccord à glissement d'un côté et vissée de l'autre (1/4-28 Swivel Barbed Adapter, IDEX). Pour la sortie liquide, la connexion est réalisée par une vis qui vient légèrement écraser une fêrule plastique autour du tube fluidique afin d'assurer l'étanchéité (Flangeless PEEK Fittings + ETFE Ferrules 1/4-28 to 1/16" OD). Il est déconseillé de trop forcer sur la vis, ce qui risque

2.3. SYSTÈME MICROFLUIDIQUE

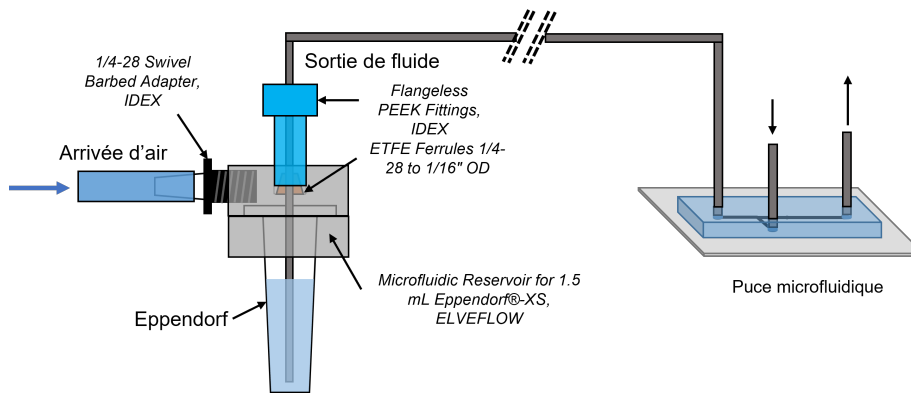


FIGURE 2.11 – Schéma de l'adaptateur de réservoir de fluide pour la microfluidique.

de boucher le tube fluide en écrasant complètement la fêrule. Ces fêrules plastiques sont assez molles pour permettre l'étanchéité par écrasement, il est donc préférable de ne pas réutiliser les mêmes si le module a été dévissé ou démonté entre deux expériences.

Le tube fluide sortant du réservoir peut être de différents types en fonction des contraintes de l'expérience (figure 2.12 [n°3]) :

- Un type de tube est le FEP (Éthylène propylène fluoré), transparent, flexible, gamme de température entre -200 et $+205^{\circ}\text{C}$, perméable pour certains solvants.

- Un autre type de tube est en PTFE (Polytétrafluoroéthylène), indéformable jusqu'à 15 bars, imperméables à de nombreux solvants, stable pour des températures de -200 à $+260^{\circ}\text{C}$, mais il est rigide et difficile à manipuler en termes de placement par rapport à la puce microfluidique. C'est ce type de tube qui est utilisé dans les expériences décrites dans les chapitres suivants concernés par la microfluidique.

- Un dernier type est le PEEK (Polyétheréthercétone) qui est la gamme supérieure du PTFE en termes de compatibilité avec les solvants, une gamme de température de -50 à $+250^{\circ}\text{C}$, grande résistance à la pression ainsi qu'une capacité à résister mécaniquement à de petites dimensions de construction (diamètre intérieur allant de 1 mm à 65 microns).

Entre le réservoir de fluide et la puce microfluidique, au moins deux organes de contrôle et de mesure de flux peuvent apparaître et communiquer avec le contrôleur pneumatique. Le premier est une vanne permettant soit de couper la circulation du flux, soit d'aiguiller le flux vers un autre chemin (Controllable Microfluidic 2/3 Port Solenoid Valve, Elveflow) grâce à une commande en 24V (figure 2.12 [n°4]). Dans le premier cas, la vanne est munie d'une entrée et d'une sortie séparée par le système "ROCKER® valve technology" permettant une coupure de la circulation du fluide avec un déplacement de volume réduit à 10 nL. Le deuxième cas et grâce à la même technologie, la vanne possède trois orifices qui peuvent être utilisés comme entrées/sorties afin de diriger le fluide dans la voie désirée. Le deuxième organe (figure 2.12 [n°2]), sert à mesurer le débit de fluide circulant dans la puce microfluidique (MFS Microfluidic Thermal Flow Sensor, Elveflow). Avec une gamme de mesure pouvant aller de 1.5 à 5000 $\mu\text{L}/\text{min}$, ce débitmètre est parfaitement adapté aux volumes microfluidiques grâce à une technologie de mesure d'asymétrie du profil de température du

flux à condition de connaître les propriétés physiques du fluide (viscosité, concentration, etc). En chauffant faiblement le liquide, celui-ci peut comparer le profil en température du flux en entrée et sortie et ainsi en déduire le flux de façon très précise.

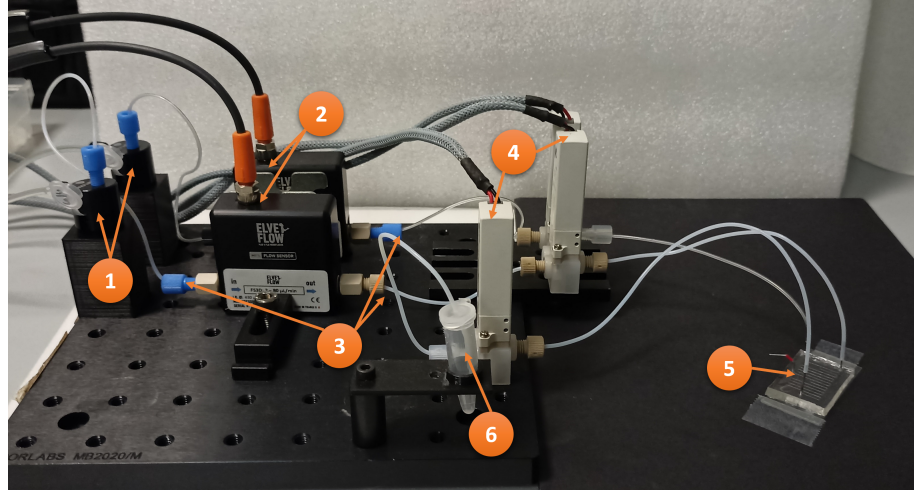


FIGURE 2.12 – Photo du montage permettant le contrôle des flux hydrauliques au sein de la puce microfluidique.

Pour que le fluide circule dans les canaux microfluidiques, il ne reste que la connexion des tubes sortant des valves et débitmètres à réaliser avec la puce microfluidique (figure 2.12 [n°5]). Cette étape peut également être source de fuites de liquide si elle n'est pas convenablement réalisée. L'arrivée de fluide se fait par la surface supérieure des puces la plupart du temps, en ayant, au préalable, percé des trous au sein du matériau. Pour le PDMS, comme nous le verrons dans un autre chapitre, il suffit d'un outil (Rapid-Core Microfluidic Punches) utilisé normalement pour des biopsies, afin de découper un cylindre de matière jusqu'au canal. Un perçage ne fonctionne pas, car le PDMS se fissure autour et crée des fuites. La taille du trou dépend de la méthode de connexion utilisée pour relier le tube et la puce. Une méthode consiste à directement insérer le tube en PTFE dans l'orifice percé afin d'obtenir l'étanchéité par raccord à glissement et nécessite donc que l'orifice soit subtilement plus petit que le tube. Une deuxième méthode consiste à réaliser la connexion avec des micro-tubes en acier de $640 \mu\text{m}$ de diamètre extérieur (OD) et $330 \mu\text{m}$ de diamètre intérieur (ID). Leur rigidité permet une insertion facile et efficace dans le matériau, mais également, si l'ID de l'aiguille est plus petite que celui du tube, alors cela génère une résistance hydrodynamique plus grande qui, nous le verrons plus tard, évite les retours de liquide. Pour la sortie fluidique de la puce, le système de connexion est le même jusqu'à un nouveau réservoir qui sert de conteneur de la solution finale (figure 2.12 [n°6]).

De manière plus générale, sur un nouveau montage microfluidique, il est préférable d'ajouter les éléments les uns après les autres afin de tester l'étanchéité réalisée après chaque étape. Une fuite est toujours difficile à détecter en raison des volumes de fluide utilisés. Également, il faut considérer que les volumes microfluidiques sont faibles au sein de la puce, mais ce n'est pas le cas pour tout le circuit, plus il y a de longueur de tube et de modules de mesure, plus il faut de solution avant de pouvoir remplir tout le circuit et commencer les expériences. Il est alors conseillé, de placer au

plus proche de l'entrée de la puce les modules de mesure de débit ou les valves, afin de minimiser les volumes hors conditions microfluidiques.

Une attention particulière doit être portée à la pression hydrostatique du montage, car de très faibles variations de hauteur d'un réservoir par rapport à l'autre peut activer une circulation parasite de fluide. De ce fait, l'entrée et la sortie du système fluidique doivent être à la même hauteur.

2.3.3 Système de contrôle des flux

Pour que les fluides puissent circuler de manière contrôlée dans les canaux microfluidiques, un module de gestion de pression pneumatique est disposé en amont de la partie fluidique. Celui-ci agit sur la pression du réservoir détaillé sur la figure 2.11, en augmentant ou diminuant la surpression. Le module pneumatique (OB1 Mk3+, Multi channel pressure and vacuum controller, ELVEFLOW) est couplé à un compresseur (Silent Lubricated Air Compressor, Jun-Air) permettant de constamment avoir une pression de 3 bars. Le module pneumatique possède de nombreuses caractéristiques intéressantes puisqu'il est possible, en fonction des besoins de l'expérience, de personnaliser les sorties pneumatiques. Les possibilités vont d'une voie très précise allant de 0 à 200 mbars (stabilité à $\pm 10 \mu\text{bars}$) jusqu'à une voie supportant une pression plus grande jusqu'à 8 bars, mais avec une précision plus faible (stabilité à $\pm 500 \mu\text{bars}$). Ces sorties peuvent également fonctionner en vide et non en surpression, ce qui peut, dans certains cas, avoir un intérêt pour la microfluidique.

Chaque sortie pneumatique est également reliée à une entrée/sortie analogique permettant de synchroniser un capteur de flux avec la commande de pression. Grâce à une boucle de contre-réaction entre capteur et commande en pression, il est alors possible d'obtenir des flux très stables, mais également des rampes de montée/descente en pression. Tout ceci est possible grâce à un logiciel (ESI - ELVEFLOW smart interface) développé pour contrôler les paramètres d'expérience via un ordinateur. Celui-ci permet par exemple de visualiser les commandes en pression ainsi que la pression actuelle induite, qui permet de détecter une éventuelle fuite. Deux modes de fonctionnement sont également disponibles, dans un cas, l'utilisateur fixe la pression pour influencer le flux, dans l'autre cas, c'est le flux qui est fixé et le module pneumatique gère tout seul la pression pour que la consigne de flux soit stable. Néanmoins, une interface labVIEW présentée figure 2.13 a également été développée pour regrouper la commande du système optique et du système microfluidique.

Lors de l'utilisation de voies en simultané, lorsque la commande est faite en pression, les flux sont très sensibles aux variations des autres voies si elles communiquent au sein de la puce. Pour éviter de désamorcer² l'expérience, les changements sur plusieurs voies, doivent se faire en simultané grâce au mode "pause" du panneau de contrôle du logiciel. Une attention particulière doit être portée à la calibration du module pneumatique, mais également à l'installation des capteurs de pression ou de flux. Leur fonctionnement est basé sur les propriétés physiques des fluides, et demande de renseigner ces caractéristiques dans les paramètres des capteurs.

2. L'obtention de conditions stables peut être long, un fort déséquilibre de pression peut stopper la dynamique de l'expérience microfluidique.

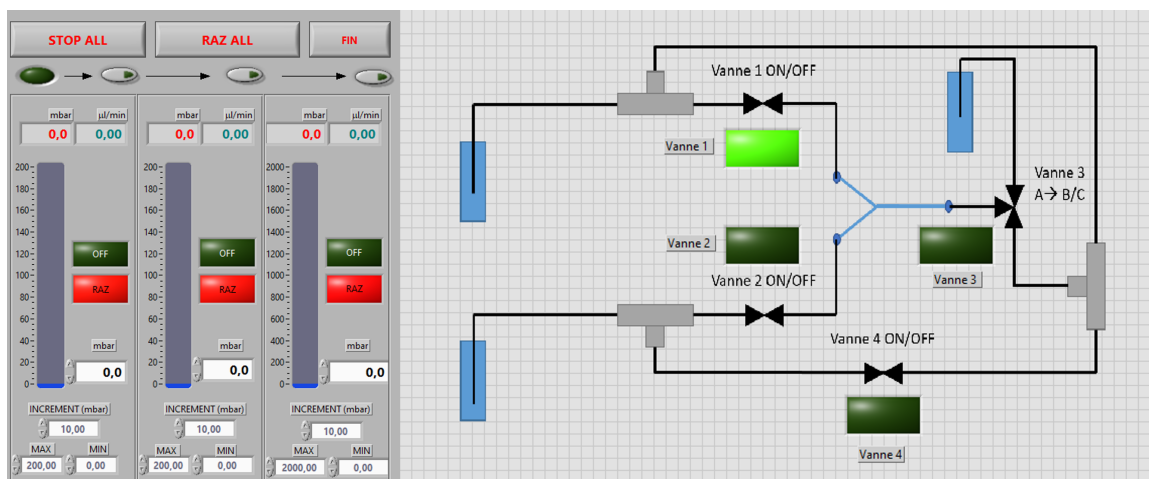


FIGURE 2.13 – Interface de commande en pression/flux et des valves du système microfluidique avec le logiciel LabVIEW.

Chapitre 3

Conception de puces microfluidiques

Ce chapitre s'intéresse à la microfabrication de puces microfluidiques en s'appuyant sur la méthode de photolithographie décrite dans le chapitre 1 (section 1.1.4). Les différentes techniques existantes étant déjà décrites, nous nous concentrons sur les méthodes mises au point au sein du laboratoire pour créer nos propres puces microfluidiques. Le but étant d'être autonome et polyvalent face à la fabrication de nouvelles puces microfluidiques pour des raisons de vieillissement ou de changement de géométrie. La première partie expose les raisons qui motivent la réalisation d'un procédé de fabrication facile à mettre en place et efficace pour de nombreuses applications. Ensuite, la deuxième partie détaille l'aspect technique de la principale méthode utilisée pour la microfabrication de puces microfluidiques depuis la réalisation du modèle 3D jusqu'au collage du module en PDMS sur le substrat. Pour finir, la troisième section traite des résultats pratiques en comparant les avantages et inconvénients de cette méthode ainsi que quelques applications utilisées pour tester la qualité des réalisations.

3.1 Procédé de fabrication accessible

Grâce au développement très actif de la microfluidique ces dernières années tout domaine confondu, cet outil s'est largement répandu au sein des laboratoires afin de répondre à des besoins techniques qui ont déjà été évoqués précédemment. Une précision sub-micrométrique de microfabrication est atteignable en utilisant des salles blanches et des matériaux tels que la résine SU-8, mais ceci nécessite des moyens que tous les laboratoires ne possèdent pas ou ne souhaitent pas investir pour débiter la fabrication microfluidique [78]. Une telle précision n'est pas toujours nécessaire en fonction des expériences, c'est pourquoi une microfabrication moins contraignante est parfois une option plus intéressante. Une autre raison venant conforter la réduction des coûts et de la complexité du processus de fabrication est la tendance actuelle à intégrer la microfluidique dans de nombreux diagnostics de base qui ne nécessitent que peu d'étapes.

Pour répondre à ces besoins, la première solution s'est répandue grâce à l'arrivée des films secs de résine photosensible (Dryfilm photoresist) développés par Dupont en 1970 (Wilmington, DE, USA) initialement utilisés pour la fabrication de circuits imprimés. Ce n'est qu'en 2005 que

l'idée est apparue d'utiliser ces films de résine photosensible afin d'élaborer des moules de puces microfluidiques [79]. En comparaison avec les résines liquides, aucune étape de *spin-coating* n'est nécessaire et cela assure une homogénéité du matériau ainsi qu'une épaisseur constante. En plus d'une facilité de manipulation, l'énergie d'activation est plus faible que la SU-8 et ainsi permet l'utilisation de sources lumineuses bien plus compactes et économiques [80].

Habituellement, l'étape d'insolation des résines se fait grâce à un masque haute précision. Cela implique souvent de dépendre d'un organisme extérieur, ce qui a pour conséquence d'augmenter les délais et les coûts lorsque de nouveaux modèles sont nécessaires. Pour remédier à cela, des méthodes permettent d'insoler des motifs particuliers en formant la géométrie directement grâce à des écrans LCD UV programmable. Ces technologies donnent davantage de polyvalence et d'adaptation pour créer rapidement de nouveaux modèles de puces microfluidiques.

3.2 Méthode de microfabrication

La qualité et la rapidité de fabrication des puces microfluidiques dépendent grandement de la conception des moules permettant de créer l'empreinte des canaux dans un module en PDMS. La qualité des canaux est déterminée par le niveau de détail que la technique d'insolation du film photosensible peut atteindre. Ici, la méthode que nous avons mise au point, utilise une imprimante 3D (Phrozen Shuffle 4K) munie d'un écran LCD possédant une résolution de 31 μm et émettant dans le proche UV (Ultra-violet) afin de polymériser une résine liquide [37] (voir article en Annexe 3). Son utilisation est ici dérivée pour uniquement tirer parti de l'écran LCD monochrome programmable afin d'insoler les motifs souhaités sur les films photosensibles. Il faut savoir également que quelques modifications ou adaptations sont nécessaires pour un bon fonctionnement de la méthode hors des conditions prévues par l'appareil. Le défi lors de l'utilisation d'un tel appareil est de trouver une qualité de source lumineuse (LCD UV) suffisante pour réaliser des moules précis. En effet, l'une des problématiques lors de l'insolation se trouve dans le parallélisme du faisceau incident. Celui-ci doit être le plus possible collimaté et homogène afin d'obtenir une intensité d'insolation constante dans le plan, mais également sur toute l'épaisseur du film photosensible. Lorsque le moule est réalisé, les différentes méthodes pour créer la puce microfluidique sont semblables peu et ne permettent pas d'économiser beaucoup de temps ou d'argent.

3.2.1 Modèles numériques

Le choix d'utiliser une imprimante 3D munie d'un écran LCD programmable permet de concevoir numériquement en amont le modèle souhaité. Deux possibilités sont réalisables, l'une utilisant un logiciel de modélisation 3D tel que OpenSCAD, l'autre option s'appuie sur une image du modèle réalisé en dessin pixelisé.

La première option demande de créer une pièce 3D au format STL¹ (Standard Triangle Language) qui est ensuite transformée grâce au logiciel de l'imprimante (FormWare Phrozen slicer) en un format PHZ lisible par l'imprimante, qui à l'origine permet de déterminer les couches successives lors de l'impression 3D. La figure 3.1 montre un modèle 3D d'un motif d'impression de circuit microfluidique réalisé avec OpenSCAD. Un paramètre important, en utilisant cette méthode, est la durée d'insolation qui est directement liée à l'épaisseur du motif. Si le modèle est créé à l'échelle

1. format de transmission de données standard de l'industrie du prototypage rapide

3.2. MÉTHODE DE MICROFABRICATION

selon la hauteur, l'imprimante qui à l'origine est destinée à l'impression 3D, comprendra que seulement quelques couches sont nécessaires, ainsi le temps d'insolation sera très inférieur à celui requis. Il est alors possible, dans les paramètres du fichier PHZ de l'imprimante, de modifier le temps d'allumage de l'écran LCD UV par couche ou bien de forcer l'allumage en réalisant une seule couche pendant un temps déterminé. Cette méthode présente une simplicité lors de la conception des motifs et du transfert des modèles vers l'imprimante puisque toutes les étapes suivent la procédure conventionnelle.

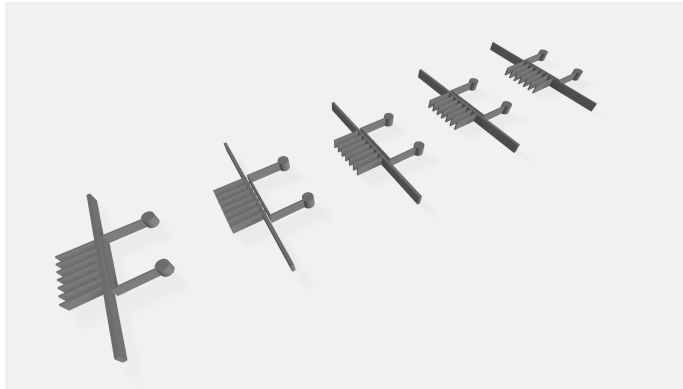


FIGURE 3.1 – Modèle 3D d'un moule pour puce microfluidique

En revanche, l'autre méthode, utilisant une modélisation 2D avec un logiciel de dessin au pixel de type Bitmap, nécessite quelques étapes plus techniques qui ne passent pas par des moyens conventionnels pour que l'imprimante lise les modèles. Ces logiciels de conception 2D tels que GIMP s'adaptent parfaitement à la configuration de l'imprimante 3D puisqu'il est possible d'intégrer les caractéristiques de l'écran LCD pour le modèle 2D (résolution en pixel, taille d'un pixel). En définissant un modèle sur fond noir avec des pixels blancs qui forment le motif, des modèles peuvent être créés avec une précision d'un pixel. Cela permet d'avoir un aperçu des détails réalisables avant l'étape d'insolation comme représenté figure 3.2.

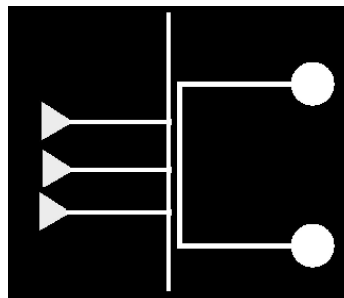


FIGURE 3.2 – Modèle 2D Bitmap pour puce microfluidique réalisé en précision pixel.

Ensuite, l'astuce consiste à utiliser les fichiers racines contenus dans la carte mémoire du micro-ordinateur (Raspberry Pi) contrôlant l'imprimante pour remplacer les modèles de base sous forme

d'images non compressées (format png). À l'aide d'un fichier texte au format gcode présent dans ce dossier, il est possible d'indiquer le nom de l'image que l'écran LCD doit utiliser comme modèle d'affichage ainsi que les temps d'insolation. Ainsi, grâce à cette méthode, il est possible de réduire l'insolation à une seule couche pendant le temps souhaité.

3.2.2 Préparation des substrats et des films photosensibles

Avant de pouvoir insoler la résine photosensible, une étape importante d'adhésion des films de résine sur un substrat est nécessaire. Pour constituer un moule robuste pouvant supporter plusieurs démoulages de PDMS, il faut que le film de résine photosensible ait une forte adhésion au substrat. Lors de l'utilisation de films de résine photosensible de type "ORDYL FP 450 dry film" d'une épaisseur de 50 μm dont la résolution donnée par le fabricant est de 25 μm , trois substrats peuvent être envisagés en raison de leur propriété d'adhésion. Le PET (Polyéthylène Téréphtalate)[81] permet de facilement découper des surfaces afin d'adapter la taille du substrat au besoin, mais il subit des effets d'usure qui le rendent peu fiable dans le temps. Un substrat en verre constitue un très bon support également, puisqu'il possède une surface très plane et régulière, souvent propre et qui subit très peu les effets du temps. Le dernier support, en cuivre, est celui qui possède la meilleure adhérence avec les films de résine, mais nécessite un nettoyage de surface maîtrisé. La résine se présente le plus souvent sous forme de rouleaux, qu'il faut conserver à l'abri de toute lumière bleue ou blanche et de préférence sous forme de grandes feuilles prédécoupées et aplanies² pour de futures utilisations.

Pour le cas du PET, le substrat doit être vendu avec au moins un côté couvert par un film protecteur afin d'éviter toutes poussières ou traces de doigts. Cette protection ne doit être retirée qu'au dernier moment pour optimiser la propreté de surface.

Pour les lames de verre, il est préférable de réaliser une étape de lavage dans un bain à ultrason avec un mélange d'Acétone et d'Ethanol. Mais cela n'est pas obligatoire si les lames présentent des surfaces très propres à l'origine.

Pour le substrat en cuivre, le plus souvent, une couche de traitement est déjà présente sur la surface ou si ce n'est pas le cas, de l'oxyde de cuivre s'y trouve. Avec un simple lavage à l'acétone, ces deux surfaces disparaissent.

Les étapes qui suivent peuvent être réalisées dans une salle noire, où seule une bande de LED rouges éclaire la zone de travail sans activer la photopolymérisation de la résine. Lorsque le support est prêt, le film photosensible doit être découpé à la taille du substrat, mais en prenant soin de retirer une faible portion par rapport aux bords. La suite des manipulations nécessite des gants pour éviter les traces de doigts. Plusieurs petites gouttes d'eau déminéralisée doivent ensuite être placées sur le substrat afin de garantir une adhésion sans bulles d'air. Il faut alors retirer une seule face de l'écran de protection³ du film de résine. Une technique efficace consiste à utiliser deux bouts de ruban adhésif collés de chaque côté du film de résine. En les décollant, l'un des deux écrans de protection se décolle forcément. Il faut ensuite rapidement disposer le film de résine du côté déprotégé sur le support en prenant soin de l'appliquer progressivement d'un bord à l'autre en s'assurant que la goutte d'eau s'étale en même temps. Ensuite, le support doit passer dans une lamineuse à une vitesse et température qui dépend des données du constructeur de la résine. Pour éviter les plis, la lamination doit se faire dans le même sens que le dépôt du film sur le support. Une

2. La courbure du film due au rouleau rend la suite des étapes plus difficile.

3. Film en mylar permettant de protéger physiquement, mais aussi de bloquer une partie des rayons UV.

3.2. MÉTHODE DE MICROFABRICATION

période de repos d'environ 15 min doit être observée pour laisser le film refroidir. Ces différentes étapes sont représentées figure 3.3.

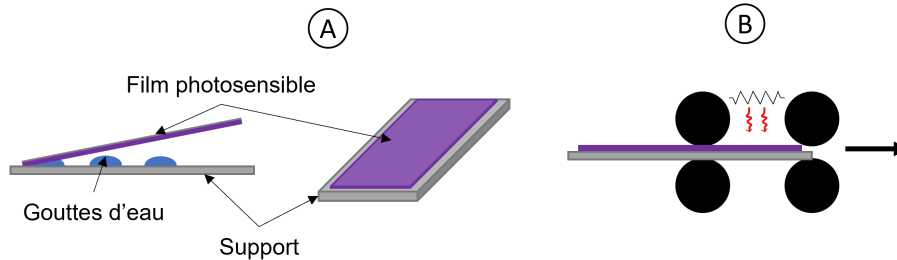


FIGURE 3.3 – A] Dépôt de film photosensible sur le support. B] Lamination à chaud du substrat.

Cette étape de préparation du film et d'application sur la surface est la plus délicate puisqu'elle est source des principaux défauts des moules en raison de plis ou bulles d'air. Quelques astuces lors de cette étape :

- Coller de petites lamelles de film de résine, éviter les très grandes surfaces qui favorisent les défauts.
- Lors de l'application sur le substrat, le premier point de contact doit toujours se faire sur une goutte d'eau.
- Pour éviter les bulles, la souplesse du film peut aider en le laissant s'incurver dans le sens d'application afin que l'eau suive la ligne de contact qui avance sur le substrat.
- Avant de réaliser la lamination, il est possible d'utiliser un petit rouleau à main pour corriger un défaut de contact du film.

Il est conseillé de stocker les supports dans un endroit à l'abri de la lumière avant la suite du processus.

Dans le cas d'une superposition d'un film de résine, quelques étapes délicates viennent s'ajouter. Comme il a été observé lors du test des différentes résines, certains films plus épais possèdent de moins bonnes résolutions, impactant considérablement le résultat. Mais il est possible de coller deux épaisseurs de film de résine de $50 \mu m$ afin d'obtenir $100 \mu m$ d'épaisseur avec une résolution de $25 \mu m$. Néanmoins, la superposition de deux épaisseurs est légèrement plus technique. Pour ajouter une deuxième couche de film photosensible, il faut reprendre à l'étape où la première épaisseur vient d'être laminée et refroidie pour 15 min. Il faut alors retirer l'écran de protection restant sur la face extérieure du film de résine. De manière similaire au premier écran de protection, un morceau de ruban adhésif facilite son décollage en le disposant sur un angle du support. Pour cette étape, si le film n'est pas plus petit que le support, il est très difficile de décoller l'écran de protection. De plus, il est conseillé de retirer cette protection d'un coup sec, car après la lamination, son décollage laisse des stries sur la surface du film de résine si cela n'est pas fait de cette manière. Ensuite, de manière similaire à la première couche, en disposant des gouttes d'eau sur la surface du film déjà collé, la deuxième couche peut être déposée sur sa face déprotégée. Le contact film-film est beaucoup moins simple à manipuler qu'avec le verre, car une fois en contact, il est presque impossible de décoller, ce qui ne laisse qu'un essai pour cette étape. Un nouveau passage à la lamineuse est ensuite nécessaire pour finaliser l'adhésion.

3.2.3 Processus d'insolation par écran LCD monochromatique programmable

Disposant du modèle 3D ou 2D du motif à reproduire ainsi que du substrat recouvert du film photosensible, il est alors possible de réaliser l'étape d'insolation. Pour cela, comme mentionné avant, une imprimante 3D arrangée pour nos besoins, est utilisée uniquement pour son écran LCD proche-UV (405 nm) programmable. Grâce au développement d'écran LCD qui atteint de hautes résolutions et l'utilisation de matrice de LED UV, le prix d'un tel ensemble a fortement diminué. L'imprimante Phrozen Shuffle 4K est vendue pour une résolution théorique de 31 μm grâce à une matrice 3×5 de LED 405 nm. La lumière émise par cette matrice de LED est ensuite collimatée afin d'obtenir des rayons lumineux parallèles⁴. Afin de sélectionner les zones illuminées, une matrice de 2160×3840 pixels (écran LCD monochromatique) commande les zones laissant passer la lumière avec une résolution de 31 μm . Munie d'une zone d'illumination de 120×170 mm relativement grande comparée aux méthodes utilisant un laser, cela permet l'impression des très grands modèles ou d'un grand nombre de motifs simultanément. Cela trouve son avantage lors du test de nouvelles géométries et ainsi permet d'imprimer une dizaine de prototypes de moules en une seule et même étape. Le temps d'insolation nécessaire pour inscrire les motifs souhaités de manière précise et optimale dépend du type de résine utilisée et de son énergie d'activation. Comme évoqué dans le chapitre 1 (section 1.1.4) à propos des résines photosensibles, certaines possèdent des gaps d'énergie d'activation qui permettent une petite marge d'incertitude sur le temps d'insolation et l'énergie déposée sur le matériau. En revanche, d'autres résines souffrent d'une grande sensibilité face à ces paramètres et peuvent provoquer un élargissement ou une non-activation des zones à polymériser si le temps ou l'énergie diffèrent des normes du constructeur.

Matrice d'illumination : La partie pratique de l'insolation nécessite de nombreuses adaptations lors de l'utilisation de résine solide. En effet, le système d'insolation de l'imprimante n'est pas aussi performant qu'il est indiqué lorsque son utilisation diffère légèrement des conditions prévues. Tout d'abord, les temps d'insolation diffèrent des valeurs préconisées par le constructeur de la résine, puisque celles-ci possèdent une énergie d'activation de 300-350 mJ/cm^2 pour une source entre 360 et 380 nm et que le système d'insolation produit de manière inhomogène, une intensité de $I_p = 1.6\text{-}2.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Avec une source à 405 nm et pour s'assurer que même les zones qui reçoivent le moins d'énergie soit polymérisées, le temps d'impression est fixé à environ 200 secondes (160 s si $I_p = 2.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$ et 220 s si $I_p = 1.6 \text{ mW}/\text{cm}^2$). De plus, la dimension des LED utilisées pour l'éclairage est relativement trop grande pour assurer une cohérence spatiale. En d'autres termes, les rayons n'arrivent pas parallèles sur le support.

Écran LCD : L'écran LCD permet de former les motifs souhaités au moyen de pixels laissant passer ou non la lumière, de la même manière que les écrans des téléviseurs fonctionnent, mais en utilisant seulement une longueur d'onde (405 nm). Néanmoins, l'écran LCD de l'imprimante 3D ne possède pas une résolution homogène à cause de la disposition des pixels comme représenté sur la figure 3.4. La résolution horizontale (i.e. l'espace entre deux pixels successifs horizontaux) semble respecter les 31 μm énoncés, mais dans la direction verticale, deux pixels successifs sont alors séparés de 42 μm . Les tests ont montré qu'en disposant les substrats, avec la face munie du film de résine au contact de l'écran LCD, des lignes droites verticales sont mieux résolues que les lignes horizontales. La figure 3.4 compare la résolution des deux directions pour des lignes de 2 pixels de largeurs. On peut alors remarquer que même la direction verticale possède des ondulations périodiques qui rendent la qualité des canaux non optimale.

4. Ici la qualité du parallélisme n'est pas parfaite.

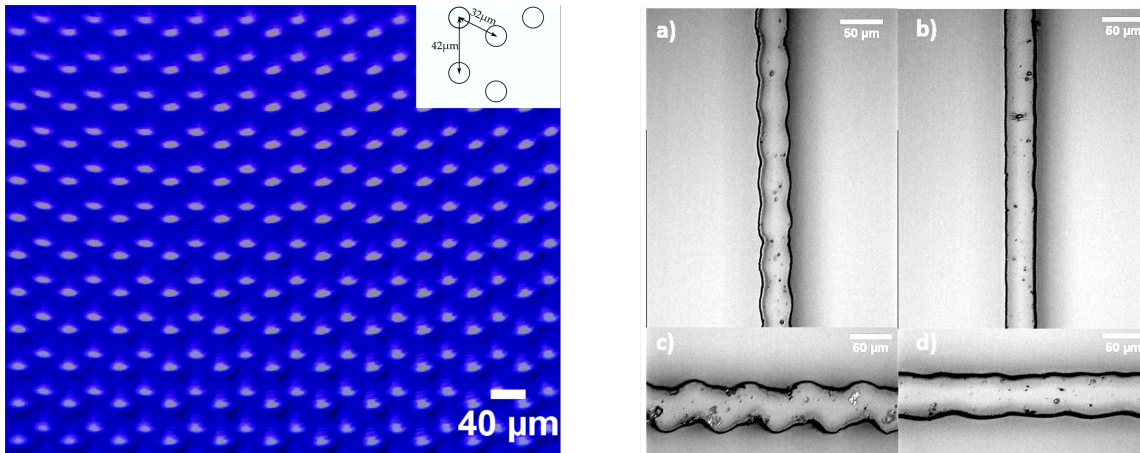


FIGURE 3.4 – À gauche, photo de la disposition des pixels de l'écran LCD. La disposition semble ressembler à celle d'un LCD RVB où le rouge et le vert ont été désactivés. À droite, comparaison entre une insolation au contact de l'écran LCD (a et c) et une insolation à $340 \mu\text{m}$ de l'écran (b et d).

Pour remédier à cela, le mauvais parallélisme des rayons lumineux ainsi que la diffraction engendrée par les pixels sont utilisés pour "gommer" cet effet en disposant la surface à insoler plus loin que le plan focal. De cette manière, l'effet d'ondulation tend à s'atténuer comme la figure 3.4 le montre. Ce résultat est obtenu en disposant simplement deux lamelles de microscope dont l'épaisseur vaut $170 \mu\text{m}$ donc $340 \mu\text{m}$ au total. En se plaçant légèrement hors du plan de focalisation, la forme des pixels à l'origine des ondulations s'atténue, voire s'efface.

En termes de procédure d'insolation, comme représenté figure 3.5, le substrat doit être posé face protégée du film de résine vers l'écran LCD avec les $340 \mu\text{m}$ de surélévation. Si le support d'insolation est un ensemble de plusieurs lames de verre, il est préférable d'allumer l'insolation avant de les déposer pour éviter qu'un motif se situe entre deux lames. Chaque motif doit être assez espacé pour permettre plus tard de séparer chaque puce. Lorsque la phase d'insolation est terminée, un temps de repos de 10 min doit être appliqué aux substrats.

3.2.4 Développement d'un moule

L'étape suivante consiste à retirer toute résine qui n'a pas subi de polymérisation et ainsi ne laisser que le motif qui constitue le moule. Le temps de développement est une phase très importante puisqu'une réaction chimique dissout la résine non insolée et laisse le motif polymérisé. Le constructeur recommande un développement avec une méthode de pulvérisation de K_2CO_3 et de rinçage à l'eau. Ici, la méthode utilisée est un bain de K_2CO_3 à 20°C , avec une concentration massique de 1%. Avec cette méthode, le temps de développement est plus long, mais permet également une meilleure précision pour arrêter la réaction. En effet, il semble que sur des matériaux comme le PET et le verre, un temps de développement trop long fini par décoller également le motif insolé. En réduisant la température du bain et en limitant l'agitation, il est plus aisé de maîtriser le temps

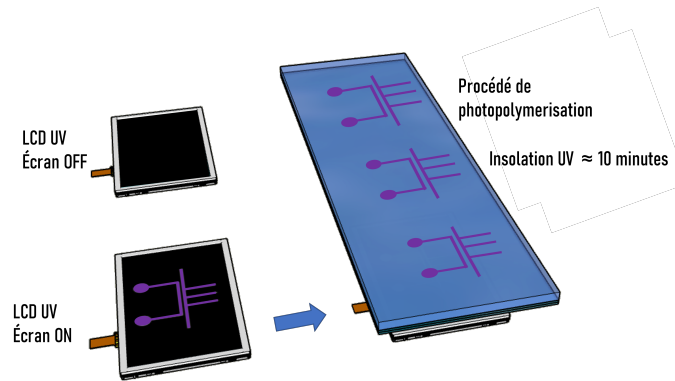


FIGURE 3.5 – Description du processus de photopolymérisation grâce à un écran LCD UV.

optimal de développement. Pour des motifs contenant des lignes à la limite de résolution ($40 \mu m$), il est difficile de les maintenir collées au substrat avant que tout soit développé. En revanche, lors de l'utilisation de substrat en cuivre, l'expérience a été réalisée de laisser un motif à développer toute une nuit, sans que celui-ci ne se décolle.

Dans les faits, la procédure consiste à plonger le substrat dans le bain de K_2CO_3 pendant 2 min, puis de retirer du substrat le film qui commence à se solubiliser, au moyen d'une pissette, puis de replonger le support si nécessaire. Pour avoir la certitude que le motif est bien développé et qu'aucune trace de résine non polymérisée subsiste, un séchage rapide avec un flux d'air et une observation sous une loupe binoculaire est très efficace. Le plus souvent, des résidus persistent au contact des motifs insolés, et cela nécessite quelques dizaines de secondes supplémentaires dans le bain. Après cette étape de développement, il est important de conserver le substrat dans un endroit à l'abri de la poussière et d'un quelconque contact extérieur, avec, par exemple, une boîte de Pétri.

3.2.5 Création d'une puce microfluidique

Disposant d'un moule positif du modèle de puce microfluidique, l'étape suivante consiste à en réaliser l'empreinte négative grâce à du PDMS (Sylgard 184 prepolymer) mélangé à un agent durcissant. En plaçant le moule dans une "piscine"⁵, le mélange PDMS/durcissant y est versé afin d'épouser les détails du motif. Lors du mélange et du versement du PDMS, des bulles d'airs se forment et dégradent la qualité du matériau. Afin de les évacuer, une cuve à vide à 10^{-3} bar est utilisée pendant quelques minutes afin de faire remonter à la surface toutes les bulles. Grâce à l'agent durcissant, le PDMS peut sécher à température ambiante, mais cela prend plusieurs jours. La vitesse d'une réaction chimique dépendant fortement de la température, il est possible de réduire le temps de séchage à 2h à $60^\circ C$. Il n'est pas possible d'aller plus haut en température en raison des propriétés thermiques du film photosensible qui tend à fondre et à déteindre sur le PDMS au-delà de $60^\circ C$.

Lorsque le PDMS est parfaitement sec et refroidi, il faut démouler le module en PDMS du moule de support avec des gants encore une fois pour éviter toute trace de doigts. C'est une étape qui

5. Nom attribué au récipient contenant le PDMS au contact du moule

peut aussi être critique, si elle ne respecte pas quelques points clefs. Tout d'abord, à l'aide d'un scalpel, les parois verticales doivent être décollées de la piscine. En ayant retiré la piscine du moule, il ne reste que le module de PDMS collé au support. Afin que l'empreinte du PDMS reste intacte, le démoulage doit se faire progressivement d'un bord à l'autre avec le moins d'à-coups possible. Si le PDMS subit trop de contraintes, il peut localement se déchirer et donc détériorer les canaux. Avec des substrats tels que le verre et le PET, il arrive que le motif en résine se décolle avec le PDMS et donc rend le moule inutilisable une nouvelle fois. Aussitôt que le module de PDMS est décollé, il est nécessaire de le protéger des poussières et autres résidus. Cela peut être fait au moyen de ruban adhésif. Ensuite, pour que l'injection de fluide dans les canaux puisse avoir lieu, un conduit doit être formé depuis la sortie des canaux vers la face extérieure. Pour cela, des *punch* à biopsie sont utilisés avec un diamètre extérieur de 0.5 mm. Cet outil a l'avantage de découper un cylindre de PDMS sans déchirer le matériau. Lorsque le PDMS est collé sur un support, il est difficile de faire des trous, il est donc important de les réaliser avant en prenant de soin de percer en commençant depuis la face à coller vers l'extérieur. Cela facilite le placement du perçage par rapport au canal et évite des résidus de perçage sur la face à coller.

Enfin, la dernière étape pour achever une puce microfluidique est de sceller les canaux formés dans le PDMS au moyen d'une lame de verre de microscope. L'adhésion est réalisée par la méthode de Plasma bonding [82] (Corona plasma treater, Elveflow) utilisant une très forte tension (10kV à 40 kV) appliquée aux deux surfaces afin de nettoyer un maximum d'impuretés organiques et de former des groupes Si-O-H aux surfaces. Lorsque les surfaces du verre et du PDMS sont traitées, leur mise en contact directement après traitement réalise un lien fort de type Si-O-Si. Pour assurer une adhésion complète, un temps de repos de 24h est recommandé.

La figure 3.6 permet de résumer toute la procédure dans l'ordre chronologique en partant de la création du moule jusqu'à l'obtention de la puce collée à une lame de verre.

3.3 Résultats et applications

Afin d'évaluer la qualité des moules produits par la méthode d'insolation par écran LCD UV, quelques réalisations de microfabrication sont comparées et caractérisées. Tout d'abord, la résolution et la forme des motifs composant le moule doivent être évaluées afin de déterminer la résolution réelle de notre méthode. Ensuite, en fonction de la résolution obtenue lors de la conception des moules, il est intéressant d'évaluer son influence sur la conception de puces microfluidiques effectuant des opérations qui demandent un équilibre des résistances hydrodynamiques dans chaque canal. En comparant les résultats d'expériences aux résultats théoriques, il est possible de conclure quant à l'influence de la résolution de la microfabrication sur la microfluidique.

3.3.1 Résolution de microfabrication et formes

Afin d'évaluer la résolution de la méthode d'insolation par écran LCD UV, des motifs simples, comportant des lignes de différentes tailles, sont caractérisées en largeur. En réalisant une ligne de largeur un pixel, cela permet de tester la limite des détails réalisable par l'écran LCD. La résolution donnée par le constructeur de l'imprimante est évaluée à $31 \mu\text{m}$ et celle de la résine à $25 \mu\text{m}$. Néanmoins, la figure 3.7 montre que la résolution minimale se situe à environ $51 \mu\text{m}$. En revanche, lorsque la largeur de la ligne augmente, la taille du pixel semble converger vers la résolution annoncée. Par exemple, la ligne de 10 pixels dont la largeur fait $340 \mu\text{m}$, équivaut à une résolution de $34 \mu\text{m}$ par pixel. Ceci peut être dû à une surexposition provenant de l'inhomogénéité

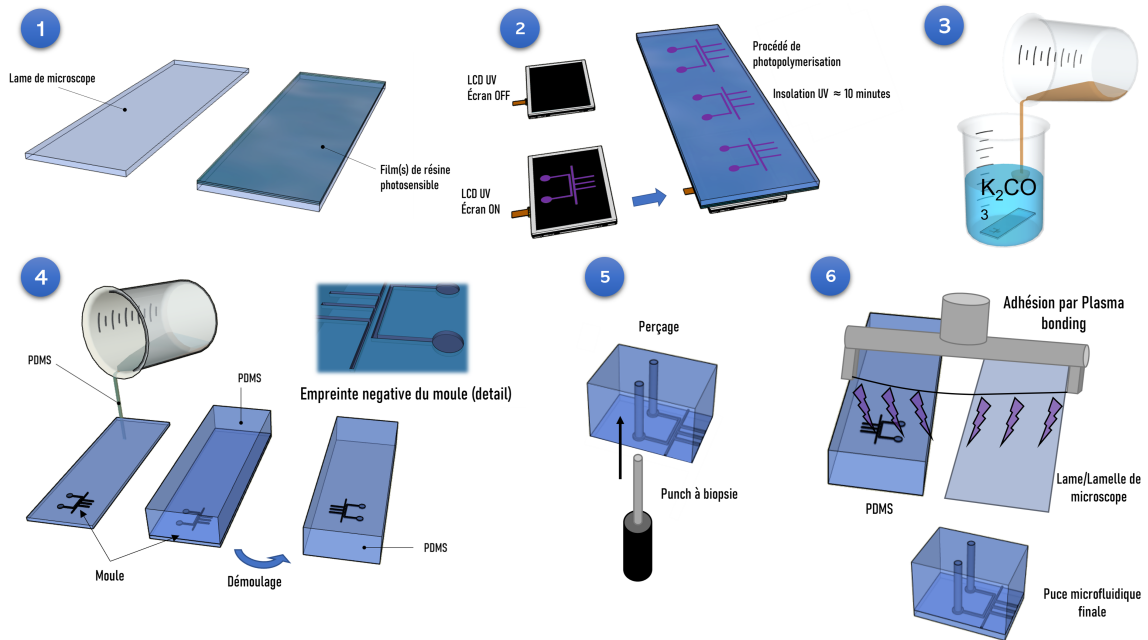


FIGURE 3.6 – Description du processus de microfabrication d’une puce microfluidique grâce à la méthode d’insolation par écran LCD UV programmable. 1] Adhésion du film photosensible par lamination. 2] Insolation des modèles 2D. 3] Développement du moule polymérisé. 4] Dépôt de PDMS liquide sur le moule et démoulage après séchage. 5] Perçage des trous pour l’arrivée des fluides. 6] Collage par traitement plasma.

de l’intensité du signal UV sur l’écran. Le temps d’exposition étant estimé pour que les zones les moins éclairées permettent tout de même la polymérisation du film, cela provoque un élargissement des motifs pour les zones de plus haute intensité. Cet effet d’élargissement est évalué à environ +50% à l’extrême sur les motifs de très faible largeur, mais n’apparaît pas sur les plus grands motifs par effet de moyennage sur la largeur. Lorsque le temps d’exposition est bien adapté à la résine, ce phénomène est très fortement réduit.

Le deuxième aspect de qualité de la microfabrication est la forme des canaux dans le plan vertical, d’autant plus lorsque deux couches de film photosensible sont utilisées. En effet, en fonction du ratio de forme (hauteur/largeur) des motifs, les parois du moule peuvent posséder des formes atypiques en fonction du type d’éclairage et du parallélisme du faisceau [83]. Afin de connaître l’aspect des canaux et ne disposant pas de mesure MEB (microscopie électronique à balayage), les premières mesures utilisent un profilomètre (Dektak). Il s’avère que ce type de mesure n’est pas capable de représenter le profil d’un canal, puisqu’à l’image de la figure 3.8, une marche à 90  dans le cas parfait, serait représentée par une rampe correspondant à l’angle de la pointe sonde.

Ce n’est qu’en observant en détail au microscope en plaçant le point de focalisation sur la partie inférieure du canal puis la partie supérieure que le motif semble élargir vers le haut. Pour s’en convaincre, une méthode très rudimentaire, mais efficace permet de connaître le profil en coupe

3.3. RÉSULTATS ET APPLICATIONS

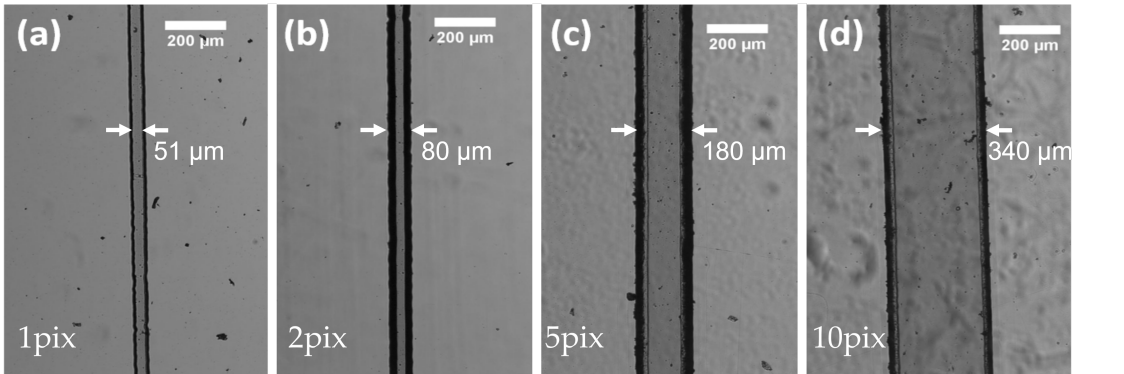


FIGURE 3.7 – Image de quatre canaux de largeurs différentes. La largeur est établie à l'étape de conception du modèle 2D en choisissant le nombre de pixels blancs sur la largeur.

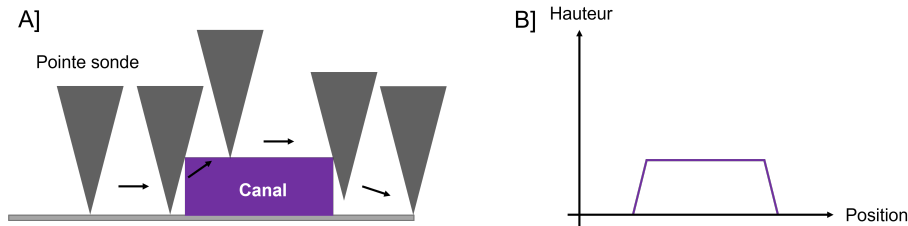


FIGURE 3.8 – Schéma représentant en A] le comportement d'une pointe sonde face à une marche à angle droit, et en B] le profil tracé par le logiciel qui enregistre la hauteur de la sonde dans le plan.

d'un canal. En insolant des canaux droits, très proches du bord d'une lame de verre ou de cuivre, il est alors possible avec un microscope comportant un objectif à longue focale, d'observer la tranche de la lame faiblement inclinée et ainsi faire l'image du profil en coupe. Grâce à cette méthode, le profil des canaux s'est avéré très différent de ce qui était estimé en première approche. En effet, comme le montre la figure 3.9d le motif semblent avoir une forme pour laquelle le sommet est plus large que la face collée au support. Cet effet peut être fortement atténué en diminuant le temps d'insolation comme l'atteste la figure 3.9 où le temps d'exposition est passé de 400 s pour D] à 150 s pour A], B], C]. Une surexposition provoque donc un effet d'étalement de la polymérisation autour du motif qui peut être dû à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, comme évoqué avant, les faisceaux ne sont pas parfaitement parallèles, ce qui provoque une différence d'énergie déposée sur toute l'épaisseur du film. Ensuite, la divergence des faisceaux et le seuil d'énergie d'activation du film peuvent induire une zone où le film ne reçoit plus assez d'énergie pour activer la photopolymérisation. Un dernier effet qui semble inévitable est celui de la diffraction qui peut rendre le profil du faisceau très différent après être passé au travers des pixels du LCD. Les conditions d'écoulements sont constantes au centre des canaux, mais changent rapidement à proximité des parois. La verticalité des canaux peut influencer le profil d'écoulement proche des parois. De plus, lors de l'intégration de dispositifs optiques au sein de la puce microfluidique, des parois inclinées

provoquent des problèmes plus importants que nous verrons dans le chapitre suivant.

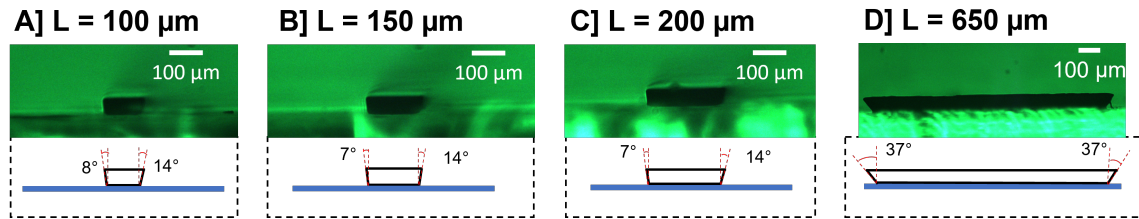


FIGURE 3.9 – Profil en coupe de canaux de différentes largeurs. A], B] et C] Hauteur de $50 \mu m$ pour des largeurs respectives de 100, 150, 200 μm . D] 100 μm de hauteur et 650 μm de largeur. Des schémas des contours des canaux sont représentés en dessous de chaque image avec l'angle des parois verticales.

3.3.2 Applications

Sachant que les canaux présentent deux inconvénients provenant d'une ondulation sur les bords et d'une inclinaison des parois, il est intéressant de réaliser des tests expérimentaux. Afin d'évaluer l'influence de la géométrie des canaux sur la fidélité de l'expérience du point de vue de la résistance hydrodynamique, un modèle de puce microfluidique de type gradient de concentration est utilisé.

Cette puce dont le moule est présenté figure 3.10(a) possède deux caractéristiques principales :

- Une géométrie en T permettant de joindre deux fluides avec un ratio équivalent.
- Une portion de canal en serpentin pour permettre au flux laminaire de se mélanger par diffusion et d'être homogène.

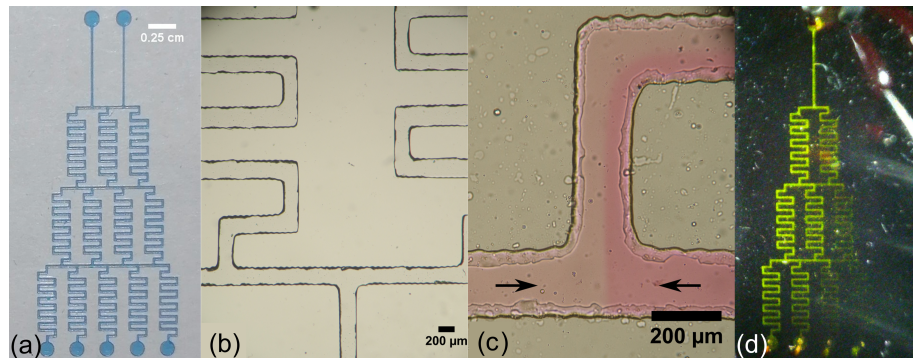


FIGURE 3.10 – (a) Moule du motif de gradient de concentration. (b) Géométrie d'un étage de mélange. (c) Front de mélange par diffusion de deux concentrations en flux laminaire. (d) Photo du mélange d'eau et de rhodamine 6G fortement concentrée, le canal contenant seulement de l'eau ne se voit pas.

De façon successive, les fluides rencontrent les deux géométries afin d'effectuer une étape de

3.3. RÉSULTATS ET APPLICATIONS

séparation puis de mélange. En effet, en injectant d'un côté de l'eau et de l'autre une solution fortement fluorescente, il est possible d'équilibrer les flux afin que les deux solutions se mélangent à 50% au premier étage, sur la branche centrale. Ensuite, grâce à la géométrie à plusieurs étages, le mélange homogénéisé est de nouveau séparé puis mélangé avec les solutions mères pour réeffectuer une dilution. La difficulté dans ce genre d'expérience est de conserver un ratio de mélange de 50% à chaque jonction en T. Le premier étage se fait facilement puisque la pression est réglable individuellement sur chaque voie. Dans une version théorique parfaite, chaque voie possède exactement la même résistance hydrodynamique et donc les deux solutions possèdent un taux d'occupation du canal de 50% à leur rencontre. Néanmoins, comme le montre la figure 3.10(c), les défauts présents dans les canaux augmentent la résistance hydrodynamique et peuvent influencer le ratio de mélange. Afin de quantifier cette incertitude sur la qualité des canaux, il est possible de mesurer le signal de fluorescence à la sortie de chaque voie de la puce afin d'en déduire la concentration pour chacune d'elles et de les comparer aux attentes théoriques.

La figure 3.10(d) montre l'expérience qui a servi à mesurer les différentes concentrations de Rhodamine 6G dans de l'eau après trois étages de mélanges. La concentration n'étant pas accessible directement grâce à l'imagerie, il est nécessaire de passer par la loi d'absorbance d'une solution de fluorophore afin de convertir la luminance en une concentration [60]. La loi en question est celle de Beer-Lambert :

$$L = L_0 e^{-\kappa x} \quad (3.3.1)$$

Avec L la luminance, L_0 la luminance de la solution mère de fluorophores, $\kappa = N\sigma$ le coefficient d'absorption en faisant apparaître le nombre de N de particules fluorescentes par unité de volume et σ la section efficace du fluorophore. Pour l'expérience, c'est de la rhodamine 6G qui est utilisée afin de mesurer l'absorbance. Sur la figure 3.11 est tracée la comparaison des mesures de l'absorbance expérimentale et celle théorique. On peut voir que les résultats expérimentaux sont proches de ceux prévus par la théorie. Cela indique que les défauts induits par la méthode d'insolation par écran LCD UV ne présentent pas de limites importantes pour des expériences dépendantes de la résistance hydrodynamique.

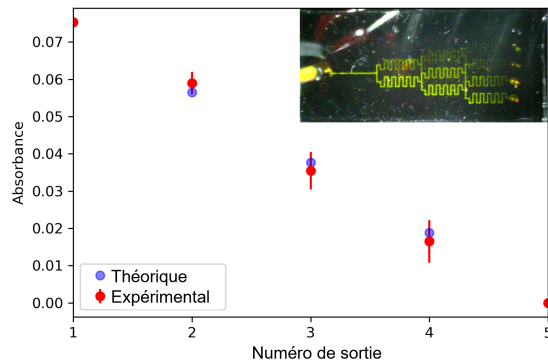


FIGURE 3.11 – Graphique représentant l'absorbance mesurée et théorique en fonction de la sortie de la puce.

Une autre manière de traiter le problème est d'utiliser l'analogie d'un circuit électrique pour

représenter le problème hydrodynamique. Suivant le modèle proposé par Wang et al. [84], les résistances symbolise la résistance au passage du fluide, le débit est assimilé au courant dans les branches et la tension représente la pression. Le modèle équivalent en circuit électrique est représenté figure 3.12. Ce modèle permet d'estimer les conséquences d'un déséquilibre de résistance dans une des branches sur les sorties finales. En réalisant un grand nombre de fois (≈ 1000) de manière aléatoire un déséquilibre (singularité) de résistance dans une branche, la simulation permet de déterminer l'influence que ces défauts ont sur les sorties.

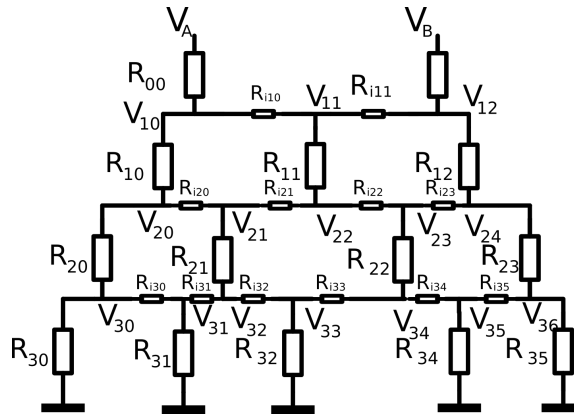


FIGURE 3.12 – Analogie électrique de la puce de type gradient de concentration.

De manière générale, quant à la méthode de conception de puces microfluidiques et sa précision en vue d'utilisations expérimentales, les objectifs sont remplis. En quelques heures, il est possible de développer un nouveau modèle de puce et de tester le prototype. Le tout pour un investissement réduit à hauteur de 1000 Euros. À noter également, qu'un nouveau modèle d'imprimante 3D "8k" (Phrozen - Sonic Mini 8K) a été développé avec une version très épurée qui réduit son coût (environ 650 € en octobre 2022). Celle-ci est vendue pour une résolution de pixel à $22 \mu m$ et un meilleur parallélisme de la source d'éclairage que le modèle précédent. Grâce à cela, l'effet d'ondulation sur les bords est corrigé et l'effet d'inclinaison des parois est atténué.

Chapitre 4

Suivi individuel de particules en solution grâce à la microscopie non-linéaire

Grâce au chapitre 1, dans la section 1.3 traitant de la microscopie non-linéaire, on sait que ces méthodes d'imagerie peuvent atteindre des résolutions sub-micrométriques et possèdent un fonctionnement non-destructif pour les échantillons biologiques. De plus, certains échantillons ne sont sensibles qu'aux effets de SHG ce qui rend indispensable l'utilisation de la microscopie non-linéaire. La problématique que soulève ce chapitre se situe dans l'utilisation de méthodes de caractérisation dynamiques de particules/agrégats en suspension dans des fluides grâce à la microscopie non-linéaire. En effet, la microscopie non-linéaire utilise la plupart du temps un système de balayage d'un faisceau laser pour exciter une large zone qui rend difficile l'étude de phénomènes dynamiques rapides. Afin de répondre à ce problème, ce chapitre présente tout d'abord les aspects de la microscopie non-linéaire qui rendent difficile l'observation de phénomènes en vitesse réelle, mais également les avantages apportés par les capacités intrinsèques de la technique. Ensuite, une deuxième partie détaille toutes les optimisations matérielles et techniques réalisées afin de tendre vers des cadences vidéo et des temps longs d'observation des phénomènes. Le troisième point de ce chapitre est consacré à une étude détaillée des outils de capture et de traitements d'images utilisés afin de reconstituer et d'analyser les trajectoires des particules en solution. La dernière partie présente les résultats obtenus lors de l'estimation en taille de particules nanométriques grâce à l'analyse de leur mouvement brownien sur une série d'images.

4.1 La microscopie non-linéaire pour des études dynamiques

La plupart des expériences qui étudient des phénomènes qui varient dans le temps à l'échelle de la seconde, utilisent des techniques de microscopie permettant d'acquérir un grand nombre d'images par seconde pour suivre l'évolution de manière précise. Ces techniques de microscopie sont nombreuses et utilisées depuis de nombreuses années [85]. Leur avantage réside dans leur capacité à utiliser des caméras à grand champ et à haute cadence. La microscopie non-linéaire, lorsqu'elle doit imager de grandes surfaces, nécessite quant à elle un temps beaucoup plus long

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

que la microscopie linéaire. En écho au premier chapitre (section 1.3), ceci est dû à l'intensité d'excitation nécessaire pour générer les effets non-linéaires, ce qui contraint à exciter des zones très confinées de manière successive. Le constat de base pour comprendre la problématique de la microscopie non-linéaire est qu'une image est formée de n pixels représentant une zone où le laser s'est arrêté n fois quelques microsecondes. Une image haute résolution nécessite alors un temps plus long en comparaison à des images similaires en microscopie linéaire. Par exemple, une caméra CMOS destinée à réaliser des images de fluorescence peut aisément faire jusqu'à 80 images par seconde pour une résolution de 1200×1200 pixels alors que la même résolution en microscopie linéaire et un temps de pose de $5 \mu s$ par pixel demande 7 secondes pour construire une seule image. Dans ces conditions, il est difficile d'imaginer suivre des phénomènes dynamiques qui évoluent plus rapidement que la cadence d'images. Néanmoins, de nombreuses expériences utilisent tout de même la microscopie non-linéaire pour étudier des phénomènes qui évoluent dans le temps, mais à des vitesses assez faibles pour qu'une image puisse être prise sans changements notables pendant le balayage du faisceau laser.

Parmi les multiples méthodes détaillées dans le chapitre 1 (section 1.2) afin d'estimer le coefficient de diffusion de particules ou molécules dans une solution, la technique de suivi individuel (SPT) connaît beaucoup de succès dans les expériences biologiques. Mais l'utilisation de cette méthode en microscopie non-linéaire est au premier abord contre-intuitif. Le but est d'enregistrer les positions successives d'une particule en diffusion libre afin de relier son déplacement carré moyen à son coefficient de diffusion. Mais en raison du temps nécessaire pour réaliser une image en microscopie non-linéaire, un problème se pose pour suivre le mouvement d'une particule qui potentiellement se déplace pendant que l'image se construit. Une manière originale de comprendre cela, est d'imaginer le jeu "un, deux, trois, soleil" dans lequel un observateur doit tourner le dos à plusieurs personnes disposées à une certaine distance. Ces personnes doivent rejoindre l'observateur sans être vues en mouvement lorsque celui-ci se retourne. En se tournant, l'observateur ne peut que constater la position des personnes et ainsi estimer une trajectoire rectiligne entre ces deux points. Mais les personnes ont peut-être emprunté une trajectoire très différente d'une ligne droite entre ces deux positions sans que l'observateur ne puisse le savoir. En reprenant l'exemple des particules en diffusion dans un liquide et grâce à la figure 4.1, on comprend que la cadence d'acquisition des positions est primordiale pour effectuer une estimation fiable des trajectoires¹.

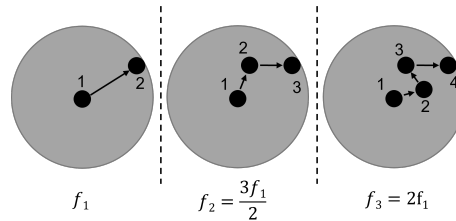


FIGURE 4.1 – Schéma d'une trajectoire de particule enregistrée à différentes fréquences d'acquisition.

Afin de surmonter ces problèmes, plusieurs aspects de l'expérience peuvent être optimisés spécifiquement pour le suivi en temps réel de particules. Néanmoins, outre les difficultés engendrées par la microscopie non-linéaire, d'autres aspects apportent un intérêt par rapport à la microscopie linéaire.

1. Théoriquement, la cadence peut être augmentée jusqu'à observer le régime balistique.

4.2. OPTIMISATION DES MÉTHODES PRATIQUES ET TECHNIQUES POUR UNE ÉTUDE DYNAMIQUE

Notamment, lorsque les particules/échantillons sont sensibles aux effets de phototoxicité, la longueur d'onde d'excitation de la microscopie non-linéaire ($\lambda > 750nm$) permet d'atténuer la nocivité de l'expérience. Le confinement spatial apporté par la microscopie non-linéaire permet aussi de préserver les particules hors volume focal des effets de photoblanchiment ou de phototoxicité qui pourraient engendrer des biais dans l'expérience. Toujours grâce à ce confinement spatial, la reconstitution 3D d'un volume est également possible, même lors d'études de phénomènes évoluant dans le temps.

4.2 Optimisation des méthodes pratiques et techniques pour une étude dynamique

Le microscope ainsi que le système d'acquisition d'images sont à l'origine optimisés pour imager des réponses en SHG afin de caractériser des échantillons statiques en fonction de la polarisation [86]. Pour que le microscope soit adapté au suivi en direct de nano-particules, plusieurs équipements de l'expérience ont été adaptés. De même, le balayage du faisceau laser commandé par un programme LabVIEW a dû être réécrit afin de supprimer les temps morts et optimiser le trajet du faisceau laser qui n'avait que peu d'influence pour les expériences passées. Le dernier point technique qu'il est nécessaire d'aborder lors d'étude de phénomènes dynamiques est la part d'information qu'apporte une meilleure résolution spatiale comparée à une meilleure résolution temporelle. Autrement dit, en fonction du phénomène étudié et des outils d'analyse, il faut établir en termes d'information, si la résolution temporelle est prépondérante par rapport à la résolution spatiale. Ce problème est central dans cette étude, car en microscopie non-linéaire, ces deux résolutions (temporelle et spatiale) sont liées en raison du balayage du laser.

4.2.1 Optimisation du balayage des miroirs de scan

La construction d'une image complète se fait par excitation d'une zone par le faisceau laser puis collection de la réponse de l'échantillon grâce à un photomultiplicateur. Cette étape est répétée autant de fois qu'il y a de pixels dans l'image. Grâce au logiciel LabVIEW, l'image est reconstruite a posteriori. Néanmoins, ce processus prend un certain temps qui dépend du chemin que doit emprunter le laser pour balayer la totalité de la zone souhaitée. La figure 4.2 illustre les différentes manières de balayer l'échantillon avec le laser. La configuration A] montre le chemin le plus simple à programmer, mais qui ne présente pas beaucoup d'intérêt puisqu'il possède des temps morts importants à chaque retour à la ligne. La première optimisation en B] est effectuée sur le retour à la ligne qui se fait sur la même colonne que le dernier pixel de la ligne précédente. Cela permet de ne pas perdre de temps pour revenir à la première colonne, mais laisse tout de même un temps mort non contrôlé pour revenir au point de départ. La configuration C] permet de revenir du dernier pixel de l'image au premier pixel de l'image suivante avec un temps contrôlé, ce qui n'est pas le cas pour la version précédente. Un temps mort qui n'est pas défini précisément, pose un problème lors de la détermination des laps de temps qui séparent deux positions de particule. La version D] permet de réaliser le balayage de l'image suivante en parcourant le chemin inverse de l'image précédente. Cela supprime totalement les temps morts entre deux images, mais peut poser des problèmes de traitements des données. Lorsqu'une particule se situe proche du bord supérieur ou inférieur de l'image, alors le temps entre deux positions n'est pas le même entre chaque image puisque le balayage change de sens. La configuration C] est celle sélectionnée pour l'enregistrement

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

des images pour le suivi de particules en diffusion, car elle présente très peu de temps morts ainsi que la meilleure cohérence avec la méthode d'estimation du coefficient de diffusion.

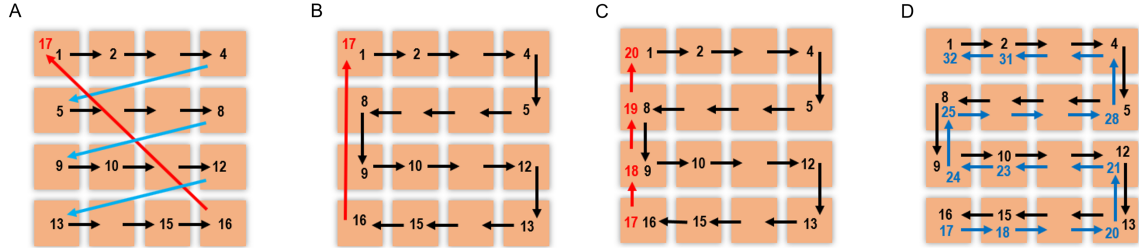


FIGURE 4.2 – Schéma des différents chemins de balayage laser pour réaliser l'image d'une zone. A] Balayage avec retour à la première colonne à chaque nouvelle ligne. B] et C] Balayage de la ligne suivante en sens inverse et pour C] le temps de retour pour l'image suivant est maîtrisé et connu. D] Balayage de la ligne suivante en sens inverse et l'image suivante est balayée dans le sens inverse également.

4.2.2 Optimisation de l'enregistrement des données en temps réel

En ayant optimisé la durée du balayage du laser permettant de réaliser une image, il est également nécessaire de s'intéresser au temps mort entre deux images. Une partie du temps mort est déjà connue grâce à la méthode de la figure 4.2C qui permet un retour au pixel de départ par un chemin calibré. Néanmoins, il est commun d'observer en direct les expériences que l'on effectue afin d'évaluer son bon déroulement avant même d'utiliser un outil d'analyse quelconque. Pour cette raison, initialement, chaque image était enregistrée et affichée après chaque balayage du laser. Cette action entre chaque image prend du temps, qui en plus de ralentir la cadence, n'est pas constante en termes de durée tout au long de la collection d'image (on parlera aussi du *stack* d'image). En effet, plus la pile d'image est grande, plus le temps pour enregistrer et afficher l'image s'allonge². Cela pose un problème majeur lors du traitement des données puisque le Δt entre deux positions d'une particule n'est pas fiable. Pour s'affranchir de ce problème, un nouveau modèle d'acquisition a été développé où les x balayages sont réalisés avant d'engager l'étape d'enregistrement. Autrement dit, les miroirs de scan et le laser opèrent en continu afin de balayer les x images souhaitées et ce n'est qu'au terme des x scans complets que les images sont enregistrées comme le présente la figure 4.3. Toutes les images sont dissociées en connaissant leur taille en pixels et en prenant soin de supprimer les n pixels provenant du retour au départ du laser.

Dans les faits, l'utilisation de cette méthode de scan rapide doit souvent être précédée d'un balayage permettant de visualiser la zone d'étude avant de lancer l'acquisition des images. L'avantage de cette méthode est de supprimer toutes les étapes possédant une incertitude temporelle élevée par rapport au temps d'un scan. Le seul temps mort est alors limité à la durée du retour au point de départ pour le scan suivant, qui représente une seule colonne prenant un temps $\Delta t_{retour} = n_{pix} \cdot t_{dwell}$ où n_{pix} est la dimension de l'image en pixels et t_{dwell} le temps de pose sur chaque pixel.

2. Peut être dû au programme labVIEW non optimisé pour encoder/enregistrer les images.

4.2. OPTIMISATION DES MÉTHODES PRATIQUES ET TECHNIQUES POUR UNE ÉTUDE DYNAMIQUE

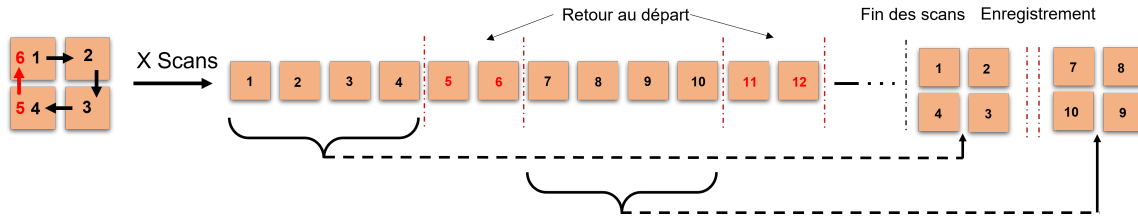


FIGURE 4.3 – Schéma simplifié de la méthode de scan en continu des x images puis classement des pixels appartenant à chaque image.

De manière générale, une image prend alors un temps connu dépendant du nombre de pixel et du temps de pose sur chaque pixel :

$$\Delta t = n_{pix}^2 t_{dwell} + n_{pix} t_{dwell} \quad [s] \quad (4.2.1)$$

On remarque que le temps mort servant à retourner au point de départ est rapidement négligeable comparé au temps total pour faire une image dont le nombre de pixels est supérieur à 100 ($\Delta t \gg \Delta t_{retour}$). Grâce à ces optimisations extérieures à l'image elle-même, les temps sont maîtrisés et connus pour la suite de l'étude.

Jusqu'ici, le contexte évoqué est celui d'études voulant imager des phénomènes dynamiques rapides comparés à la cadence d'acquisition du microscope. Pour la suite, c'est le cas particulier du suivi de particules en diffusion dans un liquide qui est étudié, car il représente un outil d'analyse fortement répandu, mais également un défi technique pour la microscopie non-linéaire.

4.2.3 Choix de l'objectif du microscope

Habituellement, la microscopie non-linéaire utilise des objectifs avec de grandes ouvertures numériques afin de garantir de très bonnes résolutions latérales ($w_{x,y}$) et axiales (w_z). Néanmoins, dans le cas du suivi de nano-particules en solution, le nombre de positions successives dans une trajectoire est un paramètre très important d'un point de vue statistique. L'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique perd alors de sa valeur, car la dimension axiale (w_z) du volume d'excitation ne permet pas d'étudier le mouvement brownien d'une particule pendant une durée statistiquement suffisante comme le montre la figure 4.4. Le but est de trouver un compromis entre une ouverture numérique d'objectif qui permet d'agrandir le volume d'excitation et une focalisation suffisante pour générer des effets non-linéaires.

Il est difficile de prévoir de manière purement théorique l'ouverture numérique adaptée, mais il est possible de manière empirique d'estimer quel objectif semble converger vers une amélioration de la longueur des trajectoires. Une première estimation théorique peut orienter le choix de l'ouverture numérique de l'objectif en trouvant un compromis en se basant sur la taille verticale du volume d'excitation et la distance moyenne d'éloignement d'une particule en un temps donné. Ce problème est en réalité multifactoriel, car le nombre de points accessibles dans une trajectoire dépend également de la cadence d'acquisition et des paramètres de diffusion de la particule (taille, viscosité du fluide et température). Afin de regrouper ces différents paramètres, on peut exprimer un temps de résidence de la particule dans le volume focal en s'appuyant sur l'expression du déplacement quadratique moyen (eq :1.2.9) :

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION
GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

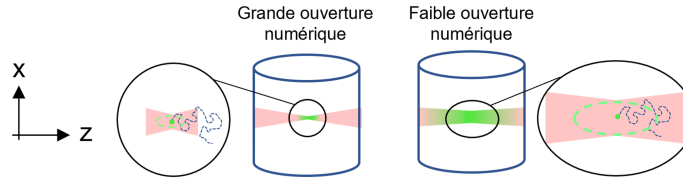


FIGURE 4.4 – Schéma comparant une particule en diffusion dans le volume d'excitation généré par un objectif à faible et à grande ouverture numérique. Seul l'axe Z est limitant, car les deux autres sont balayés par le laser.

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 2dDt \quad [m^2] \quad (4.2.2)$$

Avec pour rappel, d le nombre de dimensions de diffusion, D le coefficient de diffusion et t le temps de diffusion. L'idée ici est de représenter $\langle \Delta x^2 \rangle$ par w_z^2 , pour accéder au temps de résidence moyen d'une particule dans le volume d'excitation. Autrement dit, dans le cas où une particule se situe au centre du volume d'excitation, cela nous permet de connaître le temps moyen de résidence avant qu'elle ne s'en échappe en parcourant une distance w_z par diffusion :

$$t_r = \frac{w_z^2}{2dD} \quad [s] \quad (4.2.3)$$

Pour la suite de l'étude, l'objectif choisi est un X20 possédant une ouverture numérique de $ON=0.75$ (UPLSAPO20X, Olympus). Pour se rendre compte de l'évolution de la taille axiale du volume d'excitation, la figure 4.5 représente w_z en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif.

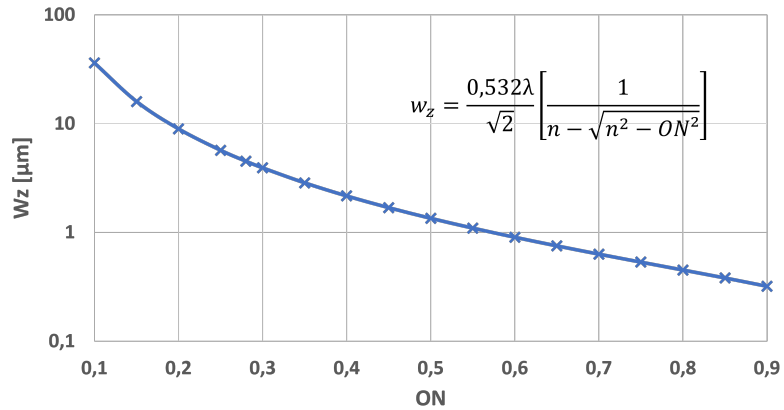


FIGURE 4.5 – Courbe semi-log de l'évolution de la résolution axiale d'un objectif en fonction de son ouverture numérique. Les calculs sont effectués pour une longueur d'onde de collection de 479 nm en suivant l'équation 1.3.21 (rappelée sur le graphe)

En raison de la dépendance de w_z avec l'ouverture numérique, le passage de celle-ci de 0.9 à 0.7 n'est que peu efficace pour obtenir une augmentation significative du volume d'excitation permettant

4.2. OPTIMISATION DES MÉTHODES PRATIQUES ET TECHNIQUES POUR UNE ÉTUDE DYNAMIQUE

un suivi plus long des particules. Sans changer d'objectif, l'ouverture numérique effective peut être modifiée en remplissant partiellement la pupille d'entrée de l'objectif comme nous le verrons dans la partie suivante.

4.2.4 Cadence d'acquisition et résolution des images

Il a déjà été mentionné à plusieurs reprises que la cadence d'acquisition des images est dépendante du nombre de pixels que le laser doit balayer. Pour suivre la trajectoire d'une particule, il est très important d'établir la cadence d'acquisition optimale permettant de décrire le plus précisément ses mouvements.

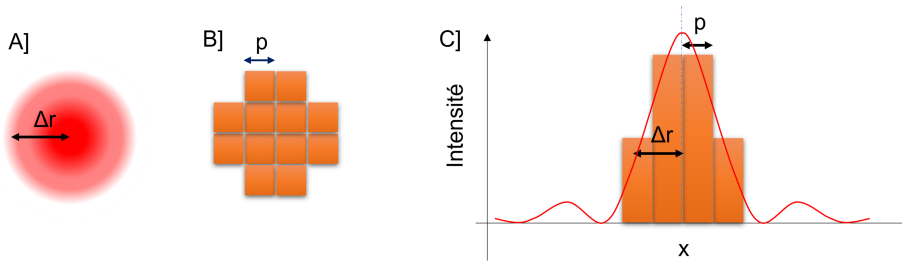


FIGURE 4.6 – A] Représentation simplifiée de la PSF d'un microscope. B] La PSF échantillonnée selon le critère de Nyquist-Shannon. C] Profil d'intensité de la PSF en rouge et son échantillonnage en orange.

Pour répondre à cette problématique, il faut s'intéresser au nombre minimum de pixels nécessaire pour décrire spatialement une particule. Le critère de résolution en pixels de l'image doit également s'adapter à la vélocité de la particule qui, comme nous l'avons vu précédemment avec l'équation de Stokes-Einstein, dépend de paramètres tels que le rayon de la particule, la température et la viscosité du fluide. Afin de déterminer la limite basse de la résolution d'une image, le critère d'échantillonnage du théorème de Nyquist-Shannon [87],[88]³ constitue une base pertinente. En adaptant cela à la microscopie comme l'illustre la figure 4.6, cela signifie que le plus petit motif élémentaire pouvant être résolu doit contenir au moins deux pixels pour ne produire aucune perte d'information [89]. Soit $\Delta r = 0.61\lambda/ON$ le pouvoir de résolution latéral du microscope selon le critère de Rayleigh. Alors la taille d'un pixel p doit respecter le critère suivant :

$$p \leq \frac{\Delta r}{2} \quad (4.2.4)$$

En appliquant ce critère au microscope dont l'objectif possède une ouverture numérique $ON = 0.75$ et collecte un signal de fluorescence à 479 nm , on peut calculer le pouvoir de résolution latéral théorique du microscope :

$$\Delta r = \frac{0.61\lambda}{ON} = 0.39 \text{ } \mu\text{m} \quad (4.2.5)$$

3. La fréquence d'échantillonnage d'un signal doit être égale ou supérieure au double de la fréquence maximale du signal.

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

Néanmoins, ce pouvoir de résolution est rarement atteint en pratique car le balayage du laser dont le diamètre du faisceau est plus grand que le pixel exerce une convolution entre la PSF de collection⁴ et la PSF d'excitation. En microscopie non-linéaire, la taille de la PSF d'excitation est rarement celle prévue par la théorie en raison du faisceau de balayage qui doit être fixe à l'entrée de l'objectif, mais qui, en pratique, opère de très faibles mouvements dus à un positionnement imparfait. En revanche, la collection du signal ne subit pas la même contrainte puisque l'objectif collecte toute la lumière contenue dans son cône de collection. Mais le cas du balayage rend le processus plus complexe puisque l'objectif collecte le signal d'une zone excitée par un faisceau bien plus grand que le pixel comme l'illustre la figure 4.7. Cet effet donne lieu à une convolution entre le faisceau d'excitation et la PSF de collection.

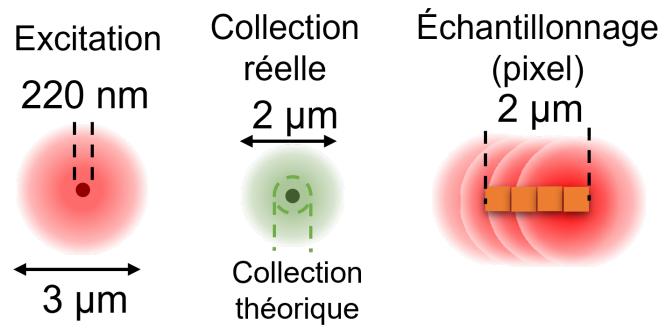


FIGURE 4.7 – Vue simpliste de l'effet d'échantillonnage d'un motif plus petit que la taille du faisceau d'excitation.

Pour déterminer le pouvoir de résolution réel du microscope, la mesure de la PSF est un bon outil pour y parvenir. Grâce à des émetteurs "ponctuels" déposés sur une lame statique [90], dans notre cas des billes fluorescentes d'un diamètre de 220 nm (Fluoresbrite® 24054, Polyscience), il est possible de mesurer le profil latéral d'intensité du signal de fluorescence. La figure 4.8 confirme que la PSF réelle est plus étendue que prévu en théorie avec un $\Delta r_{exp} = 1.05 \mu m$.

Cela revient à une ouverture numérique effective de $ON=0.28$. Grâce à Δr_{exp} , nous connaissons le plus petit élément que le microscope peut résoudre à cette longueur d'onde et avec cet objectif. Ainsi, en appliquant le critère de Nyquist-Shannon, on peut conclure qu'un pixel doit au maximum représenter $p = 0.53 \mu m$ pour ne pas perdre d'information. Maintenant que le nombre de pixels pour décrire spatialement une particule est défini, il faut s'intéresser à la taille globale de l'image qui assure le suivi d'une particule en mouvement. Afin de suivre le plus longtemps possible les déplacements d'une particule, seul une faible portion de l'image doit être attribué à sa localisation pour que les x déplacements suivants restent dans une zone périphérique autour du point initial. La taille de la zone autour de l'image (environ $50 \mu m$) est rarement limitante pour suivre une particule comparée à la taille axiale du volume d'excitation comme les valeurs le montre sur la figure 4.5. Une particule en diffusion possède une plus grande probabilité de sortir du volume d'excitation selon l'axe vertical plutôt que de quitter le plan de balayage du laser qui est souvent au moins un ordre de grandeur supérieur. Une deuxième raison d'étendre la zone de l'image est d'ordre statistique puisqu'un grand nombre de particules enregistrées simultanément permet de minimiser l'incertitude

4. En microscopie grand champ, la collection du signal atteint la résolution théorique.

4.2. OPTIMISATION DES MÉTHODES PRATIQUES ET TECHNIQUES POUR UNE ÉTUDE DYNAMIQUE

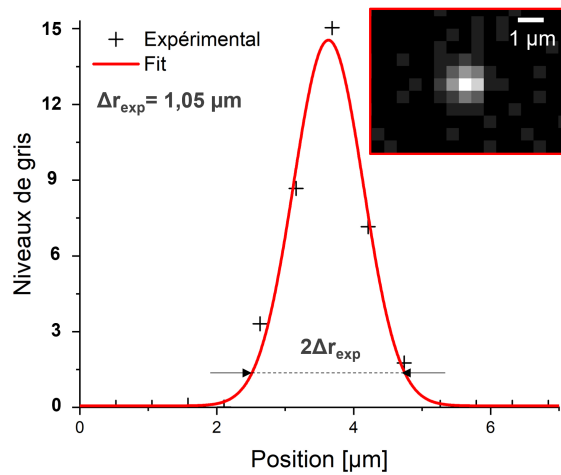


FIGURE 4.8 – Mesure expérimentale de la taille de la PSF grâce au profil d’intensité du signal de fluorescence (émission à 479 nm) d’une bille de 220 nm de diamètre.

sur les mesures.

Afin de maximiser la taille de l’image en respectant le critère de Nyquist-Shannon quant au nombre de pixels pour décrire une particule, la taille de l’image est fixée à 100x100 pixels avec un facteur de ”zoom” de 5 qui correspond à une résolution⁵ de 1.9 pixels/ μm . Cela représente 12% des pixels de l’image pour détecter chaque particule.

Pour finir, le temps de pose du laser à chaque pixel constitue un paramètre important qui influence la cadence d’acquisition et l’information contenue dans l’image. Habituellement, en imagerie, chaque pixel est codé sur un intervalle de valeurs qui permet d’apporter une information supplémentaire liée au nombre de photons reçus sur chaque élément du capteur. Dans le cas de la microscopie non-linéaire, le temps qu’utilise le laser pour exciter l’échantillon est le même que le détecteur possède pour récolter les photons. Dans le cas d’un balayage rapide comme pour le suivi de particules, le temps de pose doit être le plus court possible tout en conservant un minimum de photons permettant de décrire le profil d’intensité gaussien des émetteurs. La limite matérielle des miroirs de scan ne permet pas de réduire le temps de pose à moins de 3 μs au risque de produire des effets de traînées sur l’image. En pratique, il est difficile d’atteindre cette valeur, car le nombre de photons collecté par pixel n’excède que rarement 3, ce qui rend le signal d’une particule comparable au bruit du détecteur qui s’élève à 1 photon. Il est difficile d’établir une valeur de référence du temps de pose, car chaque microscope possède ses propres caractéristiques, en ajoutant à cela que l’intensité du signal émis par les différents types de fluorophores ou harmonophores peut être très différente. C’est pour cela qu’ici la valeur du temps de pose établie à 5 μs par pixel est purement empirique, mais permet d’atteindre des cadences vidéo (20 ips). Le prix à payer pour un temps de pose réduit est une dynamique d’image très pauvre, qui dans notre cas se réduit à une quinzaine de niveaux de gris (i.e. 15 photons maximum) sur les 255. La figure 4.9 illustre deux tailles de particules différentes en diffusion libre où l’on peut se rendre compte de l’aspect des images dans des conditions optimisées pour une cadence d’acquisition élevée.

5. Correspond à un $p_{exp} = 0.52 \mu\text{m}$ qui est parfaitement en accord avec la résolution attendue

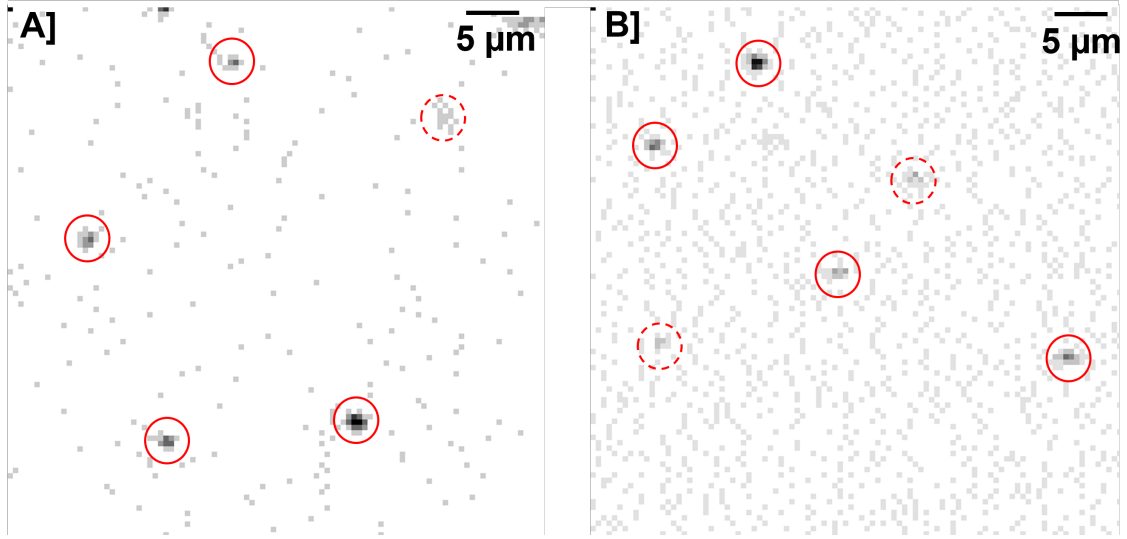


FIGURE 4.9 – Images en niveaux de gris inversés de particules fluorescentes de diamètre A] 500 nm et B] 220 nm en diffusion libre. Chaque image est réalisée grâce aux paramètres optimaux établis précédemment : Taille = 100×100 pixels, temps de pose = $5 \mu s$, résolution = $1.9 \text{ pixel}/\mu m$. Les cercles rouges représentent les particules détectées, en pointillés lorsqu’elles sont à la limite de détection.

Finalement, la cadence d’acquisition peut être déterminée avec précision en connaissant tous les paramètres d’acquisition. Soit f_{acq} la fréquence d’acquisition des images :

$$f_{acq} = \frac{1}{\Delta t} [\text{images}/s] \quad (4.2.6)$$

Où Δt est le temps pour réaliser une image carrée de n^2 pixels et revenir au point de départ comme évoqué précédemment (eq :4.2.1). Ainsi, en accord avec les paramètres choisis, la cadence d’acquisition est fixée à $f_{acq} = 19.8$ images par seconde et s’approche fortement des cadences vidéo qu’il est possible de rencontrer en microscopie grand champ utilisant des caméras. Maintenant que la cadence est connue, il est important de revenir au temps moyen de résidence des particules dans le volume d’excitation. Grâce à cela, le nombre moyen de positions dans chaque trajectoire peut être estimé et permet d’évaluer la précision statistique des mesures. Lorsque les données expérimentales accessibles sont limitées comme ici par la sortie du volume d’excitation de la particule, une erreur d’échantillonnage apparaît. Dans le cas de l’estimateur de covariance du coefficient de diffusion (équation 4.3.5), l’erreur d’échantillonnage évolue en $1/\sqrt{N}$ en fonction du nombre de points N [91]. Ci-dessous, le tableau (4.1) regroupe les valeurs du temps de résidence t_r (équation 4.2.3) pour plusieurs tailles de particules ainsi que l’erreur d’échantillonnage associée. Ces valeurs sont calculées spécifiquement pour l’expérience décrite précédemment, c’est-à-dire un objectif d’ouverture numérique effective $ON_{eff} = 0.28$ qui induit une taille axiale $w_z = 4.5 \mu m$.

On remarque que l’erreur d’échantillonnage devient importante lorsque le nombre de positions est faible pour une estimation statistique. Agrandir le volume d’excitation n’est pas envisageable

4.3. LES OUTILS D'ANALYSE D'IMAGES ET ESTIMATEURS DE COEFFICIENT DE DIFFUSION

Rayon [μm]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t_r [s]	N positions	$1/\sqrt{N}$
500	0.42	7.91	157	8%
400	0.53	6.33	125	8.9%
300	0.71	4.74	94	10.3%
250	0.85	3.95	78	11.3%
200	1.1	3.16	63	12.6%
110	1.9	1.74	34	17%
50	4.3	0.79	16	25.3%

TABLE 4.1 – Tableau regroupant les coefficients de diffusion D, les temps de résidence t_r et le nombre de positions N pour une cadence de 19.8 images/s, associé à son erreur d'échantillonnage relative $1/\sqrt{N}$ pour des particules de tailles différentes. Ces valeurs permettent d'estimer combien de temps en moyenne une particule de taille r est supposée rester dans le volume d'excitation de taille w_z .

de manière indéfinie et rend le suivi d'une seule particule peu fiable pour estimer son coefficient de diffusion. Dans ce cas, l'hypothèse ergodique permet de compenser le manque de points dans une trajectoire par un grand nombre de trajectoires. Une manière d'interpréter cette hypothèse est de considérer une forêt composée d'une seule espèce d'arbre dont on veut étudier la croissance dans le temps. L'hypothèse ergodique stipule que l'étude d'un seul arbre pendant un temps très long est équivalente à l'étude d'un grand nombre d'arbres de cette forêt à un instant donné. De manière générale, lorsque c'est possible, l'estimation du coefficient de diffusion doit être réalisée sur de nombreuses trajectoires, car individuellement, chacune d'elles ne possède pas assez de points pour constituer un échantillon statistique suffisant.

Afin de conclure sur cette partie qui permet d'établir les paramètres expérimentaux, on peut constater que ceux-ci sont rarement optimaux, mais relèvent davantage d'une optimisation entre vitesse d'acquisition et résolution des images menant à un compromis pertinent afin d'estimer des coefficients de diffusion. Il faut également rappeler que les paramètres d'acquisitions choisis sont adaptés à l'intensité du signal reçu et à la taille des particules. Pour des tailles d'émetteurs relativement différentes, certains paramètres d'acquisitions peuvent être modifiés pour s'adapter à la vitesse des déplacements. La suite de ce chapitre s'intéresse aux outils utilisés afin d'analyser les stacks d'images produits pour suivre les trajectoires de particules afin d'en extraire les données utiles à l'estimation des coefficients de diffusion.

4.3 Les outils d'analyse d'images et estimateurs de coefficient de diffusion

Cette section détaille les outils numériques permettant dans un premier temps d'extraire l'information présente dans un stack d'images de particules en diffusion libre, puis dans un deuxième temps de calculer de manière optimale le coefficient de diffusion. Le premier point consiste à prendre en main un algorithme permettant de convertir l'information sous forme de pixels dans un stack d'images en une multitude de trajectoires. Pour cette étape, le choix d'utiliser un algorithme reconnu et validé s'est imposé en raison du travail que demande l'élaboration d'un tel outil. La suite du processus utilise les données générées par l'algorithme afin de les mettre en forme pour que

l'estimateur de covariance fonctionne de manière optimale pour des images réalisées en microscopie non-linéaire. En effet, ces modèles d'estimateurs sont développés pour de l'imagerie utilisant des caméras à grand champ pour lesquelles les cadences d'acquisition sont élevées et les dynamiques d'image plus optimisées.

4.3.1 Logiciel de traitement des images

Le choix du software/algorithmme permettant d'analyser les images s'est aisément orienté vers le plugin *TrackMate* du logiciel *Fiji*. Ce plugin développé et maintenu à jour par Jean-Yves Tivnez[92] est largement utilisé dans la communauté scientifique, notamment grâce à son utilisation intuitive et gratuite. Cette partie détaille la procédure suivie lors de l'analyse du mouvement brownien de particules en expliquant les différents choix des paramètres de l'algorithmme. Avant de détailler chaque étape, une vue générale de la procédure (représentée figure 4.10) permet de comprendre la procédure dans son ensemble. La première étape de la procédure consiste à détecter les contours des particules souvent appelées "blobs" dans la littérature. De nombreuses méthodes existent afin de faire ressortir des motifs spécifiques dans une image en appliquant des filtres spatiaux ou fréquentiels[93][94]. Néanmoins, l'algorithmme utilisant le Laplacien d'une gaussienne (LoG) est très répandu lors de la détection de blobs sur une image bruitée.

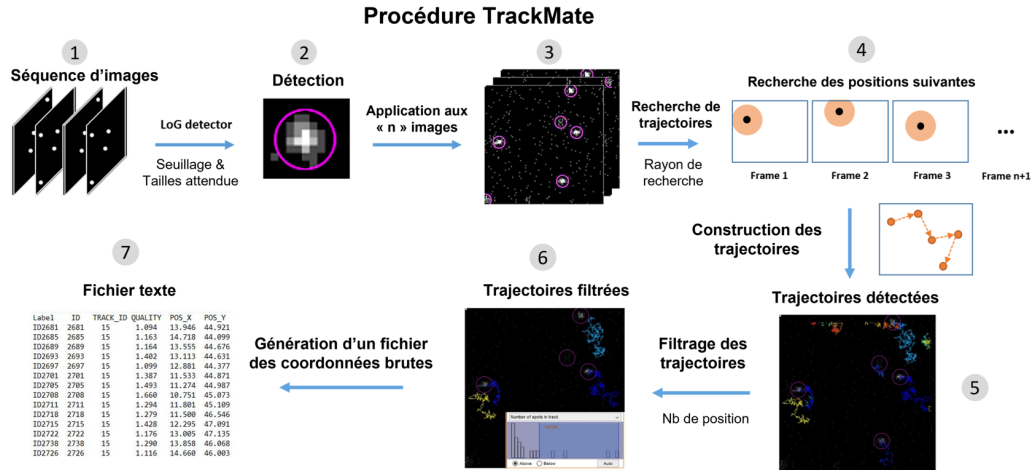


FIGURE 4.10 – Schéma simplifié de la procédure de construction des trajectoires des particules.

Détecteur LoG

Tout d'abord, l'application d'un filtre gaussien (passe-bas) sur une image a pour effet d'atténuer la sensibilité de l'opérateur Laplacien (passe-haut) face au bruit, cela équivaut finalement à réaliser un filtre passe-bande. Ce choix de traiter le bruit grâce à un filtre gaussien se justifie grâce au principe d'Heisenberg⁶ qui est satisfait pour une fonction gaussienne puisque l'on sait que la trans-

6. Limite fondamentale sur la précision de mesure en simultané de deux propriétés d'une particule, comme la position x et sa quantité de mouvement p , $\sigma_x \sigma_p \geq \hbar/2$ où $\sigma_{x,p}$ sont les précisions de mesures et \hbar la constante de Planck réduite.

4.3. LES OUTILS D'ANALYSE D'IMAGES ET ESTIMATEURS DE COEFFICIENT DE DIFFUSION

formée de Fourier d'une gaussienne est elle-même une gaussienne [95]. Soit $G(x, y; \sigma)$ la fonction gaussienne :

$$G(x, y; \sigma) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.3.1)$$

Avec σ l'écart-type 2D en considérant $\sigma_x = \sigma_y$ et x, y les coordonnées spatiales de l'image. Afin de filtrer l'image $f(x, y)$, celle-ci doit être convoluée avec la fonction gaussien $G(x, y; \sigma)$:

$$L(x, y; \sigma) = f(x, y) * G(x, y; \sigma) \quad (4.3.2)$$

Ensuite, l'opérateur Laplacien ∇^2 peut être appliqué à l'image filtrée $L(x, y; \sigma)$:

$$\nabla^2 f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} \quad (4.3.3)$$

$$\nabla^2 L(x, y) = \frac{x^2 + y^2 - 2\sigma^2}{\pi\sigma^4} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.3.4)$$

Grâce au filtrage par l'opérateur Laplacien, les zones où l'intensité change rapidement sont mises en valeur. Ainsi, en faisant varier le paramètre σ du détecteur LoG, les motifs de type blob convergent localement vers des extrema. La figure 4.11 permet de visualiser l'effet d'un filtre LoG pour deux types d'images.

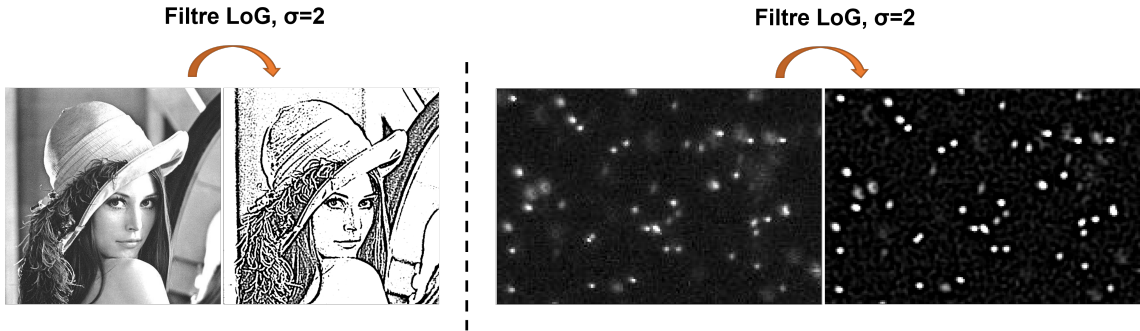


FIGURE 4.11 – Deux exemples d'applications d'un filtre LoG, à gauche sur le portrait connu de Lena et à droite sur des billes en diffusion libre.

Une approximation du filtre LoG existe également avec l'approche de la différence de gaussiennes (DoG). Cette méthode présente un intérêt lorsque la taille des blobs est inférieure à 5 pixels. Celle-ci n'est pas présentée en raison de son fonctionnement très similaire au LoG et son domaine d'utilisation optimale pour des tailles de blob légèrement plus faible. Ensuite, pour que l'algorithme procède à la détection des particules, seulement quelques paramètres d'entrées sont nécessaires :

- La taille estimée des blobs en pixels afin de guider l'algorithme en se basant sur le critère de référence où $\sigma = (s - 1)/3$ avec s le rayon du blob [96].
- Le "Threshold", qui représente le seuil en dessous duquel la détection ne doit pas s'appliquer (économie de mémoire de calcul).

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

- L'utilisation facultative d'un filtre médian 3x3 qui peut s'avérer utile lorsque les images possèdent un bruit de type poivre et sel⁷.
- L'utilisation facultative, mais fortement conseillée, d'une méthode de localisation avec une précision sub-pixel permettant d'estimer le centre d'une particule au sein d'un même pixel grâce à l'approche du profil d'intensité par la méthode des interpolations paraboliques successives [97].
- Une prévisualisation est possible sur la première image du stack afin d'estimer visuellement la pertinence des paramètres rentrés.

Filtrage

L'algorithme procède ensuite au calcul qui peut prendre un certain temps en fonction de la taille de l'image et du nombre d'entités à détecter. L'étape suivante offre la possibilité de filtrer les blobs détectés grâce à un seuillage sur la qualité des blobs. Ce facteur de qualité reste flou quant aux paramètres qu'il regroupe et le poids qui leur donne. Pour cette raison, il n'est pas recommandé de le modifier au risque de supprimer de nombreux points contenus dans les trajectoires. Après cette étape, l'affichage du stack d'images doit se faire grâce à l'option "Hyperstack display" qui utilise seulement l'afficheur de Fiji. L'étape suivante détermine les options de filtrage que doivent subir les images du stack. La plupart du temps, le nombre de particules détectées sur chaque image est bien trop important et certaines d'entre elles ne sont pas assez pertinentes pour les garder comme le montre la figure 4.12.

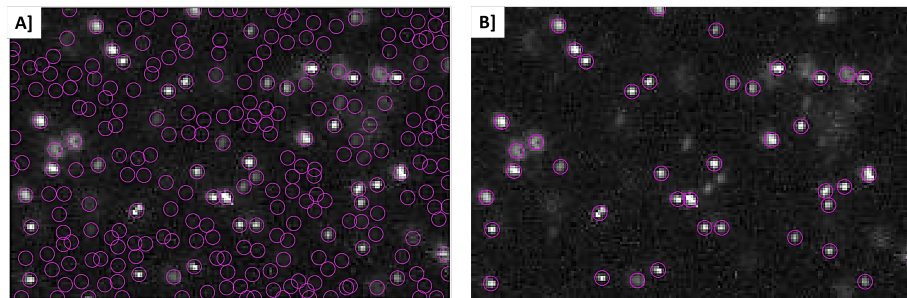


FIGURE 4.12 – Comparaison de la même image non filtrée en A] et filtrée en utilisant le seuillage automatique en B]. Les cercles violets indiquent les particules détectées par l'algorithme.

Dans l'idée de construire des trajectoires à partir des positions de ces particules, il est nécessaire que chacune d'elles ait le moins possible de voisins à proximité. Deux particules très proches sont difficiles à départager en termes de trajectoire. Il est possible d'utiliser la sélection automatique du seuil des filtres qui s'appuie sur la méthode Otsu [98], mais celle-ci considère uniquement deux classes, un fond continu et l'entité au premier plan pour lesquelles le seuil minimise la variance inter-classe. Si cette méthode n'est pas utilisée, il revient à l'utilisateur qui possède la vérité terrain d'estimer le seuil qui accomplit le seuillage le plus pertinent. Un deuxième filtre pertinent à utiliser pour éviter des artefacts dans les données est un filtrage spatial sur les bords. Lorsque des particules opèrent de faibles mouvements sur les bords de l'image, laissant apparaître uniquement une partie du blob, les trajectoires résultantes sont biaisées à cause d'une localisation très aléatoire. Il est

7. Bruit faisant apparaître de pixels très ponctuels de manière aléatoire

pertinent d'ajouter deux filtres selon les axes x, y qui coupent les positions des trajectoires très proches des bords.

Algorithme d'interconnexion des particules

Lorsque les particules détectées sont filtrées pour ne garder que les plus pertinentes, l'algorithme doit permettre de relier les positions des particules sur une image à leurs positions sur la suivante. Cette tâche est réalisée par l'algorithme en utilisant une approche de type Linear Assignment Problem (LAP) [99]. Deux options sont possibles en utilisant ce type d'approche, l'une simplifiée avec peu de paramètres en entrée, et une deuxième option plus complexe permettant de séparer ou de fusionner des trajectoires. Le "Simple LAP tracker" requiert trois paramètres en entrée permettant à l'algorithme d'orienter ses calculs. Le premier paramètre est la distance maximum de connexion entre deux positions successives d'une particule. Cela permet à l'algorithme de déterminer un rayon de recherche autour de la position précédente où potentiellement la particule est supposée se situer. Si une approximation de la taille des particules est accessible, alors le saut maximum que peut effectuer une particule peut être estimé. En s'appuyant sur la probabilité de saut d'une particule déjà évoquée au chapitre 1 (section 1.2) avec un écart-type $\sigma_s = \sqrt{2Dt}$, on peut retrouver que 99 % des sauts se situent dans l'intervalle 0 et $3\sigma_s$ [100]. Ainsi, la distance maximum de saut devient le rayon maximum de recherche et prend la valeur $l_{max} = 3\sqrt{2Dt}$.

Le second paramètre de l'algorithme représente le rayon de recherche maximum lorsqu'une particule a disparu durant une seule image. Cela peut se produire lorsqu'une particule passe hors focus de l'objectif, mais revient dès l'image suivante. Ce paramètre prend souvent la même valeur que l_{max} pour éviter que deux trajectoires différentes soient confondues. La figure 4.13 représente la procédure de recherche des positions successives pour former les trajectoires.

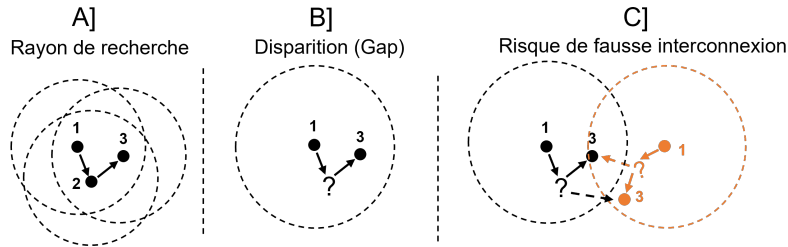


FIGURE 4.13 – Description en A] du rayon de recherche de la position suivante de la particule. En B] le cas où la particule disparaît pendant une image et revient ensuite. En C] le cas où deux trajectoires différentes mais proches, subissent une disparition pendant une image et ainsi amènent une incertitude sur les trajectoires si le rayon de recherche n'est pas adapté.

Le dernier paramètre d'entrée de l'algorithme traite du nombre de "gaps", c'est-à-dire le nombre d'images acceptées où la particule disparaît. Ce paramètre peut rapidement être sensible lorsque la cadence d'acquisition est faible (comme dans notre cas) ou que la vitesse des particules est très grande. Dans ces situations, il est recommandé de ne pas excéder deux gaps au risque de rendre chaotique la construction des trajectoires. Si ce nombre de gap est grand, la probabilité augmente de voir apparaître une autre particule que la particule originale dans le rayon de recherche, comme le montre la figure 4.13C. Après avoir rempli les trois paramètres de l'algorithme, les trajectoires s'affichent afin d'évaluer visuellement le résultat. Lorsqu'un phénomène de transport autre que la

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

diffusion affecte les particules, il est possible de le remarquer puisque toutes les trajectoires possèdent un glissement ou convergent dans une même direction comme la figure 4.14A le montre. Cela peut régulièrement se produire avec les effets de convection. D'autres trajectoires peuvent avoir un aspect confiné, comme sur la figure 4.14B, qui peut provenir d'une interaction avec d'autres particules ou un greffage sur une surface qui l'empêche de se mouvoir.

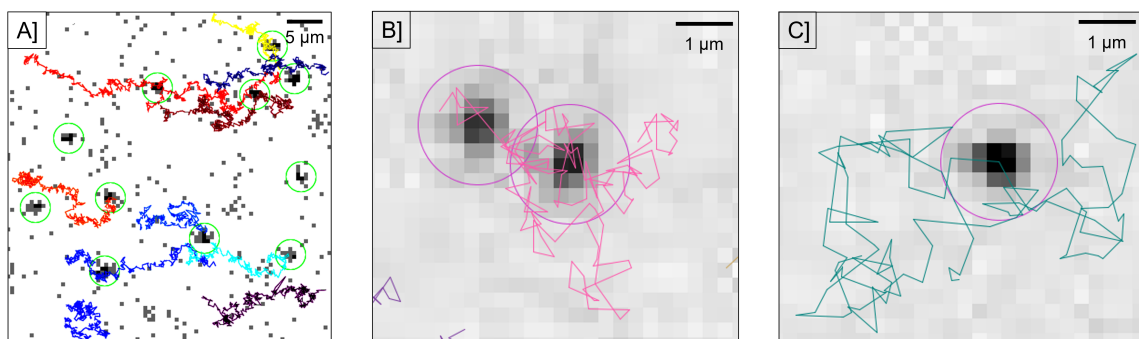


FIGURE 4.14 – Reconstitution des trajectoires : A] De particules ayant subi un glissement dû à la convection. B] Deux particules qui se contraignent dans leur mouvement. C] Particule libre n'ayant subi aucune perturbation apparente. Ces trajectoires ont été obtenues pour des particules de 250 nm de rayon en diffusion dans des micro-puits rempli d'eau.

De manière similaire au filtrage des particules, les trajectoires peuvent subir les mêmes traitements. Le nombre de points dans les trajectoires représente un critère pertinent pour filtrer les comportements marginaux. Lorsque le nombre de trajectoires est faible (≈ 10), l'utilisateur peut traiter individuellement chacune d'elles et déterminer le filtrage adapté. En revanche, si le nombre de trajectoires est très grand, l'utilisateur doit se fier à l'analyse de la distribution d'un ou plusieurs critères. Notamment, en visualisant la distribution de la longueur des trajectoires générées, les extrémités peuvent parfois être éliminées lorsqu'elles présentent un comportement très atypique par rapport au reste de la distribution. En plus du précédent, un grand nombre de filtres existe pour s'adapter aux besoins de l'expérience. Ci-dessous, deux autres critères intéressants pour notre cas sont présentés.

- Le ratio de confinement : valeur comprise entre 0 et 1 exprimant le quotient de la distance nette sur la distance totale de la trajectoire. Une valeur proche de 0 traduit un mouvement confiné dans un volume très restreint alors qu'une valeur qui tend vers 1 signifie que la direction de la trajectoire est quasi-constante.

- Vitesse maximum et minimum : valeur maximum ou minimum de vitesse atteinte durant la trajectoire. Cela peut trouver son intérêt lorsque des particules ont subi une perturbation ponctuelle qui doit être retirée ou au contraire qui doit être ciblée.

Lorsque les trajectoires sont filtrées selon les critères souhaités, leurs données brutes représentant les positions successives peuvent être générées dans un fichier au format choisi. Pour la suite du traitement numérique, notamment lors de l'utilisation des estimateurs du coefficient de diffusion, le format choisi est le format texte qui propose des séparateurs de données très simples à traiter.

4.3.2 Adaptation de l'estimation du coefficient de diffusion

Lorsque les données sous forme d'images sont traduites en trajectoires constituées de coordonnées successives, il faut encore réaliser une interface permettant de lire ces données pour les introduire dans les modèles d'estimateurs de coefficient de diffusion. Pour cela, une interface Matlab est utilisée pour classer les coordonnées de chaque trajectoire et réaliser les calculs statistiques associés. Néanmoins, pour la microscopie non-linéaire, les méthodes de calcul des estimateurs du coefficient de diffusion nécessitent quelques adaptations par rapport aux formules évoquées au premier chapitre (section 1.2). Pour rappel, la méthode choisie est l'estimateur de covariance \hat{D} :

$$\hat{D} = \frac{\langle (\Delta x_n)^2 \rangle}{2d\Delta t} + \frac{\langle \Delta x_n \Delta x_{n+1} \rangle}{d\Delta t} \quad (4.3.5)$$

Ou sa version basée sur des paramètres mesurés expérimentalement :

$$\widehat{D}_R = \frac{\langle (\Delta x_n)^2 \rangle - 2d\sigma^2}{2d(1 - 2R)\Delta t} \quad (4.3.6)$$

Fluctuation de l'intervalle de temps

Ces deux formes de l'estimateur de covariance nécessitent un intervalle de temps Δt constant entre deux positions d'une particule. Lorsque les images sont réalisées grâce à une caméra CCD ou CMOS, cela ne pose aucun problème puisque la vitesse de lecture des signaux photo-électriques générés est très grande comparée à la vitesse d'une particule en mouvement. En revanche, en microscopie non-linéaire, selon la direction de déplacement de la particule, l'intervalle de temps entre deux positions peut fluctuer. Pour comprendre cela, la figure 4.15 montre une particule se déplaçant dans le plan XY pendant que le laser balaye l'image suivante afin d'imager la nouvelle position. Mais dans ce cas, la particule s'écarte davantage du point de départ de balayage provoquant un allongement δt de l'intervalle de temps entre les deux positions.

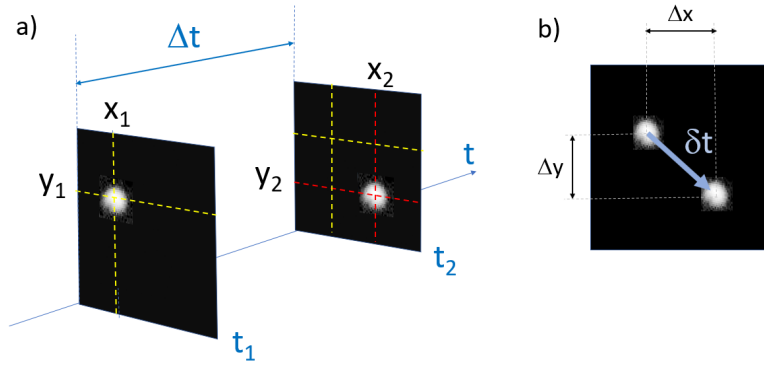


FIGURE 4.15 – Schéma représentant en A] l'intervalle de temps Δt entre deux mêmes pixels de deux images successives, en B] le supplément de temps δt ajouté à Δt pour représenter le temps réel entre deux positions successives.

CHAPITRE 4. SUIVI INDIVIDUEL DE PARTICULES EN SOLUTION
GRÂCE À LA MICROSCOPIE NON-LINÉAIRE

Pour comprendre ce que représente δt que l'on peut appeler temps de fluctuation, il faut revenir à la méthode de construction d'une image par balayage présenté précédemment sur la figure 4.2. Afin d'établir l'expression de δt , il faut dans un premier temps considérer que la direction du déplacement de la particule indique que ce temps δt peut être positif ou négatif. En effet, si la particule se rapproche du point de départ du balayage, alors l'intervalle de temps est plus court et inversement si la particule s'éloigne du point de départ. Pour établir une formule détaillant le temps de fluctuation, il faut également constater qu'un déplacement selon X ou Y n'est pas équivalent en termes de temps de balayage du laser. Pour comprendre l'influence du déplacement de la particule sur le temps de balayage, il faut considérer séparément un déplacement selon X et Y. Comme l'illustre la figure 4.16A et B, si la particule se déplace de ΔX , le temps équivalent de balayage dépend de sa direction dans le plan de l'image. Pour un déplacement selon X, il faut tenir compte de la position initiale et finale en Y afin de déterminer le sens de balayage de la ligne et ensuite en déduire le nombre de pixels que le laser doit parcourir. Soit δt_x la fluctuation de temps apportée par le déplacement de la particule selon l'axe X en prenant en compte les quatre cas possibles :

$$\delta t_x = t_{dwell} \cdot \begin{cases} p_{y1} + n - p_{y2} & \text{si } p_{y1}, p_{y2} \text{ pairs} \\ p_{y1} + p_{y2} & \text{si } p_{y1} \text{ pair, } p_{y2} \text{ impair} \\ n - p_{y1} + n - p_{y2} & \text{si } p_{y1} \text{ impair, } p_{y2} \text{ pair} \\ n - p_{y1} + p_{y2} & \text{si } p_{y1}, p_{y2} \text{ impairs} \end{cases} \quad (4.3.7)$$

Avec p_{y1} et p_{y2} les positions en pixel selon l'axe Y dans l'image 1 et 2 respectivement.

En revanche, un déplacement de ΔY_{pix} nécessite que le laser balaye chacune de ces lignes constituées de n pixels, soit un temps $\delta t_y = (\Delta Y_{pix} - 1) t_{dwell} n$.

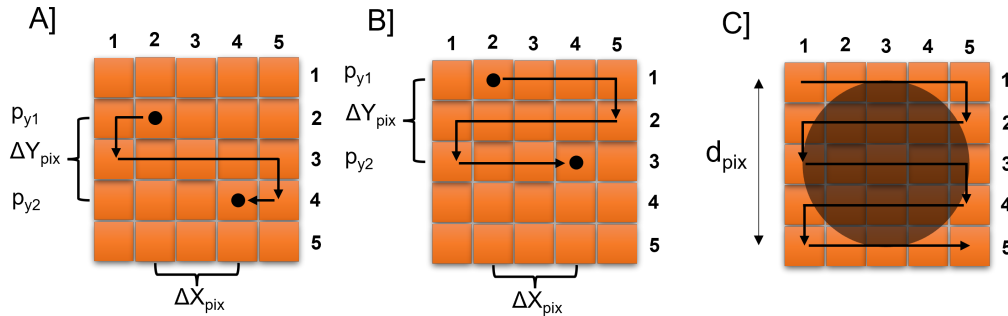


FIGURE 4.16 – A] et B] Dans l'hypothèse d'une particule ponctuelle, schémas du déplacement/temps supplémentaire engendré par le mouvement d'une particule entre deux images successives (A] p_{y1}, p_{y2} pairs, B] p_{y1}, p_{y2} impairs). C] Schéma du balayage d'une particule qui n'est plus considérée ponctuelle par rapport à la taille des pixels.

Finalement, l'intervalle de temps global τ avec les fluctuations dues au balayage s'exprime grâce à la somme de Δt et des fluctuations selon l'axe X et Y.

$$\tau = \Delta t + (\Delta Y_{pix} - 1) n_{pix} t_{dwell} + \delta t_x \quad [s] \quad (4.3.8)$$

Ce raisonnement fonctionne lorsque la particule est considérée ponctuelle par rapport à la taille d'un pixel, mais en réalité, ce n'est pas le cas puisque 4 pixels au minimum sont nécessaires pour

4.3. LES OUTILS D'ANALYSE D'IMAGES ET ESTIMATEURS DE COEFFICIENT DE DIFFUSION

décrire une particule (cf. critère de Nyquist-Shannon). La figure 4.16C permet de comprendre que le temps de balayage nécessaire pour couvrir la surface d'une particule ne se limite pas aux pixels la constituant, mais demande également de balayer le nombre de lignes correspondant à son diamètre en pixels d_{pix} . On peut estimer qu'une particule, représentée au minimum par quatre pixels ($d_{pix} = 4$), nécessite un temps $t_{blur} = n d_{pix} t_{dwell}$ pour être totalement balayée/détectée. En comparant ce temps t_{blur} qui peut être vu comme une incertitude sur la position, au temps δt_x , alors $t_{blur} \geq 2\delta t_x$ dans le cas le moins favorable. On constate que la précision apportée par la correction selon l'axe X sur la fluctuation de l'intervalle de temps (δt_x) est au mieux deux fois plus faible que l'incertitude sur le balayage de la particule non ponctuelle (t_{blur}). Le constat global que l'on peut apporter quant à cette fluctuation de l'intervalle de temps est que la correction δt est très petite devant le temps global Δt lorsque des déplacements d'environ un pixel sont enregistrés.

On peut également constater que le coefficient de flou de mouvement R décrit grâce à l'équation 4.3.6 est plus faible en microscopie non-linéaire⁸ que les valeurs habituelles ($\frac{1}{4} \leq R \leq \frac{1}{6}$). En effet, le coefficient de flou de mouvement compare le temps où l'obturateur est ouvert à l'intervalle de temps entre deux images. Mais dans le cas de la microscopie non-linéaire, l'état ouvert de l'obturateur représente seulement le temps passé par le laser à balayer la particule. Néanmoins, la particule occupe plusieurs pixels dans chaque direction et nécessite que les d_{pix} lignes soient balayées. Le coefficient peut alors s'exprimer de la façon suivante :

$$R = \frac{t_{blur}}{\tau} \quad (4.3.9)$$

Dans le cas d'images de petites tailles (≈ 100 pixels) ce coefficient prend des valeurs comprises entre 0.035 et 0.1 en fonction des dimensions et du temps de pose de l'image.

Approximation d'un τ variable

Afin d'évaluer la pertinence d'une modification du calcul de l'intervalle de temps entre deux positions successives, il est intéressant d'évaluer l'incertitude engendrée sur l'estimation du rayon si l'intervalle de temps possède une erreur de δt . Soit Δr l'incertitude⁹ sur r provoqué par une erreur de δt sur l'intervalle de temps entre deux positions successives :

$$\Delta r = \frac{\partial r}{\partial \Delta t} \delta t = \frac{\partial}{\partial \Delta t} \left(\frac{2k_B T \Delta t}{6\pi\eta \langle \Delta x_n^2 \rangle} \right) \delta t = \frac{k_B T}{3\pi\eta \langle \Delta x_n^2 \rangle} \delta t \quad (4.3.10)$$

Pour appréhender l'ordre de grandeur de cette erreur sur l'estimation du rayon, plaçons-nous dans le cas le plus défavorable. Celui-ci se produit lorsque qu'une particule réalise un saut équivalent à $l_{max} = 3\sqrt{2Dt}$ en ligne droite selon l'axe Y et se situe au plus proche d'un bord de l'image. Ainsi, comme l'illustre la figure 4.17, en prenant le cas d'une particule de 110 nm de rayon, $\Delta t = 55$ ms et une taille d'image $n = 100$, alors le déplacement maximum correspond à 3 pixels (0.526 μm /pix). Le cas défavorable correspond au balayage de 2 lignes complètes pour atteindre la position suivante et ainsi ajouter $\delta t = 3.n.t_{dwell} = 1.5$ ms. On peut conclure que δt ne représente que 2% du temps total Δt , sachant que le rayon r évolue linéairement avec l'intervalle de temps, on peut simplifier le raisonnement en restant sur le modèle d'estimateur à intervalle de temps constant.

8. Pour des images de petites tailles en pixels.

9. En référence à l'expression de Stokes-Einstein où $r = k_B T / 6\pi\eta D$

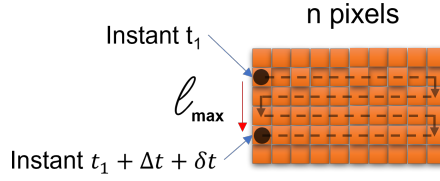


FIGURE 4.17 – Schéma représentant le cas défavorable d'un déplacement maximum dans le sens du scan et sur un bord de l'image provoquant un allongement du temps de scan.

Erreur de localisation statique et dynamique

La notion d'incertitude de localisation d'une particule en mouvement en raison du balayage porte le nom d'erreur de localisation dynamique. Cette erreur peut être évaluée grâce aux caractéristiques du microscope ainsi qu'à la précision de l'algorithme de détection. Soit σ_d l'erreur de localisation dynamique [52] :

$$\sigma_d = \sigma_0 \sqrt{1 + \frac{D t_{blur}}{s_0^2}} \quad [m] \quad (4.3.11)$$

Avec σ_0 l'erreur de localisation statique en [m], D le coefficient de diffusion en [m^2/s], t_{blur} le temps d'exposition de la particule [s] et s_0 le rayon de la PSF en [m]. Cette formule exprime le produit de l'erreur de localisation statique avec un coefficient qui compare une surface où la particule peut se trouver après un temps t_{blur} avec la surface de la PSF. Dans notre cas, on peut conclure que $\sigma_d \approx \sigma_0$ en raison du temps t_{blur} qui est de l'ordre de quelques millisecondes et ainsi rend la PSF grande devant la zone de diffusion. Dorénavant, seule l'erreur de localisation statique peut être prise en compte pour l'estimateur de covariance. L'erreur de localisation statique se détermine de manière expérimentale en déposant une particule isolée sur une surface sèche et statique, puis en réalisant un grand nombre d'images ayant les mêmes caractéristiques que l'étude dynamique (taille, temps de pose, etc). En analysant l'écart-type des déplacements détectés par l'algorithme sur un grand échantillon d'image, il est ainsi possible de déterminer l'erreur de localisation statique de l'expérience. La figure 4.18 montre les fluctuations de position estimées par l'algorithme pour une particule fluorescente de 500 nm de diamètre sur une lamelle de microscope. Ces déplacements peuvent être attribués à plusieurs sources comprenant des faux positifs¹⁰ tel que le bruit du détecteur qui altère le profil d'intensité de la particule, mais également des vrais positifs¹¹ tels que les vibrations mécaniques subies par le microscope. Finalement, lors d'un cas concret comme présenté sur la figure 4.18, on mesure une erreur de localisation de 61 nm.

Rapport de signal/bruit de localisation

Maintenant que l'erreur de localisation est connue, il faut évaluer la capacité de l'expérience à détecter un déplacement caractéristique d'une particule connaissant la précision de localisation accessible. Ceci peut se traduire sous la forme d'un rapport de signal sur bruit SNR_{loc} où le signal

10. Détection d'un déplacement qui ne s'est pas produit.

11. Cette fois, un déplacement réel se produit.

4.3. LES OUTILS D'ANALYSE D'IMAGES ET ESTIMATEURS DE COEFFICIENT DE DIFFUSION

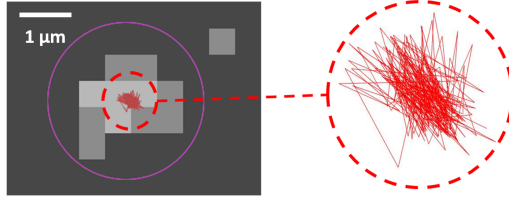


FIGURE 4.18 – Image de l'analyse par TrackMate d'une particule fluorescente de 500 nm de diamètre déposée sur lamelle de microscope statique. Le cercle en pointillés représente un zoom sur les déplacements enregistrés par l'algorithme.

constitue la distance parcourue par une particule connaissant son coefficient de diffusion et où le bruit représente l'erreur de localisation σ_0 [55] :

$$\text{SNR}_{loc} = \frac{\sqrt{dD\tau}}{\sigma_0} \quad (4.3.12)$$

Avec d le nombre de dimensions spatiales d'observation de la diffusion ($d=2$ pour notre cas, image plane), D le coefficient de diffusion et τ l'intervalle de temps global entre deux positions de particule. Il faut comprendre ici qu'à erreur de localisation égale, le SNR_{loc} s'améliore si la taille de la particule diminue.

Grâce à ces nouveaux paramètres d'expériences déterminés spécialement pour la microscopie non-linéaire, il est possible d'établir une nouvelle expression de l'estimateur de covariance lorsque l'intervalle de temps entre deux positions successives n'est pas constant. Néanmoins, la première forme de l'estimateur de covariance \hat{D} (équation 4.3.5) est difficile à adapter en raison du deuxième terme qui utilise le produit des déplacements Δx_n et Δx_{n+1} . Deux déplacements ne présentent pas le même intervalle de temps si la direction du déplacement a changé. En revanche, la version expérimentale de l'estimateur de covariance \widehat{D}_R permet une adaptation à un intervalle de temps variable τ :

$$\langle \widehat{D}_R \rangle = \left\langle \frac{\Delta x_n^2 - 2d\sigma^2}{2d(1 - 2R)\tau} \right\rangle \quad (4.3.13)$$

Glissement/Drift

Un dernier point important lors de l'utilisation des déplacements d'une particule pour estimer sa taille concerne les effets de glissement, appelé *drift* dans la littérature. Cet effet provient souvent d'une convection naturelle ou forcée (évaporation, fuite, hydrostatique, etc) non souhaitée qui peut fortement perturber les mesures si celle-ci est grande devant la vitesse de déplacement due à la diffusion. Lorsque le *drift* est supérieur d'au moins un ordre de grandeur à la diffusion, cela se remarque dès l'acquisition et peut être corrigé expérimentalement. En revanche, si le *drift* est comparable à la vitesse de diffusion, il est plus difficile de le déceler et ce n'est qu'une fois la trajectoire reconstruite que le constat est possible comme le présente la figure 4.19.

Lorsque ce mouvement de convection est homogène dans l'image et dans le temps, il est possible d'atténuer son effet sur l'estimateur du coefficient de diffusion. L'expression permettant d'accéder au coefficient de diffusion se sert du déplacement carré moyen, car une particule a tendance à rester

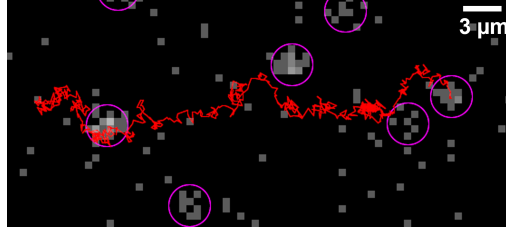


FIGURE 4.19 – Construction par TrackMate de la trajectoire d’une particule ayant subi un courant de convection et montre une tendance à se déplacer vers la droite de manière linéaire.

autour de sa position initiale et ainsi la moyenne de ses déplacements donne une valeur qui tend vers zéro. Mais dans le cas d’une *drift*, cela rend la moyenne des déplacements intéressante puisqu’en présence de convection, cette valeur s’éloigne de zéro. Néanmoins, sur le plan statistique, il est possible qu’une particule présente une trajectoire quasi-linéaire pendant quelques positions successives, mais qui pourtant est uniquement le fruit du hasard. C’est pour cela que ce critère de glissement doit être mesuré pour plusieurs particules pour un même intervalle d’images. L’algorithme utilisé pour cette étude s’appuie sur le stack d’image en entier pour évaluer sur toutes les trajectoires la dérive moyenne des particules. On peut exprimer le drift comme la moyenne des déplacements moyen de chacune des particules :

$$\text{drift} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \langle \Delta x_n \rangle \quad (4.3.14)$$

4.4 Résultats

Pour conclure ce chapitre sur le suivi de nano-particules en microscopie non-linéaire, les performances des outils développés sont testées et présentées dans cette partie. Les expériences sont réalisées avec des billes fluorescentes calibrées et dont les tailles sont connues afin de statuer sur la précision de la méthode par rapport au résultat attendu. Un autre type d’émetteur est utilisé afin d’évaluer la même expérience, mais en microscopie SHG et ainsi observer les différences avec la fluorescence à excitation biphotonique.

4.4.1 Mesures de l’erreur de localisation et du rapport signal/bruit

La première étape avant d’enregistrer des particules en diffusion libre est d’établir l’erreur de localisation statique. Comme évoqué précédemment, un stack d’images de particules déposées sur une surface statique doit être réalisé dans les mêmes conditions qu’en étude dynamique (temps de pose, taille de l’image, etc). La suite est identique à la démarche détaillée avec TrackMate puisque le but est d’évaluer les déplacements enregistrés alors que le support et les billes sont au repos. Une approche fiable est de réaliser ce test pour chaque taille de particule¹² mais également de répéter la mesure pour différentes positions dans le plan de l’image afin d’évaluer l’homogénéité. La figure 4.20 montre le résultat des analyses des positions de particules statiques de rayon 250 et 110 nm

12. Le signal qu’elles émettent change donc potentiellement l’erreur de localisation également.

dont les erreurs de localisation sont évaluées respectivement à $\sigma_0 = 61 \text{ nm}$ et $\sigma_0 = 93 \text{ nm}$ en ayant réalisé la moyenne sur les deux axes X, Y . Lorsque la taille des billes diminue, le signal s'affaiblit également. Cela provoque une baisse de la précision de localisation des billes, mais qui peut être compensée par une augmentation de leur vitesse qui agit en faveur du SNR_{loc} .

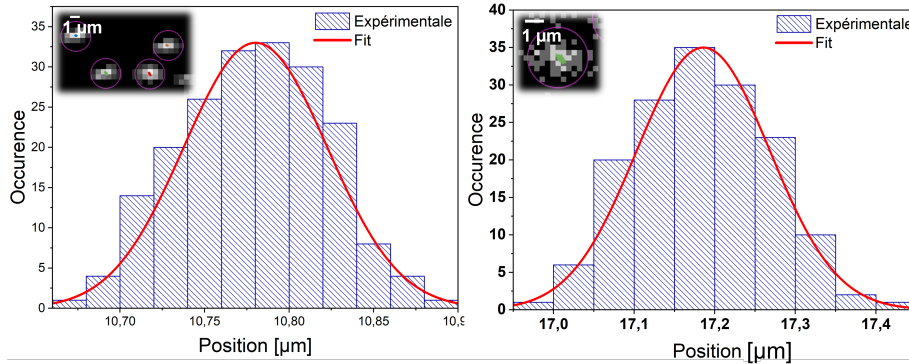


FIGURE 4.20 – Distribution des déplacements détectés pour des billes statiques. A) Billes de rayon 250 nm donnant un $\sigma_{x0} = 42 \text{ nm}$ sur l'axe X. B) Billes de rayon 110 nm donnant un $\sigma_{y0} = 82 \text{ nm}$ sur l'axe Y. Échantillon de 10 particules, chacune d'elles mesurée sur 200 images.

Afin de se rendre compte de l'importance de la précision de localisation dans le contexte du suivi de particule, il faut s'intéresser au SNR_{loc} qui prend en compte la vitesse de la particule. Grâce à l'équation 4.3.12 on peut comparer la distance moyenne qu'une particule peut parcourir à l'erreur de localisation. Ainsi pour les deux tailles de particules, le $\text{SNR}_{loc} \approx 5.5$ pour une cadence d'acquisition de 19.8 images/s. La figure 4.21 permet de se rendre compte des déplacements à observer à l'échelle de la taille d'une particule.

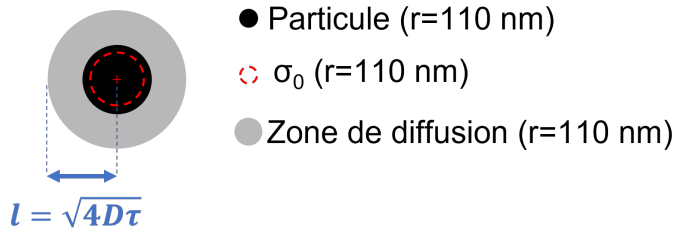


FIGURE 4.21 – Schéma comparant la zone de diffusion (cercle gris) d'une particule (cercle noir) dont la localisation possède une incertitude σ_0 (cercle en pointillés rouge).

4.4.2 Mesures des coefficients de diffusion/rayon des particules fluorescentes

Afin que la mesure soit répétable, certaines conditions doivent être respectées, notamment la diffusion libre. Le mouvement brownien de particules peut aisément être surpassé par un phénomène

de convection au sein de l'échantillon et ainsi totalement fausser les mesures.

Préparation de l'expérience

Pour remédier à cela, une astuce très simple est illustrée figure 4.22. Elle consiste à utiliser des puits en silicone (Silicone Isolators™, GBL664206, Grace Bio-Labs) dans lesquels la solution de particules fluorescentes est versée puis de sceller de part et d'autre le puits avec deux lamelles de verre. En attendant quelques minutes, les mouvements parasites de circulation ou de convection sont quasiment supprimés. Il est également déconseillé de disposer le support de l'échantillon sur une monture sensible aux vibrations.

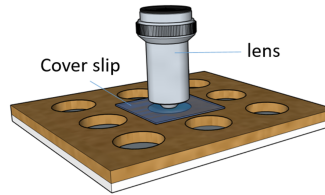


FIGURE 4.22 – Schéma du support d'échantillon permettant de contenir la solution de particules fluorescentes en quasi-diffusion libre grâce à des puits en silicone.

Ensuite, la concentration de particules fluorescente est une donnée relativement importante en raison de la détection par l'algorithme qui est plus complexe si des particules évoluent à proximité les unes des autres. Avec une taille de PSF d'environ $2 \mu m$, il est raisonnable que chaque motif soit en moyenne séparé¹³ d'environ $4 \mu m$. Cela donne une approximation de la concentration à atteindre pour que les signaux ne se superpose que rarement, mais dans le cas des premiers tests de la méthode, la concentration est fortement réduite afin que les particules ne se rencontrent quasiment jamais. Dans le but d'optimiser le signal détecté, il faut également maximiser la puissance du laser ainsi que la sensibilité du détecteur pour obtenir le meilleur rapport signal/bruit, mais tout ceci relève des méthodes habituelles d'imagerie.

Acquisition d'images

Comme présenté auparavant, la méthode d'acquisition du stack de x images ne permet pas d'observer l'évolution de l'expérience pendant l'opération. Il est nécessaire d'affiner les paramètres du détecteur et du laser sur des images individuelles avant de lancer l'acquisition du stack. En fonction du type de fluorophore et de la puissance du laser, il faut également prêter attention au photoblanchiment des particules si le suivi s'effectue sur une même zone pendant trop longtemps. Cela se remarque souvent par une diminution du nombre de particules dans chaque image. Néanmoins, grâce au phénomène de diffusion, les particules dans le volume d'excitation changent souvent.

Analyse des trajectoires

Lorsque le stack d'images est réalisé, l'outil TrackMate permet de construire les trajectoires selon le modèle décrit précédemment. Afin de s'affranchir de traitements superflus par l'algorithme

13. Depuis le centre de chaque motif.

(voir annexe 1) permettant d'estimer le coefficient de diffusion, il est souvent utile de filtrer les trajectoires peu pertinentes pour l'étude. Le choix a été fait d'utiliser les trajectoires relativement longues, c'est-à-dire celles contenant au moins le nombre moyen de positions pour lequel la particule est censée rester dans le volume d'excitation (voir tableau 4.1). Les mesures expérimentales suivantes ont été réalisées grâce à des séries de 500 à 600 images consécutives. La mesure sur les particules fluorescentes (Fluoresbrite® 24054, Polyscience) de rayon 250 nm est réalisée avec une résolution de 1.9 pixel/ μm à une cadence de 19.8 images par seconde et une dynamique d'image étalée sur 14 valeurs (i.e. nombre de photons par pixel). La zone étudiée représente 52x52 μm dans laquelle la solution de particules a été diluée pour obtenir une concentration de $\approx 4.1 \cdot 10^{-3} \text{ part}/\mu\text{m}^2$. Pour les particules fluorescentes (Fluoresbrite® 24050, Polyscience) de rayon 110 nm, les mesures ont été réalisées dans des conditions relativement différentes avec une résolution doublée de 3.8 pixel/ μm afin de compenser la diminution de la dynamique d'image qui occupe seulement 6 valeurs. Cette perte est due à un signal de fluorescence plus faible, mais également à un temps de pose modifié à $t_{\text{dwell}} = 3\mu\text{s}$ pour permettre d'augmenter la cadence à 33 images/s et ainsi enregistrer plus de point par trajectoire¹⁴. La zone étudiée est réduite à 19x19 μm pour conserver la taille de 100x100 pixels et la concentration utilisée est de $\approx 3 \cdot 10^{-2} \text{ part}/\mu\text{m}^2$.

Les résultats sont présentés sur la figure 4.24 sous forme de distributions des tailles estimées par chaque trajectoire. Une partie des trajectoires est affichée sur la figure 4.23 grâce à l'affichage du plugin TrackMate qui superpose les trajectoires sélectionnées aux images du stack. Les particules sont entourées d'un cercle violet lorsqu'elles apparaissent sur les images du stack et chaque trajectoire est représentée par une couleur différente. Les trajectoires affichées sans qu'une particule n'apparaisse en arrière-plan signifient seulement que ces trajectoires sont détectées à un autre moment dans la série d'images.

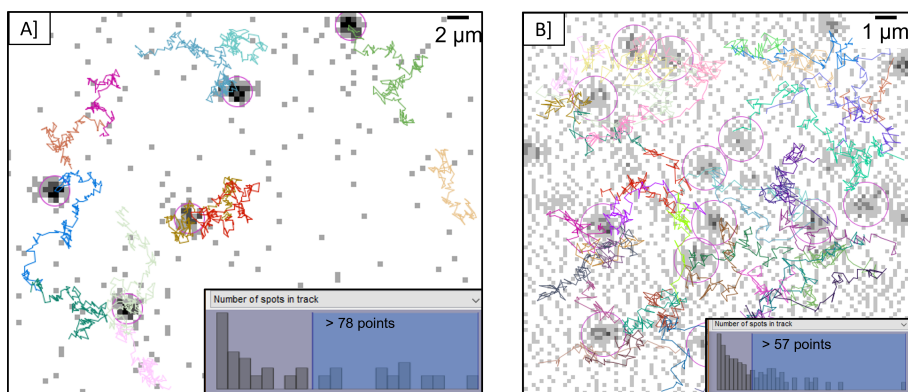


FIGURE 4.23 – Résultat des trajectoires détectées par l'algorithme TrackMate sur 500 images. A] Particules de rayon 250 nm, une résolution de 1.9 pixel/ μm et une cadence de 19.8 images/s. B] Particules de rayon 110 nm et une résolution de 3.8 pixels/ μm et une cadence de 33 images/s.

Lorsque les données brutes issues des trajectoires sont traitées par l'algorithme de l'estimateur de covariance, cela donne des résultats proches des valeurs réelles des rayons des particules. La figure 4.24 présente les distributions des rayons estimés sur la totalité de l'échantillon et pour les deux tailles de particule. La première présente une moyenne de 248 nm et un écart-type de 21.4 nm,

14. Nombre de points déjà réduit en raison de la vitesse pour des particules plus petites

la deuxième donne une moyenne à 113.7 nm et un écart-type de 14.5 nm. Ces résultats montrent que les estimations sont très proches des valeurs réelles des rayons, ce qui prouve la pertinence de la méthode qui a été publiée [101] (voir article en Annexe 3). Néanmoins, quelques critères de tris évoqués précédemment ont dû être utilisés afin d'obtenir des trajectoires facilement exploitables.

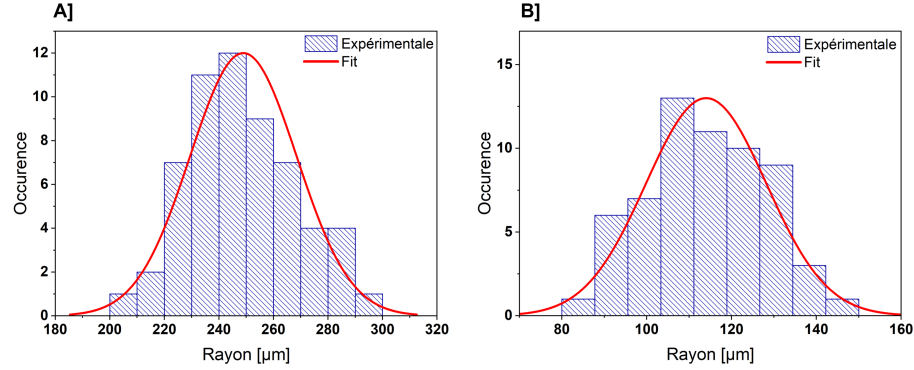


FIGURE 4.24 – Distribution des rayons estimés grâce à l’estimateur de covariance à τ variable. A] Particules de 250 nm de rayon, échantillon de 58 trajectoires > 78 points. B] Particules de 110 nm de rayon, échantillon de 61 trajectoires > 57 points.

4.4.3 Mesures du coefficient de diffusion/rayon des cristaux émetteurs de SHG

La méthode précédente d’estimation des tailles est réalisée en excitation de fluorescence à deux photons qui présente une réponse isotrope forte (l’orientation d’un émetteur¹⁵ n’affecte pas l’intensité du signal). L’utilisation de la microscopie non-linéaire sous-entend également d’entreprendre les mêmes mesures de trajectoires à partir du processus non résonnant de génération de second harmonique, grâce à des harmonophores en diffusion libre.

Afin de tester les performances de la méthode en SHG, nous avons fabriqué des cristaux de KTP (Titanyle phosphate de potassium) s’appuyant sur une synthèse connue [102]. Afin de déterminer la qualité des émetteurs de SHG, une étude de la réponse SHG de l’échantillon en fonction de la polarisation permet de reconnaître le comportement typique des harmonophores. La figure 4.25A montre la réponse de cristaux de KTP déposés sur une lame de verre selon la polarisation de l’onde incidente. La forte dépendance en polarisation de l’émission des cristaux avec une quasi-extinction du signal pour un certain angle montre que ces émetteurs génèrent un signal de SHG.

Pour compléter la caractérisation des cristaux de KTP, une analyse de la taille moyenne a été réalisée au moyen de la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS)¹⁶ déjà présentée au premier chapitre. Les résultats montrent un échantillon plutôt monodisperse comme peut le montrer la figure 4.25B dont la taille moyenne est estimée à 150 nm de diamètre.

Le suivi d’émetteurs de SHG en diffusion rend la tâche plus complexe qu’une fluorescence, car le signal reçu sur le détecteur dépend de la polarisation de l’onde incidente ou autrement dit de l’orientation de l’émetteur qui peut faire passer le signal par des extrema. Lors d’une diffusion libre,

15. Dans le cas d’un ensemble de molécules fluorescentes, ce qui n’est pas le cas d’une molécule unique.

16. Montage expérimental réalisé en stage de Master 1 à Angers

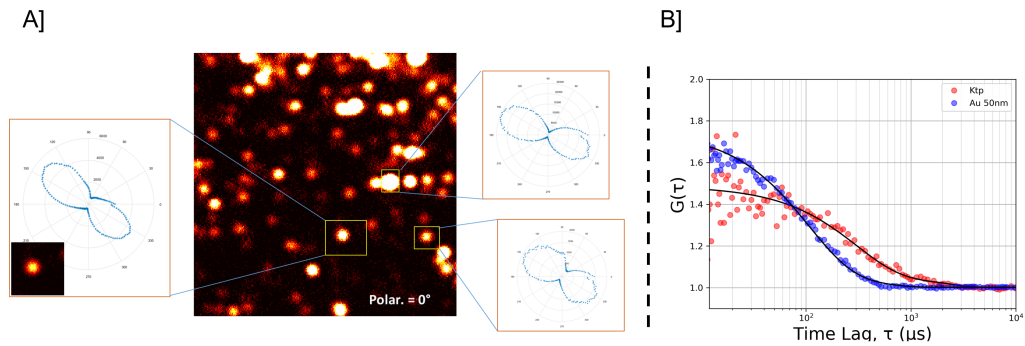


FIGURE 4.25 – A] Image de la réponse de cristaux de KTP excités à une longueur d’onde de 800 nm. Les diagrammes polaires représentent l’évolution de l’intensité de la réponse des cristaux en fonction de la polarisation de l’onde incidente. B] Graphique de la fonction d’autocorrélation du signal en fonction du décalage temporel. En rouge l’analyse pour les cristaux de KTP et en bleu des particules d’or de 50 nm de diamètre pour comparer.

la particule se déplace dans l’espace, mais effectue également des rotations dont la vitesse dépend de sa forme. Dans le cas d’une détection en SHG, cela pose un problème, car la particule disparaît régulièrement sur quelques images comme le montre la figure 4.26. De plus, l’intensité des émetteurs SHG est souvent plus faible qu’en fluorescence et cela nécessite d’être au maximum des capacités du laser afin d’obtenir une dynamique d’image équivalente à la fluorescence (5-10 niveaux de gris).

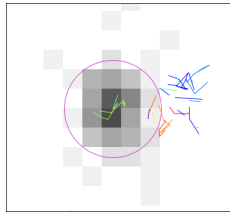


FIGURE 4.26 – Image d’un cristal de KTP dont la trajectoire est découpée en plusieurs portions en raison de la disparition du signal due à la rotation de l’émetteur.

Une solution envisagée pour parvenir à supprimer cet effet de clignotement du signal d’un émetteur de SHG en diffusion est d’utiliser une polarisation circulaire. À condition que l’intensité du signal soit suffisante, une polarisation circulaire permet d’avoir une réponse en intensité constante en fonction de la polarisation. Cette solution n’a pas fait l’objet d’une étude quantitative comme les particules fluorescentes par manque de temps durant la thèse.

Ce chapitre se termine sur ces résultats d’analyses des trajectoires de nano-sources lumineuses. Néanmoins, cette méthode d’estimation des tailles par l’analyse des déplacements en diffusion libre grâce à la microscopie non-linéaire nécessite de prouver son application lors d’expériences plus complètes telles que la biologie le fait par exemple. Afin de se rapprocher de ces conditions, le prochain chapitre s’intéresse aux techniques qu’il est possible de mettre en place pour utiliser la technique de suivi individuel de particules au service d’expériences dynamiques.

Chapitre 5

Microscopie à feuille de lumière en canal microfluidique

Ce chapitre aborde l'utilisation de la microscopie à feuille de lumière pour résoudre des limitations liées aux autres méthodes de microscopie, mais surtout pour qu'elle soit intégrée directement à des puces microfluidiques. Le choix de la microscopie à feuille de lumière afin d'étudier des expériences microfluidiques permet une approche plus simple et intuitive que la microscopie non-linéaire, tout en conservant une résolution relativement proche. Dans un premier temps, la technique de microscopie à feuille de lumière est détaillée afin de mettre en valeur ses avantages. L'utilisation de cette microscopie est justifiée grâce à ces apports en termes de contraste et sélectivité du volume d'excitation, mais son utilisation requiert souvent une mise en place qui peut être techniquement complexe. Une idée intéressante est d'adapter cette technique de microscopie à feuille de lumière pour qu'elle s'intègre directement à une puce microfluidique. Une manière astucieuse de réaliser un tel système micro-optique intégrée est d'utiliser deux fibres optiques perpendiculaires entre-elles pour créer une configuration fibre/lentille. Cette disposition permet de créer une feuille de lumière au sein d'un canal microfluidique grâce à la géométrie de la fibre jouant le rôle de lentille cylindrique. Une majeure partie de cette étude s'intéresse à établir les conditions optimales de positionnement entre la fibre laser et la lentille. Des calculs d'optique matricielle et des simulations numériques sont présentées en prenant en compte les milieux de propagation qui composent une puce microfluidique afin d'établir les caractéristiques théoriques d'une telle configuration. En raison de la méthode de fabrication des puces microfluidiques, une partie s'intéresse particulièrement aux difficultés rencontrées ainsi qu'aux solutions choisies pour les contourner. Finalement, les résultats issus des caractérisations des feuilles de lumières sont présentés afin d'évaluer le contraste ou encore l'épaisseur de la zone d'excitation pour constituer une base de comparaison aux méthodes existantes.

5.1 Apport de la microscopie à feuille de lumière

La microscopie à feuille de lumière est une méthode qui permet de former un faisceau laser convergent selon une seule direction pour réaliser une section de coupe très fine d'un échantillon en conservant un large plan d'excitation dans l'autre direction. Le fait d'observer une zone d'excitation

CHAPITRE 5. MICROSCOPIE À FEUILLE DE LUMIÈRE EN CANAL MICROFLUIDIQUE

(de fluorescence le plus souvent) dont le plan est perpendiculaire à celui de l'objectif de collection, permet d'obtenir un fond noir sur lequel seuls les émetteurs excités sont visibles. Souvent utilisée pour des échantillons fluorescents qui peuvent être denses, la microscopie à feuille de lumière permet un très bon contraste et un sectionnement optique comparable, voire meilleur que la microscopie confocale. L'épaisseur sur laquelle l'échantillon est illuminé permet de définir la résolution axiale du système, souvent rattachée à la notion de *waist*¹. La séparation de la mise en forme du signal d'excitation et de collection permet de rendre indépendantes la résolution axiale (épaisseur de la feuille de lumière) et radiale (caractéristiques de l'objectif de collection) de l'expérience. Il faut ajouter à cela que la sélection du volume d'excitation limite les effets de phototoxicité et de photoblanchiment au volume illuminé par la feuille de lumière. A la différence des autres méthodes de microscopies optiques permettant d'atteindre de très hautes résolutions telles que la TPEF, confocale ou encore SHG, la microscopie à feuille de lumière (LSM pour *Light Sheet Microscopy*) peut atteindre des cadences d'acquisition beaucoup plus hautes qu'en balayage puisque la détection du signal est réalisée au moyen de caméras. Le sectionnement optique grâce à une feuille de lumière est une méthode qui est apparue en 1903 avec *l'ultramicroscope* inventé par Siedentopf et Zsigmondy [103]. Depuis, cette idée a été développée et améliorée pour donner lieu à de nouvelles méthodes de microscopie à feuille de lumière, notamment avec les techniques de la famille des OPFOS (Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning) [104] telles que le SPIM (selective plane illumination microscopy) [105] ou encore une version qui diffère de la disposition orthogonale avec le OPM (Oblique Plane Microscopy) [106]. Ces techniques sont toujours largement utilisées et réalisent une feuille de lumière au moyen de deux objectifs et d'un système de lentilles cylindriques mettent en forme le faisceau laser. La figure 5.1 représente deux montages expérimentaux utilisant un pair d'objectifs afin de former la feuille de lumière et d'en collecter le signal de fluorescence. On peut remarquer que le support de l'échantillon doit être adapté au positionnement des objectifs en fonction de leur distance de travail. Grâce à une telle disposition des objectifs, il est possible de réaliser une reconstitution 3D des échantillons étudiés en déplaçant la feuille de lumière dans le volume d'étude.

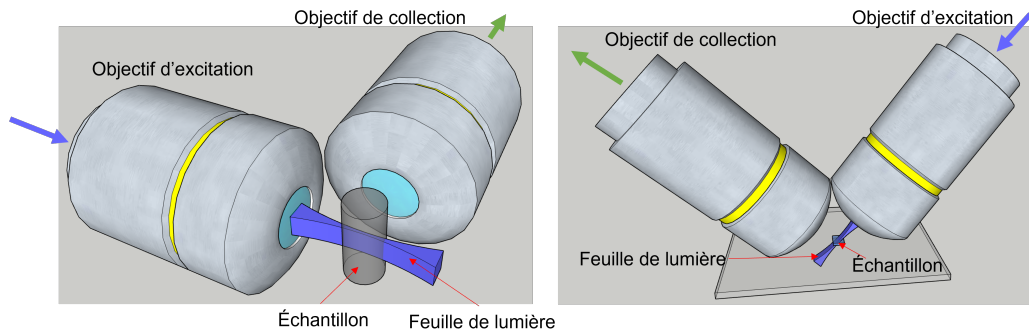


FIGURE 5.1 – À gauche, un montage où l'échantillon est placé dans un support cylindrique qui facilite la disposition des deux objectifs. À droite, l'échantillon est disposé sur une lame de verre à l'inclinaison et la distance focale des objectifs doivent être adaptées. Dans ce type de configuration, le faisceau est mis en forme en amont de l'objectif d'excitation au moyen d'une lentille cylindrique.

1. Mot anglais signifiant col du faisceau dans ce cas.

5.2 Microscopie à feuille de lumière intégrée à une puce microfluidique

La microscopie à feuille de lumière semble parfaitement adaptée pour obtenir des images à hautes résolutions ainsi qu'une grande cadence vidéo. En revanche, sa mise en place, est toujours plus compliquée lorsqu'elle doit se faire sur un microscope conventionnel déjà établi. De plus, lors de l'utilisation des puces microfluidiques, le paramètre d'encombrement engendré par les dimensions du module de PDMS ainsi que le besoin de travailler très proche de l'échantillon pour les objectifs rendent la tâche très compliquée. Pour s'affranchir de ces contraintes, l'idée est d'amener la mise en forme du signal d'excitation à l'intérieur de la puce microfluidique pour s'affranchir d'un objectif d'excitation encombrant.

5.2.1 Champ sombre en canaux microfluidiques

Avant d'aboutir à une feuille de lumière au sein d'un canal microfluidique, l'idée d'apporter le signal au plus proche de la zone d'étude du canal provient d'une volonté d'améliorer le contraste de l'observation grâce à un champ sombre. Une possibilité consiste à insérer directement la source au plus proche de la zone d'étude comme cela a été réalisé au moyen d'une fibre dans un canal [107] ou plus simplement en approchant une nappe de LED [108] de la puce microfluidique créant ainsi un éclairage rasant. D'autres méthodes proposent d'élaborer l'optique permettant la mise en forme du faisceau directement lors de la conception des puces. C'est notamment le cas pour les solutions utilisant des lentilles 2D [109] ou des miroirs paraboliques 2D [110]. Néanmoins, ces méthodes ne limitent pas l'excitation dans le plan d'observation de l'objectif de collection ce qui n'améliore pas le contraste des images. Pour que le rapport signal sur bruit s'améliore, il faut que la collection du signal soit réalisée dans la direction où le faisceau d'excitation est confiné. Soit le plan d'observation de l'objectif est déplacé pour qu'il collecte le signal issu de la feuille de lumière dans le plan perpendiculaire au plan de l'excitation [111], soit la mise en forme du faisceau lumineux doit être ingénieusement élaboré pour que son plan d'excitation soit perpendiculaire à celui de l'observation [112], [113]. Pour poursuivre l'idée d'implanter dans une puce microfluidique un système de mise en forme du faisceau laser permettant de profiter pleinement de l'amélioration du contraste, la suite présente l'utilisation de la géométrie cylindrique d'une fibre optique pour agir comme une lentille cylindrique.

5.2.2 Utilisation d'une fibre optique comme micro-lentille cylindrique

Afin de s'affranchir des problèmes engendrés par l'utilisation de deux objectifs, une solution évoquée précédemment consiste à mettre en forme la feuille de lumière directement à l'intérieur de la puce microfluidique. Habituellement, une lentille cylindrique est utilisée en amont d'un objectif afin de focaliser le faisceau laser dans une seule direction et à l'endroit souhaité. Ici, l'astuce consiste à utiliser une simple fibre optique comme lentille cylindrique et de l'intégrer directement au sein de la puce microfluidique à l'emplacement souhaité. Finalement, seulement deux fibres optiques sont nécessaires pour former une feuille de lumière. Le système complet est relativement simple et ne nécessite que peu de matériel. Une première fibre monomode² amène le faisceau laser à l'intérieur de la puce au moyen d'une cavité positionnée à quelques centaines de micromètres du canal microfluidique. Une deuxième fibre est disposée perpendiculairement à la première afin de jouer le rôle

2. Évite les interférences entre les différents modes de guidages qui mènent à un effet de *speckle*.

d'une lentille cylindrique. Cette dernière permet de mettre en forme le faisceau sortant de la fibre laser pour qu'il adopte un profil convergent selon l'axe vertical du canal microfluidique. Le schéma général du montage permettant de générer une feuille de lumière dans un canal microfluidique grâce à deux fibres optiques est présenté figure 5.2 grâce à plusieurs angles de vue.

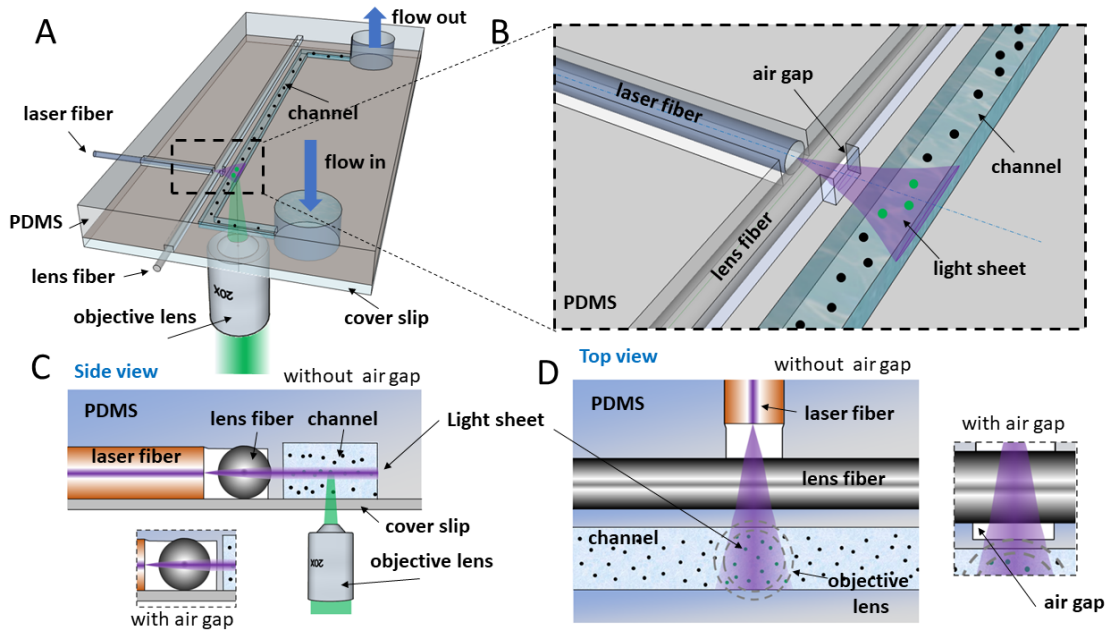


FIGURE 5.2 – A] Vue d'ensemble de la puce microfluidique disposée au-dessus d'un objectif où les deux fibres sont insérées afin de former une feuille de lumière. B] Zoom sur la zone comportant les deux fibres et le canal microfluidique avec la feuille de lumière représentée en violet. C] Vue de côté représentant le profil axial de la feuille de lumière. D] Vue de la feuille de lumière dans le plan d'observation de l'objectif.

Afin de faciliter la compréhension dans la suite de l'étude, la fibre qui amène le faisceau laser sera appelée fibre laser et la fibre servant de lentille cylindrique sera réduite à désignation de lentille. Sachant que les caractéristiques³ de la lentille et de la fibre laser sont fixes, c'est grâce à la distance les séparant que l'épaisseur de la feuille de lumière dans le canal et la position du *waist* sont déterminées. Afin de parvenir à la disposition souhaitée, la méthode utilise un positionnement manuel des deux fibres au sein de la puce microfluidique qui nécessite quelques indications pour parvenir à un résultat satisfaisant.

5.2.3 Mise en place manuelle du système fibre/lentille

Tout d'abord, le modèle de puce microfluidique doit prévoir l'espace nécessaire pour insérer les deux fibres en réalisant des cavités adaptées dans la puce microfluidique. En disposant ces cavités

3. À savoir le diamètre de la lentille et l'ouverture numérique de la fibre laser.

5.2. MICROSCOPIE À FEUILLE DE LUMIÈRE INTÉGRÉE À UNE PUCE MICROFLUIDIQUE

au contact de la lame de verre qui sert de support à la puce, on s'affranchit de l'étape d'alignement vertical entre la lentille et la fibre laser, à ceci près que le diamètre et le centrage du cœur des fibres possède une incertitude. Grâce aux cavités dans le PDMS servant de guides pour les fibres, l'insertion peut être réalisée manuellement en s'aidant par exemple d'une loupe binoculaire. Pour des raisons techniques⁴ liées au film de résine photosensible lors de la microfabrication, les canaux ne font que 100 μm de hauteur. Cela impose une contrainte⁵ lors de l'insertion des fibres dont le diamètre mesure 125 μm , mais qui n'est pas forcément néfaste pour la réalisation. Les frottements engendrés permettent de maintenir la position de la fibre malgré de légères perturbations. En raison de la fragilité du matériau, l'insertion des fibres est délicate et demande une procédure adaptée. Chaque fibre étant protégée par une gaine plastique, celle-ci doit être retirée pour l'insertion en ne laissant dénudée que la partie à positionner dans la puce. La protection de la fibre peut être dénudée dans une solution d'acétone qui dissout la gaine. Afin de glisser la fibre dans la cavité, une solution efficace consiste à utiliser une deuxième lame de microscope comme support de la fibre pour assurer un positionnement vertical avec la cavité. L'utilisation d'une loupe binoculaire permet ensuite d'ajuster relativement bien la fibre avec l'entrée de la cavité pour que celle-ci soit insérée par une simple translation comme cela présenté sur la figure 5.3.

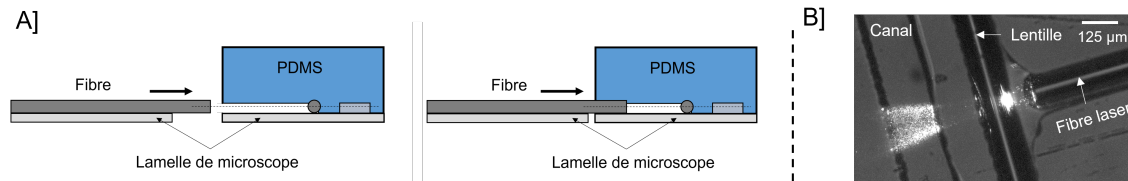


FIGURE 5.3 – A] Schéma de la procédure d'insertion manuelle d'une fibre dans une puce microfluidique. B] Résultat d'une fibre insérée devant la lentille cylindrique.

Sachant que la distance séparant la fibre laser et la lentille détermine l'épaisseur et la position du waist de la feuille de lumière, la suite de l'étude s'intéresse à évaluer les configurations optimales permettant d'obtenir une feuille de lumière qui améliore le contraste des images.

5.2.4 Profils de la feuille de lumière

Dans le but d'obtenir une résolution axiale similaire à la microscopie confocale ou non-linéaire, la première approche consiste à générer une feuille de lumière la plus fine possible pour profiter du meilleur contraste. Mais cette configuration n'est pas optimale pour toutes les situations, notamment le suivi du mouvement de particules en diffusion qui est fortement limité par la sélection axiale du volume d'excitation. Les expériences initiales cherchant à former une feuille de lumière ont permis d'envisager deux configurations de positionnement possibles détaillées ci-dessous.

4. Au-delà de deux couches de film photosensible, l'insolation devient très irrégulière, mais une solution avec un film de 125 μm est à l'étude.

5. Grâce à l'élasticité du PDMS.

Sans saut d'indice

La première disposition consiste à positionner la surface de sortie de la lentille au contact du PDMS. De cette façon, le faisceau de lumière ne subit qu'un très faible saut d'indice en passant du verre de la lentille au PDMS ($n_g - n_p = 0.023$) ce qui ne lui donne que très peu de convergence. Pour que le faisceau converge, il faut également que la fibre laser soit positionnée à une distance plus grande que la distance focale de la lentille. Dans l'approximation paraxiale⁶ et dans le cas où la lentille cylindrique ne possède pas le même milieu de propagation en entrée et en sortie, les focales image et objet sont différentes et s'expriment de la façon suivante :

$$f_{\text{image}} = \frac{-n_g R}{n_g - 2n_p + n_g n_p} \quad \text{and} \quad f_{\text{objet}} = \frac{n_g n_p R}{n_g - 2n_p + n_g n_p} \quad (5.2.1)$$

Avec n_p l'indice de réfraction du PDMS et R le rayon de la lentille cylindrique. Cette solution génère une feuille de lumière faiblement convergente, mais pour laquelle son épaisseur est réduite d'un facteur 4 à 5 comparée aux solutions sans lentille. Il faut également ajouter que sa faible convergence apporte également une très bonne homogénéité dans l'axe de propagation du faisceau qui permet à la majeure partie du canal microfluidique d'être étudiée.

Avec saut d'indice

La deuxième disposition permet au contraire de créer un saut d'indice lors de la propagation du faisceau après la lentille pour lui permettre de converger plus rapidement. Afin de réaliser ce saut d'indice, une épaisseur d'air entre la lentille et le PDMS suffit ($n_g - n = 0.47$). De manière similaire au cas précédent, il est nécessaire d'exprimer la distance focale dans l'approximation paraxiale pour situer la position de la fibre laser au-delà de laquelle le faisceau est convergent. Mais cette fois, la disposition impose une lentille cylindrique entourée d'air et permet d'exprimer la longueur focale effective de la façon suivante [114] :

$$f_{\text{cyl}} = \frac{n_g D}{4(n_g - 1)} \quad (5.2.2)$$

Avec n l'indice de réfraction, D le diamètre de la lentille. Cette disposition permet théoriquement d'atteindre une épaisseur de feuille de lumière encore plus faible ($\approx 2.5 \mu\text{m}$) que la solution sans saut d'indice en raison de la forte convergence du faisceau à la sortie de la lentille. Mais les propriétés d'un faisceau gaussien nous imposent que la réduction de la taille du *waist* se réalise au prix d'une évolution très rapide de l'épaisseur de la feuille de lumière autour de ce point. Autrement dit, si le but est d'obtenir une épaisseur de feuille de lumière de quelques micromètres, celle-ci ne conserve cette caractéristique que sur une longueur de propagation très faible.

Afin de résumer les deux solutions évoquées, la figure 5.4 présente les modèles numériques utilisés pour fabriquer les puces ainsi que les vues en coupe des feuilles de lumière associées aux dispositions sans saut d'indice en A et avec saut d'indice en B.

Afin d'établir les paramètres d'expériences pour chacune des configurations, il est intéressant de calculer l'évolution de la taille du waist et l'homogénéité de la feuille de lumière en fonction de la position de la fibre laser par rapport à la lentille. Ces calculs sont réalisés grâce à l'optique

⁶ La faible ouverture numérique de la fibre (0.12) donne au faisceau une faible divergence qui lui permet de vérifier les conditions de Gauss.

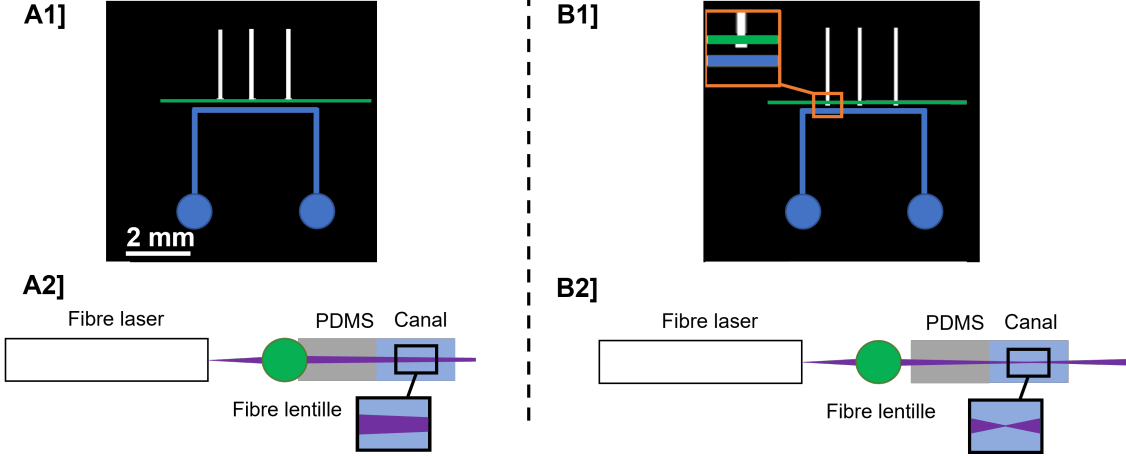


FIGURE 5.4 – 1] Modèle numérique des puces microfluidiques, avec en blanc la fibre laser, en vert la fibre lentille, et en bleu le canal fluïdique. 2] Les vues en coupe des feuilles de lumières selon la configuration. A] Configuration sans saut d'indice qui forme une feuille de lumière faiblement convergente. B] Configuration avec saut d'indice grâce à une encoche d'air, où le *waist* de la feuille de lumière est positionnée dans le canal.

matricielle qui permet de représenter le passage d'un faisceau lumineux dans un système optique par les produits successifs de matrices fondamentales telles que la propagation dans un milieu homogène, un changement d'interface ou une lentille. La suite de l'étude détaille de manière analytique les calculs numériques.

5.2.5 Calculs d'optique matricielle

Pour éviter de répéter une grande partie du calcul analytique, les deux configurations sont évoquées, mais seulement la solution sans saut d'indice est détaillée puisque la démarche est la même et que seules deux interfaces changent entre les deux cas. Tout d'abord, il est nécessaire d'exprimer la propagation d'un faisceau sortant de la fibre monomode. Celui-ci peut être approché par un faisceau gaussien dont le waist w_0 équivaut à la moitié du diamètre du champ de mode et un rayon de courbure $R(z)$ infini (source ponctuelle). Ce rayon de courbure R peut être représenté par l'intermédiaire du nombre complexe q tel que [115] :

$$\frac{1}{q} = \frac{-i\lambda}{\pi n w(z)^2} + \frac{1}{R(z)} \quad (5.2.3)$$

Avec λ la longueur d'onde, z la coordonnée sur l'axe optique, $w(z)$ le waist du faisceau à la coordonnée z et n l'indice du milieu de propagation. La largeur du waist peut également être évaluée à partir de l'équation 5.2.3 pour une position z déterminée :

$$w(z) = \frac{\lambda}{n\pi\Im(q)} |q|^2 \quad (5.2.4)$$

CHAPITRE 5. MICROSCOPIE À FEUILLE DE LUMIÈRE EN CANAL MICROFLUIDIQUE

Où $\Im(q)$ est la partie imaginaire de q . A la sortie de la fibre laser, le rayon de courbure $R(z)$ étant infini, l'expression de q se réduit à la partie imaginaire :

$$q_{fibre} = i \frac{\pi n w_0^2}{\lambda} = i z_r \quad (5.2.5)$$

Avec z_r la longueur de Rayleigh qui représente la longueur selon l'axe de propagation pour laquelle le waist du faisceau voit son rayon multiplié par un facteur $\sqrt{2}$. Pour résumer les différents paramètres du faisceau, la figure 5.5 représente le profil gaussien d'un faisceau se propageant dans un milieu continu.

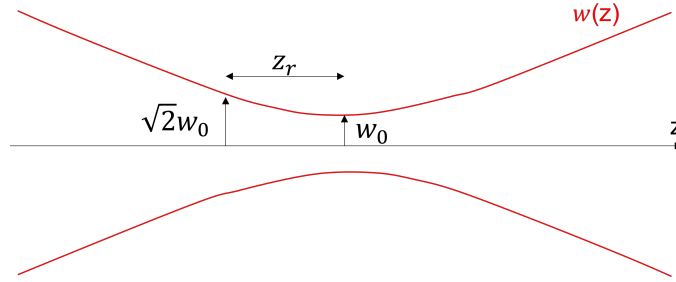


FIGURE 5.5 – Schéma de la propagation d'un faisceau gaussien. Connaissant la longueur de Rayleigh z_r il est possible de connaître de le waist $w(z)$ et inversement. La longueur de Rayleigh représente la longueur après laquelle le waist vaut $\sqrt{2}w_0$. Le waist est définie comme la distance par rapport au centre à laquelle l'intensité est divisée par e^2 .

L'optique matricielle nous permet de décrire n'importe quel système optique dans l'approximation paraxiale par une matrice de transfert 2x2 communément appelée matrice ABCD. En utilisant cette méthode, il est possible de suivre l'évolution d'un paramètre q du faisceau lors de sa propagation à travers différents éléments optiques. Ainsi, après le passage dans le système optique, on peut exprimer le nouveau paramètre complexe q' à la sortie :

$$q' = \frac{Aq + B}{Cq + D} \quad (5.2.6)$$

Tout d'abord le faisceau se propage à la sortie de la fibre sur une distance s_1 dans l'air avant d'atteindre la lentille⁷ :

$$q_1 = q_{fibre} + s_1 = i z_r + s_1 \quad (5.2.7)$$

La lentille cylindrique transforme ensuite q_1 en q_2 en utilisant la matrice ABCD :

$$q_2 = \frac{Aq_1 + B}{Cq_1 + D} \quad (5.2.8)$$

La suite du raisonnement diffère selon la configuration de la lentille cylindrique étudiée puisque l'interface de sortie n'est pas la même. Le reste du calcul est fait dans le cas de la lentille en contact

7. La matrice de transfert pour une distance s_1 dans un milieu homogène vaut : $\begin{pmatrix} 1 & d \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$

5.2. MICROSCOPIE À FEUILLE DE LUMIÈRE INTÉGRÉE À UNE PUCE MICROFLUIDIQUE

avec le PDMS à sa sortie, c'est-à-dire sans saut d'indice. Cela impose des interfaces différentes d'un côté et de l'autre de la lentille cylindrique.

Configuration sans saut d'indice

Soit M_{cyl} la matrice de transfert ABCD d'une lentille cylindrique d'indice n_g entouré d'air d'indice $n = 1$ d'une part et de PDMS d'indice n_p d'autre part :

$$M_{cyl} = \begin{pmatrix} -1 + \frac{2}{n_g} & \frac{2R}{n_g} \\ -\frac{n_g - 2n_p + n_g n_p}{n_g n_p R} & \frac{2}{n_g} - \frac{1}{n_p} \end{pmatrix} \quad (5.2.9)$$

Grâce aux coefficients ABCD identifiés de cette matrice de transfert d'une lentille cylindrique, on peut écrire q_2 de la façon suivante :

$$q_2 = \frac{BD + (BC + AD + ACs_1)s_1 + ACz_r^2}{(Cs_1 + D)^2 + C^2z_r^2} + i \frac{-z_r(BC + AD)}{(Cs_1 + D)^2 + C^2z_r^2} \quad (5.2.10)$$

A la sortie de la lentille cylindrique, une nouvelle propagation sur une distance s_2 s'opère au sein du PDMS puisque la lentille cylindrique est au contact du matériau, ainsi on transforme q_2 en q_3 :

$$q_3 = q_2 + s_2 \quad (5.2.11)$$

La rencontre avec l'interface PDMS/eau intervient après la propagation sur s_2 pour former q_4 ⁸ :

$$q_4 = \frac{n_w}{n_p} q_3 \quad (5.2.12)$$

Avec n_w l'indice de réfraction de l'eau. Finalement, le faisceau se propage dans le canal contenant l'eau sur une distance s_3 :

$$q_5 = q_4 + s_3 \quad (5.2.13)$$

Ces étapes de propagation et de transformation du faisceau peuvent être exprimées sous la forme d'une seule matrice représentant le système optique complet :

$$M_{sys} = \begin{pmatrix} 1 & s_1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s_2 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \frac{n_p}{n_w} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s_3 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.2.14)$$

La position du point focal z_f est atteinte lorsque le rayon de courbure du faisceau est infini et que le paramètre q est purement imaginaire. Cela représente en théorie le point où la focalisation est telle que le volume focal ne serait plus qu'un point. Cela se produit lorsque la distance s_3 vaut :

8. La matrice de réfraction ABCD sur une surface plane pour des indices de réfractons n_1 vers n_2 est la suivante :

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \frac{n_1}{n_2} \end{pmatrix}$$

$$s_3 = -\frac{n_w}{n_p} \left(\frac{BD + (BC + AD + ACs_1)s_1 + ACz_r^2}{(Cs_1 + D)^2 + C^2z_r^2} + s_2 \right) \quad (5.2.15)$$

En pratique, l'utilisation de calculs numériques (cf annexe :6.3.3) est beaucoup plus efficace pour évaluer et tracer l'évolution du faisceau dans l'espace. Ces calculs ont été réalisés grâce au module Diffraction-Interférence de Python appelé diffractio [116] basé sur un algorithme utilisant la méthode de propagation d'onde (WPM) [117]. En prenant comme paramètres d'entrée un diamètre de fibre de $125 \mu\text{m}$ qui représente le diamètre de la lentille, une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 125 \text{ nm}$ et des indices de réfractions $n_p = 1.447$, $n_w = 1.33$, $n_g = 1.47$ et $n = 1$, cela nous permet de tracer le graphique figure 5.6.A représentant la taille du waist du faisceau au sein du canal ainsi que sa longueur de Rayleigh en fonction de la distance entre la fibre laser et le bord de la lentille cylindrique. Pour appréhender facilement ce graphique, il faut prendre en compte que le waist et la longueur de Rayleigh sont des demi-longueurs du faisceau liées entre-elles. Ensuite, la largeur du canal microfluidique nous renseigne quant à la longueur de Rayleigh sur laquelle la feuille de lumière doit être homogène. Cette longueur de Rayleigh mène à une distance entre la fibre laser et la lentille qui elle-même nous permet de connaître la taille du waist. Le graphique A nous montre que le waist varie quasi-linéairement pour $127.5 \mu\text{m} \leq f_{\text{objet}} \leq 170 \mu\text{m}$, ce qui signifie que le positionnement de la fibre laser est relativement peu sensible à une erreur. Sur cette première partie de la courbe, une erreur de positionnement de la fibre laser à $\pm 10 \mu\text{m}$, le waist n'évolue que de $\pm 1.4 \mu\text{m}$.

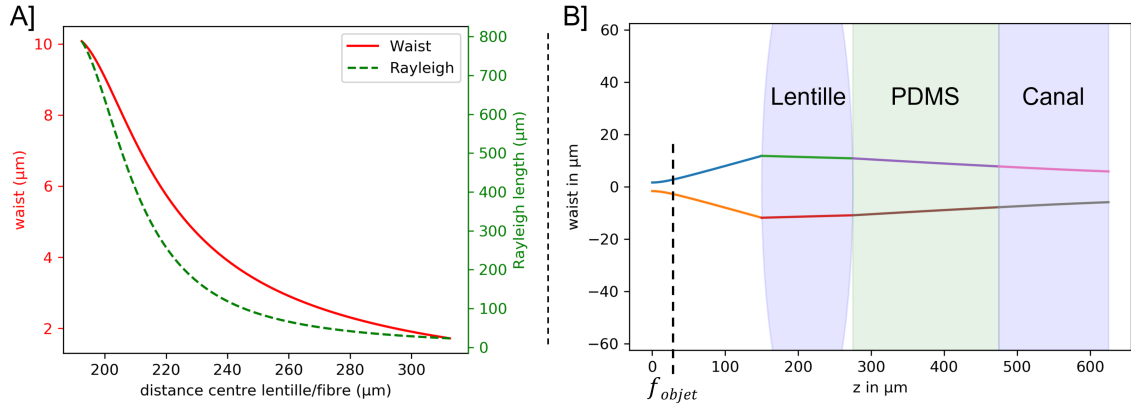


FIGURE 5.6 – A] Graphique représentant l'estimation du waist $w(z)$ du faisceau ainsi que sa longueur de Rayleigh z_r en fonction de la distance entre la fibre laser et le bord de la lentille cylindrique pour la configuration sans saut d'indice. B] Graphique représentant la propagation du faisceau pour la configuration sans saut d'indice pour une distance lentille/fibre de $150 \mu\text{m}$. Le position $f_{\text{objet}} = 127.5 \mu\text{m}$ représente la distance focale permettant de générer un faisceau collimaté.

Grâce à ces calculs numériques pour la configuration sans saut d'indice, on peut remarquer que la feuille de lumière générée possède une épaisseur supérieure à ce qui est atteignable pour des techniques telles que le SPIM (1 à $2 \mu\text{m}$), mais permet d'obtenir une zone d'observation étendue où la feuille de lumière conserve quasiment la même épaisseur. La partie suivante reprend le raisonnement précédent pour la configuration avec saut d'indice en regroupant directement les

résultats de l'optique matricielle.

Configuration avec saut d'indice

Le calcul peut être repris à partir du cas de la matrice de transfert d'une lentille cylindrique, mais entourée totalement d'air pour la configuration avec un saut d'indice. Soit M_{cyl} la matrice de transfert ABCD d'une lentille cylindrique d'indice n_g entouré d'air d'indice $n = 1$:

$$M_{cyl} = \begin{pmatrix} -1 + \frac{2}{n_g} & \frac{2R}{n_g} \\ -\frac{n_g - 2 + n_g}{n_g R} & \frac{2}{n_g} - 1 \end{pmatrix} \quad (5.2.16)$$

Ensuite, sans détailler les calculs des interfaces et des propagations, on peut exprimer le produit des matrices représentant le système complet de la façon suivante :

$$M_{sys} = \begin{pmatrix} 1 & s_1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s_2 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \frac{n}{n_p} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s_3 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \frac{n_p}{n_w} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s_4 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.2.17)$$

Avec s_1 la propagation dans l'air depuis la fibre laser jusqu'à la lentille, suivi de la matrice de transfert ABCD M_{cyl} . La propagation sur s_2 après la lentille se fait cette fois dans l'air avant de rencontrer l'interface air/PDMS. Une nouvelle propagation s_3 dans le PDMS d'indice n_p s'en suit jusqu'à atteindre l'interface PDMS/eau et finir par se propager sur une distance s_4 à nouveau dans l'eau d'indice n_w . De manière analogue à la première configuration, on peut trouver la position du point focal z_f lorsque le rayon de courbure du faisceau est infini et que le paramètre q est purement imaginaire. Cette fois, cela se produit lorsque la distance s_4 vaut :

$$s_4 = -\frac{1}{n_w} \left(n_p s_3 + s_2 + \frac{BD + (BC + AD + ACs_1)s_1 + ACz_r^2}{(Cs_1 + D)^2 + C^2z_r^2} \right) \quad (5.2.18)$$

En réalisant de nouveau ces calculs numériques, il est possible d'évaluer la taille du waist du faisceau en fonction de la distance entre la fibre laser et la lentille (voir la figure 5.7).

Ces résultats nous montrent que l'épaisseur de la feuille de lumière générée dans ces conditions peut atteindre des dimensions inférieures à la configuration sans saut d'indice avec potentiellement un meilleur contraste. En revanche, la longueur de Rayleigh est plus faible, ce qui réduit la zone d'étude dans le canal. En revanche, l'évolution de la position du waist n'est pas retranscrite sur ces graphiques alors qu'il varie rapidement lorsque la distance évolue entre la fibre laser et la lentille. Sur le plan pratique, cela rajoute une contrainte de positionnement du waist dans le canal microfluidique.

Les résultats des calculs numériques réalisés pour les deux configurations de feuille de lumière permettent d'établir les bases des expériences à réaliser. Afin de vérifier les propriétés réelles des feuilles de lumières en canal microfluidique, la suite de l'étude détaille la démarche expérimentale ainsi que les mesures effectuées pour caractériser les feuilles de lumière dans le cas des deux configurations.

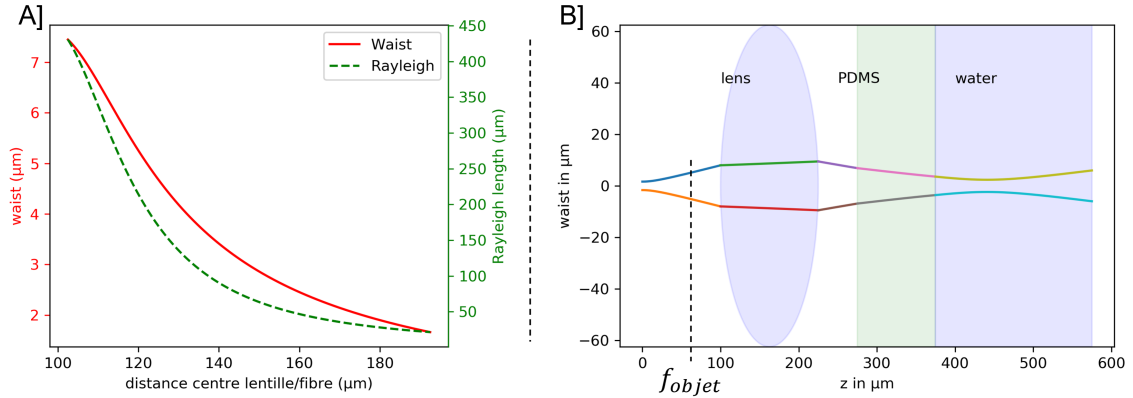


FIGURE 5.7 – A] Graphique représentant l’estimation du waist $w(z)$ du faisceau ainsi que sa longueur de Rayleigh z_r en fonction de la distance entre la fibre laser et le bord de la lentille cylindrique pour la configuration avec saut d’indice. B] Graphique représentant la propagation du faisceau pour la configuration avec saut d’indice pour une distance lentille/fibre de 160 μm . La position $f_{objet} = 100 \mu\text{m}$ représente la distance focale permettant de g nerer un faisceau collimaté.

5.3 Caractérisation des feuilles de lumière

Dans le but de caractériser une feuille de lumière, trois paramètres sont importants, le contraste, l’épaisseur et l’homogénéité. Les deux premiers sont liés, mais ne comportent pas la même information en fonction de l’application. Le contraste permet d’évaluer le rapport signal sur bruit des images alors que l’épaisseur de la feuille, malgré son influence sur le contraste, permet aussi de déterminer le volume dans lequel des particules en diffusion peuvent évoluer avant de s’en échapper. Pour le paramètre d’homogénéité, il peut être évalué selon l’épaisseur dans le canal, mais également dans le plan d’observation. La mesure de l’épaisseur de la feuille de lumière peut être réalisée grâce à différentes méthodes qui utilisent un signal de fluorescence ou de diffusion permettant d’imager le profil d’intensité du faisceau lumineux. Une première technique consiste à réaliser l’image d’une coupe transversale du faisceau grâce à un objectif perpendiculaire au plan d’observation [111]. Mais la réalisation de telles images nécessite le positionnement d’un objectif très proche du canal microfluidique qui est souvent complexe à accomplir en raison de l’agencement spatiale entre l’objectif et la puce microfluidique. Une autre méthode moins directe peut également permettre d’estimer l’épaisseur de la feuille de lumière en utilisant un microscope confocal ou une déconvolution d’une série d’images dans lesquels une solution fluorescente permet d’imager la feuille de lumière dans le plan d’observation. La série d’images agit comme une sonde le long du profil axial de la feuille de lumière qui permet de remonter à son épaisseur par une déconvolution du signal par la PSF du microscope. Afin d’établir une approche plus directe, nous avons choisi une méthode relativement connue [113] utilisant toujours une série d’images pour sonder le volume de la feuille, mais cette fois le signal collecté provient de nano-particules qui agissent comme une multitude de mini-sondes au sein de la feuille de lumière. En choisissant des billes de faible diam tre⁹, ces particules constituent

9. Inférieur au pouvoir de résolution du microscope.

des émetteurs ponctuels qui renvoient une information liée à l'intensité permettant de conclure quant à la position dans la feuille de lumière et donc son épaisseur. Ainsi, en réalisant une série d'images séparées d'une à quelques centaines de nm chacune, il est possible d'analyser l'évolution de l'intensité du signal des marqueurs lumineux suivant l'axe vertical comme l'illustre la figure 5.8. En connaissant le profil d'intensité gaussien de la feuille de lumière, on peut déterminer le seuil où les particules détectées ne sont plus considérées dans le volume d'excitation en s'appuyant sur le critère d'un *waist*, c'est-à-dire à I/e^2 . En couplant à cela un traitement numérique permettant de favoriser les émetteurs considérés dans le plan focal par rapport à ceux défocalisés, le profil d'intensité de la feuille de lumière peut être estimé.

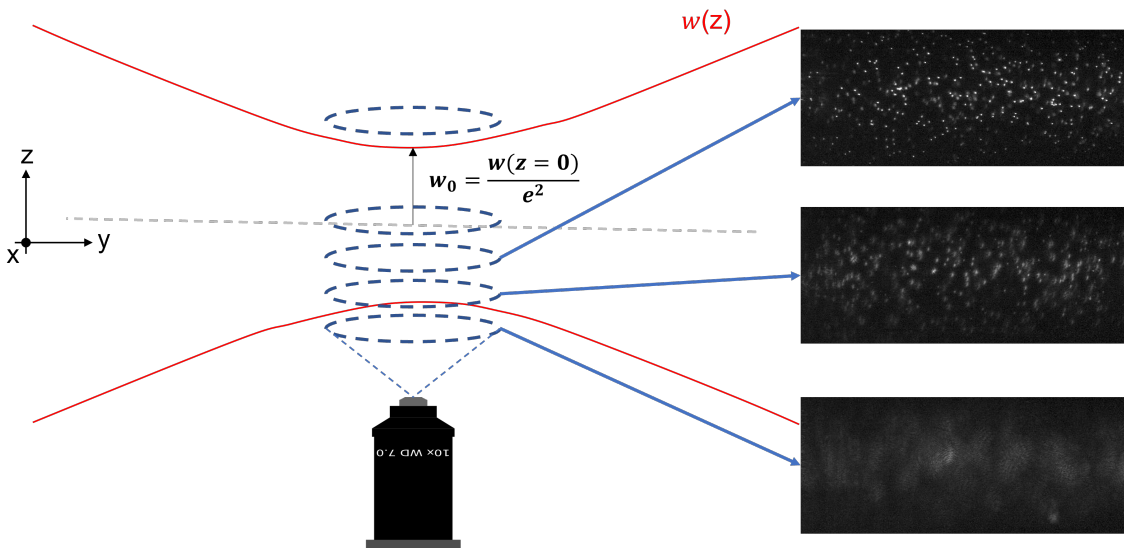


FIGURE 5.8 – Schéma représentant l'échantillonnage du profil de la feuille de lumière grâce à des images séparées d'un faible pas en Z afin d'en déduire la taille de la feuille de lumière.

Pour réaliser les séries d'images visant à mesurer l'épaisseur des feuilles de lumière dans les deux configurations, un objectif X20 ON = 0.75 est utilisé pour imager le signal de diffusion de billes de polystyrène de diamètre 220 nm. L'excitation est réalisée grâce à un laser semi-conducteur à 405 nm de puissance 50 mW injecté dans une fibre monomode d'une longueur de 2 m. Pour que le nombre de points de mesure soit statistiquement pertinentes, la concentration des billes doit être suffisante (> 1 bille/ μm^2). Ainsi, en tout plan d'observation dans la feuille de lumière, le nombre de points de mesure est similaire. Pour établir une expérience répétable, la construction de la série d'images permettant d'estimer le profil axial de la feuille de lumière est automatisée grâce à une platine de translation à trois axes dont la précision est de 150 nm et synchronisée avec le logiciel de prise d'images grâce à une interface LabVIEW. Afin d'optimiser l'information dans l'image, il faut s'assurer que la dynamique maximale est atteinte au centre de la feuille de lumière sans saturer. L'acquisition du stack d'images commence quelques μm en dehors de la feuille de lumière afin d'établir une base de signal représentant le bruit de fond de l'image. Progressivement, par pas de 200 nm de nouvelles images sont prises et laissent apparaître tout d'abord des motifs

très défocalisés qui sont les premières billes aux extrémités de la feuille de lumière, mais hors du plan focal de l'objectif, puis au passage dans la feuille de lumière s'ajoutent les billes très bien définies dans le plan focal. Lorsque la série d'images brutes est réalisée, plusieurs critères peuvent être envisagés pour établir le profil de la feuille de lumière. Certaines études s'appuient sur la mesure de la moyenne des intensités des billes détectées à laquelle a été soustraite la moyenne du bruit de fond local [113].

Soit I_{moy} la moyenne des intensités mesurées des billes sélectionnées sur l'image :

$$I_{moy} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N I_b(n) - I_{bg}(n) \quad (5.3.1)$$

Avec $I_b(n)$ la moyenne de l'intensité des pixels constituant la particule et $I_{bg}(n)$ la moyenne de l'intensité des pixels contenus dans un anneau à l'extérieur de la particule. Cette méthode permet de tracer un profil d'intensité moyenne qui varie avec le profil gaussien de la feuille de lumière. Grâce à ce profil d'intensité, il est possible de déterminer l'épaisseur de la feuille de lumière en se basant sur la définition du *waist* du faisceau gaussien. Le *waist* est la distance au centre du faisceau pour laquelle l'intensité est divisée par e^2 . Néanmoins, cette méthode utilise en premier lieu un seuillage (établi par l'utilisateur) qui permet de filtrer selon l'intensité des billes dans l'image. Ce critère peut comporter des biais puisque l'estimation de la taille de la feuille de lumière utilise l'intensité comme paramètre de mesure. Afin de s'affranchir des paramètres trop dépendant de l'utilisateur, plusieurs méthodes détaillées dans la partie suivante ont été testées.

5.3.1 Caractérisation par le nombre de particules

La première méthode abordée pour mesurer l'épaisseur de la feuille de lumière utilise le nombre de particules détectées selon la position dans la feuille de lumière. L'idée se base sur un seuillage très fort établi grâce au profil de la PSF du microscope afin de sélectionner uniquement les particules dans le plan focal. Ainsi, le nombre de particules détectées doit évoluer avec la position dans la feuille de lumière par raréfaction des particules respectant le critère d'intensité. Cette mesure est en partie biaisée par le seuil choisi ainsi qu'un effet de convolution entre les deux comportements. Tout d'abord, en s'appuyant sur l'intensité moyenne des particules détectées, le phénomène de défocalisation peut venir perturber les données. Lorsqu'une particule s'écarte du plan focal, l'intensité moyenne dans sa partie centrale tend à décroître comme le montre la figure 5.9A. Établir un critère qui filtre les particules défocalisées selon leur intensité risque également de perturber les données en raison du profil d'intensité de la feuille de lumière qui évolue a priori comme une gaussienne selon l'axe vertical. Le risque est de filtrer une particule considérée hors plan focal alors que celle-ci est au bord de la feuille de lumière et bel et bien dans le plan focal. La superposition de ces deux phénomènes résulte en une convolution entre deux profils, l'un qui est l'intensité de la feuille de lumière et l'autre qui est l'intensité de la défocalisation d'une particule. La figure 5.9B montre l'aspect de la feuille de lumière lorsqu'elle est échantillonnée selon le nombre de particules détectées pour une distance lentille/fibre¹⁰ de 172 μm dans le cas de la lentille collé au PDMS. On remarque que la taille est sous-estimée par rapport aux calculs théoriques avec une largeur à mi-hauteur¹¹ de 7.4 μm . Cela nous permet de constater que cette méthode n'est pas assez fiable

10. Mesure réalisée en mesurant la distance lentille-fibre via des images en champ clair obtenues avec un objectif X20 d'ouverture numérique de 0.75.

11. Mesure réalisée grâce à la largeur à mi-hauteur (discutable également).

5.3. CARACTÉRISATION DES FEUILLES DE LUMIÈRE

pour mesurer l'épaisseur de la feuille de lumière et qu'il est nécessaire de se baser sur un critère plus pertinent.

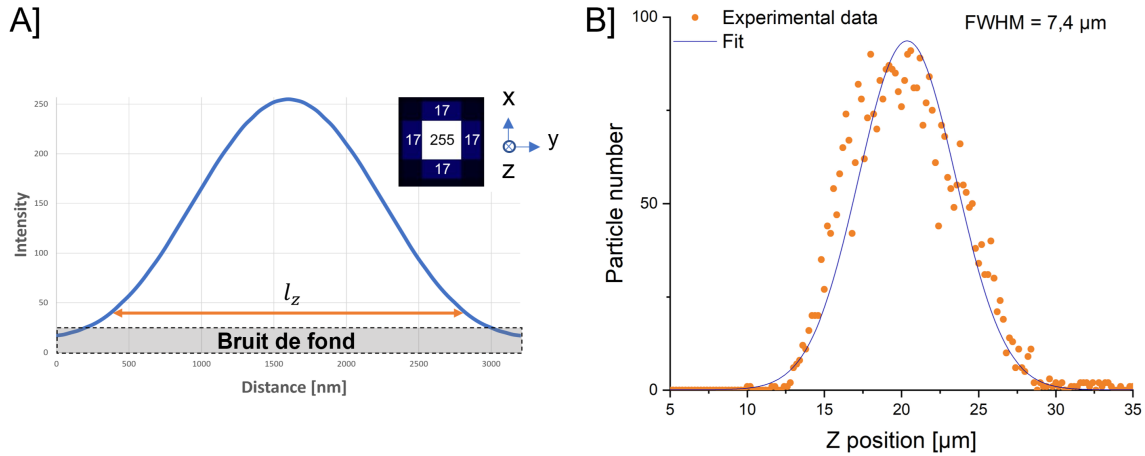


FIGURE 5.9 – A] Simulation (PSF generator, Fiji) de la PSF du microscope ($\text{ON}=0.75$, $\lambda = 405$ nm, taille pixel = 263 nm, dynamique = 8 bits) et son profil axial. l_z représente la profondeur de détection de l'objectif (détaillé plus tard). B] Profil de la feuille de lumière obtenu grâce au nombre de particules détectées selon un filtrage basé sur l'intensité des particules (FWHM = Largeur à mi-hauteur).

5.3.2 Caractérisation par la moyenne des intensités pondérées

Nous avons vu précédemment que le critère d'intensité moyenne seul n'est pas optimal en raison du seuillage et de la défocalisation. Mais il est possible de relier l'intensité moyenne à un autre paramètre afin de donner un poids plus important aux particules dans le plan focal (c'est-à-dire très localisée et intense) que celles hors du plan focal. Les méthodes précédentes sont très dépendantes du seuillage initial qui est souvent discutable. Ici, l'idée est de se détacher de la forte dépendance avec le seuil en détectant toutes les particules, même très défocalisées pour ensuite leur attribuer un poids. Ce poids permet aux images contenant beaucoup de particules intenses dans le plan focal de se démarquer du bruit sur les extrémités de la feuille de lumière lors du tracé du profil axial. Le contraste, dont le calcul compare l'intensité moyenne au centre de la particule avec le bruit de fond dans sa périphérie, est un très bon pondérateur pour débruiter le tracé de l'intensité moyenne. Lorsque des particules sont dans le plan focal de l'objectif, elles présentent un motif intense et localisé qui induit un fort contraste, alors que des particules hors du plan focal possèdent un motif dont le signal est très étalé et donc un faible contraste. Grâce à cela, les images des extrémités de la feuille de lumière ne contenant que des particules défocalisées ont un poids moins important en raison de leur faible contraste. Cette méthode permet également de s'affranchir d'un seuillage discutable puisque pour détecter toutes les particules, même les plus défocalisées, le seul seuillage opéré est celui permettant de filtrer le bruit de fond de la caméra.

Calcul de la moyenne des intensités pondérées

Afin de calculer l'intensité moyenne des particules dans chaque image, la première approche a été de réaliser un algorithme effectuant la détection et les calculs. Mais il s'est avéré que le plugin TrackMate de Fiji est très bien optimisé et qu'il est difficile d'imaginer pouvoir faire aussi bien en peu de temps. Néanmoins, cet outil est utilisé pour son détecteur LoG (Laplacien d'une gaussienne) et ses calculs numériques qui sont décrits en détail dans le chapitre précédent (voir section 4.3). À l'origine, cet algorithme est dédié à la construction de trajectoires à partir d'une série d'images. Ici, ce n'est pas le cas et seule la partie détection des spots lumineux est utilisée pour profiter des outils de détection. Les mesures réalisées sur les particules prennent en compte le diamètre que l'utilisateur renseigne au départ et effectue les calculs à l'intérieur de ce cercle (diamètre d'entrée). Ce diamètre choisi doit contenir uniquement le signal issu de la particule et le moins possible de pixels du fond continu pour éviter de biaiser les mesures de contraste. Ensuite, en appliquant un seuillage légèrement supérieur au bruit de fond, cela assure d'obtenir des images qui contiennent toujours des détections de particules, même aux extrémités de la feuille de lumière. Lorsque toutes les images sont traitées par l'algorithme, des données brutes sont générées pour chaque particule détectée de chaque image. Les deux types de données qui nous intéressent sont l'intensité moyenne de chaque particule et son contraste. Soit I_b l'intensité moyenne d'une seule particule et $\langle I_b \rangle$ la moyenne de l'intensité des particules sur une image :

$$I_b = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N I_{part}(n) \quad (5.3.2)$$

Avec N le nombre de pixels contenu dans le diamètre de la particule et I_p l'intensité d'un pixel contenu dans la particule.

$$\langle I_b \rangle = \frac{1}{B} \sum_{b=1}^B I_b \quad (5.3.3)$$

Avec B le nombre de particules dans l'image. En se limitant à cette mesure seule, le profil de la moyenne des intensités des particules selon la position dans la feuille de lumière est fortement bruité comme l'atteste la figure 5.11.A. En ajoutant le contraste pour pondérer la moyenne des intensités, les mesures sur les extrémités de la feuille de lumière retrouvent de la pertinence. Soit C le contraste d'une particule :

$$C = \frac{I_b - I_{out}}{I_b + I_{out}} \quad (5.3.4)$$

Avec I_{out} l'intensité moyenne dans un anneau dont le rayon vaut le double de celui utilisé pour I_b . Le contraste peut varier entre 0 et 1 et permet de qualifier une particule défocalisée ou non. Lorsqu'une particule se situe dans le plan focal, seuls quelques pixels au centre sont intenses, puis le signal décroît fortement comme le montre la figure 5.10A.

Le simple produit de la moyenne des intensités et de la moyenne des contrastes dans une même image permet de construire un profil de la feuille de lumière beaucoup moins bruité comme le montre la figure 5.11. Soit $\langle I_c \rangle$ le produit de la moyenne des intensités et de la moyenne des contrastes :

$$\langle I_c \rangle = \langle I_b \rangle \cdot \langle C \rangle \quad (5.3.5)$$

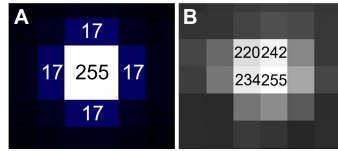


FIGURE 5.10 – Comparaison du profil théorique de la PSF du microscope dans le plan focal en A] et du profil réel d’une particule dans le plan focal en B].

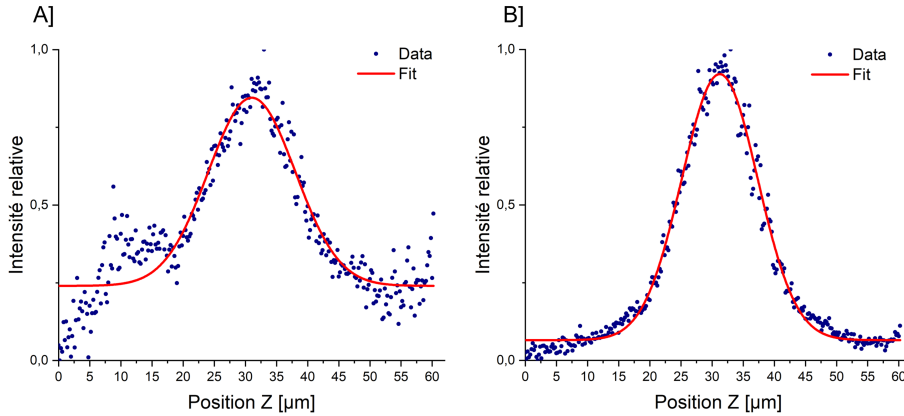


FIGURE 5.11 – Comparaison du profil de la même feuille de lumière tracé grâce à A] la moyenne des intensités et B] la moyenne des intensités pondérées par la moyenne des contrastes.

Grâce au profil axial en intensité de la feuille de lumière, il est possible d’en déduire l’épaisseur en calculant la largeur du profil lorsque celui-ci atteint la valeur $\langle I_c \rangle_{max} / e^2$. La suite de l’étude se base sur cette méthode pour étudier l’épaisseur des feuilles de lumière générées pour différentes distances lentille/fibre.

En pratique, la dynamique des images est souvent difficile à optimiser en raison du profil en intensité de la feuille de lumière qui évolue rapidement au centre. Habituellement, l’utilisateur ajuste le temps d’exposition de la caméra pour qu’aucun pixel ne sature. Mais dans le cas d’une feuille de lumière, trouver la position qui maximise l’intensité est difficile et demande souvent au moins une itération de l’expérience afin de trouver la dynamique optimale. Les conditions au sein du canal microfluidique doivent être relativement statiques, un faible mouvement de dérive n’est pas dérangeant tant qu’il ne génère pas de flou de mouvement sur les images puisqu’il faut conserver l’aspect ”ponctuel” des émetteurs. Les particules utilisées sont des billes de polystyrène de rayon 110 nm et cette fois-ci, c’est le signal de diffusion est dominant sur la fluorescence (section efficace de $15\,000\text{ nm}^2$). Les images sont réalisées avec une caméra monochrome CMOS (UI-3240ML, Stemmer Imaging) avec une résolution de 3.8 pixels/ μm , 8 bits avec un *global shutter*. Le temps d’exposition des images vaut 6 ms avec une cadence de 1 image/s afin de laisser le temps à l’échantillon de se déplacer de 200 nm et de se stabiliser.

5.3.3 Résultats en configuration sans saut d'indice

Afin de vérifier l'accord entre les calculs théoriques et l'expérience, le premier modèle de puce de la figure 5.4A1 est utilisé afin d'estimer la taille réelle de la feuille de lumière au sein du canal microfluidique.

Amélioration du rapport signal sur bruit

Tout d'abord, l'aspect visuel apporté par l'amélioration du contraste est le plus flagrant pour justifier l'utilisation d'une lentille cylindrique pour générer une feuille de lumière, comme cela est illustré sur la figure 5.12. Pour s'en convaincre, le rapport signal sur bruit est calculé grâce à l'intensité moyenne des particules dans le plan focal I_b et I_{bg} l'intensité moyenne du bruit de fond autour des particules, $SNR = I_b/I_{bg}$. Le SNR vaut respectivement 1.9 et 10 pour la configuration sans lentille et avec lentille¹², ce qui montre une amélioration considérable du contraste grâce à la feuille de lumière.

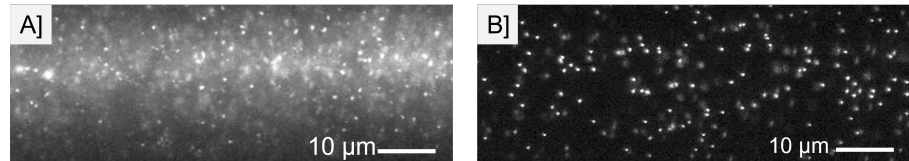


FIGURE 5.12 – Comparaison de l'aspect visuel d'une feuille de lumière générée : A] par l'ouverture numérique d'une fibre optique (ON=0.12) dont l'épaisseur est estimée à 45 μm . B] par le système fibre/lentille cylindrique où l'épaisseur est réduite à environ 12.5 μm .

Taille du faisceau en fonction de la distance focale

Grâce à l'équation 5.2.1, on connaît la distance fibre/lentille pour laquelle la feuille de lumière est collimatée. En positionnant la fibre plus près de la lentille que f_{objet} , le faisceau devient divergent et si la distance est plus grande, il converge. Pour $f_{objet} = 190 \mu\text{m}$ le faisceau collimaté fait 20 μm d'épaisseur¹³ et sert de référence pour conclure quant à la divergence ou convergence du faisceau expérimental. Afin d'évaluer pleinement le potentiel de cette configuration, les mesures de la taille de la feuille de lumière doivent être réalisées pour plusieurs positions autour de la distance focale qui permet d'obtenir un faisceau collimaté. Pour chacune des positions étudiées, la feuille de lumière doit également être analysée en séparant l'image en plusieurs portions dans la largeur du canal afin d'estimer la divergence ou convergence du faisceau. Pour caractériser le comportement de la feuille de lumière lorsque la distance lentille/fibre change, trois distances focales différentes sont étudiées. La première où la feuille de lumière est légèrement divergente est à $f_{objet} = 172 \mu\text{m}$. Le deuxième cas est à $f_{objet} = 207 \mu\text{m}$ pour lequel la feuille doit être faiblement convergente. La dernière mesure est réalisée pour une distance $f_{objet} = 240 \mu\text{m}$ qui doit former un faisceau encore plus convergent que la précédente. Pour chaque profil d'intensité mesuré, deux valeurs de la taille du faisceau sont

12. Cette valeur est sûrement sous-estimée en raison d'une saturation des pixels appartenant aux particules dans le plan focal. On aurait pu également calculer I_b à partir du pixel le plus brillant d'une particule au focus et non la moyenne des pixels contenus dans la PSF.

13. La distance focale est mesurée à partir du centre de la lentille.

extraites à partir des courbes. Ceci est dû à un manque d'accord de la communauté scientifique quant au critère mesurant l'épaisseur des feuilles de lumière. Afin d'éviter toute confusion, les mesures de taille sont réalisées pour $I_{max}/2$ (le critère le plus répandu) et I_{max}/e^2 . Une première série de mesures sur la figure 5.13 montre le profil axial en intensité de la feuille de lumière découpée en trois portions dans le canal microfluidique pour une distance focale objet de $207 \mu\text{m}$.

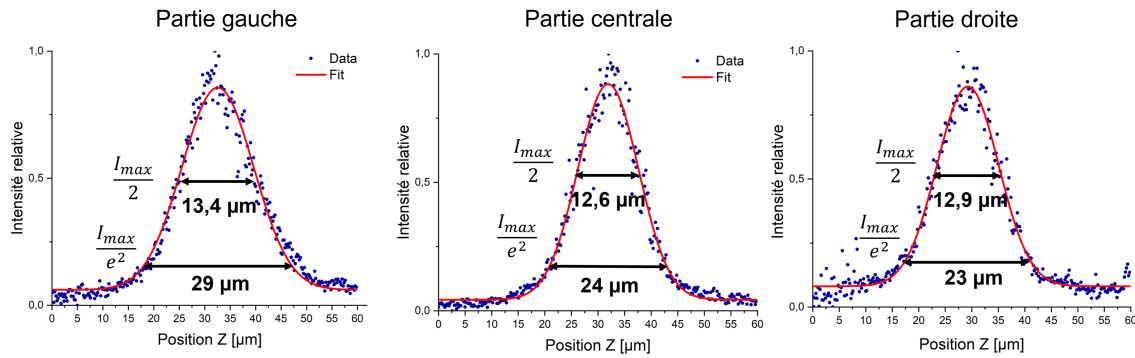


FIGURE 5.13 – Profil axial en intensité relative de la feuille de lumière découpée en trois parties dans le cas d'une distance $f_{objet} = 207 \mu\text{m}$.

En se référant à la largeur à mi-hauteur qui est la mesure la moins bruitée, on remarque que l'épaisseur varie selon l'axe de propagation du faisceau avec une épaisseur de $13.4 \mu\text{m}$ plus importante à la sortie du canal qu'en entrée où il fait $12.9 \mu\text{m}$. Cela nous informe quant à une possible divergence du faisceau. Cela ne s'accorde pas avec les calculs théoriques évoqués précédemment qui prévoient un faisceau convergent au-delà d'une distance focale de $f_{objet} = 190 \mu\text{m}$. Afin de justifier cela, on sait grâce aux calculs théoriques que la divergence/convergence des faisceaux est faible pour une telle distance focale. En ajoutant à cela que les mesures près des bords du canal microfluidique sont moins fiables en raison des artefacts (réflexion, diffusion), on peut conclure qu'il est difficile d'estimer précisément l'évolution de l'épaisseur de la feuille de lumière selon l'axe de propagation. Afin d'être cohérent face à l'estimation de l'épaisseur des feuilles de lumière en fonction de la distance lentille/fibre, seules les mesures réalisées sur une portion centrale large de $35 \mu\text{m}$ sont utilisées. La figure 5.14 présente les mesures du profil d'intensité des feuilles de lumière pour les distances focales A] $172 \mu\text{m}$, B] $207 \mu\text{m}$ et C] $240 \mu\text{m}$. Ces mesures nous montrent que les positions relativement proches de la distance focale $f_{objet} = 190 \mu\text{m}$ (faisceau collimaté), sont les plus pertinentes afin d'obtenir une épaisseur réduite et surtout homogène qui engendre une amélioration du contraste. Les épaisseurs mesurées à $I_{max}/2$ pour les distances focales de $f_{objet} = 172, 207, 240 \mu\text{m}$ sont respectivement évaluées à $(12.1 \pm 1.5) \mu\text{m}$, $(12.6 \pm 1.0) \mu\text{m}$ et $(19 \pm 4) \mu\text{m}$. En revanche, à la différence des calculs théoriques, la position $f_{objet} = 240 \mu\text{m}$ ne montre pas d'amélioration de l'épaisseur de la feuille de lumière. Ce phénomène peut être provoqué par un profil de feuille de lumière irrégulier qui laisse penser à un défaut d'expérience ou des artefacts¹⁴.

Une deuxième hypothèse pour expliquer cette différence de profil du faisceau est qu'un mauvais contact à l'interface lentille/PDMS qui est réalisé par la contrainte qu'exerce la fibre sur son

14. Une lentille ou une fibre désaxée peut déformer l'aspect de la feuille de lumière et rendre la mesure inexploitable. D'autre part, si l'on sort des conditions de Gauss, des aberrations sphériques peuvent apparaître.

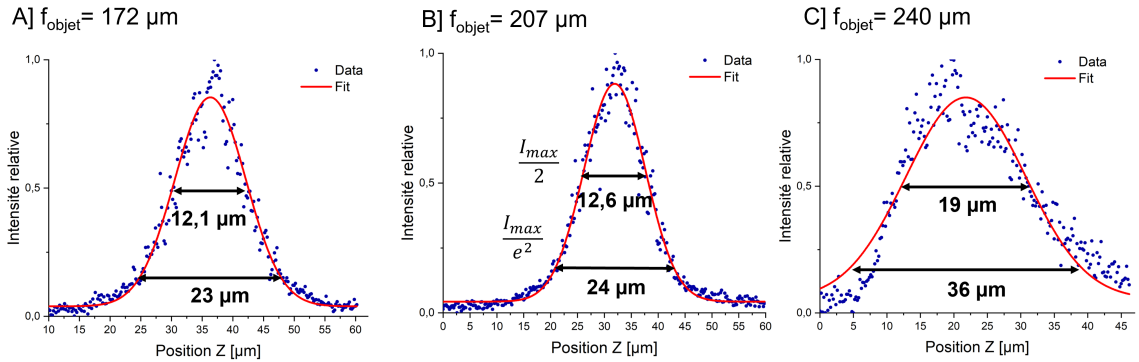


FIGURE 5.14 – Profil axial de l’intensité relative des feuilles de lumière pour les trois distances focales objet $f_{objet} = 172, 207, 240 \mu\text{m}$. Chaque mesure est réalisée sur une portion centrale de $35 \mu\text{m}$ issue de la série d’images de la feuille de lumière.

entourage possédant des propriétés élastiques. Néanmoins, la qualité de ce contact est discutable du point de vue de la surface par laquelle le faisceau sort de la lentille. La figure 5.15 représente les situations que le faisceau peut subir en fonction du contact avec le PDMS et surtout lorsqu’il n’est pas optimal en 2]. La situation B2] est d’autant plus probable que le diamètre du faisceau est grand à la sortie de la lentille puisqu’une distance plus grande entre la lentille et la fibre augmente le diamètre du faisceau de sortie à l’interface lentille/PDMS.

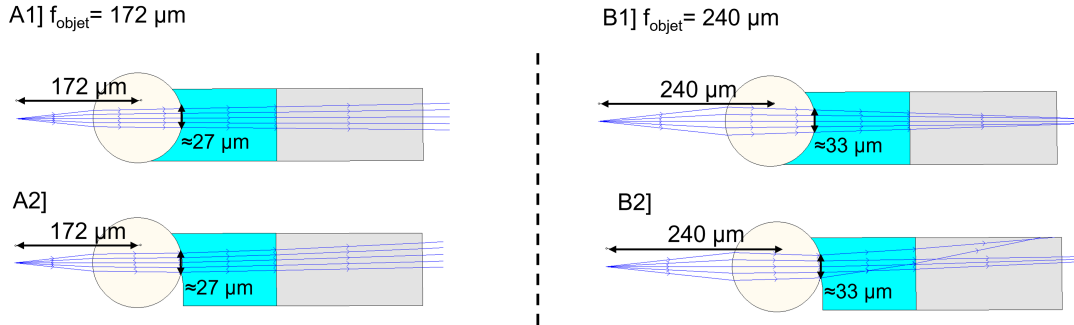


FIGURE 5.15 – Simulation grâce au logiciel OptGeo. Schémas simplifiés représentant les feuilles de lumière pour deux distances focales : A1], B1] Cas idéal où le PDMS adopte la forme de la fibre insérée. A2] et B2] Cas envisagé où le PDMS est partiellement en contact avec la fibre.

Pour conclure quant à la performance de cette configuration sans saut d’indice, on peut évoquer une forte amélioration du rapport signal sur bruit. Comparé à la solution n’utilisant pas de lentille cylindrique, le SNR est multiplié par 5 grâce à une épaisseur de la feuille de lumière pratiquement divisée par 4. L’avantage de cette solution réside dans sa fiabilité puisqu’une incertitude sur le positionnement de la fibre par rapport à la lentille n’influence que très peu le contraste de la feuille de lumière. Ce point est important puisque la méthode se base sur une insertion manuelle de la fibre

dans la puce microfluidique qui peut donner lieu à des incertitudes de positionnement. En raison d'une faible divergence/convergence, la taille axiale de la feuille de lumière peut être considérée quasi-constante au regard du contraste dans la direction de propagation du faisceau. Néanmoins, cette solution n'apporte pas toujours la résolution axiale optimale pour certaines expériences qui nécessitent un sectionnement optique très fort. Ce point nous amène à la partie suivante qui traite de l'autre configuration de positionnement de la lentille cylindrique pour permettre de focaliser le faisceau au sein du canal.

5.3.4 Résultats en configuration avec saut d'indice

Dans cette partie, la configuration étudiée est celle où la lentille cylindrique est séparée de la paroi en PDMS par une encoche d'air (figure 5.4B2). Cette disposition est largement plus difficile à mettre en place efficacement pour plusieurs raisons. Premièrement, dans cette configuration, une erreur de positionnement de $10\ \mu\text{m}$ peut déplacer la *waist* hors du canal et laisse place à un faisceau très inhomogène en termes d'épaisseur (forte divergence ou convergence). Une situation qui est très probable lorsque la fibre doit être insérée manuellement à une telle précision. Théoriquement, la position optimale de la fibre par rapport au centre de la lentille est à $160\ \mu\text{m}$, afin que le *waist* soit positionné au centre du canal microfluidique (voir figure 5.7). Cela signifie que la fibre doit être positionnée à $100\ \mu\text{m}$ du bord de la lentille. Avec l'apparition de l'encoche d'air pour le saut d'indice, le faisceau sortant de la lentille est très sensible à l'interface air/PDMS et ses défauts de surface. Les puces microfluidiques sont conçues par nos propres moyens et comportent des micro-défauts dus à la résolution de l'imprimante 3D, (voir section 3.2.3). Comme on peut le remarquer sur la figure 5.17A, un défaut de surface de l'encoche d'air génère des franges par réfraction. En raison de la qualité de réalisation des puces microfluidiques, les parois peuvent être légèrement inclinées (voir figure 5.16) à cause de la méthode d'insolation des moules des puces.

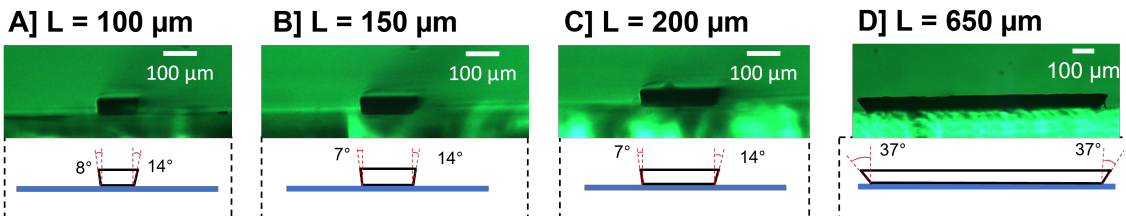


FIGURE 5.16 – Images de la forme des moules des canaux microfluidiques où une inclinaison apparaît en fonction du temps d'insolation.

L'angle des parois provoque une réfraction à l'interface air/PDMS qui incline la feuille de lumière comme l'illustre l'effet de défocalisation des extrémités de l'image sur la figure 5.17B. Finalement, seuls quelques séries d'images sont exploitables grâce à des puces microfluidiques dont la qualité est supérieure à la moyenne¹⁵ et où la fibre a pu être placée au plus près de la position théorique optimale pour positionner le *waist* du faisceau au centre du canal microfluidique. Les figures 5.17C et D montrent l'aspect visuel du centre de la feuille pour des positions à $97\ \mu\text{m}$ et $126\ \mu\text{m}$ du centre de la lentille. Ces deux séries d'images exploitables permettent d'estimer les épaisseurs mesurées

15. De l'ordre d'une puce sur dix.

CHAPITRE 5. MICROSCOPIE À FEUILLE DE LUMIÈRE EN CANAL MICROFLUIDIQUE

à mi-hauteur des feuilles de lumière respectives de $(17.4 \pm 1.5)\mu\text{m}$ et $(14.3 \pm 1.0)\mu\text{m}$. Les SNR respectifs sont également plus faibles que la configuration sans saut d'indice, avec un rapport de signal sur bruit de 3.5 et 8 respectivement pour une distance focale de $97\mu\text{m}$ et $126\mu\text{m}$.

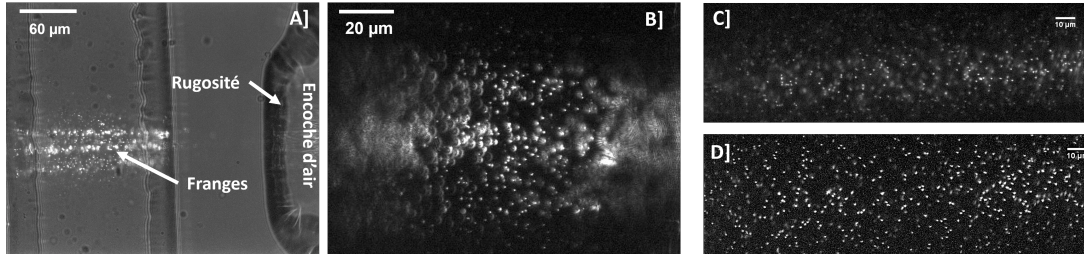


FIGURE 5.17 – Images au "centre" de la feuille de lumière. A] Présence de franges lumineuses dans la feuille. B] Feuille de lumière inclinée au sein du canal. C] et D] Feuille de lumière pour une puce avec peu de défauts et des distances focales respectivement de $97\mu\text{m}$ et $126\mu\text{m}$.

Pour conclure quant aux résultats pour cette configuration avec un saut d'indice, on peut avant tout évoquer que la qualité de fabrication des puces n'est pas suffisante pour pleinement profiter de l'intérêt de cette méthode qui est dégradé par des artefacts créés aux interfaces. Néanmoins, le but de l'intégration d'une fibre optique comme lentille cylindrique est de réaliser facilement une feuille de lumière afin d'améliorer le contraste des images. Cette dernière méthode ne correspond pas tout à fait aux critères puisqu'elle nécessite un placement très précis de la fibre qui est complexe manuellement. De plus, en focalisant fortement une feuille de lumière pour réduire son épaisseur, elle devient utilisable uniquement sur une zone très localisée. On peut imaginer qu'une feuille de lumière dont le waist atteint une très faible épaisseur ($\approx 2\mu\text{m}$)¹⁶ adopte un aspect à travers la caméra qui s'apparente à l'image B de la figure 5.17 où seule une zone très restreinte est nette avec un bon SNR.

Pour reprendre les résultats des deux configurations, on peut conclure que la solution sans saut d'indice présente une amélioration considérable du contraste avec une épaisseur d'une dizaine de micromètres sur une large portion du canal. Une telle épaisseur n'est pas toujours optimale pour des applications d'imagerie qui demandent un sectionnement optique très fin ($\approx 1 - 2\mu\text{m}$) mais d'autres applications telles que le suivi individuel de particules sont parfaitement adaptées. Pour la configuration avec saut d'indice, il est difficile de conclure quant à sa performance puisque la qualité des puces microfluidiques n'a pas permis d'avoir assez de résultats exploitables. Néanmoins, sa difficulté quant au positionnement manuel de la fibre laser indique que cette configuration est peu adaptée à la méthode expérimentale. Afin de développer une application de la configuration sans saut d'indice qui dispose d'un bon contraste avec une taille de feuille de lumière, la section suivante présente le suivi de particules en diffusion grâce à ce système.

5.4 Application au suivi de particules en diffusion

La plupart du temps en imagerie, le volume d'excitation qui définit la résolution axiale est le plus petit possible afin d'obtenir le meilleur sectionnement optique et ainsi un meilleur contraste. Lorsque

16. Valeur estimée grâce au même type de calculs matriciels présentés précédemment.

l'on s'intéresse au suivi de particule en diffusion, le contraste est loin d'être le seul paramètre qui influence la précision de la mesure. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la caractérisation en taille de particules nécessite d'observer les trajectoires issues de la diffusion. Ces trajectoires sont d'autant plus pertinentes qu'il y a de points qui les constituent. Ainsi, dans le cas du SPT, une particule, excitée par une feuille de lumière très fine, s'en échapperait rapidement au bout de quelques positions et laisserait une forte incertitude lors de l'estimation de sa taille.

5.4.1 Profondeur du champ de détection

L'épaisseur de la feuille de lumière est donc un paramètre très important afin d'établir une estimation pertinente de la taille des particules. Néanmoins, comme évoqué précédemment, la communauté scientifique n'est pas accordée quant au critère qui fixe la limite spatiale de la feuille de lumière. La définition d'un waist de faisceau gaussien situe cette limite spatiale à I/e^2 alors que de nombreux articles définissent la limite à $I/2$. En revanche, dans le cas du suivi de particule, il est intéressant de comparer la taille du volume permettant de détecter les particules et la taille du volume d'excitation. Le volume de détection du signal des particules n'est pas seulement limité à la profondeur de champ de l'objectif (DOF¹⁷) mais également à la sensibilité du détecteur. Lorsqu'une particule s'éloigne du plan focal, son signal prend la forme d'une tâche d'Airy qui tend à s'étaler sur une aire de plus en plus grande à mesure qu'elle s'éloigne, jusqu'à se confondre avec le signal de bruit de fond de la caméra. Une définition plus pragmatique peut ainsi être définie pour la profondeur de champ de détection en considérant l'évolution du signal d'une particule lorsqu'elle se défocalise. Un calcul numérique de l'évolution de la PSF est illustré sur la figure 5.18A et nous permet d'estimer la distance $l_z/2$ à laquelle une particule peut être éloignée du plan focal, mais tout de même être détectée par rapport au bruit de fond des images.

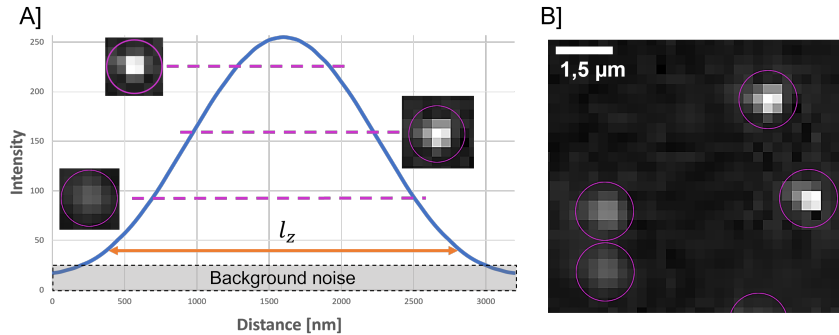


FIGURE 5.18 – A] Calcul numérique du profil axial d'intensité de la PSF du microscope pour une ouverture numérique de $ON = 0.75$ et une longueur d'onde $\lambda = 405 \text{ nm}$. La profondeur de détection des particules est indiquée par l_z . Calcul effectué grâce au plugin *PSF generator* de *Fiji*. B] Images de particules de diamètre 200 nm à différentes positions axiales au sein d'une feuille de lumière dont l'intensité est reportée sur la figure A.

En fonction du bruit de fond des images, la profondeur de détection diffère. Les images obtenues nous permettent d'évaluer le bruit de fond à $22/255$ ce qui engendre une profondeur de détection

17. Depth of field

$l_z = 2.5 \mu\text{m}$. Cela signifie qu'une particule au sein de la feuille de lumière, mais éloignée à $1.25 \mu\text{m}$ du plan focal, ne peut pas être distinguée du bruit de fond. Cela permet de conclure que l'épaisseur optimale de la feuille de lumière est atteinte lorsque le waist w_z vaut $1.25 \mu\text{m}$ afin de correspondre à la profondeur de détection. Les résultats de l'estimation de la demi épaisseur des feuilles de lumière ($\approx 6 \mu\text{m}$) ne correspondent pas à la valeur optimale calculée ($1.25 \mu\text{m}$). Une telle épaisseur n'est pas atteignable pour la configuration sans saut d'indice puisqu'en se référant au graphique de la figure 5.6A, la distance entre la lentille et la fibre laser doit atteindre $250 \mu\text{m}$. Cette distance engendre trop d'aberrations du faisceau en raison des conditions de Gauss qui ne sont pas respectées. On peut donc se satisfaire d'une feuille de lumière plus épaisse que la profondeur de détection pour profiter d'un fort contraste sur une plus grande zone. En reprenant le raisonnement du chapitre précédent par rapport au temps de résidence d'une particule dans le volume de collection de l'objectif, on peut estimer le nombre moyen de positions qu'une trajectoire doit contenir en fonction de la cadence vidéo. A la différence de la microscopie non-linéaire, les caméras de type CMOS peuvent atteindre des cadences d'acquisition bien plus élevées et ainsi donnent accès à plus de positions à temps égal. Néanmoins, en raison du faible volume de détection, un plus grand nombre de trajectoires possèdent peu de points. Afin de prendre en compte ces trajectoires contenant un faible nombre de positions, l'algorithme d'estimation des tailles nécessite quelques ajustements afin de favoriser le résultat des trajectoires les plus longues.

5.4.2 Méthode de la somme des gaussiennes normalisées

Cette méthode, qui, a notre connaissance, n'est pas encore présentée dans la littérature, doit permettre de s'adapter aux résultats expérimentaux qui comportent souvent beaucoup de trajectoires courtes dont la fiabilité est faible. Statistiquement, lorsque des particules sont en diffusion dans un volume de collection limité, le nombre de points dans chacune des trajectoires peut varier selon une distribution gaussienne. Néanmoins, en fonction de leur longueur, les trajectoires ne possèdent pas toutes la même incertitude par rapport à leur déplacement carré moyen qui dépend du nombre de points de la trajectoire. Ainsi, l'estimation des tailles issue des trajectoires est reliée à un poids qu'elle constitue dans la distribution finale des tailles. Ce poids est représenté par une gaussienne normalisée dont l'écart-type vaut l'incertitude δr sur le rayon calculé. Cette incertitude est évaluée à partir de la variance du coefficient de diffusion qui dépend du nombre de positions dans la trajectoire. Soit $\text{Var}(\hat{D})$ la variance au deuxième ordre de l'estimateur de covariance du coefficient de diffusion (équation 4.3.6) [55] :

$$\text{var}(\hat{D}) = \hat{D}^2 \left[\frac{6 + 4\epsilon + 2\epsilon^2}{N} + \frac{4(1 + \epsilon)^2}{N^2} \right] = \delta \hat{D}^2 \text{ avec } \epsilon = \frac{\sigma_0^2}{\hat{D}\Delta t} - 2R \quad (5.4.1)$$

Avec N le nombre de déplacements collectés par trajectoire, σ_0 l'erreur de localisation en $[m]$, Δt l'intervalle de temps entre deux images en $[s]$ et R le coefficient de flou de mouvement (équation 1.2.13). Afin de calculer δr , on peut exprimer les valeurs $r - \delta r$ et $r + \delta r$:

$$r + \delta r = \frac{k_b T}{6\pi(\hat{D} - \delta \hat{D})\mu} \text{ et } r - \delta r = \frac{k_b T}{6\pi(\hat{D} + \delta \hat{D})\mu} \quad (5.4.2)$$

On peut en déduire δr :

$$\delta r = \frac{k_b T \delta \hat{D}}{6\pi\mu(\hat{D}^2 - \delta \hat{D}^2)} \quad (5.4.3)$$

Cette incertitude sur le rayon δr permet d'établir l'écart-type d'une gaussienne centrée en r_c , le rayon moyen, pour chaque trajectoire :

$$f(r) = \frac{1}{\delta r \sqrt{2\pi}} \exp \frac{(r - r_c)^2}{2(\delta r)^2} \quad (5.4.4)$$

Chaque gaussienne est normalisée de sorte que son aire sous la courbe soit unitaire, ainsi une trajectoire avec peu de points forme une gaussienne très étalée et aplatie alors qu'au contraire, les trajectoires longues forment des gaussiennes très étroites qui donnent plus de poids à la distribution finale. Ainsi, en sommant toutes les gaussiennes, on obtient une distribution centrée sur la valeur "attendue" du rayon. Finalement, l'ensemble des trajectoires contribue à former une distribution des rayons estimés avec plus ou moins de poids selon le nombre de positions disponibles pour chacune d'elles. La figure 5.19 illustre la somme de gaussiennes issues de différentes trajectoires comportant un nombre de points N différents.

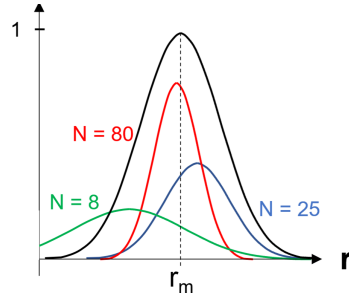


FIGURE 5.19 – Graphique illustrant la construction d'une distribution (noir) grâce à la somme de gaussiennes normalisées (couleurs) dont l'écart-type dépend du nombre de points N de la trajectoire.

5.4.3 Résultats

Afin d'appliquer cette nouvelle méthode dans des conditions où les trajectoires sont courtes, des billes d'or de rayon 40 et 25 nm sont utilisées. Premièrement, leur petite taille leur donne une grande vélocité qui aura tendance à régulièrement les faire quitter le volume de détection. De plus, en utilisant seulement l'intensité du signal de diffusion des particules qui évolue en r^6 , cela permet de tester la sensibilité de l'expérience pour des particules de faibles tailles et peu diffusantes¹⁸. La figure 5.20 montre deux images issues des séries d'images réalisées au sein des feuilles de lumière pour des billes d'or de rayon 40 et 25 nm.

Ces images sont issues de séries de 8000 images réalisées avec une résolution de 3.8 pixel/ μm et une cadence vidéo de 60 images/s pour les billes de rayon 40 nm et 80 images/s pour les billes de rayon 25 nm. Les résultats obtenus grâce à la méthode de la somme des gaussiennes normalisées nous permet d'évaluer les deux distributions illustrées sur la figure 5.21.

18. Pour les billes de 25 nm de rayon, la section efficace vaut 450 nm^2 et 4500 nm^2 pour les 40 nm de rayon. Pour des raisons pratiques, un laser à 405 nm est utilisé qui est loin de la résonance plasmon (environ 520 nm) des particules d'or. Des particules d'argent de rayon 12 nm pourraient également être utilisées afin de profiter de leur résonance plasmon à 400 nm qui aurait la même section efficace que l'or pour une excitation à 405 nm.

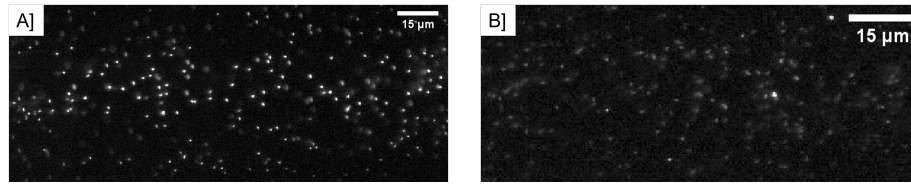


FIGURE 5.20 – Images au sein d’une feuille de lumière générée par la configuration sans saut d’indice pour des particules d’or de rayons A] 40 nm et B] 25 nm.

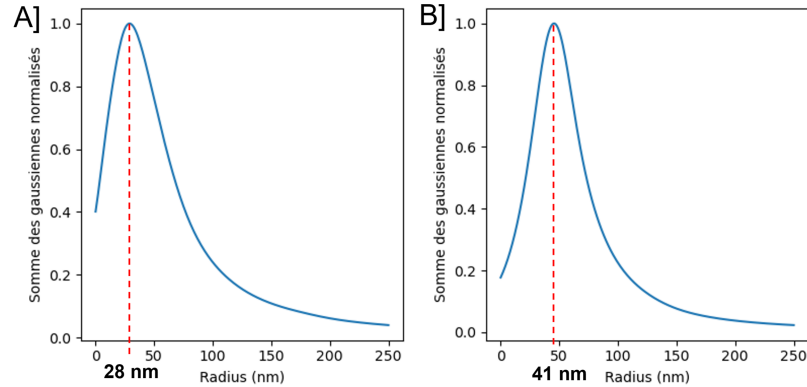


FIGURE 5.21 – Deux distributions des tailles estimées grâce à la méthode de la somme de gaussiennes normalisées pour des particules d’or de rayon A] 25 et B] 40 nm. Le sommet de la gaussienne reporter par le trait pointillé rouge représente la valeur vraisemblable du rayon estimé.

Ces estimations prouvent que malgré une épaisseur de la feuille de lumière trop importante par rapport au volume de détection, le contraste est suffisant pour suivre les trajectoires de particules de 40 et 25 nm de rayon dans le but d’estimer leur taille. La méthode d’approche de la distribution des rayons par la somme des gaussiennes normalisées semble également permettre de trouver la valeur vraisemblable du rayon en donnant moins d’importance aux résultats extrêmes et singuliers. Néanmoins, il est possible d’imaginer des améliorations liées à la méthode de génération d’une feuille de lumière avec une fibre optique comme lentille cylindrique afin de réduire l’épaisseur pour améliorer le contraste.

5.5 Perspectives d’améliorations

Afin de constituer un compromis entre les deux configurations précédentes, une solution a été imaginée pour créer une feuille de lumière focalisée dans le canal dont la longueur de Rayleigh est supérieure à ce que l’on pourrait avoir en configuration avec un saut d’indice. Cette solution utiliserait l’option sans saut d’indice, qui apporte une certaine facilité pour positionner la fibre laser par rapport à la lentille. Mais au lieu de placer le canal microfluidique à quelques centaines de micromètres de la lentille, il s’agirait de focaliser la feuille de lumière très loin comme cela est présenté sur la figure 5.22.

5.5. PERSPECTIVES D'AMÉLIORATIONS

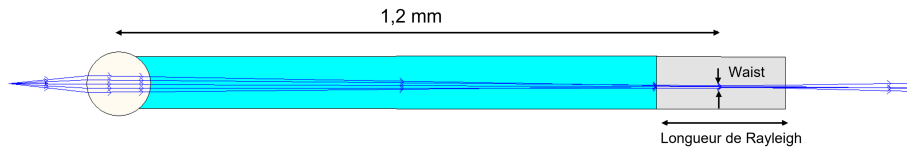


FIGURE 5.22 – Simulation grâce au logiciel OptGeo de la configuration sans saut d'indice lorsque le faisceau est focalisé très loin de la lentille.

Pour aller plus loin dans cette idée, il est possible d'imaginer que la partie optique intégrée serait séparée de l'organe microfluidique afin de rendre mobile l'un ou l'autre. Il serait alors possible de déplacer le module optique entier plutôt que de positionner la fibre laser par rapport à la lentille pour que celle-ci focalise le faisceau à l'endroit souhaité. Cela complexifie le système, mais octroie plus de liberté quant aux caractéristiques d'épaisseur et de longueur de Rayleigh de la feuille de lumière. La figure 5.23 illustre le système adaptable. On peut imaginer qu'en plus du déplacement pour placer le *waist* du faisceau au sein du canal, il serait possible de reconstituer le profil 3D d'un échantillon relativement plus grand que l'épaisseur de la feuille de lumière en déplaçant le module optique selon la hauteur du canal microfluidique.

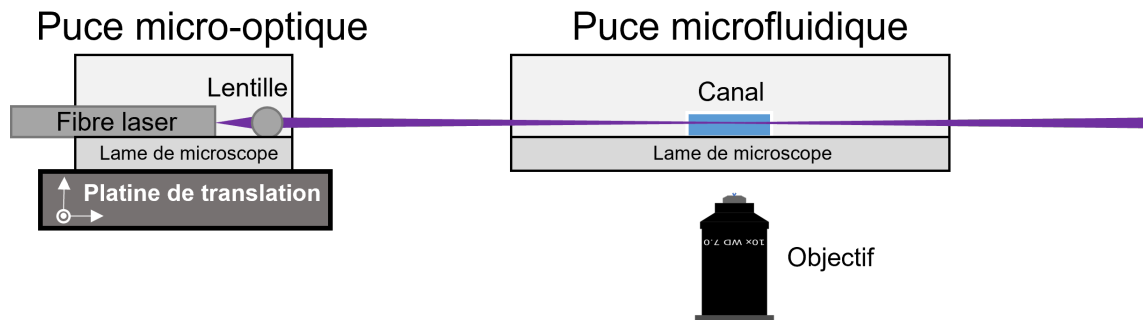


FIGURE 5.23 – Schéma de la solution imaginée permettant de créer un module micro-optique mobile afin de former une feuille de lumière au sein du canal microfluidique.

En parallèle, l'acquisition d'une imprimante 3D 8K permet d'obtenir des moules de puces microfluidiques beaucoup mieux résolus et dont le parallélisme des faisceaux atténue beaucoup l'effet d'inclinaison des parois des canaux. On peut envisager de réitérer les essais pour la configuration avec saut d'indice, sachant que les artefacts dus aux irrégularités des canaux seront largement atténués.

Chapitre 6

Étude du phénomène d'agrégation en régime microfluidique

Ce dernier chapitre s'intéresse à l'étude de phénomènes dynamiques réalisés en microscopie en champ clair ou microscopie à feuille de lumière dans un premier pour faire évoluer l'étude vers la microscopie non-linéaire lorsque l'expérience se révèle pertinente. Le but est de mettre à profit les outils d'analyse développés et détaillés dans les chapitres précédents afin d'étudier des effets encore peu connus. Parmi ces effets, la cristallisation et l'agrégation sont des processus qui nécessitent des études plus approfondies pour déterminer leurs cinétiques de formation. Pour cela, on propose dans ce chapitre d'utiliser la microfluidique dans le but d'appréhender et si possible maîtriser les étapes clé de ces phénomènes. Afin d'appréhender les mécanismes détaillés par les théories qui entourent la cristallisation et l'agrégation, la première partie de ce chapitre reprend de manière générale les aspects les plus connus. La suite de ce chapitre détaille les quelques expériences qui ont permis d'étudier l'apparition de signaux de fluorescence lors de l'agrégation d'un nouveau type de molécules AIE (Aggregation Induced Emission). Une troisième partie décrit la mise en place d'un système hydraulique permettant d'approcher un flux quasi-nul dans les canaux microfluidiques afin d'étudier la taille des agrégats formés grâce à la méthode de suivi des trajectoires en diffusion libre. La dernière partie traite des perspectives que l'expérience peut entrevoir afin d'évoluer vers l'utilisation de la microscopie à feuille de lumière ou la microscopie non-linéaire pour étudier ces phénomènes d'agrégation.

6.1 Dynamique d'agrégation et de cristallisation

6.1.1 L'état cristallin

Parmi les trois états majeurs de la matière (gazeux, liquide et solide), l'état cristallin qui appartient aux solides, suscite un intérêt particulier grâce à ses propriétés intrinsèques. Certaines conditions, qu'elles soient naturelles ou expérimentales, peuvent amener des atomes ou des molécules à adopter une disposition parfaitement définie dans le but d'optimiser leur état d'énergie ou leur interaction inter et intra-moléculaire [118]. Par exemple, dans son milieu naturel, un cristal de glace trouve une forme optimisant son énergie dans une structure fascinante pour l'œil humain, comme l'a remarquablement photographié Wilson Bentley vers 1902 (voir figure 6.1).

CHAPITRE 6. ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION EN RÉGIME MICROFLUIDIQUE

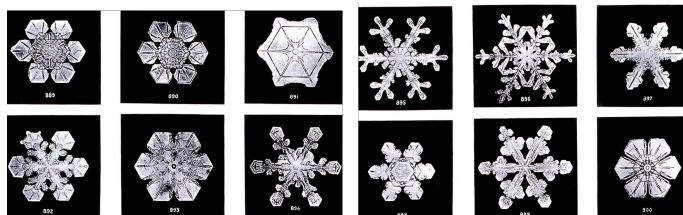


FIGURE 6.1 – Série de photos de flocons de neiges prises par Wilson Bentley vers 1902 [119]

L'intérêt scientifique porté à cet état de la matière provient des dispositions géométriques des atomes. En effet, cet état cristallin peut avoir des comportements très différents alors que la composition des cristaux est la même. L'exemple du diamant et du graphite représenté figure 6.2 l'évoque parfaitement puisque tous les deux sont constitués d'atomes de carbone, l'un est transparent à la lumière visible et peut couper le verre et l'autre est sombre et s'effrite au contact du papier. Lorsque du graphite est composé de feuilles d'atomes superposées les unes aux autres et qui facilite leur glissement, le diamant, quant à lui chaque atome lié à quatre autres dans une disposition resserrée [120].

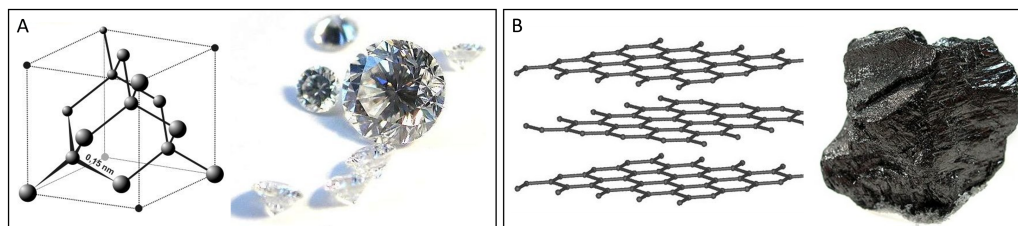


FIGURE 6.2 – Comparaison entre deux formations cristallines constituées d'atomes de carbones. A) Diamant et sa maille cristalline. B) Graphite et sa maille cristalline.

Ces formations cristallines, hautement ordonnées, limite l'insertion de différentes molécules au sein du maillage. Comme Victor Hugo a su le décrire, “Le style est comme le cristal, sa pureté fait son éclat”, cette propriété de pureté d'un cristal en fait un candidat privilégié dans la production industrielle tel que l'agroalimentaire (isolation du dextrose, lactose, acide benzoïque, vitamines) et le pharmaceutique (antibiotiques, Paracetamol)[121]. Mais également, lorsque la recherche s'intéresse à la fonction de certaines protéines et leurs mécanismes de diffusion, c'est la position précise des atomes d'hydrogène et la distribution des charges qui permet d'y parvenir. Alors que la pureté d'un cristal semble faire consensus dans de nombreux domaines, d'autres recherches, notamment dans le développement des lasers [122], se tournent vers le dopage de cristaux. Ceci n'est autre que l'ajout maîtrisé d'impuretés lors de la cristallisation afin de modifier les propriétés du cristal de la façon souhaitée tel que le laser Ti :Saphir (titane-saphir) ou encore le Nd-YAG (grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme).

6.1.2 Processus de cristallisation

La cristallisation peut être vue comme une étape de séparation tirant parti de la limite de solubilité d'un produit dans un solvant. Aussi appelée cristallogenèse, celle-ci est alors constituée de deux étapes principales, la nucléation puis la croissance cristalline. Lors de la nucléation, les molécules s'arrangent de manière définie en agrégats jusqu'à une "taille critique" qui empêche alors la redissolution. Ces clusters ayant dépassé cette taille critique, aussi appelés *nucléi* peuvent, au gré, commencer leur croissance cristalline. Macroscopiquement, plusieurs méthodes de cristallisation existent et s'appuient sur le refroidissement, l'évaporation ou encore l'ajout d'un contre-solvant, mais visent un même objectif qui est la supersaturation [123]. Ce phénomène est un état où la solution chimique contient plus de soluté qu'elle n'est capable de dissoudre. Ceci dépendant grandement des conditions d'expérience telles que la pression et la température, le but est alors de maximiser la supersaturation de la solution pour forcer la formation des cristaux. La figure 6.3 permet de suivre la dynamique de cristallisation en profitant du fait que la solubilité diminue avec la température pour la plupart des produits. Le processus de nucléation est encore aujourd'hui quelque chose difficilement compris. La théorie possède deux approches principales, la théorie classique [124] qui comporte quelques approximations, mais permet de facilement comprendre le processus. La deuxième approche est la théorie de la nucléation à deux étapes [125], plus récente et mieux adaptée pour l'étude de molécules comme les protéines qui présentent des tailles plus importantes.

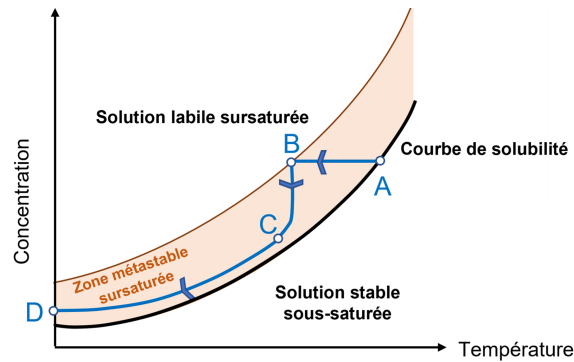


FIGURE 6.3 – Diagramme de solubilité et profil de cristallisation pour un matériau quelconque. En prenant l'exemple d'un point de départ en A dans une solution non saturée, le moindre cristal qui se forme est instantanément dissous. Ensuite, un refroidissement qui amène dans la zone métastable sursaturée entre les points A et B, permet à des cristaux déjà existant de grossir, mais n'en crée pas de nouveaux. Atteindre le point B dans la zone labile (instable, qui peut changer rapidement) sursaturée est la clef pour déclencher la nucléation de nouveaux cristaux. L'apparition de ces nouveaux cristaux va engendrer une diminution rapide de la concentration de la solution et nécessite un refroidissement vers le point C permettant de ne pas retourner dans la zone sous-saturée qui dissout les cristaux. Les cristaux formés entre B et C observent une croissance qui dépend du taux de supersaturation créé par le refroidissement pour finalement atteindre la fin de la cristallisation en D lorsque la majeure partie du produit est consommé.

Théorie classique de la nucléation

Dans cette théorie classique [124][126], trois conditions de nucléation sont admises. En se référant au diagramme de solubilité (figure 6.3), on peut situer une nucléation primaire hétérogène entre les points A et B dans la zone métastable¹. Celle-ci décrit la formation de germes cristallins grâce à un point de départ extrinsèque tel qu'un défaut sur une paroi ou des impuretés dans la solution. Ensuite, le point B décrit la nucléation primaire homogène qui produit de nouveaux germes à partir d'une solution exempte de cristaux ou de points de départ. La dernière nucléation est appelée la nucléation secondaire et apparaît uniquement lorsque de nouveaux cristaux sont formés à partir de collisions entre cristaux ou d'une libération de poussières cristallines précédemment fixées à d'autres cristaux.

Nucléation primaire homogène : Pour comprendre les trois types de nucléation, il faut commencer par la nucléation primaire homogène, bien que plus rare, elle permet de comprendre plus facilement les autres. Pour cela, il faut utiliser l'énergie libre de Gibbs (c.-à-d. enthalpie libre) qui est une mesure d'un potentiel de travail réversible qui peut être effectué dans un système à une température T et pression constante. La variation d'énergie libre de Gibbs pour la formation de clusters contenant n particules est formulée de la façon suivante :

$$\Delta G(n)_{hom} = -n\Delta\mu + S(n)\sigma \quad [J] \quad (6.1.1)$$

Où $\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2$ et μ_1, μ_2 sont respectivement les potentiels chimiques de la phase initiale et de la phase cristalline. $S(n)$ représente l'aire de la surface du cluster en $[m^2]$ et σ l'énergie interfaciale solution-cristal en $[J m^{-2}]$. Dans l'hypothèse de particules sphériques de rayon r , l'équation 6.1.1 peut s'écrire sous la forme suivante [126] :

$$\Delta G(r)_{hom} = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega}\Delta\mu + 4\pi r^2\sigma \quad [J] \quad (6.1.2)$$

Avec Ω le volume d'une molécule du *nucléi* en m^3 . En reprenant la notion de taille critique évoquée précédemment, il est alors possible de calculer le rayon critique pour lequel l'enthalpie libre de nucléation est maximisée, soit $\frac{\partial\Delta G}{\partial r} = 0$. On obtient alors l'expression de Gibbs-Thomson-Freundlich donnant le rayon critique :

$$r_c = \frac{2\Omega\sigma}{\Delta\mu} \quad [m] \quad (6.1.3)$$

Grâce à cette formulation du rayon critique, on peut trouver l'expression de ΔG_{hom}^* qui représente le maximum de la fonction $\Delta G(r)_{hom}$ alors que les termes de surface en r^2 et de volume en r^3 évoluent en opposition. À ce rayon critique, l'ajout d'une molécule supplémentaire permet au cristal d'accéder à une croissance cristalline alors que la perte d'une molécule engendre sa dissolution. Dans les deux cas, croissance ou dissolution, une perte d'enthalpie libre s'observe (figure 6.4) car un système a tendance à baisser son énergie.

Expérimentalement, la nucléation se produit rarement de façon homogène en raison d'un faible potentiel chimique $\Delta\mu$ à basse température et d'une barrière de nucléation ΔG_{hom}^* qui dépend de manière inversement proportionnelle à $\Delta\mu^{d-1}$, avec d la dimension du système. La probabilité de former un cristal de taille critique est alors dictée par le facteur de Boltzmann et menant à une

1. Vitesse de transformation très faible.

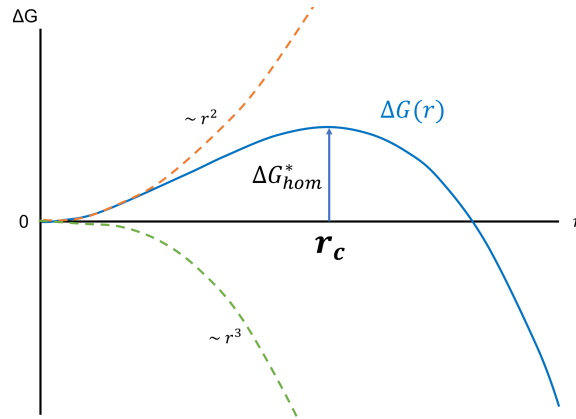


FIGURE 6.4 – Diagramme d'enthalpie libre en fonction de la taille du nucléi.

fréquence de nucléation $R_p \approx N_s Z_j \exp(-\Delta G^*_{hom}/k_B T)$ établie par Volmer et Weber en 1926 [127], où N_s est le nombre de site de nucléation, Z_j le facteur de Zeldovich, k_B est la constante de Boltzmann et T la température en [K]. L'exemple le plus connu pour représenter cet effet est le phénomène de surfusion de l'eau : si de l'eau est refroidie à une température plus basse que son point de fusion en conservant une solution sursaturée (i.e. sans cristaux). En pratique, à cause de cette forte barrière de nucléation, des températures plus basses que les prédictions théoriques sont utilisées pour engendrer une nucléation homogène.

Nucléation primaire hétérogène : Dans beaucoup de cas, la nucléation débute sur un support comme une paroi ou des impuretés dans le contenant. Pour comprendre ce phénomène, prenons l'exemple d'un germe sphérique se formant sur une paroi non-déformable de très grande taille devant celle du germe. Il est important également de noter que la formation d'un germe sur un support dépend des effets de tension de surface qui vont déterminer l'angle de contact α entre la nouvelle phase (i.e. le germe) et le support. Comme la figure 6.5 le montre, plus l'affinité entre les deux entités est grande, plus l'angle de contact est faible et par conséquent le nombre de molécules pour former le germe diminue également.

On peut alors décrire l'énergie libre d'activation de la nucléation hétérogène ΔG^*_{het} comme un produit d'une fonction de l'angle de contact et de l'énergie libre d'activation homogène :

$$\Delta G^*_{het} = f(\alpha) \Delta G^*_{hom} \quad (6.1.4)$$

Étant donné que dans ce cas, le rayon critique r_c est le même que pour la configuration homogène, l'équation 6.1.4 peut également s'écrire grâce aux volumes des sphères :

$$\Delta G^*_{het} = \frac{V_c}{V_0} \Delta G^*_{hom} \quad (6.1.5)$$

Où V_c est le volume de la calotte sphérique de taille critique et V_0 le volume total de la sphère complète de rayon r_c . Cette fraction des volumes est une fonction de l'angle α qui peut s'écrire comme $V_c/V_0 = (1 - \cos \alpha)^2 (2 + \cos \alpha) / 4$ [126]. L'énergie nécessaire pour l'activation de la nucléation

hétérogène est donc toujours plus faible pour le cas homogène, ce qui explique que ce premier cas est le plus probable dans une grande partie des expériences.

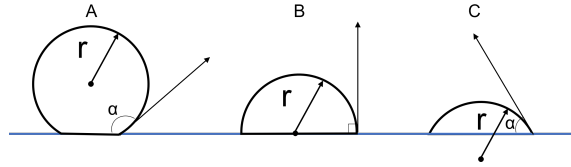


FIGURE 6.5 – Schéma montrant la géométrie d'un germe établi sur une surface et pour différentes affinités de contact entre le germe et la surface d'après Boistelle [128], avec α l'angle de contact entre la surface et la tangente au contour du germe.

Nucléation secondaire

Ce dernier phénomène de nucléation secondaire, comme son nom l'indique, ne peut se produire que si des cristaux sont déjà présents dans la solution initialement. Celle-ci peut se produire grâce à une brisure de cristaux déjà en solution due à une agitation ou encore à l'ajout volontaire de cristaux déjà formés. Pour décrire ce phénomène, S. Jancic [129] a formulé la fréquence de nucléation secondaire avec l'équation suivante :

$$J_s = k_s \epsilon^h \Delta C^i M_T^j \quad (6.1.6)$$

Où k_s est un facteur de température et de condition d'agitation, ϵ l'énergie transmise par l'agitateur en $[\text{W kg}^{-1}]$, $\Delta C = C - C_s$ la sursaturation en $[\text{kg m}^{-3}]$ et M_T la concentration cristalline en solution en $[\text{kg m}^{-3}]$. Chaque exposant est une valeur dépendante des conditions d'expériences. ($0.5 < i < 3$; $0.5 < j < 2$; $0 < h < 1$)

Lorsque la nucléation apparaît grâce à une agitation ou des microcristaux collés aux surfaces des autres cristaux, on appelle ce cas la nucléation secondaire apparente. Ce phénomène d'attrition² est lié aux propriétés des matériaux telles que la dureté, robustesse aux fractures ou encore résistance au cisaillement. Tous ces effets sont pris en compte dans l'équation suivante permettant de donner la fréquence de nucléation correspondante :

$$J_{attri} = \text{MP} \cdot \phi \cdot \epsilon_{ef} \cdot \sigma_{ef} \quad (6.1.7)$$

Où MP est un terme permettant de prendre en compte les propriétés liées au matériau telles que sa dureté, sa résistance au cisaillement ou encore sa résistance aux fractures, ϕ le ratio des concentrations volumiques des cristaux en solution en $[m_{crystal}^3 / m_{solution}^3]$, ϵ_{ef} la puissance spécifique de l'agitateur et σ_{ef} la sursaturation relative.

La théorie de nucléation à deux étapes

La théorie classique de la nucléation permet de comprendre et de décrire de nombreuses expériences de cristallisation lorsqu'elles concernent des réactions à un seul composant. En revanche, certains

2. Phénomène d'usure par frottement

aspects ne sont pas en adéquation avec les résultats observés, notamment lors de la cristallisation à deux ou plusieurs espèces comme des protéines par exemple [130].

L'un des premiers travaux sur la théorie de nucléation à deux étapes a été mené par ten Wolde et Frenkel en 1997 [131] et a permis de simuler la nucléation homogène de protéine globulaire (i.e. sphérique). Cette étude a montré que de fortes fluctuations de densité de soluté se produisent autour du point critique de nucléation et ainsi provoquent des changements dans le cheminement vers la nucléation de cristaux. Ces fluctuations donnent lieu à la formation de gouttes de solution hautement désordonnées dans lesquelles s'en suit l'apparition de *nucléi* cristallins à partir d'une certaine taille critique. Étant donné que ces gouttes conservent leur proximité avec le point critique de nucléation, la barrière d'énergie de cristallisation est plus faible et permet d'augmenter la fréquence de nucléation de plusieurs ordres de grandeur. La figure 6.6 permet d'illustrer ce phénomène à deux étapes qui diffère de la théorie classique.

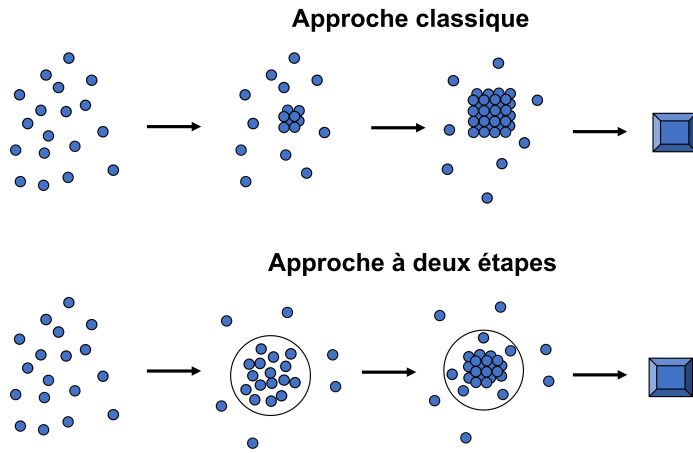


FIGURE 6.6 – Schéma illustrant les deux approches théoriques permettant de décrire le processus de nucléation. L'approche classique nécessite d'atteindre une taille critique du cluster (lorsque la somme de l'énergie libre de surface (r^2) et l'énergie libre de volume (r^3) est maximisée) avant d'amorcer la croissance cristalline. Le modèle à deux étapes, quant à lui, propose que des gouttes de solutions supersaturées et hautement désordonnées se forment en conservant une proximité avec le point critique puis se réorganisent en structures cristallines.

Pour décrire ce nouveau processus de formation de cristaux, la fréquence de nucléation doit prendre en compte l'étape de formation de ces phases denses (c.-à-d. gouttes de liquide) qui possèdent également une probabilité d'apparition en plus de la probabilité classique de formation d'une phase cristalline. Soit N_{TS} le nombre de cristaux formés au temps t :

$$N_{TS}(t) = N_0 \left\{ 1 - \exp \left[- \int_0^t j_c(t') v_0 dt' \right] \right\} \quad (6.1.8)$$

Avec N_0 le nombre de phases denses dans un volume v_0 et j_c la fréquence de nucléation des cristaux dans cette phase dense.

6.1.3 L'agrégation

Dans le contexte de la cristallisation, l'agrégation joue un rôle important puisqu'elle permet de décrire l'interaction qui mène deux ou plusieurs particules à rentrer en contact et rester ensemble. En restant à proximité assez longtemps les unes aux autres, des ponts cristallins peuvent s'installer pour former un agglomérat stable. Agrégat et agglomérat sont deux termes proches qu'il convient de définir pour la suite en utilisant la convention établie par Randolph et Larson en 1988 [132] :

- L'agglomération : entité formée par des liaisons de cristaux individuels.
- Agrégation : un ensemble de particules plus faiblement liées les unes aux autres.

L'agrégation qui est le précurseur de l'agglomération (figure 6.7), peut être un processus réversible, comme cela a été évoqué dans la partie précédente lors d'étapes de cristallisation. Ce phénomène d'agrégation et son inverse sont définis grâce à une fréquence d'occurrence qui dépend des mouvements des particules au sein du fluide, mais également des paramètres extérieurs tels que des turbulences, des forces inter-particules comme, par exemple, les forces de Van der Waals. La capacité de deux particules à rester liées entre-elles pour former une entité plus grosse et stable dépend alors de plusieurs paramètres [133] :

- Phénomènes de transport dans le milieu.
- L'affinité des particules entre-elles (forces répulsives ou attractives).
- Taille et concentration des particules par unité de volume.

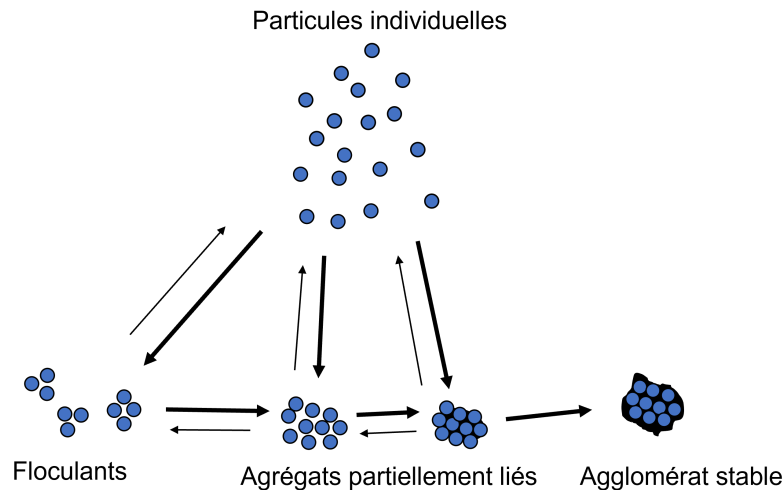


FIGURE 6.7 – Les étapes de formation d'un agglomérat selon Ilievski et White en 1994 [134]. En fonction des phénomènes de transport, un ensemble de particules individuelles peuvent former des floculant (flocons sur lesquels d'autres substances peuvent s'accrocher), ou directement des agrégats partiellement liés. Chacun de ces états peuvent se former et se séparer jusqu'à ce qu'ils forment des agglomérats stables.

En fonction des mécaniques de transport présentes dans le fluide, une fréquence de collision peut être établie grâce à des relations semi-empiriques. En 1917, Von Smoluchowski élabore un modèle permettant de calculer une fréquence de collision binaire [135] :

$$r_{i,j} = \beta(L_i, L_j, T)N_iN_j \quad (6.1.9)$$

Avec $r_{i,j}$ la fréquence de collision entre une particule i et une particule j en [nb/m³], β la fréquence de collision de kernel [m³/nb s] et $N_{i,j}$ la concentration en particule i et j en [nb/m³].

Afin de déterminer la fréquence de collision de kernel, trois modes de transports sont possibles, le mouvement brownien, un flux laminaire/turbulent (agitation) ou une sédimentation³. Lorsqu'un mouvement brownien est présent, le modèle de collision utilisé est appelé *perikinetik* en référence à la probabilité de cohésion lors d'une collision. Si un flux laminaire ou turbulent agit sur les particules, alors le modèle de collision *orthokinetik* permet de décrire l'énergie cinétique transmise lors des collisions. Le dernier modèle s'appuie sur les *forces d'inertie* pour traiter de la sédimentation.

Fréquences de collision *perikinetik*

Pour que le mouvement brownien soit efficace comme mécanisme de transport, le modèle prévoit une taille de particule inférieure à 500 nm. Soit $\beta(L_i, L_j, T)$ la fréquence de collision de kernel :

$$\beta(L_i, L_j, T) = \frac{2k_B T}{3\mu} (L_i + L_j) \left(\frac{1}{L_i} + \frac{1}{L_j} \right) \quad (6.1.10)$$

Avec k_B la constante de Boltzmann en [JK⁻¹], T la température en [K], μ la viscosité dynamique en [Pa s] et L_i, L_j les diamètres des particules i et j en [m]. Lorsque la solution est monodisperse, alors le coefficient β vaut :

$$\beta(T) = \frac{8k_B T}{3\mu} \quad (6.1.11)$$

Il faut néanmoins noter que ce coefficient pour une solution monodisperse n'est plus valide à partir du moment où le système commence à s'agglomérer et donc former une solution polydisperse.

Fréquences de collision *orthokinetik*

Pour le cas des collisions orthokinetik, deux régimes d'écoulement sont à différencier ; le régime laminaire où toutes les particules s'écoulent dans la même direction sans fluctuations locales et le régime turbulent qui à l'inverse forme des tourbillons de manière désordonnée.

Le cas du régime laminaire est peu pertinent, car il reflète le cas où deux écoulements de directions opposées se rencontrent et engendrent des collisions à l'interface. Cette configuration est peu probable et ne constitue pas un cas que nous détaillerons ici.

En revanche, pour le cas du régime turbulent qui est composé d'une multitude de zones de cisaillement⁴, il est possible de calculer un coefficient de cisaillement moyen Γ :

$$\Gamma = \sqrt{\frac{\epsilon}{\nu}} \quad (6.1.12)$$

Avec ϵ l'énergie de dissipation caractéristique en [W kg⁻¹] et ν la viscosité cinématique en [kg/m s].

Le coefficient de collision de kernel peut alors s'exprimer de la façon suivante :

3. Processus où les particules se déplacent vers le fond du liquide en raison de la gravité ou d'une force centrifuge.
4. En raison des multiples tourbillons formant un régime chaotique.

$$\beta(L_i, L_j) = \frac{4}{3}\Gamma(L_i + L_j)^3 \quad (6.1.13)$$

Ces équations sont valides uniquement dans le cas où les tailles de particules sont inférieures aux dimensions des tourbillons.

Fréquences de collision inertielle

Le dernier mécanisme agissant sur la fréquence de collision des particules est la sédimentation. Autrement dit, l'effet engendré par la gravité sur des particules, lorsqu'elles sont de taille suffisante pour que le mouvement brownien ne les maintienne plus en suspension. Cet effet engendre des vitesses de sédimentation différentes en raison de sa dépendance à la taille des particules. Dans l'hypothèse de particules sphériques et en suivant la loi de Stokes, la fréquence de collision kernel peut s'écrire de la façon suivante :

$$\beta(L_i, L_j, T) = \frac{\pi g(\rho_c - \rho_l)}{72\mu} (L_i + L_j)^3 |L_i - L_j| \quad (6.1.14)$$

Avec g l'accélération de la pesanteur en $[\text{m s}^{-2}]$, $\rho_{c,l}$ les masses volumiques du cristal et du liquide en $[\text{kg m}^{-3}]$.

Ces trois modèles qui représentent des fréquences de collision ne suffisent pas à décrire le phénomène complet, car l'interaction entre particules n'est pas prise en compte. Pour que le modèle soit plus pertinent, deux forces doivent être intégrées. La première est la force attractive de Van der Waals qui décroît fortement selon la distance de séparation des particules avec une évolution en $1/r^6$ où r est la distance de séparation [136]. La seconde force est répulsive, et peut provenir de la surface chargée électriquement des particules ou encore de leurs caractères hydrophobes. En raison des préférences d'absorption ionique dans les solutions aqueuses, une couche chargée se forme à la surface des particules, mais qui est également compensée par une deuxième couche formée en solution qui rend cette double couche neutre au total [137]. Néanmoins, localement, lorsque des particules s'approchent, ces couches se repoussent entre-elles. Étant donné que chaque collision ne suffit pas à engendrer une agrégation de deux particules, il faut également que cette collision réunisse les conditions pour que la cohésion se fasse. Pour représenter le succès d'agrégation lors d'une collision, un modèle semi-théorique qui, à l'inverse, permet d'écrire une fonction de perturbation du processus d'agrégation [138] :

$$\beta(L_i, L_j, \epsilon, S) = \beta_{disr} \epsilon^r S^s (L_i + L_j)^3 \quad (6.1.15)$$

Avec β_{disr} la perturbation de kernel (empirique) en $[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$, ϵ la fréquence moyenne de dissipation d'énergie en $[\text{m}^2 \text{s}^{-3}]$, r la fréquence de collision en $[\text{m}^{-3} \text{s}^{-1}]$, S le ratio de supersaturation.

L'ensemble de ces approches théoriques et semi-théoriques permettent d'avoir une vue générale des phénomènes déterminants lors des processus d'agrégation/agglomération. La présentation succincte des mécanismes physiques mentionnés nous permet d'entrevoir des expériences avec l'outil microfluidique afin d'étudier et de comprendre ces phénomènes plus en détail. La suite de ce chapitre présente les expériences utilisant la microfluidique afin d'observer les phénomènes dynamiques tels que l'agrégation ou la cristallisation.

6.2 Étude du phénomène AIE en régime microfluidique

Habituellement, lorsque des molécules fluorescentes s'agrègent entre-elles, un phénomène d'extinction du signal de fluorescence (ACQ)⁵ apparaît en raison d'un échange d'énergie inter-moléculaire au sein de l'agrégat [139]. Mais certaines molécules présentent des propriétés spéciales qui leur confèrent un comportement opposé vis-à-vis de l'agrégation. Ce phénomène appelé AIE⁶ décrit l'apparition d'un signal de fluorescence lorsque l'échantillon passe d'un état dispersé en solution à une agrégation [140]. Lorsqu'elles sont en solution, les molécules AIE dissipent leur énergie sous forme non-radiative, typiquement sous forme de rotations et de vibrations après l'absorption d'un photon. En revanche, lorsqu'elles s'agrègent entre-elles, certains mouvements moléculaires sont contraints par l'encombrement stérique et permettent aux molécules de libérer l'énergie d'absorption par une émission de fluorescence. La figure 6.8 détaille la différence de fonctionnement des mécanismes d'ACQ et d'AIE.

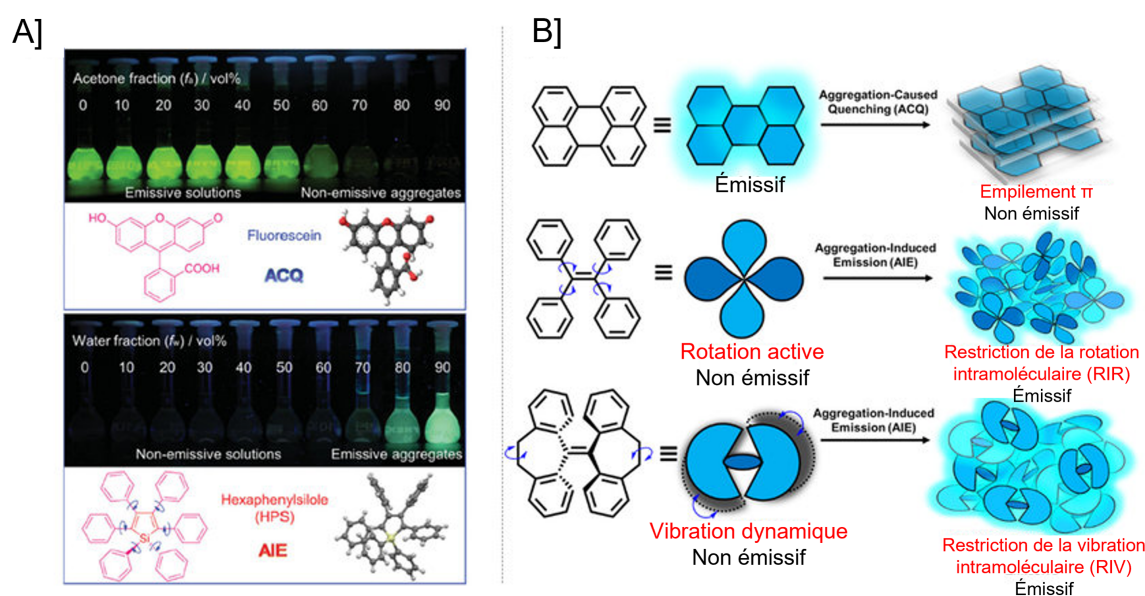


FIGURE 6.8 – A) Photo montrant le comportement de la fluorescéine et du HPS lorsque que le taux d'agrégation de la solution augmente. Crédit[141]. B) Schéma comparant les mécanismes d'émission de l'ACQ et de l'AIE face à l'agrégation. Crédit[142].

Cette (re)découverte du phénomène AIE permet d'étendre le spectre des applications opto-électroniques limité par l'effet d'extinction dû à l'agrégation. Parmi les tous les candidats au phénomène AIE, la molécule de HPS (Hexaphenylsilole) nous intéresse particulièrement grâce à son rendement quantique et à ses propriétés hydrophobes qui facilitent l'étude de la dynamique d'agrégation. Grâce à la microfluidique et ses conditions d'expérience en régime laminaire, il est

5. De l'anglais Aggregation-Caused Quench.

6. De l'anglais Aggregation-Induced Emission (émission induite par l'agrégation).

possible d'étudier la formation d'agrégats de HPS au sein d'une jonction en trident plus communément appelée *Flow-focusing*.

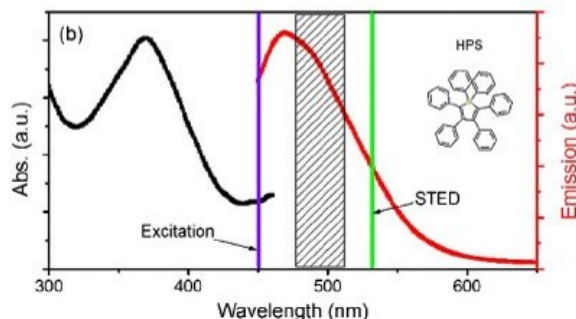


FIGURE 6.9 – Spectre d'absorption et d'émission de la molécule de HPS [143]

6.2.1 Résultats qualitatifs du *flow-focusing*

Afin de tester les capacités de la microfluidique pour étudier des réactions dans des conditions aussi précises, une expérience de *flow-focusing* est présentée ici d'un point de vue qualitatif par rapport aux mesures sur l'agrégation du HPS. La molécule de HPS possède un maximum d'absorption à 370 nm et un pic d'émission à 460 nm (voir figure 6.9). L'expérience est effectuée à température ambiante en champ clair afin de faciliter l'observation globale des phénomènes en profitant tout de même d'un signal de diffusion. La solution de HPS est solubilisée dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à une concentration de 10^{-8} mol/ml. Les canaux mesurent tous $100\ \mu\text{m}$ de hauteur, mais leurs largeurs diffèrent. Le canal principal où l'agrégation a lieu mesure $400\ \mu\text{m}$, alors que les deux entrées d'eau mesurent $150\ \mu\text{m}$ et le rétrécissement seulement $50\ \mu\text{m}$. Les objectifs utilisés sont un X4 ON = 0.13 pour les images à grand champ et un X20 ON = 0.75 pour les images en fluorescence.

Les figures 6.10A et B montrent des images issues d'un film enregistrant le cas où un canal central est cerné par deux flux laminaires d'eau et délivre un très faible débit de HPS ($\approx 1\ \mu\text{l}/\text{min}$). La zone où l'eau et le HPS sont en contact est alors limitée à l'interface des deux flux laminaires et permet ainsi d'étudier l'intensité du signal de diffusion selon la position dans le canal. On remarque qu'un signal plus intense n'apparaît qu'à partir du premier contact avec l'eau. Cela est en partie dû au phénomène de diffusion dont l'intensité émise dépend de la taille de la particule à la puissance 6. L'interface HPS/eau semble également créer un effet de lentille qui accentue l'intensité du signal à l'interface. Néanmoins, le signal de diffusion est d'abord localisé à l'interface HPS/eau, mais finit par se répandre sur la largeur du canal en raison de la diffusion⁷ des agrégats. Dans un canal microfluidique, réaliser des mesures à des positions distinctes dans le sens de l'écoulement revient à étudier différents instants du phénomène d'agrégation à condition que les flux soient adaptés à la cinétique du phénomène. Des travaux ont déjà été menés afin de mesurer la coopération des molécules de HPS lors d'agrégation induite par des interactions hydrophobes [143]. Cette étude mesure l'intensité du signal de fluorescence le long du canal afin d'évaluer la vitesse de formation ainsi que la taille des agrégats. En effet, le nombre de molécules en contact avec l'eau augmente par

7. Diffusion dans un liquide et non de la lumière.

6.2. ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE AIE EN RÉGIME MICROFLUIDIQUE

diffusion et génère plus d'agrégats, mais également fait grossir les agrégats déjà formés à condition d'être dans des conditions de sursaturation. Les résultats montrent une formation d'agrégats de HPS dont le signal de fluorescence ne varie quasiment plus (c.-à-d. la taille) après $200 \mu s$ pour une concentration en HPS de 2 mM.

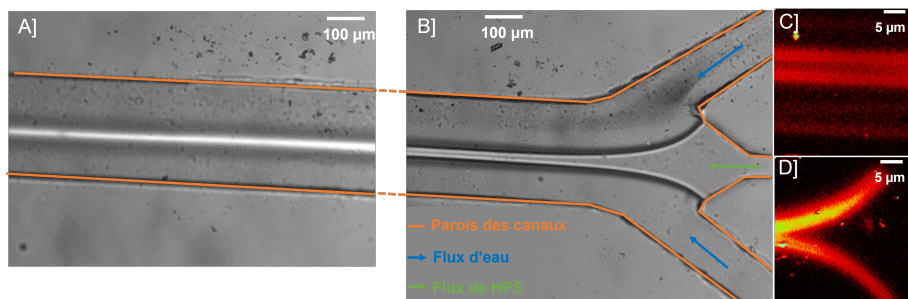


FIGURE 6.10 – A] Image en champ clair montrant un flux de HPS confiné par un flux d'eau. Image monochrome, 8 bits, taille d'un pixel 263 nm . B] et C] Images en fluorescence excitée à deux photons des zones où les flux de HPS et d'eau se rencontrent et forment des agrégats. B] Position avancée dans le canal, $200 \mu m$ après la jonction HPS/eau. C] Jonction entre les flux d'eau sur les extérieurs avec le flux de HPS au centre qui ne présente pas de fluorescence tant qu'il ne rencontre pas d'eau.

Le signal de diffusion enregistré sur la figure 6.10A représente une quantité tellement grande d'agrégats en mouvement en raison du flux, qu'il est impossible de les distinguer de manière individuelle. La seule mesure possible dans ces conditions est une moyenne de l'intensité reçue sur le temps d'ouverture de la caméra. Les mêmes images ont été réalisées en microscopie d'excitation de fluorescence à deux photons afin de s'assurer qu'un signal de fluorescence est présent à la formation des agrégats. Ces images sont réalisées à une longueur d'onde d'excitation à 768 nm et des images de 100×100 pixels d'une zone de $263 \mu m \times 263 \mu m$ donnant accès à une résolution de $0.38 \text{ pixel}/\mu m$. Les figures 6.10C et D représentent les deux zones grossies sur la figure en champ clair où l'on peut voir le signal de fluorescence à l'interface eau/HPS. On remarque également que la microscopie non-linéaire n'est pas limitée par le balayage puisque le flux d'agrégats est assez rapide pour voir un signal continu dans le temps dont les conditions sont stables en raison du flux laminaire.

6.2.2 Réalisations pratiques de conditions microfluidiques stables

Afin d'obtenir les conditions souhaitées et stables au sein des canaux microfluidiques, certains paramètres sont à prendre en compte afin de converger vers un état stable. Tout d'abord, la géométrie des canaux est d'une importance considérable par rapport à la stabilité des flux ainsi que la facilité à amorcer l'expérience. En microfluidique, où la résistance hydrodynamique est plus élevée qu'à l'échelle macroscopique, le passage d'un liquide dans des canaux est d'autant plus difficile la première fois lorsque le canal est "sec"⁸. Dans le cas présenté précédemment, des canaux jusqu'à $50 \mu m$ de largeur nécessitent des pressions allant jusqu'à 200 mbars pour amorcer la circulation du fluide. Lorsque le fluide est passé une première fois dans tout le circuit, la pression nécessaire pour maintenir la circulation est plus faible. Ensuite, la résistance hydrodynamique des quatre portions

8. La tension de surface est sûrement bien plus forte lorsqu'il y a une interface air/PDMS/eau

CHAPITRE 6. ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION EN RÉGIME MICROFLUIDIQUE

de la puce microfluidique doit être estimée afin que la pression imposée en amont soit capable de vaincre la résistance du canal menant à la sortie. Si ce n'est pas le cas, le fluide emprunte toujours la voie qui possède le moins de résistance hydrodynamique et parfois, cette voie est une des trois entrées. Afin d'éviter ce genre de cas, une solution consiste à imposer un ratio d'élargissement entre les canaux d'entrées et le canal de sortie. La figure 6.11 montre le modèle de puce microfluidique utilisé afin de générer le *flow-focusing* du HPS où les canaux d'entrées sont deux fois plus étroits et spécialement le canal de HPS qui possède un rétrécissement à $50 \mu\text{m}$. Cela assure un flux de HPS bien plus stable, même à très faible débit.

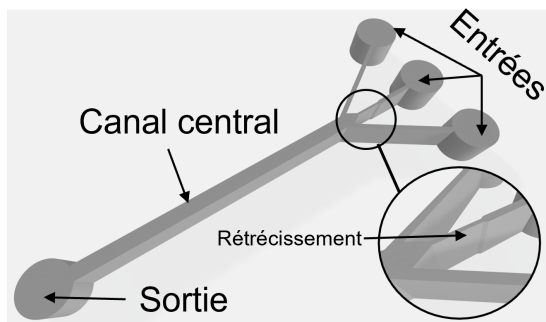


FIGURE 6.11 – Modèle 3D des canaux microfluidiques utilisés pour générer le *flow-focusing*.

Les canaux microfluidiques n'étant jamais parfaitement identiques d'un canal à l'autre malgré la symétrie lors de la conception⁹, les pressions en entrée doivent être commandées séparément afin de contrôler le débit sur chaque branche de manière optimale. L'avantage d'une observation en direct des flux de HPS et d'eau en champ clair est de pouvoir agir sur les pressions d'entrées afin d'atteindre un équilibre approximatif des débits grâce à la position de l'interface des flux de HPS/eau sur la vidéo. Au sein du canal, la coordonnée selon l'axe d'écoulement peut être vue comme la position temporelle dans l'expérience, alors que la position verticale représente l'équilibre hydrodynamique de l'expérience. Cela permet à l'utilisateur d'agir de manière intuitive sur les pressions d'entrées pour que l'expérience s'adapte aux besoins. Le bon déroulement de l'amorçage des flux est souvent très important comme dans le cas du HPS qui au contact de l'eau forme des agrégats. En effet, tant que des conditions stables de flux ne sont pas établies, le remplissage des canaux peut être délicat et difficile appréhender. Quelques astuces sont efficaces afin d'éviter le cas désagréable d'un déséquilibre soudain qui provoque des reflux de HPS dans les canaux d'eau en amont et ainsi créer des dépôts d'agrégats considérables sur toutes les parois. La première est d'assurer le "mouillage"¹⁰ des canaux, avec un premier passage d'un solvant neutre par rapport aux futurs produits. Ensuite, l'utilisation de vannes de coupure permet d'assurer une mise en circulation des fluides en simultanée et d'arrêter rapidement un reflux s'il se produit. La figure 6.12 illustre deux cas où l'agrégation n'est pas maîtrisée et perturbe les mesures.

L'obtention de conditions stables de circulation des fluides ne permet pas d'observer individuellement les agrégats formés par le HPS par réaction hydrophobe et d'extraire des informations quant à leurs caractéristiques morphologiques. Afin de tendre vers une observation d'agrégats dispersés

9. Défauts de fabrication des moules ou lors du démoulage des puces.

10. Expression utilisée qui signifie de faire passer le fluide une première fois.

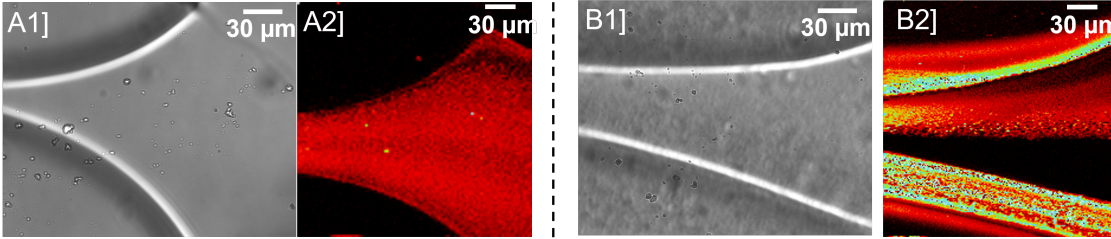


FIGURE 6.12 – Images des conséquences A] d'un reflux dans le canal de HPS, B] d'un dépôt de gros agrégats sur les parois du canal (saturation du signal). 1] Images en champ clair. 2] Images en excitation de fluorescence à deux photons.

dans le canal dont leur taille¹¹ est estimée grâce à leur trajectoire, l'idée est de figer pendant quelques secondes les flux afin d'observer la diffusion libre des agrégats et d'observer leur évolution en taille et forme en fonction des conditions initiales. Cela amène à la problématique de l'arrêt du flux, qui est difficile à l'échelle d'écoulements microfluidiques. La partie suivante traite des méthodes testées afin d'aboutir à un arrêt quasi-total du flux au sein du canal.

6.3 Le "zero-flow" au service du suivi de particules

Nous avons vu précédemment dans le chapitre dédié au suivi individuel de particules en diffusion que les mouvements de dérives liées à des phénomènes de transports autres que le mouvement brownien sont néfastes pour l'estimation du coefficient de diffusion. Afin de caractériser les agrégats, la condition de flux nul au sein du canal doit être respectée durant un délai suffisamment long pour que l'analyse statistique soit pertinente. Afin de rendre l'expérience simple dans un premier temps, la géométrie de la puce microfluidique est limitée à un canal simple de $200 \mu\text{m}$ de largeur et 1 mm de longueur comme illustré figure 6.13. Cette géométrie simplifiée a pour but d'exclure tous les paramètres qui complexifient l'expérience lorsque plusieurs entrées/sorties doivent être commandées. Les deux premières parties de cette section décrivent le cheminement réalisé avant d'arriver à la méthode permettant d'arrêter réellement le flux qui est décrite en troisième partie.



FIGURE 6.13 – Modèle 2D de la géométrie des canaux utilisés pour réaliser les essais d'arrêt du flux.

L'approche utilisée pour parvenir à arrêter le flux se base sur une méthode macroscopique qui prend place à l'extérieur de la puce microfluidique avec des vannes. Des solutions existent où la coupure des flux est réalisée directement au sein de la puce microfluidique grâce à des vannes de *Quakes* [144]. Ce système utilise deux canaux superposés, l'un transportant le fluide et l'autre de l'air permettant de contraindre, voire d'arrêter le flux liquide grâce à un clampage induit par le

11. Via leur coefficient de diffusion

gonflement du canal d'air en surpression. L'autre idée envisagée a été de se servir de l'asservissement du contrôleur de pression qui utilise des boucles de contre-réaction pour converger vers un flux nul, mais cela avait pour effet de rendre le flux très instable. Par conséquent, cette solution n'a pas été poursuivie.

6.3.1 Vanne de coupure On/Off

La première solution envisagée (figure 6.14) et la plus intuitive consiste à arrêter le flux dans le canal en plaçant en entrée et en sortie une vanne de coupure qui permet de couper le canal microfluidique du reste du circuit. Les vannes utilisées (Contrôlable Microfluidic 2/3 Port Solenoid Valve, Elveflow) utilisent une technologie de type "ROCKER® valve technology" permettant une coupure de la circulation du fluide avec un déplacement de volume réduit à 10 nL. Les connectiques utilisées entre les vannes et la puce microfluidique sont en PTFE (Polytétrafluoroéthylène), indéformable jusqu'à 15 bars. La longueur des tubes est minimisée afin que le moins de volume mort soit présent en dehors du canal. Le but est de générer un flux d'environ $10 \mu\text{l}/\text{min}$ et d'être capable de l'arrêter rapidement et durablement. Le protocole utilisé dans un premier temps est simple :

- Arrêter la pression du module pneumatique afin que celle-ci atteigne la pression atmosphérique.
- Fermer les vannes de coupure simultanément pour isoler le canal du reste du circuit.
- Mesurer dans le temps le flux résiduel.

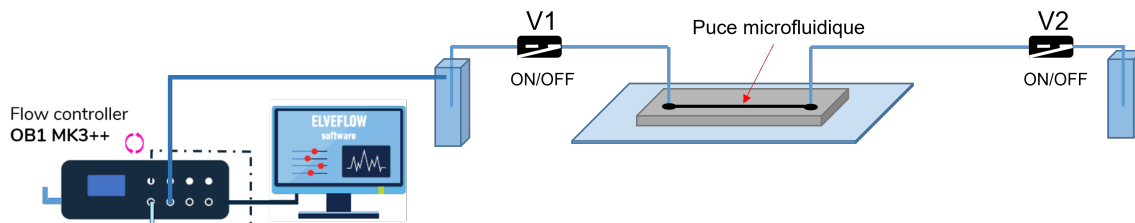


FIGURE 6.14 – Schéma du premier montage microfluidique utilisant simplement deux vannes de coupure disposées en entrée et en sortie.

Le résultat de cette méthode n'est pas satisfaisant puisque malgré la fermeture des vannes et l'arrêt de la pression, le canal comporte toujours un flux résiduel très instable qui peut changer de direction. La figure 6.15 montre l'évolution du débit au cours du temps lorsque les vannes de coupures sont déclenchées. On remarque une forte diminution du débit et de manière très rapide, mais qui n'arrête pas totalement le flux. Tout d'abord, la direction d'écoulement s'inverse directement après la fermeture des vannes et laisse un flux oscillant entre 0.04 et $0.02 \mu\text{l}/\text{min}$. Néanmoins, la précision des débitmètres est limitée à $0.4 \mu\text{l}/\text{min}$ ce qui rend leur utilisation peu fiable pour cette gamme de mesures. Malgré cela, pour cette première solution, il n'est pas nécessaire d'être précis puisque même à l'œil humain, on peut voir un flux résiduel important.

Afin d'évaluer le flux résiduel malgré les faibles valeurs, il est possible d'utiliser des particules en suspension dans le liquide afin de mesurer leur vitesse de déplacement. La mesure de la vitesse doit se faire au centre du canal pour des particules suffisamment grosses pour éviter que le mouvement brownien influence les mesures. La moyenne des vitesses des particules de diamètre $2 \mu\text{m}$ est évaluée à $(570 \pm 57) \mu\text{m}/\text{s}$ et ne semble pas réduire dans le temps. Ce résultat semble contre-intuitif au

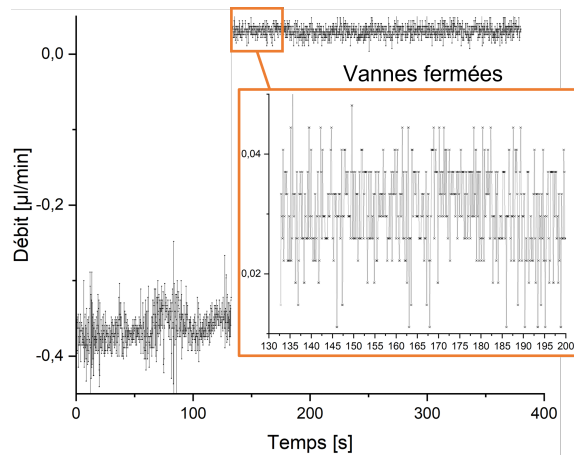


FIGURE 6.15 – Graphique représentant l'évolution du débit au cours du temps lorsque les vannes sont fermées simultanément.

premier abord puisque les deux vannes sont totalement fermées (testé en appliquant une forte pression en position fermée) mais l'effet d'inversement du flux pourrait signifier que le système subit un amortissement d'oscillations générées par la fermeture soudaine des valves.

6.3.2 Boucle de retour

Afin d'éviter cet effet de contraintes exercées par les valves lors de l'arrêt du flux, une solution consiste à utiliser un système de deux valves qui crée une boucle entre la sortie et l'entrée du canal comme présenté sur la figure 6.16. Une première valve de coupure (V1) en sortie doit permettre de bloquer l'évacuation du fluide. Une seconde valve d'aiguillage (V2) en entrée doit permettre à l'entrée de la puce de passer de la voie provenant du réservoir de pression à une boucle qui mène à la sortie. Cette valve d'aiguillage doit également de relier le réservoir à la sortie pour remplir la boucle¹². Cet aiguillage doit permettre de passer d'une pression appliquée par le module de contrôle à la pression du circuit. Ainsi, pour effectuer l'arrêt du flux, la pression atmosphérique est rétablie avant de fermer la vanne de sortie et de boucler le circuit, ainsi l'entrée et la sortie possèdent la même pression hydrostatique.

La vitesse d'écoulement étant trop faibles pour être mesurée par un débitmètre, la méthode de mesure de la vitesse de déplacement de particules de $2 \mu\text{m}$ est effectuée après l'arrêt de la pression et le bouclage du circuit sur lui-même. La figure 6.17A présente la vitesse d'une particule durant 5 secondes calculée à partir de la trajectoire détectée grâce au plugin TrackMate dont le résultat est illustré figure 6.17B. En moyenne, les particules au centre du canal se déplacent à $(28 \pm 10) \mu\text{m}/\text{s}$, cela représente une nette amélioration de la vitesse d'écoulement comparé à la première solution. Néanmoins, ce flux résiduel est toujours observable même à l'œil humain et ne permet pas d'évaluer le coefficient de diffusion dans les meilleures conditions. Ce flux résiduel et instable est difficile à justifier sachant que les valves semblent totalement étanches et que les pressions à chaque extrémité du canal sont identiques. Une possibilité est que l'élasticité du PDMS joue un rôle important lors

12. Sans pré-remplissage du liquide, l'air qui occupe le canal déstabilise la pression.

CHAPITRE 6. ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION EN RÉGIME MICROFLUIDIQUE

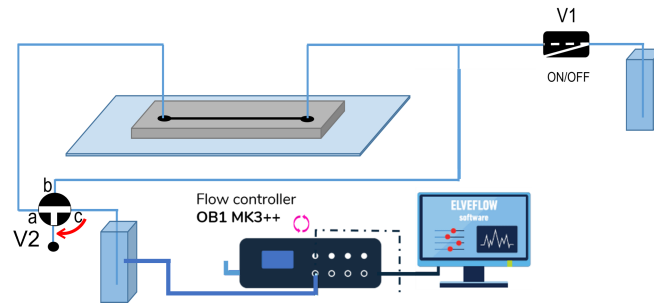


FIGURE 6.16 – Schéma du montage microfluidique utilisant une boucle qui impose la même pression hydrostatique de part et d'autre du canal de la puce microfluidique. V1 est une vanne de coupure de type On/Off, V2 est une vanne d'aiguillage en T qui permet de tester les trois configurations : a vers c qui assure la circulation du fluide dans la puce, a vers b qui réalise le bouclage du circuit sur lui-même et b vers c afin de remplir la boucle.

de l'arrêt soudain du flux et qu'il renvoie les contraintes subies sous forme d'oscillations amorties. Mais des mesures après 2, 5, 8 et 20 minutes révèlent un flux similaire et instable.

Très peu d'études s'intéressent à arrêter quasi parfaitement le flux dans un canal, ainsi aucune explication n'a pour le moment été trouvée même auprès du développeur des systèmes de microfluidiques (Elveflow) qui semble rencontrer les mêmes contraintes. En effet, ces deux premières solutions sont proposées sur leur site sous le nom de *Stop-flow*, mais quelque temps après cela, une dernière méthode a été proposée par Elveflow en 2020 sous le nom de *Zero-flow* qui permettrait de résoudre les problèmes de flux résiduels que les utilisateurs semblaient rencontrer.

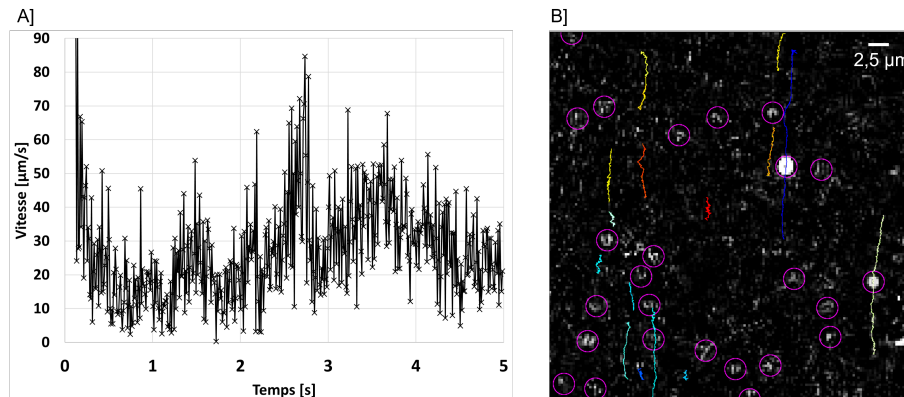


FIGURE 6.17 – A] Mesure de la vitesse de déplacement d'une particule après l'arrêt du flux. B] Image des trajectoires construites grâce au plugin *TrackMate* de *Fiji*. Les particules sont entourées d'un cercle violet et les trajectoires les plus longues sont tracées de différentes couleurs.

6.3.3 Zero-flow

La dernière solution pour arrêter le flux au sein du canal relève d'un principe relativement simple puisqu'une boucle de retour est réalisée au moyen d'une vanne à deux sorties qui peut envoyer le fluide vers la sortie ou vers une jonction en T qui relie le réservoir et l'entrée du canal microfluidique. Le but est d'arrêter la pression dans un premier temps puis de modifier la sortie de la vanne pour que la sortie et l'entrée de la puce microfluidique partagent la même pression du réservoir. La figure 6.18 illustre le schéma proposé par Elveflow pour réaliser du *Zero-flow*.

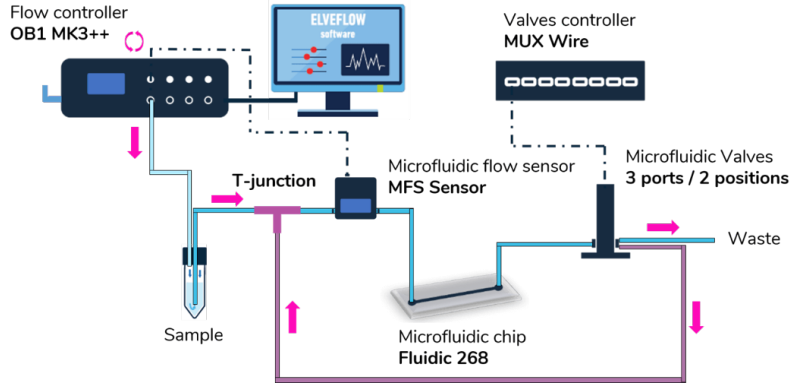


FIGURE 6.18 – Schéma du montage microfluidique nécessaire afin de réaliser du *Zero-flow*. La vanne de sortie réalise un bouclage avec l'entrée au moyen d'une jonction en T. Crédit : Elveflow

Encore une fois, la mesure de la vitesse d'écoulement est mesurée grâce aux trajectoires de particules de $2\ \mu\text{m}$ de diamètre, dispersées dans le fluide. La figure 6.19A montre la vitesse des particules à partir de l'arrêt de la pression et le bouclage sur la jonction T. La figure 6.19B montre une image des trajectoires construites grâce au plugin TrackMate de Fiji. L'aspect visuel des mouvements des particules est intéressant à observer puisque le ralentissement permet au mouvement brownien d'être observé. Afin de statuer sur la quantité de flux résiduel, il faut s'intéresser à une comparaison pertinente du mouvement des particules avec le mouvement brownien puisque la vitesse résiduelle ne peut pas être nulle. Le calcul de la moyenne des déplacements permet ainsi d'obtenir une information par rapport au flux résiduel ou plutôt *drift* comme nous l'avons appelé précédemment dans les chapitres traitant du suivi individuel de particules. Sur un ensemble de 10 trajectoires et pour des valeurs en régime stable quelques secondes après l'arrêt du flux, la moyenne des déplacements représente $18\ \text{nm/s}$. Cette valeur montre que le flux résiduel est quasiment supprimé pour atteindre une valeur assez faible qui permet d'exploiter les trajectoires du mouvement brownien de particules en diffusion.

Néanmoins, faute de temps, cette méthode n'a pas pu faire encore l'objet d'applications plus poussées permettant d'appliquer le *zero-flow* à des expériences d'agrégation ou de cristallisation.

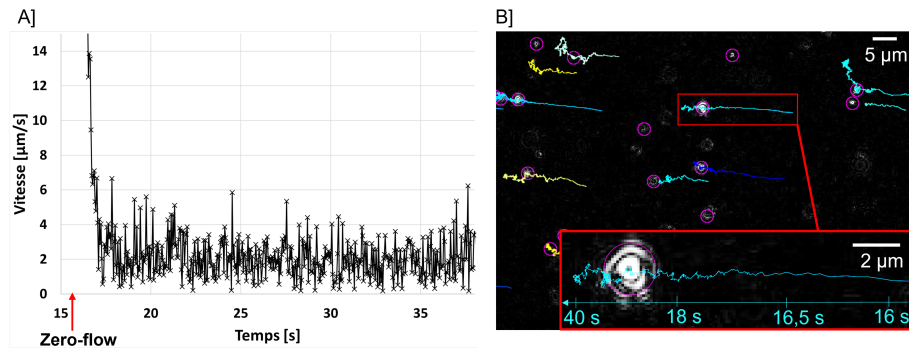


FIGURE 6.19 – A] Mesure de la vitesse de déplacement d’une particule après l’arrêt du flux avec le montage *zero-flow*. B] Image des trajectoires construites grâce au plugin *TrackMate*. Les particules sont entourées d’un cercle violet et les trajectoires les plus longues sont tracées de différentes couleurs. Un grossissement est réalisé sur une trajectoire pour constater le ralentissement qui laisse voir le mouvement brownien.

Conclusion et perspectives

Cette thèse avait pour but de développer une méthode de caractérisation des nano-sources de lumière grâce à la microscopie non-linéaire comme outil de mesure et dans une configuration microfluidique permettant de maîtriser les conditions d'expériences. Ce premier objectif a été atteint en optimisant les paramètres de balayages et d'enregistrement des données afin que la cadence d'acquisitions des images soit suffisante pour décrire les trajectoires des particules en mouvement. Les diverses optimisations ont fait appel à des notions statistiques afin d'établir un lien entre le nombre de points mesurés dans une trajectoire et sa fiabilité pour estimer sa taille. La théorie, validée par l'expérience, a également montré que des images de hautes résolutions ne sont pas toujours optimales si l'information de localisation spatiale (théorème de Nyquist-Shannon) est suffisante pour établir le mouvement des objets d'études. Les conditions expérimentales montrent finalement que les paramètres d'acquisition doivent être établis en faisant des compromis entre la résolution spatiale et la résolution temporelle pour accéder à des mesures fiables statistiquement.

Afin de progresser vers une expérience complète qui utilise la microscopie non-linéaire comme outil de mesure, la thèse s'est orientée vers la microfluidique en lui donnant un intérêt plus prononcé que prévu, notamment par rapport à la microfabrication. Le besoin s'est fait ressentir de développer au sein du laboratoire une méthode de fabrication des puces microfluidiques afin de produire nos propres supports d'études adaptés aux expériences à réaliser. Une méthode rapide et accessible a été mise au point en utilisant l'écran LCD programmable d'une imprimante 3D afin de réaliser les moules des puces microfluidiques par photolithographie. Cette méthode de fabrication a demandé de nombreux tests et quelques adaptations afin de convenir à la microfabrication de moules en résine photosensible. Néanmoins, la qualité et la polyvalence lors de la conception des canaux microfluidiques ont été démontrées grâce à des géométries de puces mettant à l'épreuve l'équilibre des résistances hydrodynamiques. La validation expérimentale du modèle du gradient de concentration a montré un accord avec la théorie qui traduit une qualité de la structure des canaux microfluidiques.

Dans l'idée d'effectuer l'étude de la dynamique d'agrégation ou de cristallisation en canaux microfluidiques, une solution intermédiaire devait être réalisée afin d'appréhender les nouvelles expériences avec une microscopie moins contraignante que la microscopie non-linéaire. En conciliant ce besoin avec les possibilités d'innovation offertes par la méthode de microfabrication par rapport à la géométrie des canaux, cela a permis de concevoir une méthode de microscopie à feuille de lumière en canaux microfluidiques. En prévoyant lors de la microfabrication l'espace nécessaire à l'insertion de deux fibres optiques perpendiculaires l'une à l'autre, a permis de créer un système fibre/lentille qui génère une feuille de lumière d'environ $12 \mu\text{m}$ d'épaisseur au sein du canal. Cette configuration fibre/lentille sans saut d'indice permet ainsi d'améliorer le rapport signal sur bruit d'un facteur au moins 5 comparé aux méthodes utilisant une simple fibre comme guide. Cette

méthode a également prouvé sa facilité de mise en place et sa fiabilité, ce qui en fait une méthode avec un grand potentiel pour les études en régime microfluidique. Le fait de pouvoir générer une feuille de lumière relativement fine a permis d'envisager dans un premier temps de réaliser les études de suivi de particules en microscopie à feuille de lumière et par la même occasion, d'élaborer une nouvelle méthode de construction d'une distribution par la somme de gaussiennes normalisées représentant un poids lié au nombre de points pour chaque trajectoire. L'idée d'utiliser une fibre comme une lentille cylindrique doit permettre de poursuivre les innovations avec pour objectif de réduire l'épaisseur de la feuille de lumière en focalisant le faisceau dans un canal placé beaucoup plus loin de la lentille.

Afin d'évoluer vers une expérience complète d'étude de la dynamique d'agrégation en conditions microfluidiques, la solution de *flow-focusing* 2D a été développée. Cette méthode a prouvé son succès en réalisant l'agrégation de molécules de HPS qui présentent non seulement des propriétés hydrophobes, mais également une capacité à émettre de la fluorescence lorsqu'elles s'agrègent (effet AIE). Ainsi, une géométrie microfluidique a permis de confiner un flux de HPS au sein d'un flux d'eau, provoquant une agrégation des molécules de HPS à l'interface des deux solutions qui peut être facilement mesurée grâce à son signal de fluorescence. Ce dispositif a fait l'objet de nombreux prototypes visant à optimiser la géométrie des canaux microfluidiques qui s'avère être un paramètre essentiel pour établir des conditions stables et reproductibles. Une solution a finalement été élaborée en maximisant les résistances hydrodynamiques des entrées par rapport à la sortie afin d'assurer un écoulement stable et facile à interrompre et à réamorcer.

L'objectif suivant était de passer d'un régime d'écoulement laminaire générant des agrégats de molécules de HPS à un arrêt des flux visant à utiliser la méthode de caractérisation du mouvement brownien pour évaluer les tailles des agrégats formés. L'arrêt du flux au sein d'un canal micrométrique s'est avéré relativement difficile au regard du flux résiduel qui peut subsister. Les expériences ont montré une forte sensibilité des écoulements microfluidiques face aux perturbations. Pour que le mouvement brownien soit exploitable, il a fallu réduire la vitesse d'écoulement résiduel à quelques nanomètres par seconde. La solution réalisée pour arrêter le flux utilise d'un bouclage du circuit fluide sur lui-même.

Les expériences de ce travail de thèse se sont arrêtées sur ces résultats prometteurs qui regroupent plusieurs domaines de la physique qui ont été globalement complexes à mettre au point. Néanmoins, on peut retenir que plusieurs avancées ont été réalisées dans le but de converger vers une expérience finale. Ces avancées peuvent être résumées à travers les points suivants :

- La faisabilité du suivi de particules en diffusion grâce à la microscopie non-linéaire.
- La conception simplifiée de puces microfluidiques au sein du laboratoire.
- Le développement d'une méthode accessible de microscopie à feuille de lumière intégrée à une puce microfluidique.
- La mise au point d'une méthode d'étude de la taille de particules en formation au sein d'un écoulement microfluidique multiphasique.

Ces résultats demandent de poursuivre ce travail de thèse en élaborant un protocole de formation d'agrégats au sein d'une puce microfluidique munie du système de micro-optique permettant la formation d'une feuille de lumière au sein du canal. Ainsi, les agrégats pourraient être étudiés à une position fixe dans le canal en faisant varier les conditions expérimentales (concentration, ratio des flux, vitesse d'écoulement, température, etc.).

Bibliographie

- [1] P. TABELING, *Introduction à la microfluidique*. Paris : Belin, 2003.
- [2] A. MANZ, D. HARRISON, E. VERPOORTE et al., "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems : Capillary electrophoresis on a chip," *Journal of Chromatography A*, p. 253-258, 1992. DOI : [10.1016/0021-9673\(92\)80293-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80293-4).
- [3] D. HARRISON, A. MANZ et P. GLAVINA, "Electroosmotic pumping within a chemical sensor system integrated on silicon," in *Proceedings of TRANSDUCERS '91 : International Conference on Solid-State Sensors and Actuators.*, 1991, p. 792-795. DOI : [10.1109/SENSOR.1991.149002](https://doi.org/10.1109/SENSOR.1991.149002).
- [4] P. WILDING, M. SHOFFNER et L. KRICKA, "PCR in a silicon microstructure," *Clinical Chemistry*, p. 1815-1818, 1994. DOI : [10.1093/clinchem/40.9.1815](https://doi.org/10.1093/clinchem/40.9.1815).
- [5] T. PERKINS, D. SMITH, R. LARSON et S. CHU, "Stretching of a Single Tethered Polymer in a Uniform Flow," *Science*, p. 83-87, 1995. DOI : [10.1126/science.7701345](https://doi.org/10.1126/science.7701345).
- [6] G. WANG, F. YANG et W. ZHAO, "There can be turbulence in microfluidics at low Reynolds number," *Lab Chip*, p. 1452-1458, 2014. DOI : [10.1039/C3LC51403J](https://doi.org/10.1039/C3LC51403J).
- [7] W. SELLERS, S. POND, C. BRASSEY, P. MANNING et K. BATES, "Investigating the running abilities of Tyrannosaurus rex using stress constrained multibody dynamic analysis," *PeerJ*, e3420, 2017. DOI : [10.7717/peerj.3420](https://doi.org/10.7717/peerj.3420).
- [8] T. SQUIRES et S. QUAKE, "Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale," *Rev. Mod. Phys.*, p. 977-1026, 2005. DOI : [10.1103/RevModPhys.77.977](https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977).
- [9] G. BIRD, "Definition of mean free path for real gases," *The Physics of Fluids*, p. 3222-3223, 1983. DOI : [10.1063/1.864095](https://doi.org/10.1063/1.864095).
- [10] E. HITZER, "Early works on the Hagen-Poiseuille flow," *viXra*, p. 45-53, 2001.
- [11] H. EYRING, "The Activated Complex in Chemical Reactions," *The Journal of Chemical Physics*, p. 107-115, 1935. DOI : [10.1063/1.1749604](https://doi.org/10.1063/1.1749604).
- [12] E. PURCELL, "Life at low Reynolds number," *American Journal of Physics*, p. 3-11, 1977. DOI : [10.1119/1.10903](https://doi.org/10.1119/1.10903).
- [13] J. PLAWSKY, *Transport Phenomena Fundamentals*, sér. Chemical Industries. Taylor et Francis, 2001.
- [14] A. FICK, "Ueber Diffusion," *Annalen der Physik*, p. 59-86, 1855. DOI : [10.1002/andp.18551700105](https://doi.org/10.1002/andp.18551700105).

- [15] Z. ZLATEV, R. BERKOWICZ et L. PRAHM, "Testing subroutines solving advection-diffusion equations in atmospheric environments," *Computers and Fluids*, p. 13-38, 1983. DOI : [10.1016/0045-7930\(83\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0045-7930(83)90011-7).
- [16] C. BIGG, "Evident atoms : visibility in Jean Perrin's Brownian motion research," *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, p. 312-322, 2008. DOI : [10.1016/j.shpsa.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2008.06.003).
- [17] R. BIRD, W. STEWART, E. LIGHTFOOT et J. WILEY, "Transport phenomena," *AIChE Journal*, 5J-6J, 1961. DOI : [10.1002/aic.690070245](https://doi.org/10.1002/aic.690070245).
- [18] B. ALBERTS, D. BRUCE ALBERTS, D. BRAY et al., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub., 1989.
- [19] H. ANDERSSON et A. van den BERG, "Microfluidic devices for cellomics : a review," *Sensors and Actuators B : Chemical*, p. 315-325, 2003. DOI : [10.1016/S0925-4005\(03\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00266-1).
- [20] A. E. KAMHOLZ, E. A. SCHILLING et P. YAGER, "Optical Measurement of Transverse Molecular Diffusion in a Microchannel," *Biophysical Journal*, p. 1967-1972, 2001. DOI : [10.1016/S0006-3495\(01\)76166-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76166-8).
- [21] T. CHAPMAN, "Pure but not simple," *Nature*, p. 795-796, 2005. DOI : [10.1038/434795a](https://doi.org/10.1038/434795a).
- [22] L. WU, C. QIUSHUI, L. XUOXIA et L. JIN-MING, "Online multi-channel microfluidic chip-mass spectrometry and its application for quantifying noncovalent protein-protein interactions," *Analyst*, p. 1551-1554, 2015. DOI : [10.1039/C4AN02370F](https://doi.org/10.1039/C4AN02370F).
- [23] S. SUI et S. L. PERRY, "Microfluidics : From crystallization to serial time-resolved crystallography," *Structural Dynamics*, p. 032 202, 2017. DOI : [10.1063/1.4979640](https://doi.org/10.1063/1.4979640).
- [24] R. SCOTT, *Techniques and Practice of Chromatography*. CRC Press, 2020.
- [25] Z. ZHOU, Y. LIU et B. ZHANG, "Microfluidic Array Liquid Chromatography : A Proof of Principle Study," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, p. 500-507, 2019. DOI : [10.1016/S1872-2040\(19\)61154-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61154-0).
- [26] M. WHITE et A. FROST, "The rate of nucleation of supersaturated potassium nitrate solutions," *Journal of Colloid Science*, p. 247-251, 1959. DOI : [10.1016/0095-8522\(59\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0095-8522(59)90049-2).
- [27] W. HARRIS, *Chemical milling : the technology of cutting materials by etching*. Clarendon Press, 1976.
- [28] G. WHITESIDES, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, p. 368-373, 2006. DOI : [10.1038/nature05058](https://doi.org/10.1038/nature05058).
- [29] S. TERRY, J. HERMAN et J. ANGELL, "A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer," *IEEE Transactions on Electron Devices*, p. 1880-1886, 1979. DOI : [10.1109/T-ED.1979.19791](https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791).
- [30] "Stellan Hjertén, Uppsala University," *Analyst*, p. 1307-1309, 2003. DOI : [10.1039/B307798P](https://doi.org/10.1039/B307798P).
- [31] A. FOLCH et M. TONER, "Cellular micropatterns on biocompatible materials," *Biotechnology Progress*, p. 388-392, 1998. DOI : [10.1021/bp980037b](https://doi.org/10.1021/bp980037b).
- [32] D. HUH, B. MATTHEWS, A. MAMMOTO, M. MONTOYA-ZAVALA, H. YUAN HSIN et D. INGBER, "Reconstituting organ-level lung functions on a chip," *Science*, p. 1662-1668, 2010. DOI : [10.1126/science.1188302](https://doi.org/10.1126/science.1188302).

-
- [33] D. BORNSIDE, C. MACOSKO et L. SCRIVEN, "Modeling of spin coating," *Journal of Imaging Science and Technology*, p. 122-130, 1987.
- [34] P. PHAM, P. SARRO et J. BURGHARTZ, "Spray coating of AZ4562 photoresist for MEMS applications," STW Technology Foundation, 2001, p. 154-158.
- [35] P. MUKHERJEE, F. NEBULONI, H. GAO, J. ZHOU et I. PAPAUTSKY, "Rapid Prototyping of Soft Lithography Masters for Microfluidic Devices Using Dry Film Photoresist in a Non-Cleanroom Setting," *Micromachines*, 2019. DOI : [10.3390/mi10030192](https://doi.org/10.3390/mi10030192).
- [36] M. YOSHIKAWA, O. TAKASHI, T. TATSUO et S. KYOZO, "Deep-UV Photolithography," *Japanese Journal of Applied Physics*, p. 541-550, 1978. DOI : [10.1143/jjap.17.541](https://doi.org/10.1143/jjap.17.541).
- [37] V. COLIN, T. TRAVERS, D. GINDRE, R. BARILLÉ et M. LOUMAIGNE, "Cheap, versatile, and turnkey fabrication of microfluidic master molds using consumer-grade LCD stereolithography 3D printing," *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, p. 537-544, 2021. DOI : [10.1007/s00170-021-07329-3](https://doi.org/10.1007/s00170-021-07329-3).
- [38] H. TOSHIYUKI, K. SOICHIRO et K. HIROSHI, "Simple maskless lithography tool with a desktop size using a liquid-crystal-display projector," *Microelectronic Engineering*, p. 37-43, 2015. DOI : [10.1016/j.mee.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.mee.2015.01.003).
- [39] R. PHILLIPS, "Photopolymerization," *Journal of Photochemistry*, p. 79-82, 1984. DOI : [10.1016/0047-2670\(84\)85016-9](https://doi.org/10.1016/0047-2670(84)85016-9).
- [40] H. LORENZ, M. DESPONT, N. FAHRNI, N. LABIANCA, P. RENAUD et P. VETTIGER, "SU-8 : A low-cost negative resist for MEMS," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, p. 121-124, 1997. DOI : [10.1088/0960-1317/7/3/010](https://doi.org/10.1088/0960-1317/7/3/010).
- [41] N. MIHAICH, R. FENDINGER et E. LEHMANN, "7 Polydimethylsiloxane," 1997. DOI : [10.1007/978-3-540-68331-5_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68331-5_7).
- [42] M. UNGER, H. CHOU, T. THORSEN, A. SCHERER et S. QUAKE, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," *Science*, p. 113-116, 2000. DOI : [10.1126/science.288.5463.113](https://doi.org/10.1126/science.288.5463.113).
- [43] C. LUO, X. ZHU, T. YU et al., "A fast cell loading and high-throughput microfluidic system for long-term cell culture in zero-flow environments," *Biotechnology and Bioengineering*, p. 190-195, 2008. DOI : [10.1002/bit.21877](https://doi.org/10.1002/bit.21877).
- [44] K. HAUBERT, T. DRIER et D. BEEBE, "PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system," *Lab on a Chip*, p. 1548-1549, 2006. DOI : [10.1039/b610567j](https://doi.org/10.1039/b610567j).
- [45] H. PARK, J. CHO, J. JUNG, P. DUY, A. H. LE et J. YI, "A Review of Wet Chemical Etching of Glasses in Hydrofluoric Acid based Solution for Thin Film Silicon Solar Cell Application," *Current Photovoltaic Research*, p. 75-82, 2017. DOI : [10.21218/CPR.2017.5.3.075](https://doi.org/10.21218/CPR.2017.5.3.075).
- [46] R. BROWN, "XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies," *The Philosophical Magazine*, p. 161-173, 1828. DOI : [10.1080/14786442808674769](https://doi.org/10.1080/14786442808674769).
- [47] E. ALBERT, *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*, 1905.
- [48] J. PERRIN, "Mouvement brownien et molécules," *Journal de Physique Théorique et Appliquée*, p. 5-39, 1910. DOI : [10.1051/jphysap:0191000900500](https://doi.org/10.1051/jphysap:0191000900500).

BIBLIOGRAPHIE

- [49] L. GOUY, *Note sur le Mouvement Brownien*. Journal de physique Théorique et Appliquée, 1888, ISBN : 9781000723618.
- [50] L. BACHELIER, “Théorie de la spéculation,” *Annales scientifiques de l’École Normale Supérieure*, p. 21-86, 1900. DOI : [10.24033/asens.476](https://doi.org/10.24033/asens.476).
- [51] B. DUPLANTIER, “Le mouvement brownien, ”divers et ondoyant”,” *Séminaire Poincaré*, 2005. adresse : <http://www.bourbaphy.fr/duplantier2.pdf>.
- [52] X. MICHALET et A. BERGLUND, “Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking,” *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, p. 1-14, 2012. DOI : [10.1103/PhysRevE.85.061916](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.061916).
- [53] A. BERGLUND, “Statistics of camera-based single-particle tracking,” *Phys. Rev. E*, p. 011 917, 2010. DOI : [10.1103/PhysRevE.82.011917](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.82.011917).
- [54] H. QIAN, M. SHEETZ et E. ELSON, “Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems,” *Biophysical Journal*, p. 910-921, 1991. DOI : [10.1016/S0006-3495\(91\)82125-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82125-7).
- [55] C. VESTERGAARD, P. BLAINEY et H. FLYVBJERG, “Optimal estimation of diffusion coefficients from single-particle trajectories,” *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2014. DOI : [10.1103/PhysRevE.89.022726](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.022726).
- [56] M. CATIPOVIC, P. TYLER, J. TRAPANI et A. CARTER, “Improving the quantification of Brownian motion,” *American Journal of Physics*, p. 485-491, 2013. DOI : [10.1119/1.4803529](https://doi.org/10.1119/1.4803529).
- [57] D. AXELROD, D. E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, E. ELSON et W. W. WEBB, “Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics,” *Biophysical Journal*, p. 1055-1069, 1976. DOI : [10.1016/S0006-3495\(76\)85755-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85755-4).
- [58] T. BASCHÉ, “Fluorescence intensity fluctuations of single atoms, molecules and nanoparticles,” *Journal of Luminescence*, p. 263-269, 1998. DOI : [10.1016/S0022-2313\(97\)00284-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(97)00284-6).
- [59] K. MUDUMBI, E. SCHIRMER et W. YANG, “Single-point single-molecule FRAP distinguishes inner and outer nuclear membrane protein distribution,” *Nature Communications*, p. 12 562, 2016. DOI : [10.1038/ncomms12562](https://doi.org/10.1038/ncomms12562).
- [60] M. WERTS, V. RAIMBAULT, R. TEXIER-PICARD et al., “Quantitative full-colour transmitted light microscopy and dyes for concentration mapping and measurement of diffusion coefficients in microfluidic architectures,” *Lab Chip*, p. 808-820, DOI : [10.1039/C2LC20889J](https://doi.org/10.1039/C2LC20889J).
- [61] A. KAMHOLZ et P. YAGER, “Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure-Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels,” *Biophysical Journal*, p. 155-160, 2001. DOI : [10.1016/S0006-3495\(01\)76003-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76003-1).
- [62] J. TYNDALL, “On the blue colour of the sky, the polarization of skylight, and on the polarization of light by cloudy matter generally,” *Proc. R. Soc. Lond.*, p. 223-233, 1869. DOI : [10.1098/rsp1.1868.0033](https://doi.org/10.1098/rsp1.1868.0033).
- [63] J. RAYLEIGH, “Colours of sea and sky,” *Nature*, p. 48-50, 1910. DOI : [10.1038/083048a0](https://doi.org/10.1038/083048a0).
- [64] B. BERNE et R. PECORA, *Dynamic Light Scattering : With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications, 2013.

-
- [65] R. CERBINO et V. TRAPPE, "Differential Dynamic Microscopy : Probing Wave Vector Dependent Dynamics with a Microscope," *Phys. Rev. Lett.*, p. 188 102, 2008. DOI : [10.1103/PhysRevLett.100.188102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.188102).
- [66] F. GIAVAZZI, D. BROGIOLI, V. TRAPPE, T. BELLINI et R. CERBINO, "Scattering information obtained by optical microscopy : Differential dynamic microscopy and beyond," *Phys. Rev. E*, p. 031 403, 2009. DOI : [10.1103/PhysRevE.80.031403](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.031403).
- [67] D. GERMAIN, M. LEOCMACH et T. GIBAUD, "Differential Dynamic Microscopy to characterize Brownian motion and bacteria motility," *American Journal of Physics*, p. 202, 2016. DOI : [10.1119/1.4939516](https://doi.org/10.1119/1.4939516).
- [68] L. YU, Y. LEI, Y. MA et al., "A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy," *Frontiers in Physics*, 2021. DOI : [10.3389/fphy.2021.644450](https://doi.org/10.3389/fphy.2021.644450).
- [69] B. HERMAN, "Fluorescence Microscopy," p. 1-10, 1998. DOI : [10.1201/9781003077060](https://doi.org/10.1201/9781003077060).
- [70] C. WINNEWISSER, F. LEWEN et H. HELM, "Transmission characteristics of dichroic filters measured by THz time-domain spectroscopy," *Applied Physics A : Materials Science and Processing*, p. 593-598, 1998. DOI : [10.1007/s003390050720](https://doi.org/10.1007/s003390050720).
- [71] J. KERR, "Journal of Science," *Journal of Science*, 2018. DOI : [10.47944/jos.2.5.2018](https://doi.org/10.47944/jos.2.5.2018).
- [72] M. GÖPPERT-MAYER, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen," *Annalen der Physik*, p. 273-294, 1931. DOI : [10.1002/andp.19314010303](https://doi.org/10.1002/andp.19314010303).
- [73] P. FRANKEN, A. HILL, C. PETERS et G. WEINREICH, "Generation of optical harmonics," *Physical Review Letters*, p. 118-119, 1961. DOI : [10.1103/PhysRevLett.7.118](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.118).
- [74] X. CHEN, O. NADIARYNKH, S. PLOTNIKOV et P. CAMPAGNOLA, "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure," *Nature Protocols*, p. 654-669, 2012. DOI : [10.1038/nprot.2012.009](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009).
- [75] W. ZIPFEL, R. WILLIAMS et W. WEBB, "Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences," *Nature Biotechnology*, p. 1369-1377, 2003. DOI : [10.1038/nbt899](https://doi.org/10.1038/nbt899).
- [76] D. GINDRE, K. ILIOPOULOS, O. KRUPKA, M. EVRARD, E. CHAMPIGNY et M. SALLÉ, "Coumarin-Containing Polymers for High Density Non-Linear Optical Data Storage," *Molecules*, 2016. DOI : [10.3390/molecules21020147](https://doi.org/10.3390/molecules21020147).
- [77] D. GINDRE, K. ILIOPOULOS, O. KRUPKA, E. CHAMPIGNY, Y. MORILLE et M. SALLÉ, "Image storage in coumarin-based copolymer thin films by photoinduced dimerization," *Opt. Lett.*, p. 4636-4639, 2013. DOI : [10.1364/OL.38.004636](https://doi.org/10.1364/OL.38.004636).
- [78] H. NGUYEN, H. THACH, E. ROY, K. HUYNH et C. PERRAULT, "Low-cost, accessible fabrication methods for microfluidics research in low-resource settings," *Micromachines*, p. 1-10, 2018. DOI : [10.3390/mi9090461](https://doi.org/10.3390/mi9090461).
- [79] P. VULTO, N. GLADE, L. ALTOMARE et al., "Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips," *Lab Chip*, p. 158-162, 2005. DOI : [10.1039/B411885E](https://doi.org/10.1039/B411885E).
- [80] B. MAISONNEUVE, T. HONEGGER, J. CORDEIRO et al., "Rapid mask prototyping for microfluidics," *Biomicrofluidics*, n° 2, 2016. DOI : [10.1063/1.4943124](https://doi.org/10.1063/1.4943124).
- [81] C. KIM, D. LEE, J. YOUN, H. LEE et J. JEONG, "Simple and cost-effective microfabrication of flexible and stretchable electronics for wearable multi-functional electrophysiological monitoring," *Scientific Reports*, p. 14 823, 2021. DOI : [10.1038/s41598-021-94397-w](https://doi.org/10.1038/s41598-021-94397-w).

- [82] K. HAUBERT, T. DRIER et D. BEEBE, “PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system,” *Lab on a Chip*, p. 1548-1549, 2006.
- [83] D. INGLIS, J. WHITE et V. SREENIVASAN, “Sidewall profiles in thick resist with direct image lithography,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2021. DOI : [10.1088/1361-6439/ac220c](https://doi.org/10.1088/1361-6439/ac220c).
- [84] Y. WANG, T. MUKHERJEE et Q. LIN, “Systematic modeling of microfluidic concentration gradient generators,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, p. 2128-2137, 2006. DOI : [10.1088/0960-1317/16/10/029](https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/10/029).
- [85] K. THORN, “A quick guide to light microscopy in cell biology,” *Mol Biol Cell*, p. 219-222, 2016. DOI : [10.1091/mbc.e15-02-0088](https://doi.org/10.1091/mbc.e15-02-0088).
- [86] F. HLELI, N. MERCIER, M. BEN HAJ SALAH et al., “Morphology and temperature dependence of a dual excitonic emissive 2D bromoplumbate hybrid perovskite : the key role of crystal edges,” *J. Mater. Chem. C*, p. 10 284-10 291, 2022. DOI : [10.1039/D2TC01449A](https://doi.org/10.1039/D2TC01449A).
- [87] H. NYQUIST, “Certain Topics in Telegraph Transmission Theory,” *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers*, p. 617-644, 1928. DOI : [10.1109/T-AIEE.1928.5055024](https://doi.org/10.1109/T-AIEE.1928.5055024).
- [88] C. SHANNON, “Communication in the Presence of Noise,” *Proceedings of the IRE*, p. 10-21, 1949. DOI : [10.1109/JRPROC.1949.232969](https://doi.org/10.1109/JRPROC.1949.232969).
- [89] P. COLARUSSO, L. KIDDER, I. LEVIN et E. NEIL LEWIS, “Raman and Infrared Microspectroscopy,” in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, J. LINDON, éd., Oxford : Elsevier, 1999, p. 1945-1954. DOI : [10.1006/rwsp.2000.0402](https://doi.org/10.1006/rwsp.2000.0402).
- [90] R. COLE, T. JINADASA et C. BROWN, “Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control,” *Nature Protocols*, p. 1929-1941, 2011. DOI : [10.1038/nprot.2011.407](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.407).
- [91] J. BULLERJAHN, S. VON BÜLOW et G. HUMMER, “Optimal estimates of self-diffusion coefficients from molecular dynamics simulations,” *Journal of Chemical Physics*, p. 024 116, 2020. DOI : [10.1063/5.0008312](https://doi.org/10.1063/5.0008312).
- [92] D. ERSHOV, M. PHAN, J. PYLVÄNÄINEN et al., “TrackMate 7 : integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines,” *Nature Methods*, 2022. DOI : [10.1038/s41592-022-01507-1](https://doi.org/10.1038/s41592-022-01507-1).
- [93] T. LINDBERG, “Detecting salient blob-like image structures and their scales with a scale-space primal sketch : A method for focus-of-attention,” *International Journal of Computer Vision*, p. 283-318, 1993. DOI : [10.1007/BF01469346](https://doi.org/10.1007/BF01469346).
- [94] —, “Feature Detection with Automatic Scale Selection,” *International Journal of Computer Vision*, p. 79-116, 1998. DOI : [10.1023/A:1008045108935](https://doi.org/10.1023/A:1008045108935).
- [95] R. PETERS, *Spreadsheet Filtering by FFT Gaussian-based Convolution*, 2004. DOI : [10.48550/ARXIV.PHYSICS/0406087](https://doi.org/10.48550/ARXIV.PHYSICS/0406087).
- [96] H. KONG, H. AKAKIN et S. SARMA, “A Generalized Laplacian of Gaussian Filter for Blob Detection and Its Applications,” *IEEE Transactions on Cybernetics*, p. 1719-1733, 2013. DOI : [10.1109/TSMCB.2012.2228639](https://doi.org/10.1109/TSMCB.2012.2228639).
- [97] D. LOWE, “Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints,” *International Journal of Computer Vision*, p. 91-, 2004. DOI : [10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94](https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94).

-
- [98] N. OTSU, "A threshold selection method from gray level histograms," *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, t. 9, p. 62-66, 1979. DOI : [10.1109/TSMC.1979.4310076](https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076).
- [99] K. JAQAMAN, D. LOERKE, M. METTLEN et al., "Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences," *Nat Methods*, p. 695-702, 2008. DOI : [10.1038/nmeth.1237](https://doi.org/10.1038/nmeth.1237).
- [100] P. VAN DER MEEREN, M. KASINOS et H. SAVEYN, "Relevance of two-dimensional Brownian motion dynamics in applying nanoparticle tracking analysis," *Methods Mol Biol*, p. 525-534, 2012. DOI : [10.1007/978-1-61779-953-2_42](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_42).
- [101] T. TRAVERS, V. COLIN, M. LOUMAIGNE, R. BARILLÉ et D. GINDRE, "Single-Particle Tracking with Scanning Non-Linear Microscopy," *Nanomaterials*, 2020. DOI : [10.3390/nano10081519](https://doi.org/10.3390/nano10081519).
- [102] L. MAYER, A. SLABLAB, G. DANTELLE et al., "Single KTP nanocrystals as second-harmonic generation biolabels in cortical neurons," *Nanoscale*, p. 8466-8471, 2013. DOI : [10.1039/C3NR01251D](https://doi.org/10.1039/C3NR01251D).
- [103] H. SIEDENTOPF et R. ZSIGMONDY, "Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser," *Annalen der Physik*, p. 1-39, 1902. DOI : [10.1002/andp.19023150102](https://doi.org/10.1002/andp.19023150102).
- [104] A. VOIE, D. BURNS et F. SPELMAN, "Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning : Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens," *Journal of Microscopy*, p. 229-236, 1993. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x).
- [105] J. HUISKEN, J. SWOGER, F. DEL BENE, J. WITTBRODT et E. . STELZER, "Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy," *Science*, p. 1007-1009, 2004. DOI : [10.1126/science.1100035](https://doi.org/10.1126/science.1100035).
- [106] C. DUNSBY, "Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy," *Opt. Express*, p. 20306-20316, 2008. DOI : [10.1364/OE.16.020306](https://doi.org/10.1364/OE.16.020306).
- [107] R. BLUE et D. UTTAMCHANDANI, "Recent advances in optical fiber devices for microfluidics integration," *Journal of Biophotonics*, p. 13-25, 2016. DOI : [10.1002/jbio.201500170](https://doi.org/10.1002/jbio.201500170).
- [108] M. WERTS, V. RAIMBAULT, M. LOUMAIGNE et al., "Optical microscopy and spectroscopy of analyte-sensitive functionalized gold nanoparticles in microfluidic systems," *Proc. SPIE 2013, 8595, 85950W*, 85950W-85950W-11, 2013. DOI : [10.1117/12.2001608](https://doi.org/10.1117/12.2001608).
- [109] S. CAMOU, H. FUJITA et T. FUJII, "PDMS 2D optical lens integrated with microfluidic channels : Principle and characterization," *Lab on a Chip*, p. 40-45, 2003. DOI : [10.1039/b211280a](https://doi.org/10.1039/b211280a).
- [110] M. WERTS, F. ALLIX, O. FRANÇAIS et al., "Manipulation and Optical Detection of Colloidal Functional Plasmonic Nanostructures in Microfluidic Systems," *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, p. 1-13, 2014. DOI : [10.1109/JSTQE.2013.2284549](https://doi.org/10.1109/JSTQE.2013.2284549).
- [111] F. SALA, M. CASTRIOTTA, P. PAIÈ et al., "High-throughput 3D imaging of single cells with light-sheet fluorescence microscopy on chip," *Biomedical Optics Express*, p. 4397, 2020. DOI : [10.1364/boe.393892](https://doi.org/10.1364/boe.393892).
- [112] P. PAIÈ, F. BRAGHERI, A. BASSI et R. OSELLAME, "Selective plane illumination microscopy on a chip," *Lab on a Chip*, p. 1556-1560, 2016. DOI : [10.1039/c6lc00084c](https://doi.org/10.1039/c6lc00084c).
- [113] H. DESCHOUT, K. RAEMDONCK, S. STREMERSCHE et al., "On-chip light sheet illumination enables diagnostic size and concentration measurements of membrane vesicles in biofluids," *Nanoscale*, p. 1741-1747, 2014. DOI : [10.1039/c3nr04432g](https://doi.org/10.1039/c3nr04432g).

- [114] E. HECHT, *Optics*. Addison-Wesley, 1998.
- [115] A. GERRARD et J. BURCH, *Introduction to Matrix Methods in Optics*. Dover, 1994.
- [116] L. SANCHEZ BREA, “*Diffractions*, python module for diffraction and interference optics, <https://pypi.org/project/diffractio/>, 2019.
- [117] K. BRENNER et W. SINGER, “Light propagation through microlenses : a new simulation method,” *Applied optics*, p. 4984-4988, 1993. DOI : [10.1364/AO.32.004984](https://doi.org/10.1364/AO.32.004984).
- [118] H. THOMPSON et G. DAY, “Which conformations make stable crystal structures? Mapping crystalline molecular geometries to the conformational energy landscape,” *Chemical Science*, p. 3173-3182, 2014. DOI : [10.1039/c4sc01132e](https://doi.org/10.1039/c4sc01132e).
- [119] W. J. H. W. A. BENTLEY, *Snow crystals*. Dover Publications, New York, 1962.
- [120] E. BELENKOV et V. ALI-PASHA, “3D-graphite structure,” *Crystallography Reports*, p. 101-106, 2011. DOI : [10.1134/S1063774511010044](https://doi.org/10.1134/S1063774511010044).
- [121] P. VONK, “Industrial Aspects of Crystallization,” in Springer International Publishing, 2016, p. 31-71. DOI : [10.1007/978-3-319-20949-4_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20949-4_2).
- [122] Z. YONGZONG, “Growth of high quality large Nd : YAG crystals by Temperature Gradient Technique (TGT),” *Journal of Crystal Growth*, p. 31-35, 1986. DOI : [10.1016/0022-0248\(86\)90497-5](https://doi.org/10.1016/0022-0248(86)90497-5).
- [123] A. HOLDEN et P. SINGER, *Crystals and crystal growing*. New-York : Anchor Books-Doubleday, 1960.
- [124] K. KELTON et A. GREER, “Test of classical nucleation theory in a condensed system,” *Phys. Rev. B*, p. 10089-10092, 1988. DOI : [10.1103/PhysRevB.38.10089](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.38.10089).
- [125] D. KASHCHIEV, P. VEKILOV et A. KOLOMEISKY, “Kinetics of two-step nucleation of crystals,” *The Journal of Chemical Physics*, p. 244706, 2005. DOI : [10.1063/1.1943389](https://doi.org/10.1063/1.1943389).
- [126] S. RYU, *The Validity of Classical Nucleation Theory and Its Application to Dislocation Nucleation*. Stanford University, 2011.
- [127] M. VOLMER et A. WEBER, “Keimbildung in übersättigten Gebilden,” *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, p. 277-301, 1926. DOI : [doi:10.1515/zpch-1926-11927](https://doi.org/10.1515/zpch-1926-11927).
- [128] R. BOISTELLE et J. ASTIER, “Crystallization mechanisms in solution,” *Journal of Crystal Growth*, p. 14-30, 1988. DOI : [10.1016/0022-0248\(88\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0022-0248(88)90294-1).
- [129] S. JANCIC et E. de JONG, *Proceedings of the 9th Symposium on Industrial Crystallization, the Hague, the Netherlands, 1984*. Elsevier Science, 1984.
- [130] D. ERDEMIR, A. Y. LEE et A. S. MYERSON, “Nucleation of Crystals from Solution : Classical and Two-Step Models,” *Accounts of Chemical Research*, p. 621-629, 2009. DOI : [10.1021/ar800217x](https://doi.org/10.1021/ar800217x).
- [131] P. R. ten WOLDE et D. FRENKEL, “Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations,” *Science*, p. 1975-1978, 1997. DOI : [10.1126/science.277.5334.1975](https://doi.org/10.1126/science.277.5334.1975).
- [132] A. D. RANDOLPH et M. A. LARSON, “Particulate processes,” in *Theory of Particulate Processes (Second Edition)*, Academic Press, 1988, p. 1-18. DOI : [10.1016/B978-0-12-579652-1.50007-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-579652-1.50007-7).
- [133] A. LEWIS, M. SECKLER, H. KRAMER et G. van ROSMALEN, “Agglomeration,” in Cambridge University Press, 2015, p. 130-150. DOI : [10.1017/CB09781107280427.007](https://doi.org/10.1017/CB09781107280427.007).

-
- [134] D. ILIEVSKI et E. WHITE, "Agglomeration during precipitation : agglomeration mechanism identification for Al(OH)₃ crystals in stirred caustic aluminate solutions," *Chemical Engineering Science*, p. 3227-3239, 1994. DOI : [10.1016/0009-2509\(94\)E0060-4](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)E0060-4).
- [135] M. SMOLUCHOWSKI, "Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, p. 129-168, 1918. DOI : [doi:10.1515/zpch-1918-9209](https://doi.org/10.1515/zpch-1918-9209).
- [136] A. ANANDARAJAH et J. CHEN, "Van Der Waals Attractive Force Between Clay Particles in Water and Contaminants," *Soils and Foundations*, p. 27-37, 1997. DOI : [10.3208/sandf.37.2_27](https://doi.org/10.3208/sandf.37.2_27).
- [137] A. JONES, "Crystal agglomeration and disruption," in Butterworth-Heinemann, 2002, p. 155-189. DOI : [10.1016/B978-075065520-0/50007-9](https://doi.org/10.1016/B978-075065520-0/50007-9).
- [138] J. A. WOJCIK et A. G. JONES, "Particle disruption of precipitated CaCO₃ crystal agglomerates in turbulently agitated suspensions," *Chemical engineering science*, p. 1097-1101, 1998. DOI : [10.1016/S0009-2509\(97\)00400-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00400-4).
- [139] Y. HONG, J. LAM et B. TANG, "Aggregation-induced emission," *Chem. Soc. Rev.*, p. 5361-5388, 2011. DOI : [10.1039/C1CS15113D](https://doi.org/10.1039/C1CS15113D).
- [140] J. LUO, Z. XIE, J. LAM et al., "Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole," *Chem. Commun.*, p. 1740-1741, 2001. DOI : [10.1039/B105159H](https://doi.org/10.1039/B105159H).
- [141] J. MEI, Y. HONG, J. LAM, A. QIN, Y. TANG et B. TANG, "Aggregation-induced emission : the whole is more brilliant than the parts," *Adv Mater*, p. 5429-5479, 2014. DOI : [10.1002/adma.201401356](https://doi.org/10.1002/adma.201401356).
- [142] M. CHUA, S. KWOK WEI, H. ZHOU et J. XU, "Recent Advances in Aggregation-Induced Emission Chemosensors for Anion Sensing," *Molecules*, p. 2711, 2019. DOI : [10.3390/molecules24152711](https://doi.org/10.3390/molecules24152711).
- [143] L. JIANG, S. CAO, P. CHEUNG et al., "Real-time monitoring of hydrophobic aggregation reveals a critical role of cooperativity in hydrophobic effect," *Nature communications*, p. 15 639, 2017. DOI : [10.1038/ncomms15639](https://doi.org/10.1038/ncomms15639).
- [144] A. AU, H. LAI, B. UTELA et A. FOLCH, "Microvalves and Micropumps for BioMEMS," *Micromachines*, p. 179-220, 2011. DOI : [10.3390/mi2020179](https://doi.org/10.3390/mi2020179).

Annexe 1 : Algorithme de traitement des données de TrackMate

Cette annexe détaille le code Matlab utilisé afin de lire et de traiter les données de positions issues des trajectoires détectées par le Plugin TrackMate de Fiji. Ce code montre les opérations réalisées pour évaluer le coefficient de diffusion ainsi que le rayon des particules grâce aux déplacements enregistrés sur l'axe X. Les différents déplacements des trajectoires sont tout d'abord rangées dans différentes colonnes dont la taille diffère en fonction du nombre de positions. Grâce à l'ensemble des trajectoires, le *drift* peut être estimé afin de l'implémenter dans l'estimateur du coefficient de diffusion. Deux estimations des rayons sont réalisées, l'une utilisant la formule basique sans correction (équation 1.2.17) et l'autre en utilisant l'estimateur de covariance (équation 4.3.6). Les estimations des rayons sont ensuite extraites pour être analysées sous forme d'une distribution des tailles et ainsi en déduire le rayon le plus probable (maximum de probabilité de la distribution).

```
clear all, clc, close all;
% importe le fichier texte
data=importdata('Tracks.txt');
% Taille du fichier
k=length(data.data);
% Numéro de la track
ID_track=data.data(:,2);
%Erreur de localisation
sigma=61E-9;
taille_image=100;
%taille tache en pixel
taille_blob=5;
%temps d'arrêt sur chaque pixel
t_pose=5E-6;
%temps pour scan image total + temps pour remonter au pixel de départ
tau=(taille_image^2*t_pose)+(taille_image*t_pose);
% coefficient de motion blur R
R=taille_blob*taille_image*t_pose/tau;
T=293; %température
nu=1E-3; %viscosité
```

ANNEXE . ANNEXE 1 : ALGORITHME DE TRAITEMENT DES
DONNÉES DE TRACKMATE

```

tau=1/19.8; %1/f avec la fréquence en image/s

%initialisation des indices
m=1; j=1; i=[1:k];
% Soustraction de la matrice des ID avec elle même en décalé =
%différence de zéro signifie un changement de track
same_ID=ID_track(2:length(i))-ID_track(1:length(i)-1);
same_ID(514,1)=1;
%trouve les lignes où la track change d'ID
[row_new_track,col] = find(same_ID >0);
% vecteur nb de track
nb_track=[1:length(row_new_track)];
%faire une matrice de n colonnes de taille variable
% d'abord une colonne des tailles décalé par un zéro initial
row_new_track_decale=zeros(length(row_new_track),1);
row_new_track_decale(2:end)=row_new_track(1:end-1);
%soustraire l'une à l'autre pour avoir la taille de chacune des tracks
sizes_tracks=row_new_track-row_new_track_decale;
track_size_loop=1;
%rangement des tracks en colonnes
for n=1:length(nb_track)
posx(1:sizes_tracks(n),n)=data.data(track_size_loop:row_new_track(n),4)*1E-6;
% pour la première track
track_size_loop=row_new_track(n)+1;
%déplacement
Delta_xn(1:sizes_tracks(n)-1,n)=posx(2:sizes_tracks(n),n)-posx(1:sizes_tracks(n)-1,n);
%drift
Drift_x(1,n)=mean(Delta_xn(1:sizes_tracks(n)-1,n));
end
%drift total du stack moyenné
drift_x_global= mean(Drift_x);

for n=1:length(nb_track)
%correction des déplacements carré
Delta_xn_carre(1:sizes_tracks(n)-1,n)=Delta_xn(1:sizes_tracks(n)-1,n).^2;
%estimateur basique
Dx(n)=(mean(Delta_xn_carre(1:sizes_tracks(n)-1,n))-(drift_x_global^2))/(2*tau);
rx(n)=(1.38E-23*T)/(6*pi*nu*Dx(n));
%estimateur de covariance
Dx_CBE(n)=((mean(Delta_xn_carre(1:sizes_tracks(n)-1,n))-(drift_x_global^2))-(2*sigma^2))
/(tau*(2-(4*R)));

rx_CBE(n)=(1.38E-23*T)/(6*pi*nu*Dx_CBE(n));
end

```

Annexe 2 : Tracé de faisceaux gaussiens dans l'approximation paraxiale

Cette deuxième annexe décrit le type de code Python utilisé pour réaliser les calculs d'optique matricielle dans les configurations sans et avec saut d'indice pour la génération d'une feuille de lumière dans le canal microfluidique. L'exemple ci-dessous détaille la configuration sans saut d'indice où la lentille est collée au PDMS.

```
# -*- coding: utf-8 -*-

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

def waist_from_q(q, wavelength=0.405, n_medium=1):
    return abs(wavelength / (np.pi*n_medium) * abs(q)**2 / q.imag)**0.5

modeFieldDiameter = 3.3 #μm
waist = modeFieldDiameter / 2
lambda_ = 0.405
# theta = lambda_ / (np.pi * waist)
# NA = np.sin(theta)
zr = np.pi * waist**2 / lambda_
print("zr = ", zr)
nP = 1.4
nW = 1.33
n = 1.47
R = 62.5

# Distance fibre surface de la lentille (pas son centre)
s1 = 175 # in micron
s2 = 200
s3 = 250

q1 = 1j * zr + s1
```

ANNEXE . ANNEXE 2 : TRACÉ DE FAISCEAUX GAUSSIENS DANS
L'APPROXIMATION PARAXIALE

```
print("waist q1 ", waist_from_q(q1))

z_zone1 = np.linspace(0, s1, 100)
q_zone1 = 1j * zr + z_zone1
w_zone1 = waist_from_q(q_zone1)
plt.plot(z_zone1, w_zone1)
plt.plot(z_zone1, -w_zone1)

# First Interface
A = 1
B = 0
C = -1/R*(1-1/n)
D = 1/n

q2 = (q1*A + B) / (q1*C + D)

print("waist q2", waist_from_q(q2, wavelength=lambda_, n_medium=n))

# Propagation inside the ball lens
A = 1
B = 2*R
C = 0
D = 1

z2 = s1
z3 = z2 + 2*R

q3 = q2 + 2*R

z_zone2 = np.linspace(z2, z3, 100)
q_zone2 = q2 + (z_zone2-z2)
w_zone2 = waist_from_q(q_zone2, wavelength=lambda_, n_medium=n)
plt.plot(z_zone2, w_zone2)
plt.plot(z_zone2, -w_zone2)

# Second Interface
A = 1
B = 0
C = 1/R*(1-n/nP)
D = n/nP

q4 = (q3*A + B) / (q3*C + D)

print("waist q3", waist_from_q(q3, wavelength=lambda_, n_medium=n))
print("waist q4", waist_from_q(q4, wavelength=lambda_, n_medium=nP))
```

```

# Propagation in PDMS

z2 = s1 + 2*R
z3 = z2 + s2
z_zone3 = np.linspace(z2, z3, 100)
q_zone3 = q4 + (z_zone3-z2)
w_zone3 = waist_from_q(q_zone3, wavelength=lambda_, n_medium=nP)
plt.plot(z_zone3, w_zone3)
plt.plot(z_zone3, -w_zone3)

q5 = q4 + s2

print("waist q5", waist_from_q(q5, wavelength=lambda_, n_medium=nP))

# Refraction PDMS/water (flat surface)
A = 1
B = 0
C = 0
D = nP/nW

q6 = (q5*A + B) / (q5*C + D)
print("waist q6", waist_from_q(q6, wavelength=lambda_, n_medium=nW))
# Propagation in Water

z4 = z3 + s3
z_zone4 = np.linspace(z3, z4, 1000)
q_zone4 = q6 + (z_zone4-z3)
w_zone4 = waist_from_q(q_zone4, wavelength=lambda_, n_medium=nW)
plt.plot(z_zone4, w_zone4)
plt.plot(z_zone4, -w_zone4)

#find the position where the wais is minimum.
waist_focus = np.min(w_zone4)
pos_focus = z_zone4[np.argmin(w_zone4)]
print("pos_focus (µm) : ", pos_focus)
print("waist focus (µm) : ", waist_focus)
print("zr (µm) : ", np.pi*waist_focus**2/lambda_)

circle1 = plt.Circle((s1+R, 0), R, color='b', alpha=0.1)
plt.gca().add_patch(circle1)
pdmsRect = plt.Rectangle((s1+2*R, -R), s2, 2*R, color='g', alpha=0.1)
plt.gca().add_patch(pdmsRect)
waterRect = plt.Rectangle((s1+2*R+s2, -R), s3, 2*R, color='b', alpha=0.1)
plt.gca().add_patch(waterRect)

```


ANNEXE . ANNEXE 2 : TRACÉ DE FAISCEAUX GAUSSIENS DANS
L'APPROXIMATION PARAXIALE

```
plt.ylim(-R, R)
plt.xlabel("z in  $\mu\text{m}$ ")
plt.ylabel("waist in  $\mu\text{m}$ ")
# plt.ylim(-(s1+2*R+s2)/2, (s1+2*R+s2)/2)
# plt.axis("equal")
plt.show()
```

Annexe 3 : Articles publiés

Article 1

Théo Travers, Vincent Colin, Matthieu Loumaigne, Régis Barillé, et Denis Gindre,
”**Single-Particle Tracking with Scanning Non-Linear Microscopy**”
Nanomaterials 10, no. 8 : 1519. (2020)

Abstract : This study describes the adaptation of non-linear microscopy for single-particle tracking (SPT), a method commonly used in biology with single-photon fluorescence. Imaging moving objects with non-linear microscopy raises difficulties due to the scanning process of the acquisitions. The interest of the study is based on the balance between all the experimental parameters (objective, resolution, frame rate) which need to be optimized to record long trajectories with the best accuracy and frame rate. To evaluate the performance of the setup for SPT, several basic estimation methods are used and adapted to the new detection process. The covariance-based estimator (CVE) seems to be the best way to evaluate the diffusion coefficient from trajectories using the specific factors of motion blur and localization error.

Article 2

Vincent Colin, Théo Travers, Denis Gindre, Régis Barillé et Matthieu Loumaigne,
”**Cheap, versatile, and turnkey fabrication of microfluidic master molds using consumer-grade LCD stereolithography 3D printing**”
The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 116, 537–544 (2021).

Abstract : The recent development of 3D printers allowed a lot of limitations in the field of microfabrication to be circumvented. The ever-growing chase for smaller dimensions has come to an end in domains such as microfluidics, and the focus now shifted to a cost-efficiency challenge. In this paper, the use of a high-resolution stereolithography LCD 3D printer is investigated for fast and cheap production of microfluidic master molds. More precisely, the UV LED array and the LCD matrix of the printer act as an illuminator and a programmable photomask for soft lithography. The achieved resolution of around 100 μm is mainly limited by the pixel geometry of the LCD matrix. A tree-shape gradient mixer was fabricated using the presented method. It shows very good performances despite the presence of sidewall ripples due to the uneven pixel geometry of the LCD matrix. Any design can be brought from concept to realization in under 2 h. Given its sub-€1000 cost, this method is a very good entry point for labs wishing to explore the potential of microfluidic devices in their experiments, as well as a teaching tool for introducing students to microfluidics.



Article

Single-Particle Tracking with Scanning Non-Linear Microscopy

Théo Travers, Vincent G. Colin, Matthieu Loumagne[†], Régis Barillé[†] and Denis Gindre *[†]

MOLTECH-Anjou Laboratory, UMR CNRS 6200, University of Angers, 2 bd Lavoisier, 49045 Angers CEDEX, France; theo.travers@univ-angers.fr (T.T.); vincent.colin@univ-angers.fr (V.G.C.); matthieu.loumagne@univ-angers.fr (M.L.); regis.barille@univ-angers.fr (R.B.)

* Correspondence: denis.gindre@univ-angers.fr

Received: 7 July 2020; Accepted: 30 July 2020; Published: 3 August 2020



Abstract: This study describes the adaptation of non-linear microscopy for single-particle tracking (SPT), a method commonly used in biology with single-photon fluorescence. Imaging moving objects with non-linear microscopy raises difficulties due to the scanning process of the acquisitions. The interest of the study is based on the balance between all the experimental parameters (objective, resolution, frame rate) which need to be optimized to record long trajectories with the best accuracy and frame rate. To evaluate the performance of the setup for SPT, several basic estimation methods are used and adapted to the new detection process. The covariance-based estimator (CVE) seems to be the best way to evaluate the diffusion coefficient from trajectories using the specific factors of motion blur and localization error.

Keywords: non-linear microscopy; two-photon fluorescence imaging; scanning microscopy; single particle tracking; free diffusion; particle size characterization; particle tracking algorithms

1. Introduction

Single-particle tracking (SPT) is a well-known method to measure the motion of sub-micrometer particles in a liquid phase. This technique provides access to information about particle size which cannot be reached by imaging because of the diffraction limit. Estimating the particle localization and performing statistical calculations over many frames makes it possible to estimate its displacements with high accuracy and to measure the diffusion coefficient [1]. This coefficient is linked directly to the size of the particles and allows estimation of a size depending on the movement recorded [2].

SPT method has proven its worth with fluorescence microscopy since T. Schmidt in 1996 [3] with the first imaging of a moving fluorescent particle. This experiment was achieved with wide-field imaging illuminated by a laser at 514 nm and a high signal-to-noise ratio localization (SNR_{loc}) of 28. With a localization accuracy of 30 nm, the experiment is a reference for SPT methods. Since then, many improvements have been made. Two different approaches have been developed: one involves studying the behavior of a single-particle over a long time (SPT) [4], the other one, called Nanoparticle Tracking Analysis, uses the statistical advantage of a large number of particles to estimate the size distribution [5]. The SPT is a useful method for determining the radius of free-scattering nanoparticles but also for dissecting different kind of motions of fluorescently labelled moieties, and this has led to the development of many applications in biology and biophysics in the past few years [6,7].

Thanks to new materials and methods developed since the first experiment, it is now possible to localize particles with an accuracy of a few nanometers (≈ 10 nm) [8]. New methods for the estimation of the diffusion coefficient, such as the covariance-based estimator [9], have been an important research topic to find the optimal experimental parameters and the best way to use the information about the movement of particles in a liquid phase.

These optimal parameters and methods have been tested and validated with various experiments and simulations [10–12], but always using single-photon fluorescence and wide-field microscopy.

The usual particle tracking techniques based on a sequence composed of many wide-field images cannot be applied to this type of microscopy. Indeed, Non-Linear Optical (NLO) responses of materials, like Two-Photon Excited Fluorescence (TPEF) or Second-Harmonic Generation (SHG), require high intensity excitation; direct imaging of the sample is therefore possible with temporal focusing method but requires cutting-edge equipment and setup [13,14]. SPT can be used from confocal images obtained with scanning microscopy [15]. For non-linear imaging, the commonly used method is to scan a small area with a pulsed laser, then the non-linear response of the sample is recorded and reconstructed to create a pixel-by-pixel image. The full process leading to the final image is lengthy and represents a limit to track moving particles. For these reasons, only a few experiments have been performed on the tracking of particles with non-linear microscopy. The article of Gregor [16] in 2017 is the first to introduce rapid non-linear image scanning microscopy as a method to track particles with a frame rate of 30 Hz. However, in this study, the tracking of particles is only performed with very short track (<10 positions). Two-photon microscopy was also used in 3D tracking techniques [17]. The purpose of this study is to track particles over a long period of time to estimate their sizes. This study shows that it is possible to obtain good size estimation with non-linear microscopy tracking on calibrated particles smaller than 1 μm by optimizing the scanning and optical parameters.

This nonintuitive approach inevitably has limitations compared to full-field imaging techniques: the image resolution has to be low in order to reduce the time between frames, the dwell time (i.e., time spent on a pixel by the laser) on each pixel must be sufficient to detect a few NLO photons, and the signal-to-noise ratio is lower [18] than single-photon microscopy. However, this approach has several advantages: not only does it provides access to NLO particle tracking, but it also reduces the phenomenon of photobleaching in the case of fluorescent particles, due to the smaller intrinsic focal volume compared with single-particle fluorescence. Moreover, the near-infrared wavelength used in two-photon microscopy provides a better depth penetration in tissues with less toxicity on living cells. These two advantages make two-photon imaging a more suitable technique for biology [19].

Another type of two-photon microscopy is the Second-Harmonic Imaging Microscopy [20] based on the first demonstration of SHG performed in 1961 [21]. For special materials which have non-centrosymmetric properties, the SHG process exactly doubles the wave frequency for high intensity excitation. This phenomenon is a direct conversion of energy without absorption which means there is no photobleaching effect during imaging.

It is relevant to note that other optical techniques for particle sizing using non-linear effects have also been developed, for instance non-linear correlation spectroscopy [22]. This technique, akin to fluorescence correlation spectroscopy, could be seen as SPT but with only one pixel. While this technique is arguably simpler to implement and allows study of smaller particles, it is only devoted to particle sizing and cannot recreate an image.

The SPT method has many applications in biology and particularly in cellular activity and virology. Using non-linear microscopy to track biomarker in living cells without the limitation of single-photon imaging could help to better understand biological mechanisms [23]. Non-linear microscopy is a powerful tool with high resolution if the typical moving time of the sample is far longer than the time required to create the image.

The goal here is to demonstrate the efficiency of the SPT method with non-linear microscopy. It has several advantages compared to single-photon microscopy but also many limits which call for compromises.

As a first step, the scanning signal was optimized to generate usable images for post-processing. To evaluate the relevance of this new application, three basic statistical methods are used here to estimate the size of particles. Future studies will focus on improving size estimation with innovative methods such as sigma point-based expectation maximization [24] or the maximum likelihood estimator [25].

2. Material and Methods

2.1. Equipment

The laser used is a Ti:Sa femtosecond pulsed laser operating between 700 and 1000 nm (Tsunami, Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA). To achieve the scanning process, a mirror galvanometer (6210H, Cambridge Technology, Bedford, MA, USA) is used to control the angle of the laser beam. A scan lens (LSM54-850, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) and tube lens are placed to (i) create an afocal optical system, (ii) enlarge the beam diameter for widening the illuminated part of the objective pupil aperture (in order to increase the resolution) and conjugates the mirrors and the objective pupil plane, (iii) create a conjugated plane between the primary image plane (in the focal plan of the scan lens) and the scanned area of the sample (See Figure S1 of Supplementary Materials).

The separation of excitation and emission signals is achieved by a longpass dichroic mirror (DMLP490R, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA); however a Bandpass filter (377/50 Bandpass Filter, Semrock Inc., New York, NY, USA) with high optical density is required to eliminate most of the residual signal of the excitation source. The nonlinear response of the sample is collected by a superfast wideband photomultiplier (H7422P-40, Hamamatsu, Japan).

Where static imaging is based on image accumulation, moving objects imaging requires raising the intensity of the laser source to increase the number of photons emitted by the sample. The high optical density filter should stop all the residual photons coming from the dichroic mirror but with a very intense excitation source, a few photons still reach the photomultiplier (PM), thus adding noise.

A microscope objective is used for both focusing the excitation beam towards the sample and collecting the signal generated by non-linear processes. The objective used is a X20, NA = 0.75 (UPLSAPO20X, Olympus Corp., Japan); the reasons for choosing this objective will be discussed later in Section 4.

Figure 1 shows the complete setup of the scanning microscope. More information about the setup can be found in Section S1 of Supplementary Materials.

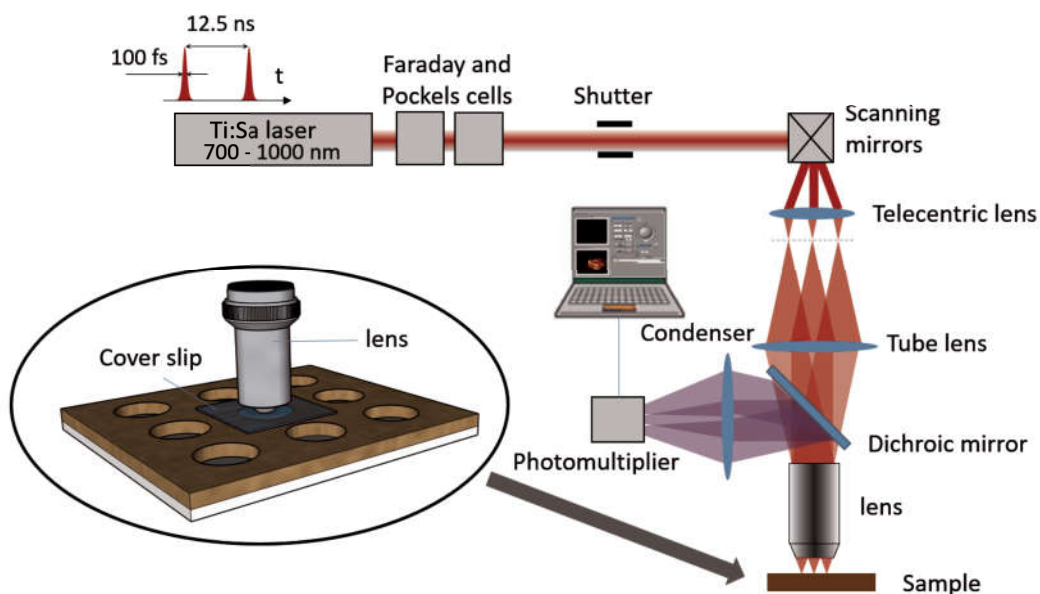


Figure 1. Complete setup of the non-linear microscope, which can be used for two-photon fluorescence and second-harmonic generation. The circled diagram shows the medium used to study the particles. The solvent containing the particles fills one of the cells of a multiwell support (Silicone IsolatorsTM, GBL664206, Grace Bio-Labs) and a microscope slide is placed between the study volume and the microscope objective. Thus, turbulence due to evaporation of the liquid does not occur.

2.2. Consumables

To demonstrate the feasibility of this approach, we used calibrated commercial fluorescent particles. The fluorescent latex beads used for the experiments are Fluoresbrite[®] (24054, PolyScience, Niles, IL, USA) of 250 nm and 110 nm radius, with absorption and emission maxima at 377 nm and 479 nm for both sizes, and a satisfying size dispersion of 3% and 5% respectively. To study these beads correctly, a few important steps are taken. First, a 1000-fold dilution ensures that each particle's free diffusion is long enough to record tracks without collisions. Then the diluted solution is placed for 5 min in an ultrasonic bath to minimize the number of aggregated particles. Finally, a few droplets of the solution are poured in a small 4.5 mm diameter well formed by a silicone isolator stuck to a coverslip. A droplet bigger than the well must be formed to add an extra coverslip on the top and ensure that no evaporation will occur and disturb the observations.

2.3. Software

The whole setup is managed by an in-house engineered interface in LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA), a highly modular graphical programming language for data acquisition and monitoring environments. The program controls the whole process from the positioning of the scanning mirror until the image acquisition. The sequence of images is then processed in a particle tracking plug-in of ImageJ [26] called TrackMate [27] to build all the individual trajectories and extract a data file. A simple Matlab program (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) is used to transform the successive positions into an estimation of the diffusion coefficient.

2.4. Scanning Methods

To create the image of an area, a non-linear microscope needs to light up several successive points and then rebuild the signal response detected by the photomultiplier. Each step of the scanning process creates one pixel of the image. The spatial resolution, limited by diffraction, does not allow nanoparticles to be resolved. But the image resolution (i.e., the total number of pixels in the image) is an essential factor of accuracy for the localization of each particle. According to the Nyquist sampling theorem, at least two pixels is needed to describe the radius of the Point Spread Function (PSF). If p is the pixel size and s the PSF radius, then the criteria $\pi(2p)^2 \approx 12p^2 \leq s^2$ must be respected. As shown in Figure 2 the image (a) of the particle is slightly under-sampled whereas image (b) respects the Nyquist sampling limit.

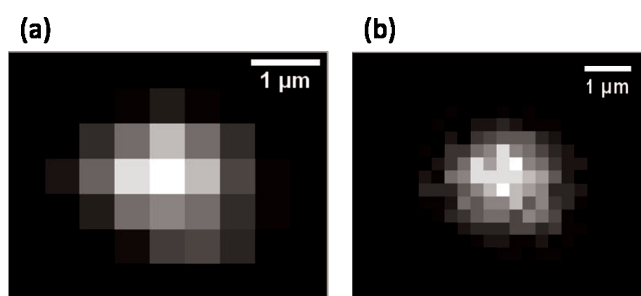


Figure 2. Images of the same bead (radius = 250 nm) with (a) 48,260 dpi (1.9 pixels/ μm) resolution and (b) with 96,520 dpi (3.8 pixels/ μm) resolution.

Forming an image from several successive spots takes some time. Therefore, the scanning method must be optimized to reduce the image acquisition time. Several scanning methods were tested in order to reduce the dead times, i.e., the times when the mirrors return to the beginning of the line or to the starting point without being able to detect a useful signal. A discussion of the different methods is detailed in Section S2 of Supplementary Materials. In order to optimize the duration of a sequence and to keep the same time between two images, the chosen solution, illustrated in Figure 3, requires the

laser to scan line by line (once on the last position of one row, the laser starts scanning the following line in the reverse direction). Coming back to the starting point is achieved through a controlled dead time by scanning linearly the first column without recording the signal.

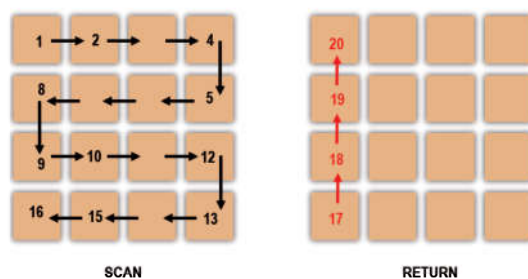


Figure 3. Drawing of the scanning process. Each orange square represents a residence time of the laser. During this dwell time, the photomultiplier counts the number of incoming photons, thus determining the pixel value of the final image. The laser beam follows the black arrows over the area to create an image. The red arrows show the path back to the starting position for a controlled dead time. In this simplistic example of a 4×4 pixel image, the return to the starting position requires 4 additional dwell times.

2.5. Track Analysis Methods

Compared to the common SPT method, using a scanning method for tracking causes the lag time to be only approximately constant between frames. Indeed, the movement of a particle between two images adds or removes some travel time for the laser to scan the next position. This difference of travel in the scan causes a variable time interval between each frame. Every displacement has a unique time lag depending on the direction of the movement between two successive positions as described in Figure 4.

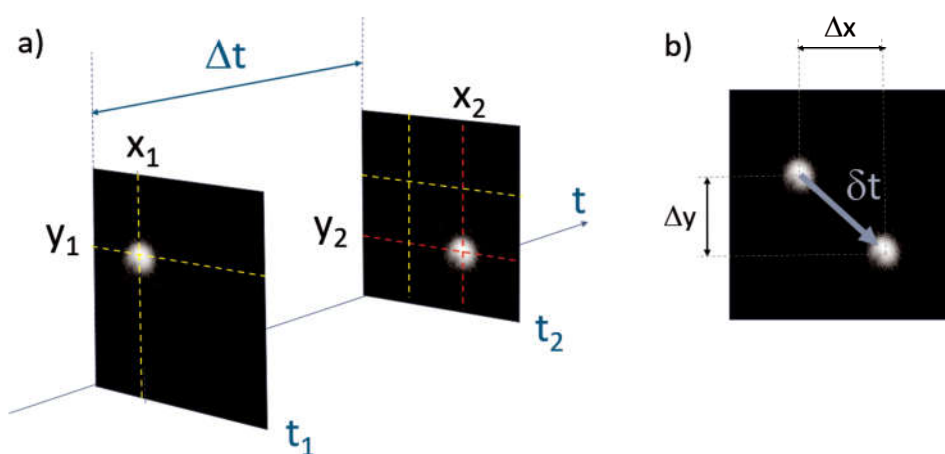


Figure 4. Description of the variation of the scanning time between two successive positions. (See Section S3 of Supplementary Materials for complete description of the timing projection for image construction.) (a) X_1 and Y_1 represent the position of the particle in the frame 1 and X_2 , Y_2 its position in the frame 2. t_1 represents the time needed to scan every pixel of each line to reach the particle in the first frame and t_2 is the same for the second frame. (b) The particle with a movement in the direction of the scan will add or delete a time depending on the sign of $\delta t = t_2 - t_1$ to the normal time Δt to complete a full scan of one frame.

In this study, two approaches will be used: the first is the common method assuming a constant time between two successive frames called time lag which represents the time needed to create an image and come back to the first pixel. The second method uses a specific time based on the periodic time lag of the scan but also takes into account the displacement of the particles between two frames.

In the approximation of a constant time lag, the characteristic time is called Δt :

$$\Delta t = N_{pix}^2 t_{dwell} + N_{pix} t_{dwell} \quad [s] \quad (1)$$

N_{pix} is the number of pixels per line and t_{dwell} is the dwell time (the NLO signal is collected during the dwell time of the beam on the sample for each position). The second term of Equation (1) represents the time needed for the laser to travel back to the first pixel of the image as shown in Figure 3 with the red arrow.

For the variable time lag, the characteristic time τ is defined as follows:

$$\tau = \Delta t + \delta t \quad [s] \quad (2)$$

with δt the time to add or subtract due to the displacements detailed in Figure 4:

$$\delta t = \Delta Y_{pix} N_{pix} t_{dwell} + \Delta X_{pix} t_{dwell} \quad [s] \quad (3)$$

with ΔY_{pix} and ΔX_{pix} the number of pixels displacement on each direction. Because of the scanning method, a displacement along Y or X is not equivalent in a matter of time travel. A displacement on the Y axis requires a full scan of every previous line, whereas for an X axis displacement only needs to scan the previous pixel from the beginning of the line. To simplify Equation (3), it is possible to approximate δt by the first term:

$$\delta t = \Delta Y_{pix} N_{pix} t_{dwell} \quad [s] \quad (4)$$

Indeed, according to the chosen scanning method, the time depending on the X movement is not relevant, first because the scan changes direction at every line change and secondly, for the same number of pixels displacement, $\delta t_y \gg \delta t_x$.

2.6. Tracking

The powerful tool called TrackMate developed by J.Y. Tinevez is used to process the tracks of particles (see Figure 5) in image sequences [27]. The chosen method for the localization is the LoG (Laplacian of a Gaussian) detector which applies a LoG filter to the image and achieves a maxima localization with a sub-pixel precision thanks to a quadratic fitting. Then successive frames are examined to find a link between particles according to a maximum search radius which corresponds to the maximum distance a particle could have moved between two frames. The algorithm can also account for particle disappearance over a small number of frames (detection error or moving out of focus). Finally, the full track is built by assembling all the successive positions for each particle. The Sections S4–S6 of Supplementary Materials describes the raw acquired images, the TrackMate process and used algorithms.

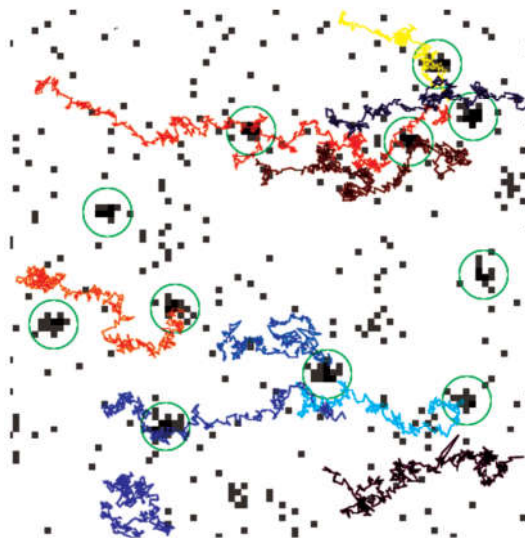


Figure 5. A few tracks recorded over 600 frames over an area of $52 \times 52 \mu\text{m}$ with the plug-in “TrackMate” of ImageJ developed by J.Y. Tinevez. The detected particles are circled in green and their tracks are marked using different colors. The isolated grey spots are some noise from the PM and are not detected as particles according to a minimum detection size.

3. Estimator

3.1. Theory

Diffusion coefficient estimation: To link displacement of the particle to its size, Einstein established the relation between the Brownian motion and the diffusion coefficient with the mean square displacement (MSD) [2]:

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 2dDt \quad [\text{m}^2] \quad (5)$$

where D is the diffusion coefficient [m^2/s], d the number of dimensions of the movement and t the duration of the observation [s].

The Stokes-Einstein law links the diffusion coefficient D and the parameters of the experiment. It is used to obtain the size of spherical particles:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad [\text{m}^2/\text{s}] \quad (6)$$

with k_b the Boltzmann constant, T the temperature in Kelvin, η the dynamic viscosity of the fluid in Pa.s and r the hydrodynamic radius of the particle in meters.

3.2. Experimental Estimation

The previous Equation (5) gives the theoretical diffusion behavior of spherical particles, but may not be the best approach to extract the diffusion coefficient from experimental data. Several methods have been developed to optimize the estimation according to experimental parameters. Here, different methods are presented, two of them are known and the last one is adapted to non-linear microscopy.

Mean Square Displacement: The most basic and common method is to calculate the mean square displacement [28] for different time lags and establish the slope coefficient of the fitted curve to get the diffusion coefficient. In practice, only the first two points are used to evaluate the diffusion coefficient. Some studies show that the error is correlated with the frame rate used to estimate the slope [29]. It is also shown that using short or long time lag does not improve the accuracy of measurements overall.

Moreover, in the present case, the small amount of data makes the use of coefficients based on longer time lags unreliable at best.

$$D_n = \frac{\langle \Delta x^2 \rangle}{2dn\Delta t} \quad [\text{m}^2/\text{s}] \quad (7)$$

where n represents the number of time lags between two frames ($n = 1, 2, 3, \dots$). For example, in the calculation of $D1$, Δx is evaluated between all the successive positions, while for $D2$, Δx is evaluated between positions separated by one frame, and so on.

Covariance-based estimator: A new estimator elaborated in 2014 [9] is unbiased and more accurate than the previous method when the S/N is low and the number of positions is close to 100. The covariance estimator is expressed as follows:

$$D_{CVE} = \frac{\langle \Delta x_i^2 \rangle}{2d\Delta t} + \frac{\langle \Delta x_i \Delta x_{i+1} \rangle}{d\Delta t} \quad (8)$$

with $\Delta x_i = x_i - x_{i-1}$, where x is the position and i the frame number. The second term of the sum represents the localization noise.

The same equation can be written according to experimental parameters, depending on the microscope characteristics, as follows:

$$D_{CVE(\sigma,R)} = \frac{\langle \Delta x_i^2 \rangle - 2d\sigma^2}{2d(1-2R)n\Delta t} \quad (9)$$

where σ is the dynamic localization error (see Section 5.1) and R the motion blur coefficient [30]. R is not estimated in the usual way [see Equation (13)] because of the scanning process as explained further (see Section 4.2).

Variable time lag estimator: A new method is tested in this experiment because of the scanning process and the variable time lag. Instead of using the mean square displacement, a diffusion coefficient is calculated for every displacement with its own time lag, then a mean diffusion coefficient is evaluated.

Let $\langle D_n \rangle$ be the diffusion coefficient calculated with different time lags:

$$\langle D_n \rangle = \left\langle \frac{\Delta x_i^2}{2dn\tau} \right\rangle \quad (10)$$

with τ the variable time between two successive positions as described in Equation (2).

For the covariance-based estimator with the variable time lag τ , the Equation (9) changes as follows:

$$\langle D_{CVE(\sigma,R)} \rangle = \left\langle \frac{\Delta x_i^2 - 2d\sigma^2}{2d(1-2R)n\tau} \right\rangle \quad (11)$$

4. Overview of Improvements and Limits with NLO Microscopy

To properly understand the problem, we need to redesign several aspects of single-particle tracking with single-photon microscopy. As we saw previously, the time lag changes radically; however, several other parameters must be modified as well.

Using non-linear microscopy is a very different way to create an image of a sample because of the scanning step. It already takes a long time to create a low resolution image (30–50 ms for 100×100 pixels) and contrary to conventional NLO imaging it is not possible to accumulate images in order to increase the number of detected photons because of the particle motion. The following parts deal with the advantages of using non-linear imaging on moving particles which cannot be obtained by other microscopy techniques.

4.1. Photobleaching

The photobleaching effect is an alteration of the photochemical property of the fluorophore molecule [31]. This phenomenon limits the duration of the tracking when all the fluorescent molecules are fully damaged. In both single- and two-photon microscopy, this effect appears because of the high laser intensity. However, when dealing with a large amount of particles in a free diffusion movement, the small focal volume and scanning process of two-photon microscopy are more advantageous. When a wide-field image is made with single-photon excitation microscopy, a large and deep area is illuminated, and many particles are subjected to the photochemical process. On the contrary, two-photon microscopy, which is intrinsically confocal due to the non-linear absorption process, excites only a smaller volume for a very short time with stronger illumination to fully record the signal of the particle. Compared to one-photon absorption, a two-photon process reduce photobleaching because out-of-focus particles are illuminated by the laser but not excited.

4.2. Motion Blur

Motion blur is a phenomenon appearing when the object recorded is too fast for the exposure time of the camera and causes the signal to spread over an area around the object. However, motion blur is less significant with the scanning process described in Figure 3. Even if the full image takes longer to be acquired, the time spent scanning the object is really short (5–10% of Δt) as described in Figure 6:

$$t_{blur} = S_{blob} t_{dwell} N_{pix} \quad (12)$$

with S_{blob} the size in pixel of the round point spread function (PSF) due to the particle on the image. To calculate the motion blur coefficient, this formula is usually used [30]:

$$R = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} S(t)(1 - S(t))dt \quad (13)$$

with $S(t)$ the aperture function of the camera representing the fraction of illumination happening before a time t . More precisely $S(t) = \int_0^t \zeta(t')dt'$ with $\zeta(t)$ the normalized state of the camera shutter during a tracking frame ($\zeta(t) = 0$ means closed shutter, while ($\zeta(t) > 0$ means open shutter). The common values of R are in the interval of 0 to 1/4 (with $R = 1/6$ for a shutter open during the full duration of a tracking frame). For a non-linear scanning process, we can consider that the camera is only open during the time t_{blur} (cf Figure 6). The motion blur coefficient is then easily calculated:

$$R = \frac{t_{blur}}{\Delta t} \quad (14)$$

and common experimental value is here $R \approx 0.06$.

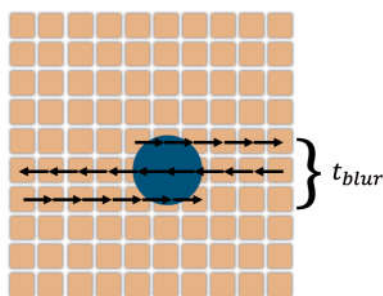


Figure 6. Description of motion blur with scanning process. t_{blur} is the time spent to achieve the scan of the object. The blue circular shape (blob) represents the particle subjected to scanning and the arrows are the path to fully scan the particle.

4.3. Brilliance and Numerical Aperture

To optimize an estimation with SPT, it is necessary to record as many positions as possible for each particle. Knowing that non-linear microscopy has a very small axial excitation volume compared to conventional one-photon microscopy, there is a small probability for every particle to stay in this excitation volume for a long period of time. Consequently, the best objective is not the one with the highest numerical aperture (NA), which would lead to an even smaller axial focal volume. A low NA is not satisfying either, because the laser spot must be focused enough to generate NLO effects. A compromise had to be found between these two factors, and was achieved through a X20, 0.75 NA objective. The numerical aperture of the objective can be used to estimate how long a particle can stay in the excitation volume. The two-photon excitation depth can be calculated as follow [32]:

$$w_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (15)$$

with λ the wavelength of the excitation laser, n the refractive index and NA the numerical aperture of the objective. To estimate an average track duration t_{vox} , the mean square displacement (Equation (5)) can be assimilate as the voxel depth w_z [1]:

$$t_{vox} \approx \frac{w_z^2}{2D} \quad (16)$$

However, one can note that in this experiment, the NA of the objective is not fully used. The laser beam diameter is only 4 mm over a back-aperture diameter of 14 mm. One can estimate the effective numerical aperture via $4/14 \times 0.75 \approx 0.2$ which was also confirmed with numerical simulations (see Section S7 of Supplementary Materials) An effective NA at around 0.2 for the excitation leads to an axial voxel excitation depth w_z of around 15 μm . This configuration has been maintained because the microscope uses several objectives with different back-aperture sizes. This is an important aspect to consider because the excitation light is not as focused by the objective as it could be. This increases the voxel depth while reducing light intensity for the two-photon excitation. On the other hand, because the light collected from the sample enters through the front face of the objective, the full NA must be taken into account for the collected signal leading to more photons being collected. As a side note, the axial detection volume size is not limited here by the depth of field of the objective. Indeed, the size of the active area of the photomultiplier (around 5 mm) leads to a large geometrical optical circle of confusion and a depth of field around 300 μm . Consequently, the axial detection volume size is here determined by the excitation profile and is around 15 μm . Finally, we use a dry objective for measurements within water which could increase the spherical aberrations and, as a result, increase the size of the observation volume. In order to limit those effects, we work at around 20 μm above the surface so that on one hand, the surface does not alter the free Brownian motion and, on the other hand, the mismatch of indexes does not create too many aberrations.

4.4. Image Resolution and Frame Rate

Considering that the estimation requires a large amount of data, the frame rate of the sequence acquisition is really important to ensure that enough data have been recorded before the particle leaves the focal volume. However, this frame rate setting influences all the other image quality parameters. So to optimize the amount of data, it is again important to find a compromise between resolution and frame rate.

4.5. Image Resolution and Localization Error σ

Another important aspect of the estimation is the static localization error which sets the accuracy of the measurement. In other words, generating an image sequence of static particles will lead to a false detection of movements because of the fluctuation of the pixel value. Several other parameters,

such as the intensity of the signal emitted by the fluorophore and the detector noise, are linked with the localization error. However, it was previously established that the image resolution and the localization error are linked with the frame rate and again, a compromise had to be found.

4.6. Scanned Area and Image Resolution

The last relevant parameter is the artificial zoom of the scanning step. For the same number of pixels, if a smaller area is scanned, it leads to a zoom. Then, more pixels are used to depict the particle, but the scanning duration remains the same, causing the localization error to decrease. Estimating a center over many pixels is always easier than over a few. The zoom is the best tool to increase the image resolution without reducing the frame rate. Nevertheless, this tool has a limitation: a large part of the image needs to be empty so that the movement of the particle can be tracked.

4.7. Signal-To-Noise Ratio Localization and Particle Size

The SNR_{loc} [9] is often used to assess the quality of a measurement and the highest possible accuracy:

$$SNR_{loc} = \frac{\sqrt{D\Delta t}}{\sigma} \quad (17)$$

with, D the diffusion coefficient [m^2/s], Δt the time lag between two frames [s] (for a variable time lag, $\langle \tau \rangle = \Delta t$) and σ the static localization error [m].

Typically, $1 < SNR_{loc} < 20$ in SPT experiment, but in our case, $SNR_{loc} \approx 2.5$ because of the high localization error (cf Section 5.1: Static and dynamic localization error). However, the SNR_{loc} is almost constant thanks to a balance between the size of the particle and the zoom. Indeed, the motion of a particle depends on its size: a small one moves faster than a big one, so its displacement between two frames increases. On the other hand, reducing the zoom is necessary to record all its movement, thus the localization error increases as well.

5. Results and Discussion

This part introduces the results obtained for single-particle tracking of fluorescent beads of two different sizes with the scanning microscope described above. Numerous tests showed that the best compromise between frame rate and image resolution for the setup is a 100×100 pixels image. Its characteristics are detailed in Table 1. Increasing the frame rate is not possible due to the limited scanning speed of the two-axis scanning head (max speed $3 \mu s/\text{pixel}$), and the number of positions recorded before the particle exits the excitation volume would be too low if the frame rate is decreased.

Table 1. Optimized parameters for tracking fluorescent beads with TPEF scanning microscopy

Particle Radius (nm)	Image Size (pixels)	Dwell Time (μs)	Frame Rate (fps)	Scale (pix/ μm)
250	100×100	5	20	2.53
110	100×100	3	33	3.81

5.1. Errors

To estimate the size of the particles, many steps are involved and each of them adds a possible error. We will try to estimate most of these before showing the size results.

Size distribution: Every sample of fluorescent beads is manufactured around a specific radius, with a dispersion characterized by the standard deviation, 5% for the 250 nm radius beads and 3% for the 110 nm radius beads.

Sampling error: Every statistical method of estimation using only a sample of the population leads to a fractional sampling error [33], defined by:

$$\epsilon = \sqrt{\frac{2}{N-1}} \quad (18)$$

This equation shows that a small amount of data positions, around 100, produces a 14% sampling error on the estimated value.

Static and dynamic localization error [34]: To assess the accuracy of the localization, two parameters are involved. First, the resolution and the dynamic range of the image with its number of pixel and the number of collected photons. Secondly, the quality of the algorithm used to evaluate the positions in the image. A suitable method to assess the overall localization accuracy entails using a particle with a size under the diffraction limit deposited on a substrate at rest, and to measuring the track detected by the algorithm. Typical variations in the position of detected static particles are shown in Figure 7. These fluctuations are attributed to residual vibrations (e.g., from the microscope table), non-linear signal and detector fluctuations, inaccuracies in the position of the scanning mirrors or errors in estimating the center of the particle by the TrackMate algorithm. For the selected parameters, the static localization error amounts to $\sigma_0 \approx 80$ nm ($std = 40$ nm) for 250 nm radius beads and $\sigma_0 \approx 100$ nm ($std = 50$ nm) for 110 nm radius beads.

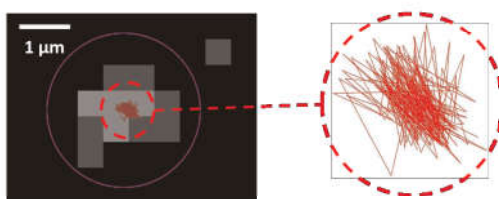


Figure 7. Track detected by the algorithm for a particle of $d < 1 \mu\text{m}$ at rest on a coverslip glass for an image of 100×100 pixels, $1.9 \text{ pixel}/\mu\text{m}$ over 200 frames. The track is represented by the small red pattern in the center and enlarged in the dotted circle (right).

When the particle is moving, this error becomes a dynamic localization error, based on the previously measured σ_0 as follows [25]:

$$\sigma = \sigma_0 \sqrt{1 + \frac{D t_{dwell}}{s_0^2}} \quad (19)$$

with σ_0 the static localization error, D the diffusion coefficient, t_{dwell} the scanning time on the particle and s_0 the radius of the PSF. However, for the selected scanning method, the exposure time is very short, therefore the dynamic error can be approximated by (± 1 nm) the static error $\sigma \approx \sigma_0$.

5.2. Size Estimation

The goal of this experiment is to evaluate the dispersion of the size estimation for the two samples of fluorescent beads. To increase the probability of tracking a single-particle over more than 100 positions, it is necessary to scan many frames. From Equation (16), for a 250 nm radius bead and a $1 \mu\text{m}$ voxel depth, the particle theoretically exits the volume after 0.6 s. Considering this, the average track has 12 positions at 20 fps, but the underfilled back-aperture of the objective allows a deeper focal volume. The track length can be increased using a concentrated solution of beads to leverage the Gaussian distribution of track lengths. Only the tracks comprised of over 100 positions are then selected.

To evaluate the experimental performance of the previous methods, a radius ($R_{x,y}$) is estimated for both axis, x and y with the diffusion coefficient (see Section 3.2) and R_z is the average of R_x and R_y . When it is possible, the diffusion coefficient is calculated with the two different approaches, the constant and variable time lags. The different estimators are compared according to their efficiency for non-linear microscopy.

The mean square displacement slope (MSD) can only be evaluated with a constant time lag Δt . The mean square displacement cannot be calculated using the variable time lag τ because each displacement is evaluated with a different time lag.

The estimation of the diffusion coefficient can be calculated with the standard estimator (Equation (7)) for two different time lags, D_1 for Δt and D_2 for $2\Delta t$. It shows the behavior of the method when the constant time lag increases. Those two coefficients can be estimated for variable time lags ($\langle D_1 \rangle$ and $\langle D_2 \rangle$) to evaluate the influence of this method. When the coefficients are estimated with different time lags it means the first coefficient D_1 is calculated with the native time lag of the image sequence Δt , whereas D_2 uses separated odd and even images to have $2\Delta t$.

The last chosen way to estimate the diffusion coefficient is the covariance-based estimator with its two different formulations, D_{CVE} (Equation (8)) with the localization noise term and $D_{CVE(\sigma,R)}$ (Equation (9)) with the experimental parameters from the microscope. To evaluate this estimator for a variable time lag, only Equation (9) can be used. Indeed, Equation (8) cannot be adapted to this method because it takes into account the displacements x_n and x_{n+1} which have different time lags; thus this equation would require a new formulation.

The results obtained with the different methods are shown in Table 2, with the mean radius and the standard deviation estimated in the sample. Between the 250 and 110 nm radius beads, it is necessary to reduce the dwell time (cf Table 1 in order to record enough data for each track (data > 100 positions) because of the higher velocity of smaller particles. However, reducing the dwell time decreases the number of photons detected by the PM and thus the S/N, which is why the zoom is increased to enhance the S/N. The excitation wavelength of the laser is 760 nm for beads of both sizes.

Table 2. (A) Table of the radius ($R_{x,y}$) estimated for the 250 nm of radius beads with all different methods. Results calculated over 43 trajectories with a minimum of 100 positions each and an uncertainty on the radius evaluated at ± 55 nm. (B) Table of the radius ($R_{x,y}$) estimated for the 110 nm of radius beads with all different methods. Results calculated over 25 trajectories with a minimum of 100 positions each and an uncertainty on the radius evaluated at ± 32 nm.

(A) $r = 250$ nm	MSD	D_1	D_2	$\langle D_1 \rangle$	$\langle D_2 \rangle$	$D_{CVE(\sigma,R)}$	$\langle D_{CVE(\sigma,R)} \rangle$	D_{CVE}
Mean radius R_x (nm)	411	252	308	253	308	269	270	418
$\sigma(R_x)$ (nm)	115	46	58	46	58	58	58	127
Mean radius R_y (nm)	725	221	325	221	325	230	231	746
$\sigma(R_y)$ (nm)	439	41	69	42	68	51	51	507
$R_z = (R_x + R_y)/2$ (nm)	568	237	316	237	316	250	250	582
(B) $r = 110$ nm	MSD	D_1	D_2	$\langle D_1 \rangle$	$\langle D_2 \rangle$	$D_{CVE(\sigma,R)}$	$\langle D_{CVE(\sigma,R)} \rangle$	D_{CVE}
Mean radius R_x (nm)	143	101	116	101	116	105	106	160
$\sigma(R_x)$ (nm)	31	15	13	15	13	19	19	43
Mean radius R_y (nm)	286	90	131	90	131	92	92	90
$\sigma(R_y)$ (nm)	220	12	25	12	25	14	15	12
$R_z = (R_x + R_y)/2$ (nm)	214	96	124	96	123	99	99	125

Method performance: To evaluate the experimental performance of the methods, two indicators are important: the mean value and the standard deviation. The best performance for the mean value is achieved using $D_{CVE(\sigma,R)}$, as expected according to the method's performance discussed previously [9]. The estimation of the diffusion coefficient using only the first time lag (D_1) shows good results with a lower dispersion than for the covariance-based estimator, but causes the mean to shift slightly. Both D_{CVE} and MSDs result in unreliable estimations of the mean and significant dispersion across all the

measurements. It seems that on specific tracks with singular behavior, those two methods are really sensitive and completely overestimate the size with a radius measured around 500 μm . However, D_{CVE} seems to improve when the frame rate increases for the 220 nm beads.

An interesting evolution can be observed with D_1 and D_2 coefficients depending on the time lag used for the estimation of the diffusion coefficient (see Figure 8). As the time between two frames increases, the accuracy on the coefficient worsens, the size being increasingly overestimated. Given that the SNR_{loc} is higher when time lag is longer, it could be assumed that the estimation would improve but the exact opposite is true. Since the total lapse of time during which the particle can be observed is limited (the particle ends up exiting the volume), increasing the time lag will decrease the total amount of data available for the calculation of the coefficient D , thus significantly decreasing the accuracy of the estimation.

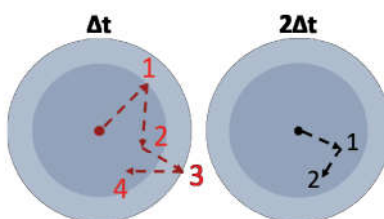


Figure 8. Representation of the behavior of a Brownian movement seen with two different acquisition times [34]. The center dot represents the particle and the arrows are the displacements detected. The same track is represented with two different observation time lags, on the left Δt and on the right $2\Delta t$. The shaded circles represent the diffusion area where a particle should be found after a diffusion time of Δt (first circle) and $2\Delta t$ (second circle) if we take as radius the square of Equation (5).

The last aspect of the results is the effect of the variable time lag called τ previously. It seems that the modification brought by this new way of estimation does not affect the final result significantly. Even if its use seems to be justified, no real influence is observed, and it can be explained by the localization error of the setup. Referring to the experimental data for 250 nm radius beads, the maximum displacement h_{max} observed is 1.14 μm , while the theory [35] gives:

$$h_{max} = 3\sqrt{\pi D t} = 1.11 \mu\text{m} \quad (20)$$

Then, we can consider the extreme case where this displacement only happens in the linear scanning direction and adds an extra scanning time:

$$\delta t_{max} = h_{max} N_{pix} t_{dwell} R_{ima} = 110 \mu\text{s} \quad (21)$$

With R_{ima} the scale resolution of the image. Here $R_{ima} = 2.53 \text{ pixel}/\mu\text{m}$, $N_{pix} = 100 \text{ pixels}$ and $t_{dwell} = 5 \mu\text{s}$. Knowing this extra time produced by the displacement, we can evaluate the difference on the diffusion length over δt_{max} :

$$h_{gap} = h_{max(t=\Delta t+\delta t)} - h_{max(t=\Delta t)} \approx 12 \text{ nm} \quad (22)$$

Comparing this result which covers all the extremes cases (with a low occurrence) with the static localization error of the measurements, $h_{gap} < \sigma$, we can say that using a variable time lag for the estimation is insignificant if the localization error is five time higher than the extra accuracy brought by the new method.

6. Conclusions

In conclusion, this study shows the feasibility of tracking particles in liquid phase using non-linear microscopy and punctual detector. It can provide a robust estimation of a diffusion coefficient. As described, this study is mainly experimental and required several attempts, various materials, and different configurations of the setup to find a good compromise between localization accuracy and frame rate. The coefficient D_1 provided good results but is sensitive to the chosen frame rate. Finally, only $D_{CVE(\sigma,R)}$ can be considered a good estimator according to the results and can be easily adapted to non-linear microscopy with the specific parameters σ and R . The improvement brought by considering the variable time lag will be useful in the future if the localization accuracy is increased, but has no impact at the moment. Improvements in this technique are possible. A way to improve the accuracy of the measurements is to reduce the localization error thanks to a better objective with higher numerical aperture. This solution is only possible if the particles size makes it possible to record enough data, otherwise a compromise is needed between localization accuracy and track length. Another way to improve the accuracy of the measurements is to refine a new particle localization algorithm suitable for images with low resolution and photon signal.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4991/10/8/1519/s1>, Section S1: Optical Setup, Figure S1: Optical optimization of laser beam. Figure S2: Complete setup of the non-linear microscope. Section S2: Raster scan methods, Figure S3: Illustration of used Raster scan methods. Section S3: Timing of images, Figure S4: Timeline of acquisition of successive images and lag time between images. Section S4: Raw images, Figure S5: Raw image of latex beads of 500 μm of diameter in a droplet of water. Figure S6: Histogram of the raw image. Section S5: TrackMate process, Figure S7: Procedure to generate coordinates of particles from TrackMate. Section S6: Algorithm, Figure S8: Flow chart of the algorithm for constant time lag. Figure S9: Flow chart of the algorithm for variable time lag. Section S7: Calculation of focal volume size via vectorial diffraction.

Author Contributions: Conceptualization, D.G. and M.L.; project administration, D.G.; methodology, all authors; Data curation, T.T., software, T.T. and D.G., writing—original draft preparation, T.T.; writing—review and editing, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by ANR under Project ANR-17-CE09-0009 SIPAIE (Aggregation Induced Emission at Single-Particle level).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fick, A. Ueber Diffusion. *Ann. Phys.* **1855**, *170*, 59–86. [[CrossRef](#)]
2. Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **1905**, *322*, 549–560. [[CrossRef](#)]
3. Schmidt, T.; Schütz, G.J.; Baumgartner, W.; Gruber, H.J.; Schindler, H. Imaging of single molecule diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2926–2929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Saxton, M. Single-particle tracking: The distribution of diffusion coefficients. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1744–1753. [[CrossRef](#)]
5. Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 796–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marchetti, L.; Bonsignore, F.; Gobbo, F.; Amodeo, R.; Calvello, M.; Jacob, A.; Signore, G.; Schirripa Spagnolo, C.; Porciani, D.; Mainardi, M.; et al. Fast-diffusing p75NTR monomers support apoptosis and growth cone collapse by neurotrophin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 21563–21572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Amodeo, R.; Nifosa, R.; Giacomelli, C.; Ravelli, C.; La Rosa, L.; Callegari, A.; Trincavelli, L.; Mitola, S.; Luin, S.; Marchetti, L. Molecular insight on the altered membrane trafficking of TrkA kinase dead mutants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2019**, *1867*, 118614. [[CrossRef](#)]
8. Savin, T.; Doyle, P.S. Static and Dynamic Errors in Particle Tracking Microrheology. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 623–638. [[CrossRef](#)]

9. Vestergaard, C.L.; Blainey, P.C.; Flyvbjerg, H. Optimal estimation of diffusion coefficients from single-particle trajectories. *Phys. Rev. E* **2014**, *89*, 022726. [[CrossRef](#)]
10. Shen, H.; Tauzin, L.J.; Baiyasi, R.; Wang, W.; Moringo, N.; Shuang, B.; Landes, C.F. Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7331–7376. [[CrossRef](#)]
11. Walker, J.G. Improved nano-particle tracking analysis. *Meas. Sci. Technol.* **2012**, *23*, 065605. [[CrossRef](#)]
12. Chenouard, N.; Smal, I.; De Chaumont, F.; Maska, M.; Sbalzarini, I.F.; Gon, Y.; Cardinale, J.; Carthel, C.; Coraluppi, S.; Winter, M.; et al. Objective comparison of particle tracking methods. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 281–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Oron, D.; Tal, E.; Silberberg, Y. Scanningless depth-resolved microscopy. *Opt. Express* **2005**, *13*, 1468–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ding, Y.; Li, C. Dual-color multiple-particle tracking at 50-nm localization and over 100-nm range in 3D with temporal focusing two-photon microscopy. *Biomed. Opt. Express* **2016**, *7*, 4187–4197. [[CrossRef](#)]
15. Durso, W.; Martins, M.; Marchetti, L.; Cremisi, F.; Luin, S.; Cardarelli, F. Lysosome Dynamic Properties during Neuronal Stem Cell Differentiation Studied by Spatiotemporal Fluctuation Spectroscopy and Organelle Tracking. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3397. [[CrossRef](#)]
16. Gregor, I.; Spiecker, M.; Petrovsky, R.; Großhans, J.; Ros, R.; Enderlein, J. Rapid nonlinear image scanning microscopy. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 1087–1089. [[CrossRef](#)]
17. Levi, V.; Ruan, Q.; Gratton, E. 3-D Particle Tracking in a Two-Photon Microscope: Application to the Study of Molecular Dynamics in Cells. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2919–2928. [[CrossRef](#)]
18. Ferrand, P. GPScan.VI: A general-purpose LabVIEW program for scanning imaging or any application requiring synchronous analog voltage generation and data acquisition. *Comput. Phys. Commun.* **2015**, *192*, 342–347. [[CrossRef](#)]
19. Squier, J.; Müller, M. High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 2855–2867. [[CrossRef](#)]
20. Freund, I.; Deutsch, M. Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Opt. Lett.* **1986**, *11*, 94–96. [[CrossRef](#)]
21. Franken, P.A.; Hill, A.E.; Peters, C.W.; Weinreich, G. Generation of Optical Harmonics. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 118–119. [[CrossRef](#)]
22. Geissbuehler, M.; Bonacina, L.; Shcheslavskiy, V.; Bocchio, N.L.; Geissbuehler, S.; Leutenegger, M.; Märki, I.; Wolf, J.P.; Lasser, T. Nonlinear Correlation Spectroscopy (NLCS). *Nano Lett.* **2012**, *12*, 1668–1672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mertz, J. Nonlinear microscopy: New techniques and applications. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 610–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lin, Y.; Andersson, S.B. Simultaneous Localization and Parameter Estimation for Single Particle Tracking via Sigma Points based EM. In Proceedings of the 2019 IEEE 58th Conference on Decision and Control (CDC), Nice, France, 11–13 December 2019; pp. 6467–6472.
25. Michalet, X.; Berglund, A.J. Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking. *Phys. Rev. E* **2012**, *85*, 061916. [[CrossRef](#)]
26. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)]
27. Tinevez, J.Y.; Perry, N.; Schindelin, J.; Hoopes, G.M.; Reynolds, G.D.; Laplantine, E.; Bednarek, S.Y.; Shorte, S.L.; Eliceiri, K.W. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **2017**, *115*, 80–90. [[CrossRef](#)]
28. Ernst, D.; Köhler, J. Measuring a diffusion coefficient by single-particle tracking: statistical analysis of experimental mean squared displacement curves. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 845–849. [[CrossRef](#)]
29. Kepten, E.; Bronshtein, I.; Garini, Y. Improved estimation of anomalous diffusion exponents in single-particle tracking experiments. *Phys. Rev. E* **2013**, *87*, 052713. [[CrossRef](#)]
30. Berglund, A.J. Statistics of camera-based single-particle tracking. *Phys. Rev. E* **2010**, *82*, 011917. [[CrossRef](#)]
31. Giloh, H.; Sedat, J. Fluorescence microscopy: Reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* **1982**, *217*, 1252–1255. [[CrossRef](#)]
32. Zipfel, W.R.; Williams, R.M.; Webb, W.W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Cohen, E.R. An Introduction to Error Analysis: The Study of Uncertainties in Physical Measurements. *Meas. Sci. Technol.* **1998**, *9*. [[CrossRef](#)]
34. Michalet, X. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Phys. Rev. E* **2010**, *82*, 041914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wagner, T.; Lipinski, H.G.; Wiemann, M. Dark field nanoparticle tracking analysis for size characterization of plasmonic and non-plasmonic particles. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, *16*, 2419. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Cheap, versatile, and turnkey fabrication of microfluidic master molds using consumer-grade LCD stereolithography 3D printing

Vincent G. Colin¹ · Théo Travers¹ · Denis Gindre¹ · Régis Barillé¹ · Matthieu Loumagne¹

Received: 2 March 2021 / Accepted: 23 May 2021 / Published online: 22 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2021

Abstract

The recent development of 3D printers allowed a lot of limitations in the field of microfabrication to be circumvented. The ever-growing chase for smaller dimensions has come to an end in domains such as microfluidics, and the focus now shifted to a cost-efficiency challenge. In this paper, the use of a high-resolution stereolithography LCD 3D printer is investigated for fast and cheap production of microfluidic master molds. More precisely, the UV LED array and the LCD matrix of the printer act as an illuminator and a programmable photomask for soft lithography. The achieved resolution of around 100 μm is mainly limited by the pixel geometry of the LCD matrix. A tree-shape gradient mixer was fabricated using the presented method. It shows very good performances despite the presence of sidewall ripples due to the uneven pixel geometry of the LCD matrix. Any design can be brought from concept to realization in under 2 h. Given its sub-€1000 cost, this method is a very good entry point for labs wishing to explore the potential of microfluidic devices in their experiments, as well as a teaching tool for introducing students to microfluidics.

Keywords Microfabrication · Microfluidics · Dry film photoresist · Low cost · Gradient mixer

1 Introduction

Despite its quite recent development, microfluidics is nowadays seen as much as a tool as its own research field [1]. Microfluidics has become a staple in chemical studies, thanks to the low amount of reagents required for a study in microchannels, the fast reaction time, and the controlled aspect of the laminar flow [2, 3]. There is no doubt about the relevance of such an implement for specific studies (lab on chip [4], bio [5] and chemical analysis [6], etc.). Sub-micrometric precision was reached using clean rooms and specific materials such as SU-8 resin. However, this process can be very expensive, and not accessible in every lab [7]. Moreover, not all applications require the finest resolutions possible, and it is more relevant in various cases to engineer cheaper microfluidic chips [8]. The focus is rather being drawn on the variety of circuits that can be engineered and processed in a short time period [9]. Different methods have

been investigated and developed over the recent years, with a focus on lowering the production costs of such devices, in order to better integrate them into regular diagnosis [10].

In this article, the process of design and fabrication of microfluidic master molds using a consumer-grade stereolithography (SLA) LCD 3D printer is presented. The LED array of the 3D printer delivers a parallel beam used to insolate a dry film photoresist through the LCD screen of the same printer. The whole process can be described as turnkey; the consumer-grade device can be used without any required modification. The design is directly displayed on the LCD screen, and no additional optics are required in order to shape the insolation beam.

The process described here is suited for prototyping, since the printed patterns can be modified at will quickly. The entire process from start to finish requires less than 6 h to manufacture a microfluidic device. Although the resulting devices are not on par in term of resolution with the state of the art, the idea here is a cheap and quick alternative, either to investigate different patterns for microfluidic devices, or even as an academic tool in order to introduce students to the subject of microfluidics. The process of microfabrication will be extensively described in the first part, and results obtained for a specific application of a tree-shaped gradient mixer will be presented in the second part to

✉ Matthieu Loumagne
matthieu.loumagne@univ-angers.fr

¹ Laboratoire MOLTECH-Anjou, UMR CNRS 6200,
UNIV Angers, SFR MATRIX, 2 Bd Lavoisier, 49045,
Angers CEDEX, France

demonstrate the feasibility of the method. Comparisons with other methods sharing the same philosophy will be carried out in a third part.

2 Material and methods

The manufacturing of the microfluidic circuits is conducted in a dark, non clean room setting. The goal is to demonstrate the feasibility of such microchips outside of the state of the art, and in very controlled conditions. The experimental environment described here can be reproduced in basically any room.

2.1 Microfluidic chips design

The microfluidic devices were initially designed with a 3D CAD software (OpenSCAD), and sliced through the software provided by the printer. However, it is also possible to draw the printed pattern at the pixel level by uploading directly a bitmap file instead of a CAD file (see SI section 1). The devices were then designed with a generic raster graphic editor.

2.2 Substrate preparation

Fifty-micrometer-thickness Ordyl FP450 dryfilm negative photoresist is used as the base material to create the microfluidic master mold. The theoretical achievable transverse resolution using this material is 25 μm . PET (polyethylene terephthalate) plates were chosen as a substrate for the dryfilm photoresist, because they are easier to process rather than glass slides, and offer better adherence to the dryfilm photoresist [11]. The only plate size limitation is the printing dimension, which is constrained by the size of the LCD screen, roughly $12 \times 7 \text{ cm}^2$. The pressing of the film against the PET substrate is an important step carried out with a basic thermal laminator (FGK-220). This step determines the quality of the microchip master mold. A particular attention has to be paid to avoid the formation of wrinkles between the dry film and the PET substrate, which could alterate the characteristics of the final microchannel. Additional practical details are given in section SI 2.

2.3 Insolation through a SLA LCD 3D printer

The printer used for insolation is a €1500 Phrozen Shuffle 4K [12]. It is sold as a high-resolution SLA 3D printer, initially designed to work with liquid photosensitive resins. The idea is to create a 3D object by printing successive layers on top of each other. Originally, a laser was used as the light source; nowadays, high-resolution LCD screens are extensively used, in combination with a high-power LED

array, in order to dramatically lower the prices of such apparatus.

The theoretical achievable transverse resolution is 31 μm . The printer uses a 3×5 matrix of 405 nm LEDs which is roughly collimated with one lens per LED. The light is then selectively masked by a 2160×3840 “4K” LCD screen. The whole system is operated by a Raspberry Pi and a custom motherboard.

The typical insolation time to ensure the polymerization of the dryfilm takes between 10 and 15 min, depending on the size of the details to be printed. Furthermore, thanks to the large size of the LCD screen, up to 5 microscope slides can be inserted at the same time in the insolation chamber, making the parallelization task incredibly easier.

The development process can be initiated as soon as 15 min after the illumination step is over. The substrates are submerged in a $K_2C O_3$ solution (1% weight concentration), at a temperature of around 20 °C. The development time takes usually 2 min, but highly depends on the size of the finest details of the circuit. The obtained microfluidic master molds are stored in dry and dark conditions, and protected from the dust in plastic Petri dishes.

2.4 PDMS imprint

A negative replica of the master mold can then be created with PDMS. Sylgaard 184 prepolymer is strongly mixed with the corresponding curing agent with a weight ratio of 10:1. This mixture is poured on the master mold, subjected to vacuum (10^{-3} bar) for a few minutes in order to eliminate air bubbles, and then left to dry in an oven for a minimum of 2 h at 60 °C. Higher temperatures would imply faster drying of the PDMS, however, it tends to destroy and melt the photoresist, resulting in a deterioration of the PDMS imprint.

To achieve a sealed microfluidic circuit, the PDMS imprint is bonded to a glass microscope slide using a corona treater [13].

2.5 Characterization apparatus

Height measurements of the master mold channels were obtained with a Veeco Dektak 6M Profilometer.

2.6 Microfluidics setup and absorbance measurement

The microfluidics setup is built around an IX73 Olympus inverted microscope.

The pressure in the channels is controlled using an Elveflow microfluidic flow controller OB1 MK3+ and the flow rates are measured via MFS2 and MFS3 Elveflow flow sensors.

The Rhodamine 6G dye (Sigma-Aldrich CAS: 989-38-8) used for absorbance measurement was prepared at 45 mg L^{-1} in ultrapure water.

The absorbance measurements are performed directly in the microfluidics channel according to the protocol given by Werts et al. [14]. The light from a day light white high-power LED lamp (Thorlabs SOLIS-3C), is collimated and focused onto the microfluidic device, and then collected through a $\times 4$ 0.1 NA microscope objective. The optical beam goes through a 550LP optical filter in order to eliminate the fluorescence of the Rhodamine 6G. The image of the channel is then formed on a color camera (Canon EOS 70D). The absorbance was measured using the green channel of the camera. The baseline signal I_0 was obtained by delimitation of a region of interest (RI) in the PDMS areas outside the microfluidic channels. The signal I was obtained by the mean value of the intensity inside the channel and the absorbance A was computed as $A = -\log_{10}(I/I_0)$. According to the Beer-Lambert law, at low absorbance, the absorbance is proportional to the concentration of Rhodamine 6G.

3 Results

3.1 Characterisation of the LED array

The central wavelength of the emitting LED is at 405 nm with an approximate width of 15 nm (see SI S3). The luminance provided by the LED matrix is not uniform (see picture on Fig. SI 4). The optical power was

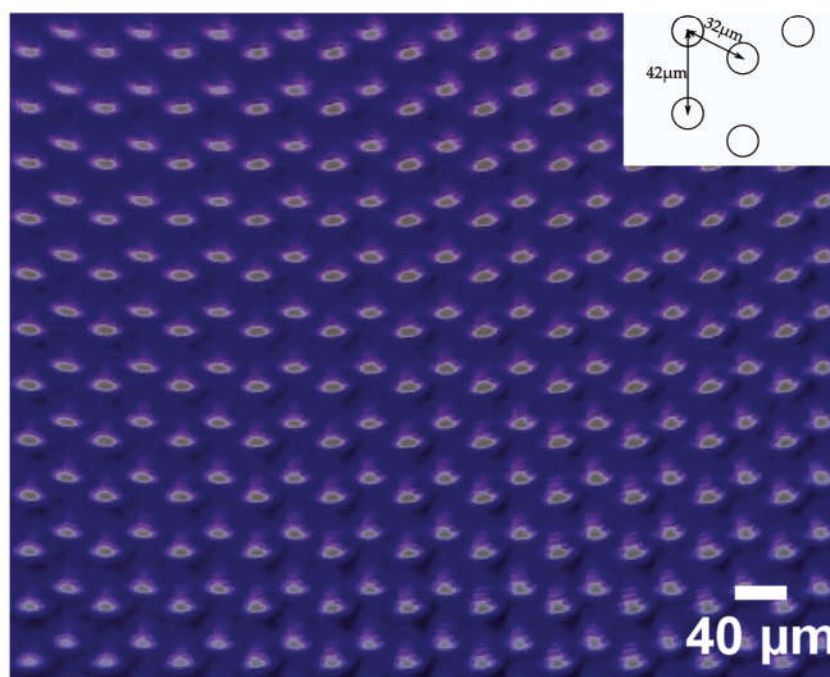
estimated between 1.6 and 2.2 mW cm^{-2} (see SI section 5). As a comparison, the data sheet of the dry film photoresist recommends an optimal energy of exposure of 300 to 350 mJ cm^{-2} for a UV source between 360 and 380 nm. Consequently, assuming that the absorption of the photoresist is lower at 405 nm than 370 nm, an optical power of 2 mW cm^{-2} is compatible with the 600 s exposure at 405 nm used here to insolate the photoresist.

The light emitted by the 405 LED array is not well collimated. In fact, it seems that the LED array aims at having a high luminance and quite uniform lighting at the cost of a parallel beam. Indeed, the matrix uses quite a large LED chip with a relatively small spatial coherence which prevents it from being efficiently collimated with a lens. Quantifying the beam divergence is difficult since it appears that different positions on the LED array have different angles of divergence/convergence.

3.2 Characterisation of the LCD matrix

A close picture of the LCD matrix, obtained with a handheld microscope, is shown on the Fig. 1. The picture shows clearly that the pixels are organized in a non uniform shifted pattern. More specifically, pixels form vertical lines which are each shifted by 33% of the vertical inter-pixel distance compared to the next line. As discussed below, this uneven pixel geometry is the main obstacle to achieving the best isotropic and finest resolution. We present in Section 3.4 a very simple method to mitigate this effect, even though this method does not balance the precision of vertical and horizontal patterns.

Fig. 1 Image of the LCD matrix used for illuminating the photoresist film. Inset: schematic of the pixel geometry of the LCD matrix



3.3 Single microfluidic channel master mold and maximum resolution

Figure 2a, b, c and d show optical images of the master mold of vertical channels obtained using respectively 1, 2, 5 and 10 pixels of the LCD matrix. From the measurement obtained with the profilometer (Fig. 2e) we can see that the minimum channel width obtained here is 75 μm . This value is higher than what could have been expected with a 31- μm LCD pixel size and a 25- μm resolution for the dryfilm photoresist. This is most likely due to the uneven pixel geometry of the LCD screen and the non parallelism of the LED array beams.

The 75- μm value potentially corresponds to the maximum expected resolution of this setup. However, one can see some oscillations around the channel. This effect directly results from the uneven pixel geometry of the LCD screen. For a one pixel large vertical channel (see Figs. 2a and 3a), this oscillation represents a 15% modulation of the width of the microchannel. It can also be seen on Fig. 2f that the canal width, for a channel bigger than 5 pixel, is almost proportional to the pixel size of the pattern of the LCD. One additional pixel leads to an additional width of

approximately 36 μm which is slightly more than the pixel size of the LCD screen.

However, drawing a single pixel vertical line is a special case. Indeed, looking at a horizontal channel (cf Fig. 3c), one can see stronger oscillations around the channel compared to the vertical channel. While the mean width of the canal is kept approximately constant, the position of the canal oscillates with an amplitude of roughly 30% of the canal width. Once again, this is due to the LCD screen pixel geometry. For a 5-pixel pattern on the LCD, corresponding to a 200- μm channel, the oscillation represents only 7% of the microchannel.

The mean height of the microchannel is 47 μm , which is in agreement with the thickness of the dry film photoresist.

Additionally, the master mold obtained from square patterns is shown in SI S6 in order to qualitatively evaluate the spatial low-pass filter effect of the whole system.

3.4 Mitigating the effect of the pixel geometry

Firstly, it is important to mention that a thicker 125- μm dryfilm photoresist (Ordyl P50125) was unsuccessfully tested. The lower resolution (125- μm transverse resolution)

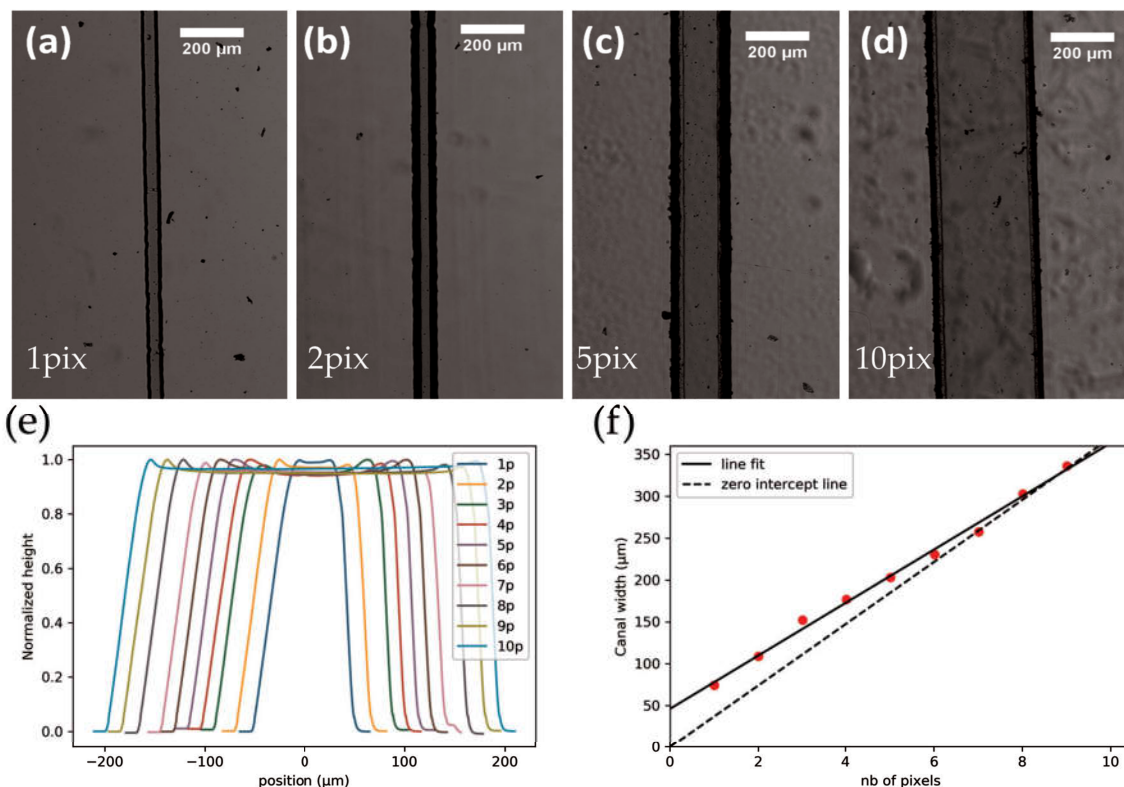
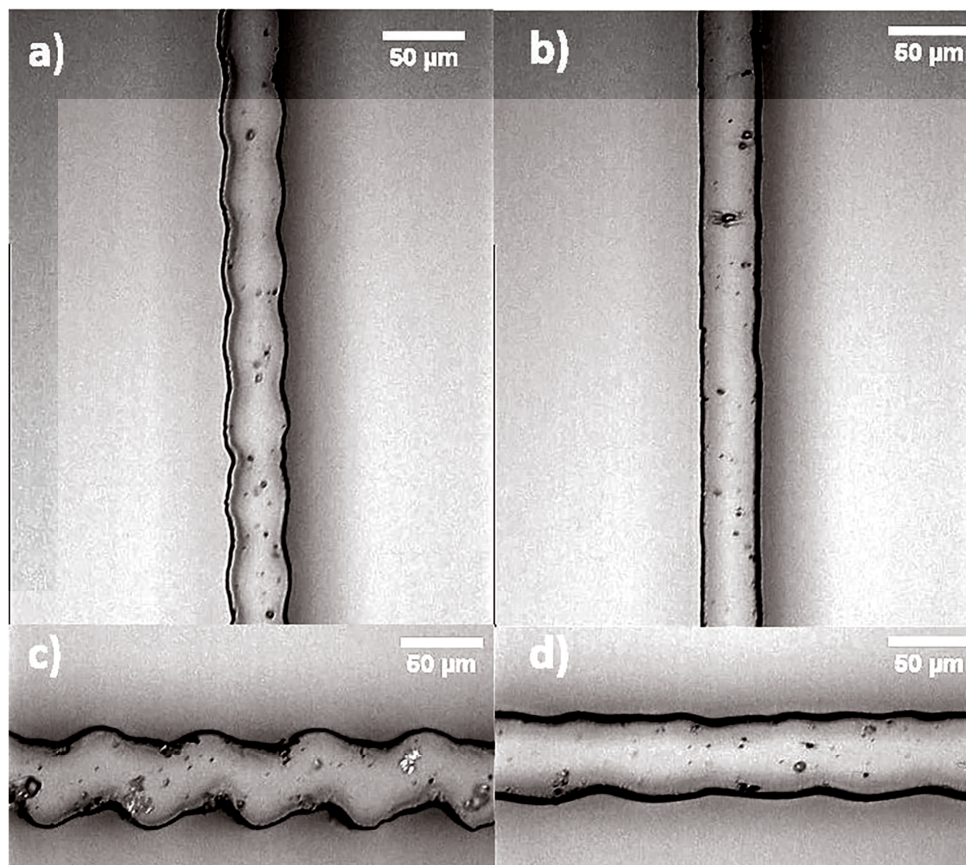


Fig. 2 a, b, c, d Optical image of a microchannel (vertically insolated) obtained with 1, 2, 5 and 10 pixels of the LCD screen respectively. e Horizontal profile of microchannels obtained for a width corresponding from 1 to 10 pixels of the LCD screen. f Evolution of the width

at half maximum of vertical microchannels with the number of pixels on the LCD screen. The plain line takes into account all the points whereas the dashed line has a forced zero intercept and only takes into account the channels made with more than 5 pixels

Fig. 3 Optical image of a microchannel created from 1 pixel of a LCD screen. **a** Vertical, pressed against the LCD screen. The small sidewall ripples may be attributed to the fact that the vertical pixels of the LCD matrix are not totally contiguous. **b** Vertical, insulated 340 μm away from the LCD screen. **c** Horizontal, pressed against the LCD screen. The important sidewall ripples are most surely due to the fact that, for drawing a horizontal line, alternating pixels of two different rows are turned on by the LCD matrix (cf Fig. 1). **d** Horizontal, insulated 340 μm away from the LCD screen



could have acted as a spatial low-pass filter, smoothing the pixel geometry effect. Instead, we apparently have observed the Fresnel diffraction created by the LCD matrix inscribed in different heights of the photoresist (see SI S7).

Indeed, the LCD mask also acts as a diffraction grid. Consequently, by being sufficiently far away from the surface of the LCD matrix, the light diffracting from several pixels can be blended into a smoother shape. This effect is shown on the Fig. 3 where a 1-pixel microchannel was insulated on the resin while pressed against the LCD screen (Fig. 3a and c) or 340 μm away from it (Fig. 3b and d).

3.5 Gradient mixer

Here are presented the results obtained with a gradient mixer. The basic tree-shape design [15] was deliberately chosen in order to maximize the footprint and show that large microchips can be easily manufactured. Additionally, creating a functional gradient mixer is more demanding than it seems. Indeed, the tolerance on the channel dimension is quite low since a slight imbalance in the hydrodynamic resistances of the different arms of the mixer will add up at each stage of the mixer and lead to concentrations significantly different from the theoretical values [16] (see SI S8).

Figure 5 shows optical images of the PDMS microchannels. Despite the apparent roughness of the microfluidic devices, in particular the sidewall ripples mentioned previously, the total hydrodynamic resistance on each channel is well balanced since applying the same pressure on the entrance with the same liquid leads to an even flow in the two channels within a 5% margin error.

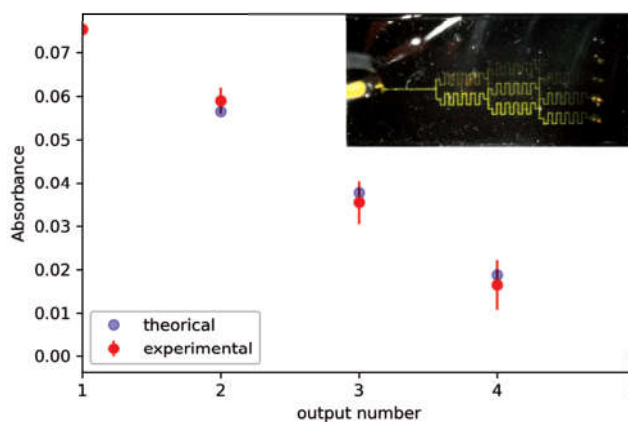


Fig. 4 Absorbance obtained at the five outputs of the gradient mixer chip after mixing Rhodamine 6G and water. Inset: picture of the microdevice with Rhodamine 6G visualized via its fluorescence

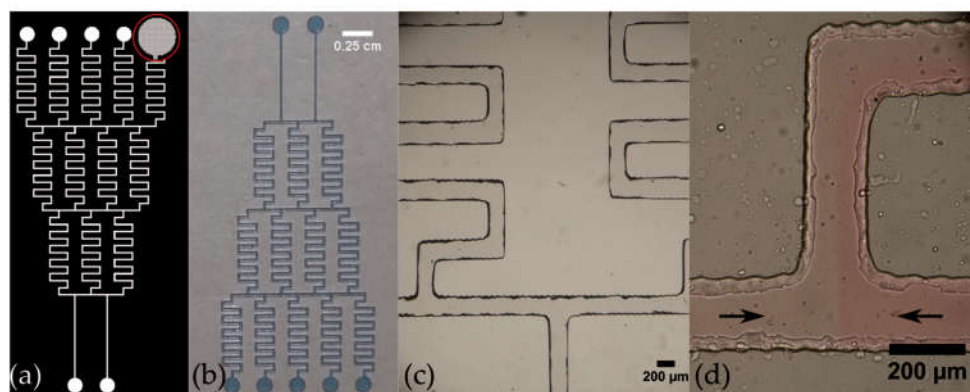


Fig. 5 **a** Raw file used for the microchip design. The red circle is a magnified zone to show the drawing at the pixel level. **b** Picture of the master mold made of dry film photoresist **c** Optical image ($\times 40.1$ NA) of the gradient mixer microdevice filled with water. Channels are “5

pixels” wide (i.e. $\approx 200 \mu\text{m}$) and sidewall ripples are more prominent on the horizontal channel **d** Optical image ($\times 10.025$ NA) of a junction of the gradient mixer where the concentrations c_0 and $c_0/2$ start to mix by diffusion

Based on the dimensions and length of the microchannel, the flow rate was set to $1 \mu\text{L min}^{-1}$ so that the rhodamine 6G would fully mix into water by diffusion [17].

Inset of Fig. 4 is a picture of the microdevice filled with water and rhodamine 6G and Fig. 4 shows the evolution of the absorbance of the liquid along the five outputs of the gradient mixer. Experimental output concentrations are in agreement with the theoretical ones [18] (Fig. 5).

Concerning the manufacturing aspect, the resin was insolated 340 μm away from the LCD screen (i.e. the thickness of two microscopy glass coverslips). Five master molds were insolated at the same time using the 5-in. display of the 3D printer. Consequently, five PDMS chips were obtained in a matter of a few hours.

4 Discussion

The goal of the present paper is to demonstrate another use of a consumer-grade product in the framework of research and/or academic activities. In this part, this method will be compared in this part against other techniques, acting as cheaper and faster counterparts to the more traditional fabrication strategy using white rooms and expensive reagents. Different approaches have been studied in order to reduce the cost and increase the flexibility of fabrication of microfluidic devices.

Some techniques completely bypassed the use of photolithography, using direct methods of microfabrication: to cite a few examples, micromilling [19], lost wax [20], 3D printing [21], electrophoresis [22]. Another perspective has focused on finding an easier and cheaper way to perform photolithography. Two major axis have been worked on. First of all, the use of resins (much easier to manipulate) have arisen with the development

of so-called dryfilm photoresists. Originally introduced by Dupont in 1970, these films were initially used for printed circuit board (PCB) fabrication. These films have many advantages, including a short processing time and a uniform photoresist distribution [23]. Moreover, the exposure energy is noticeably lower in this case, which means cheaper and more compact light sources such as commercial LEDs can be used [24]. However, these techniques still require the engineering of high precision photomasks representing the circuits to be drawn on the resin. Two major drawbacks arise from this need: first of all, these high-resolution masks are often produced by specific companies outside of the lab, and increase the overall cost and processing time of the whole operation. Secondly, new circuits will require new masks, which limits drastically the freedom of prototyping and the variety of the circuits that can be designed. Office printers can be used to print these masks [25] but at the cost of having a coarser 250- μm resolution.

More recently, the overwhelming development of 3D printers and Computer-Aided Design (CAD) in general have been investigated to help with this idea of fast-prototyping microfluidic chips. The versatility of such instruments perfectly aligns with the problematic of “fast prototyping”. Several techniques have been developed with this apparatus in mind. First of all, the microfluidic chip can be directly printed [26, 27] with specific resins, compatible with a wider range of chemical reagents [28], or transparent in order to be used within an optics framework [29, 30]. However, these new materials are far less characterized compared to the very popular polymers such as PDMS (polydimethylsiloxane) or PMMA (polymethyl methacrylate). These polymers have now been used for a very long time, and they have become the flagship, and go-to materials for microfluidics [31]. As they have been studied and used for several decades now, these materials are

far more flexible, and compatible with an incredibly wide range of chemicals. A middle-of-the-road solution would be to build a master mold using a 3D printer, instead of directly printing the circuit [21, 32]. The microfluidic chip can then be obtained through soft lithography with well-characterized materials, such as those aforementioned.

The main line of the idea presented here is to have access to an out-of-the-box working setup to prepare microfluidic devices. For this matter, the use of a consumer-grade SLA LCD 3D printer is relevant in many aspects. The device does not have to be modified in any way, avoiding thus any additional tedious step in the process. As an important side note, a very similar model (Phrozen Sonic MINI 4K) made by the same company, and using the same LCD screen and LED array is now available for €350 [12] and boasts many of the same characteristics, the only drawback being a smaller overall printing volume (which is not an issue for this photolithography application). It is safe to assume that the results presented here can be reproduced with this much cheaper SLA printer. Additionally, this reflects the current downward trend of consumer-grade SLA printer prices.

5 Conclusion

The system presented here is a compact, low cost (largely under €1000), and turnkey system to manufacture microdevices master molds to be used with soft lithography afterwards. The convenient aspect of the method is that the 3D printer is usable out of the box for this purpose, without any further modification. Its undeniable flexibility is due to the direct design of patterns with a drawing software, pixel by pixel. Moreover, the entire master mold manufacturing process takes less than an hour.

The main concern compared to other stereolithography technologies like laser SLA or DLP, is the uneven pixel geometry of the LCD matrix that leads to sidewall ripples, mainly on horizontal channels. This aspect is only an issue for very small channels (1 and 2 pixels) and ultimately limits the resolution of the apparatus around 100 μm . However, commercial DLP or laser SLA setup for microfluidics lithography are at least one order of magnitude more expensive.

Creating chips is only one of the steps for performing microfluidic experiments, but one can also rely on other low cost alternatives for microfluidic pumps [33, 34], reservoirs [35], valves [36] or PDMS bonding [13]. We believe that this system is a good entry point for labs wishing to start using microfluidics devices as tools for their experiment. It is also interesting for university/high school who wish to create introductory experimental labs on microfluidics.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00170-021-07329-3>.

Author contribution Conceptualization, M.L.; project administration, M.L, D.G.; methodology, all authors; data curation, V.C, T.T., software, M.L.; writing—original draft preparation, V.G. and M.L.; writing—review and editing, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This research was funded by ANR under Project ANR-17-CE09-0009 SIPAIE (Aggregation Induced Emission at Single-Particle level).

Data availability The data sets supporting the results of this article are included within the article and its additional files (cf [Electronic Supplementary Material](#)).

Declarations

Ethics approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Consent to participate The authors consent to participate.

Consent for publication The authors consent to publish.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Convery N, Gadegaard N (2019) 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering* 2(November 2018):76–91
- Convery N, Gadegaard N (2019) 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering* 2:76–91
- Whitesides GM (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442(7101):368–373
- Temiz Y, Lovchik RD, Kaigala GV, Delamarche E (2015) Lab-on-a-chip devices: how to close and plug the lab? *Microelectron Eng* 132:156–175
- Pei H, Lu L, Han Z, Wang Y, Bo T (2020) Recent advances in microfluidic technologies for circulating tumor cells: enrichment, single-cell analysis, and liquid biopsy for clinical applications. *Lab Chip* 20(21):3854–3875
- Liu Y, Jiang X (2017) Why microfluidics? Merits and trends in chemical synthesis. *Lab Chip* 17(23):3960–3978
- Nguyen HT, Ha T, Roy E, Huynh K, Perrault CMT (2018) Low-cost, accessible fabrication methods for microfluidics research in low-resource settings. *Micromachines* 9(9):1–10
- Charmet J, Rodrigues R, Yildirim E, Challa PK, Roberts B, Dallmann R, Whulanza Y (2020) Low-cost microfabrication tool box. *Micromachines* 11(2):135
- Lee JW, Daly SR, Huang-Saad AY, Seifert CM, Lutz J (2018) Using design strategies from microfluidic device patents to support idea generation. *Microfluid Nanofluid* 22(7):1–22
- Gale BK, Jafek AR, Lambert CJ, Goenner BL, Moghimifam H, Nze UC, Kamarapu SK (2018) A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects. *Inventions* 3(3):60
- Khalkhal F, Chaney KH, Muller SJ (2016) Optimization and application of dry film photoresist for rapid fabrication of high-aspect-ratio microfluidic devices. *Microfluid Nanofluid* 20(11):153

12. Phrozen 3d lcd printers. <https://www.phrozen3dp.com/categories/phrozen-lcd-3d-printer>. Accessed 16 Feb 2021
13. Haubert K, Drier T, Beebe D (2006) Pdms bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab Chip* 6(12):1548–1549
14. Martinus HV, Werts VR, Texier-Picard R, Poizat R, Franais O, Griscom L, Navarro JRG (2012) Quantitative full-colour transmitted light microscopy and dyes for concentration mapping and measurement of diffusion coefficients in microfluidic architectures. *Lab Chip* 12(4):808–820
15. Wang X, Liu Z, Pang Y (2017) Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems. *RSC Advances* 7(48):29966–29984
16. Yi W, Mukherjee T, Lin Q (2006) Systematic modeling of microfluidic concentration gradient generators. *J Micromech Microeng* 16(10):2128–2137
17. Oh KW, Lee K, Ahn B, Furlani EP (2012) Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. *Lab Chip* 12(3):515–545
18. Dertinger SKW, Chiu DT, Jeon NL, Whitesides GM (2001) Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Analytical Chemistry* 73(6):1240–1246
19. Guckenberger DJ, De Groot TE, Wan AMD, Beebe DJ, Young EWK (2015) Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab Chip* 15(11):2364–2378
20. Chung C, Chen YJ, Chen PC, Chen CY (2015) Fabrication of PDMS passive micromixer by lost-wax casting. *Int J Precis Eng Manuf* 16(9):2033–2039
21. Bazaz SR, Kashaninejad N, Azadi S, Patel K, Asadnia M, Jin D, Warkiani ME (2019) Rapid softlithography using 3D-printed molds. *Advanced Materials Technologies* 4(10):1–11
22. Renaudot R, Fouillet Y, Jalabert L, Kumemura M, Collard D, Fujita H, Agache V (2014) Programmable LDEP technology to fabricate versatile master molds for PDMS continuous-flow microfluidic applications. *Microfluid Nanofluid* 16(4):701–710
23. Vulto P, Glade N, Altomare L, Bablet J, Del Tin L, Medoro G, Chartier I, Manaresi N, Tartagni M, Guerrieri R (2005) Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips. *Lab Chip* 5(2):158
24. Maisonneuve BGC, Honegger T, Cordeiro J, Lecarme O, Thiry T, Fuard D, Berton K, Picard E, Zelsmann M, Peyrade D (2016) Rapid mask prototyping for microfluidics. *Biomicrofluidics* 10(2):024103
25. Deng T, Wu H, Brittain ST, Whitesides GM (2000) Prototyping of masks, masters, and stamps/molds for soft lithography using an office printer and photographic reduction. *Anal Chem* 72(14):3176–3180
26. Waheed S, Cabot JM, Macdonald NP, Lewis T, Guijt RM, Paull B, Breadmore MC (2016) 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab Chip* 16(11):1993–2013
27. Wang Z, Martin N, Hini D, Mills B, Kim K (2017) Rapid fabrication of multilayer microfluidic devices using the liquid crystal display-based stereolithography 3D printing system. *3D Printing and Additive Manufacturing* 4(3):156–164
28. Kotz F, Risch P, Helmer D, Rapp BE (2019) High-performance materials for 3D printing in chemical synthesis applications. *Advanced Materials* 31(26):1805982
29. Au AK, Lee W, Folch A (2014) Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices. *Lab Chip* 14(7):1294–1301
30. Kotz F, Arnold K, Wagner S, Bauer W, Keller N, Nargang TM, Helmer D, Rapp BE (2018) Liquid PMMA: a high resolution polymethylmethacrylate negative photoresist as enabling material for direct printing of microfluidic chips. *Adv Eng Mater* 20(2):1–5
31. Kiran Raj M, Chakraborty S (2020) PDMS Microfluidics: a mini review. *J Appl Polym Sci* 137(27):1–14
32. Mohamed MGA, Kumar H, Wang Z, Martin N, Mills B, Kim K (2019) Rapid and inexpensive fabrication of multi-depth microfluidic device using high-resolution LCD stereolithographic 3D printing. *Journal of Manufacturing and Materials Processing* 3(1):1–11
33. Frank P, Haefner S, Elstner M, Richter A (2016) 2016 fully-programmable, low-cost, “do-it-yourself” pressure source for general purpose use in the micro-fluidic laboratory. *Inventions* 1(2):1–11
34. Thurgood P, Suarez SA, Chen S, Gilliam C, Pirogova E, Jex AR, Baratchi S, Khoshmanesh K (2019) Self-sufficient, low-cost microfluidic pumps utilising reinforced balloons. *Lab Chip* 19(17):2885–2896
35. Direct delivery of reagents from a pipette tip to a pdms microfluidic device. <https://blogs.rsc.org/chipsandtips/2015/10/09/direct-delivery-of-reagents-from-a-pipette-tip-to-a-pdms-microflu-device/>. Accessed 14 October 2020
36. A simple microfluidic 4-way valve by clamping vinterconnected tubing. <https://blogs.rsc.org/chipsandtips/2011/10/17/a-simple-microfluidic-4-way-valve-by-clamping-interconnected-tubing/>. Accessed 14 October 2020

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Titre : Caractérisation de nano-sources de lumière en régime microfluidique grâce à la microscopie non-linéaire

Mots clés : Microscopie non-linéaire, Suivi individuel, Microfluidique, Microfabrication, Feuille de lumière.

Résumé : La microscopie non-linéaire a permis depuis plusieurs années de faire évoluer l'observation des tissus biologiques grâce à une amélioration des contrastes lorsque les échantillons sont denses et épais. Néanmoins, la génération des effets non-linéaires impose des limitations techniques telles que le balayage d'un faisceau laser pour former une image de la réponse de l'échantillon. Cela peut restreindre l'utilisation de la microscopie non-linéaire à des expériences où les émetteurs sont statiques. Pourtant, de nombreuses expériences en biologie requièrent le suivi individuel de biomarqueurs greffés à des molécules comportant un intérêt pour la compréhension des phénomènes d'interactions au sein de cellules vivantes. Le but de ce travail de thèse est d'adapter l'utilisation de la microscopie non-linéaire limitée temporellement par son balayage, au suivi individuel de nano-émetteurs de lumière en diffusion libre. Cette étude répond à cette problématique en établissant un compromis entre la résolution spatiale et la cadence d'acquisition des images afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. L'objectif de ce travail s'est également étendu à la maîtrise d'un nouveau processus de fabrication de puces microfluidiques. Ceci a permis de mettre au point une microscopie à feuille de lumière intégrée à une puce microfluidique au moyen de deux fibres optiques. Dans le but d'appliquer les outils de mesure et les supports d'expériences réalisés, un début d'étude sur la formation d'agrégats en canaux microfluidiques est présenté où l'agrégation de molécules AIE est forcée afin d'estimer leur taille en arrêtant le flux et en étudiant leur mouvement de diffusion.

Title : Characterization of nano emitter of light in a microfluidic regime using non-linear microscopy

Keywords : Non-linear microscopy, Tracking, Microfluidics, Microfabrication, Light-sheet.

Abstract : Nonlinear microscopy has allowed for several years to evolve the observation of biological tissues thanks to an improvement in contrast when the samples are dense and thick. Nevertheless, the generation of nonlinear effects imposes technical limitations such as scanning a laser beam to image the sample response. This may restrict the use of nonlinear microscopy to experiments where the emitters are static. However, many experiments in biology require the individual monitoring of biomarkers grafted to molecules of interest for the understanding of interaction phenomena within living cells. The aim of this thesis is to adapt the use of non-linear microscopy, limited in time by its scanning, to the individual follow-up of light nano-emitters in free diffusion. This study addresses this problem by establishing a compromise between spatial resolution and image acquisition rate in order to obtain statistically reliable results. The objective of this work has also been extended to the control of a new microfluidic chip fabrication process. This allowed the development of a light sheet microscopy integrated to a microfluidic chip using two optical fibers. In order to apply the measurement tools and experimental supports realized, a first study on the formation of aggregates in microfluidic channels is presented where the aggregation of AIE molecules is forced in order to estimate their size by stopping the flow and by studying their diffusion movement.