



HAL
open science

Développement d'un procédé de fabrication de laboratoire sur puce à base de chitosane : vers une réduction de l'utilisation des polymères pétro-sourcés

Morgane Zimmer

► **To cite this version:**

Morgane Zimmer. Développement d'un procédé de fabrication de laboratoire sur puce à base de chitosane : vers une réduction de l'utilisation des polymères pétro-sourcés. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2024. Français. NNT : 2024ECDL0044 . tel-04957586

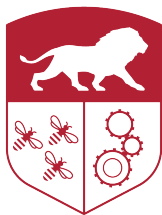
HAL Id: tel-04957586

<https://theses.hal.science/tel-04957586v1>

Submitted on 19 Feb 2025

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.



**CENTRALE
LYON**

N° d'ordre NNT : 2024ECDL0044

THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

Ecole Doctorale N°160

Ecole Doctorale Electronique Electrotechnique et Automatique (EEA)
Spécialité de doctorat : Ingénierie pour le vivant

Soutenue publiquement le 21 novembre 2024 par :

Morgane ZIMMER

Développement d'un procédé de fabrication de laboratoire sur puce à base de chitosane : vers une réduction de l'utilisation des polymères pétro-sourcés

Devant le jury composé de :

Alexandra Montembault	Professeure, UCBL (Lyon 1)	Présidente du jury
Franck Chollet	Professeur, Université de Franche-Comté	Rapporteur
Christophe Vieu	Professeur, INSA Toulouse	Rapporteur
Maïwenn Kersaudy	Professeure, Heriot-Watt University	Examinatrice
Emmanuelle Laurenceau	Maîtresse de conférences, Ecole Centrale de Lyon	Directrice de thèse
Anne-Laure Deman	Maîtresse de conférences, UCBL (Lyon 1)	Directrice de thèse
Stéphane Trombotto	Maitre de conférences, UCBL (Lyon 1)	Invité

Unité de recherche : INL - Institut des Nanotechnologies de Lyon

Résumé

Les laboratoires sur puce (LoC) sont des dispositifs microfluidiques de plus en plus utilisés dans les domaines de l'analyse biomédicale ou environnementale. Il est estimé que des millions de ces dispositifs seront utilisés quotidiennement dans les hôpitaux et foyers dans les années à venir. Or, ils sont principalement à usage unique et majoritairement fabriqués à partir de polymères d'origine pétrochimique (thermoplastiques ou PDMS), générant une pollution environnementale importante due à leur production et à leur destruction soit par incinération, soit dans des décharges à ciel ouvert.

Pour proposer une alternative éco-responsable, nous avons développé un procédé de fabrication de ces dispositifs microfluidiques à partir de chitosane, un polysaccharide biosourcé, biodégradable et biocompatible. Nous avons comparé plusieurs stratégies pour obtenir des films transparents et épais à partir de chitosane en poudre, en minimisant leur gonflement dans une solution aqueuse. En outre, leurs propriétés mécaniques et physiques (rugosité, hydrophobicité, module de Young, dureté) ont été caractérisées. Le pressage à chaud et la micro-gravure ont été étudiés pour produire des micro-canaux sur les films de chitosane obtenus. Ensuite, une étape d'adhésion basée sur le dépôt d'une résine sèche sur les films de chitosane micro-structurés a permis de les coller soit à une lame de verre, soit à un autre film de chitosane. Nous avons alors pu fabriquer les premiers dispositifs microfluidiques fonctionnels en chitosane. Leurs comportements (gamme de débits et durées, diffusion de molécules, déformation des canaux) pendant l'injection ont été examinés. Enfin, des cellules (ML-2 ou MDA-MB-231) ont été cultivées avec succès sur les films de chitosane. Ceci a conduit à l'implémentation d'une chambre de culture cellulaire dans un dispositif microfluidique en chitosane, permettant l'observation sur quelques jours de leur comportement. Cette étude ouvre la voie au développement de LoC éco-responsables intégrant diverses fonctions.

Mots clés :

Chitosane, Laboratoire sur puce, Microfluidique, Biomatériaux, Culture cellulaire, Micro-structuration

Abstract

Lab-on-a-chip (LoC) are microfluidic devices that are increasingly used in biomedical and environmental analysis. It is expected that millions of these devices will be used daily in hospitals and homes in the coming years. However, they are mainly single-use devices, and most of them are manufactured from hydrocarbons (thermoplastics or PDMS), resulting in significant pollution due to their production and disposal, either by incineration or in open-air landfill sites.

To offer an eco-responsible alternative, we have developed a fabrication process for microfluidic devices from chitosan, a bio-sourced, biodegradable, and biocompatible polysaccharide. We compared several strategies to obtain transparent and thick films from chitosan powder, that minimizes their swelling in aqueous solution. Furthermore, their mechanical and physical properties (rugosity, hydrophobicity, Young's modulus, hardness) were characterized. Both hot-embossing and micro-drilling were investigated to produce microchannels on the resulting chitosan films. Then, an adhesion step based on the deposition of a dry photoresist on micro-structured chitosan films enabled their bonding to either a glass slide or another chitosan film. We were then able to prepare the first functional chitosan microfluidic devices. Their behaviors (range of flowrates and duration, diffusion of molecules, channel deformation) during injection were examined. Finally, cells (ML-2 or MDA-MB-231) were successfully cultivated on chitosan films. This led to the implementation in a chitosan microfluidic device of a cell culture chamber allowing the observation over a few days of their behavior. This study paves the way for the development of eco-friendly lab-on-a-chip integrating various functions.

Keywords :

Chitosan, Lab-on-a-chip, Microfluidic, Biomaterials, Cell culture, Micro-patterning

Liste des communications

Liste des publications :

- M. Zimmer, S. Trombotto, E. Laurenceau, A.L. Deman-Him, « Chitosan as material for the elaboration of lab-on-a-chip », *2023 IEEE Biosensors Conference (BioSensors)*, 2023, pp.1-4, <https://hal.science/hal-04707496>
- M. Zimmer, S. Trombotto, E. Laurenceau, and A. L. Deman, « Chitosan as an alternative to oil-based materials for the fabrication of lab-on-a-chip », *Micromachines*, 2024, 15(3), pp.379, <https://hal.science/hal-04707490>

Liste des communications :

- M. Zimmer, A.L. Deman-Him, S. Trombotto, E. Laurenceau, « Etude d'un procédé de fabrication de laboratoire sur puce biosourcé », *Journées d'Etude sur l'Adhesion 2022* (21-23 Septembre 2022) – poster
- M. Zimmer, A.L. Deman-Him, S. Trombotto, E. Laurenceau, « Elaboration d'un système microfluidique à partir de biopolymère », *Microfluidique, capteurs et interfaces biologiques, Journée croisée des GDR B2I et MNF* (7 octobre 2022) – poster
- M. Zimmer, A.L. Deman-Him, S. Trombotto, E. Laurenceau, « Development of a fabrication process for a bio-based lab-on-a-chip », *SNOSCELLS* (26-27 Janvier 2023) – poster
- M. Zimmer, A.L. Deman-Him, S. Trombotto, E. Laurenceau, « Bio-sourced polymer for the elaboration of lab-on-a-chip », *Journées plénières GDR MNF* (3-4 avril 2023) – poster
- M. Zimmer, S. Trombotto, E. Laurenceau, A.L. Deman-Him, « Chitosan as material for the elaboration of lab-on-a-chip », *IEEE Biosensors 2023* (30 juillet-1er août 2023) – oral
- M. Zimmer, S. Trombotto, A.L. Deman-Him, E. Laurenceau, « Towards eco-friendly lab-on-a-chip with bio-sourced polymer », *MicroTAS 2023* (15-19 octobre 2023) – poster

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont facilité la réalisation de cette thèse, bien que les remercier tous individuellement soit impossible.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude envers mes directrices de thèse, Emmanuelle et Anne-Laure, pour toute leur aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en leur compagnie car elles ont toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Leur motivation pour ce projet a également été une source d'inspiration tout au long de cette aventure.

Je remercie aussi Stéphane Trombotto qui, en plus de son appui scientifique, a participé à l'encadrement de cette thèse.

Franck Chollet et Christophe Vieu m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse, ils ont pris le temps de relire mon manuscrit en détail et de le discuter avec moi, ce m'a permis d'envisager mon travail sous d'autres angles.

Je tiens à remercier Maïwenn Kersaudy et Alexandra Montembault pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour nos échanges enrichissants.

Je remercie le labex iMUST pour le financement auxquels ils ont contribué pour l'environnement de ma thèse.

Je suis reconnaissante envers Marie-Charlotte Audry (INL) et Rémi Gauthier (Matéis) pour les mesures qu'ils ont réalisé pour compléter les caractérisations de mes échantillons.

De même, je remercie tous les stagiaires et élèves de Centrale Lyon dont les résultats ont enrichi ce projet.

Finalement, je tiens à remercier chaleureusement mes collègues (tous les chercheurs, ingénieurs et doctorants que j'ai pu rencontrer) pour leur accueil et l'ambiance agréable qui règne au sein des deux laboratoires que j'ai côtoyés. Je suis particulièrement heureuse d'avoir fait partie du Bureau de la Passion et j'espère que nos amitiés vont perdurer au delà de cette thèse.

Mes derniers remerciements vont à ma famille et mes amis qui m'ont soutenue et ont écouté mes histoires pendant ces 3 ans de thèse. Je garderai de merveilleux souvenirs de ces week-ends, que ce soit à la maison ou en visite à travers la France et l'Europe.

Table des matières

Résumé	I
Abstract	II
Liste des communications	III
Remerciements	IV
Table des matières	VII
Table des figures	XII
Liste des tableaux	XIV
Listes des abréviations	XV
Introduction générale	1
Chapitre 1 Matériaux et méthodes de fabrication des laboratoires sur puce	4
I Contexte de la production et gestion des déchets plastiques médicaux . . .	6
II Matériaux et méthodes de fabrication standards des LoC	9
II.A PDMS et lithographie douce	9
II.B Thermoplastiques	11
II.C Impacts sur l'environnement	15
II.D Résumé et perspectives	17
III Matériaux bio-sourcés pour la microfluidique	19
III.A Papier	19
III.B Acide Polylactique (PLA)	21
III.C Soie	22
III.D Zéine	24
III.E Alginate	25
III.F Gomme-Laque	27
III.G Bois	28

III.H	Résumé et perspectives	30
IV	Chitosane : un biopolymère pour la fabrication de laboratoires-sur-puce	32
IV.A	Production de chitosane	32
IV.B	Propriétés du chitosane	33
IV.C	Mise en forme du chitosane	37
V	Défis à relever pour fabriquer des LoC en chitosane et positionnement des travaux de thèse	52
	Bibliographie	54
Chapitre 2 Préparation et Caractérisation des films de chitosane		68
I	Matériels & Méthodes	69
I.A	Matériels	69
I.B	Protocoles de fabrication des films de chitosane	69
I.C	Caractérisations des solutions et films de chitosane	74
II	Résultats & Discussions	79
II.A	Elaboration de films épais de chitosane	79
II.B	Stratégies pour limiter le gonflement des films de chitosane	87
III	Conclusion du chapitre	102
	Bibliographie	103
Chapitre 3 Elaboration de systèmes microfluidiques en chitosane		108
I	Matériels & Méthodes	109
I.A	Matériels	109
I.B	Méthodes de Micro-structuration	110
I.C	Méthodes de caractérisation	112
II	Résultats & Discussions	114
II.A	Micro-structuration de films de chitosane par pressage à chaud	114
II.B	Micro-structuration de films de chitosane avec micro-gravure	121
II.C	Assemblage des microsystèmes fluidiques à base de chitosane et évaluation des performances	125
III	Conclusion du chapitre	135
	Bibliographie	136
Chapitre 4 Application des laboratoires sur puce en chitosane pour la culture cellulaire		138
I	Matériels & Méthodes	139
I.A	Matériels	139
I.B	Protocoles de stérilisation de films de chitosane	139
I.C	Culture de cellules sur des films de chitosane stérilisés	140

I.D	Culture cellulaire en microsystème	142
II	Résultats & Discussions	145
II.A	Stérilisation des films de chitosane	145
II.B	Culture cellulaire sur films de chitosane	148
II.C	Evaluation de système microfluidique en chitosane pour la culture cellulaire	153
III	Conclusion du chapitre	158
	Bibliographie	159
	Conclusion générale	162
	Annexes	II
A	Purification du chitosane	II
B	Caractérisation de la BSA marquée avec Alexa Fluo [®] 555	III
C	Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur les canaux microfluidiques	IV
C.a	Scans 3D	IV
C.b	Vidéos	V
D	Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur la culture cellulaire des MDA-MB-231 dans des puits	VI
D.a	Vidéos	VI
D.b	Photos	VII
E	Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur la culture dans un système microfluidique	VIII

Table des figures

Figure 1.1 (a) Aperçu des défis en matière de dispositifs de diagnostic à usage unique [12]; (b) Schéma du cycle de vie d'un LoC [21].	7
Figure 1.2 (a) Lithographie douce de PDMS; (b) Collage de PDMS avec un autre substrat; (c) Photo d'un système microfluidique en PDMS sur une lame de verre pour l'analyse de cellules [31].	10
Figure 1.3 (a) Thermoplastiques utilisés pour la fabrication de LoC : Polyméthacrylate de méthyle (PMMA), Polystyrène (PS), Copolymère d'oléfine cyclique (COC) et Poly-carbonate (PC); (b) Schéma de la transition vitreuse des thermoplastiques; (c) Propriétés optiques, physiques et chimiques des thermoplastiques couramment utilisés [35].	11
Figure 1.4 Schémas des méthodes de mise en forme des thermoplastiques : (a) Pressage à chaud; (b) Moulage par injection; (c) Ablation par laser; (d) Impression 3D.	13
Figure 1.5 Résumé des méthodes de collage directes et indirectes pour les LoC en thermoplastiques [35].	15
Figure 1.6 Polymérisation du PDMS à partir du DMS.	16
Figure 1.7 (a) Molécule de cellulose; (b) Schéma du procédé de fabrication de microsystèmes fluidique en papier [66]; (c) Photos d'un système papier multiplexé pour la détection de 3 cibles (1, 2 et 3) avec un contrôle positif (P) et négatif (N) dont le résultat est donné par colorimétrie visual [70].	20
Figure 1.8 (a) Schéma de synthèse du PLA; (b) Photo d'un système microfluidique en PLA micro-structuré par ablation laser (adapté de [75]); (c) Schéma de prototypage rapide pour la production de systèmes en PLA [76].	21
Figure 1.9 (a) Schéma de fabrication d'un hydrogel de soie en 2 couches à partir de moulage sacrificielle en gélatine et de superposition de couches [86]; (b) Système microfluidique en hydrogel de soie avec 3 canaux 5 min après l'injection de para-nitrophényle (à gauche) et après 30 min (à droite) [86].	23
Figure 1.10 (a) Photos de systèmes microfluidiques en zéine sur verre ou sur un autre film de zéine (adapté de [95]); (b) Collage de films de zéine par vapeur d'éthanol (adapté de [95]); (c) Collage par solvant (adapté de [95]).	24
Figure 1.11 (a) Structure chimique de l'alginate composé des unités de répétition G et M; (b) Schéma de la fabrication de canaux dans un hydrogel d'alginate de calcium à partir d'une solution d'alginate de sodium (NaA) et d'alginate de propylène glycol (PGA), puis scellement du microsystème avec poly-L-lysine (PLL) [107]; (c) Photos d'un système en hydrogel d'alginate après lithographie douce et pendant l'injection d'une solution aqueuse contenant un colorant bleu (adapté de [107]).	26
Figure 1.12 (a) Molécules constituant la gomme-laque; (b) Schéma du protocole de préparation de microsystèmes en gomme-laque : 1 & 3) Filmification, 2) Pressage à chaud, 4) Collage par traitement thermique, 5) Perforations d'entrée et sortie pour fluides (adapté de [68]); (c) Photos de systèmes en gomme-laque sur papier [68].	27
Figure 1.13 (a) Schéma de la structure du bois à différentes échelles [122]; (b) Section transversale d'un canal dans un dispositif microfluidique en bois gravé par laser CO ₂ et scellé par colle cyanoacrylate [123]; (c) Dispositif microfluidique en bois et PMMA perfusé à 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ [123].	28

Figure 1.14 Schéma des étapes pour la production de chitine et chitosane.	33
Figure 1.15 Etats de protonation du chitosane.	34
Figure 1.16 (a) Analyses des courbes thermogravimétriques et (b) Courbes différentielles du chitosane en poudre (CS) et des films de chitosane avec de l'acide acétique, acide citrique et acide lactique, respectivement CS-Ac, CS-Cit et CS-La [163].	36
Figure 1.17 Protocole de fabrication de film de chitosane.	37
Figure 1.18 (a) Résistance à la traction et (b) Perméabilité à la vapeur d'eau de films de chitosane avec différentes M_w et degré de désacétylation ($DDA = 1 - DA$) après stockage à T_{amb} : 1 - 1 jour, 2 - 7 jours et 3 - 30 jours [164].	38
Figure 1.19 (a) Résistance à la traction et (b) Perméabilité à la vapeur d'eau de films de chitosane produit avec acide acétique et lactique après stockage à T_{amb} : 1 - 1 jour, 2 - 7 jours et 3 - 30 jours [164].	39
Figure 1.20 (a) Courbes de contraintes en fonction de la déformation de films plastifiés avec x% (w/w) de glycérol (GLY), d'éthylène glycol (EG), de poly(éthylène glycol) (PEG) ou de propylène glycol (PG) après stockage pendant 3 semaines [168]; (b) Schéma de l'effet des plastifiants.	40
Figure 1.21 Tableau des résistances en traction et élongation à la rupture (a) et courbe de perméabilité à la vapeur d'eau (b) de films de chitosane neutralisés avec différentes concentrations de NaOH pour différents temps de neutralisation : x%-ys avec x la concentration de NaOH et y le temps de neutralisation [170].	40
Figure 1.22 (a) Schéma de lithographie douce forcée [177]; (b) Schéma de photolithographie avec résine positive et négative; (c) Profil et image de micro-structures produites sur des films de chitosane de 500 μm d'épaisseur par lithographie douce avec une périodicité de 10 μm [177]; (d) Image MEB de structures obtenues par photolithographie sur chitosane (ligne de 47 nm line avec 332 nm d'espace) [180].	42
Figure 1.23 (a) Schéma de gravure par plasma oxygène de films de chitosane [147]; (b) Image MEB de ressorts serpentins gravés en chitosane [181]; (c) Assemblage direct du chitosane en réponse à un stimuli électrique [140]; (d) Dépôt de chitosane à 4 A.m^{-2} pendant 10 min sur les parois d'un canal microfluidique sur un détecteur optique [182].	43
Figure 1.24 (a) Groupes chimiques sur le chitosane; (b) Spectres FTIR de chitosane en poudre [a], en film non-neutralisé [b] et en film neutralisé [c] (adapté de [191]).	45
Figure 1.25 (a) Réticulation du chitosane par un dialdéhyde; (b) Réticulation du chitosane par un diacide carboxylique.	46
Figure 1.26 (a) Réticulation du chitosane avec un diépoxyde; (b) Réticulation du chitosane avec de la génipine.	46
Figure 1.27 Schéma des différentes liaisons physiques pour des hydrogels de chitosane.	48
Figure 1.28 (a) Gonflement dans l'eau d'hydrogels de chitosane réticulés avec des ratios de glutaraldéhyde / groupes amine du chitosane égaux à 0 (G/0), 0,068 (G/1), 0,102 (G/1.5), 0,205 (G/3) et 0,307 (G/4.5) [194]; (b) Gonflement pour des films de chitosane neutralisés par 1 M d'hydroxyde de sodium réticulés avec de la génipine à différents pH pendant l'immersion dans [1.] une solution aqueuse à pH=1,2 et [2.] du PBS à pH=7,4 [202].	50
Figure 1.29 (a) Courbes du degré d'ionisation du citrate et du chitosane, et courbe de titrage de la turbidité d'une solution de citrate/chitosane à 420 nm [206]; (b) Relargage de chitosane au cours du temps à partir d'hydrogels de chitosane/citrate dans des solutions de pH différents [206]; (c) Taux de gonflement (après stabilisation du gonflement) de l'hydrogel de citrate/chitosane dans des solutions à différents pH [206].	51
Figure 2.1 Protocole de préparation de films de chitosane.	70
Figure 2.2 Protocole de neutralisation de films de chitosane.	71
Figure 2.3 Protocole de ré-acétylation de films de chitosane.	72

Figure 2.4	Protocole de réticulation du chitosane avec du glutaraldéhyde.	73
Figure 2.5	Protocole de réticulation du chitosane avec du glutaraldéhyde.	74
Figure 2.6	Schéma de mesure de la viscosité à l'aide d'un viscosimètre cône-plan.	75
Figure 2.7	Schéma de mesure de spectre infrarouge par FTIR.	77
Figure 2.8	Schéma de mesure d'angle de contact.	77
Figure 2.9	Schéma d'une mesure de nano-indentation.	78
Figure 2.10	Spectres FTIR de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG avant et après neutralisation avec 1M NaOH pendant 45 min.	81
Figure 2.11	Films de chitosane après rinçage lors d'une neutralisation à 1M NaOH pendant 10 min : (a) 6% (m/v) de chitosane 144, 200% (m/m) de glycérol par rapport à la masse de chitosane; (b) 6% (m/v) de chitosane 244LG, 200% (m/m) de glycérol par rapport à la masse de chitosane.	82
Figure 2.12	Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG non-neutralisés ou neutralisés avec différentes concentrations de NaOH et différents temps d'immersion dans les solutions basiques (mesures en triplicate).	83
Figure 2.13	Schéma du séchage de solutions de chitosane dans des boîtes de Petri sans (a) ou avec (b) un couvercle percé.	84
Figure 2.14	(a) Epaisseurs de films de chitosane (double couche, neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min) en fonction de la concentration de la solution de chitosane et de leur M_w ; (b) Photos des mêmes films.	85
Figure 2.15	Spectres UV-visible normalisés pour 100 μm d'épaisseur de films de chitosane (double couches, neutralisés avec 1M NaOH pendant 45 min) selon la concentration et la M_w du chitosane.	85
Figure 2.16	(a) Réaction de ré-acétylation de chitosane avec de l'anhydride acétique; (b) Spectres FTIR de films de 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés (1M NaOH pendant 45 min) avant et après ré-acétylation.	88
Figure 2.17	Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG après ré-acétylation (mesures sans réplcation).	89
Figure 2.18	Taux de gonflement des films de chitosane 244LG à 4% (m/v) neutralisés (a) pour différents temps de neutralisation dans 1M NaOH et (b) avec différentes concentrations de NaOH pendant 1 nuit (mesures en triplicate).	90
Figure 2.19	Mesures AFM sur un film de chitosane neutralisé : Profil linéaire (a) de la hauteur extraite depuis la carte de la surface (b).	91
Figure 2.20	Spectres FTIR de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG avant et après neutralisation avec 1M NaOH/EtOH pendant 15h30.	92
Figure 2.21	(a) Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés avec des solutions basiques hydroalcooliques à 70% (v/v) d'éthanol pendant 15h30 (mesures en triplicate); (b) Solubilisation des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés avec 1M NaOH/EtOH pendant 15h30 (mesures en triplicate).	93
Figure 2.22	(a) Réaction de réticulation entre chitosane et glutaraldéhyde; (b) Taux de gonflement de films de chitosane réticulé avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane (mesures sans réplcation); (c) Photos des solutions de chitosane et glutaraldéhyde avec des ratios molaires de 1 : 20, 1 : 50 et 1 : 100 (de haut en bas) après 24h de séchage.	96
Figure 2.23	Spectres UV-visible normalisés pour 100 μm d'épaisseur de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG réticulé avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane.	97
Figure 2.24	(a) Réaction de réticulation entre chitosane et génipine; (b) Spectres FTIR de films de chitosane sans et avec réticulation avec génipine à un ratio molaire de 1 : 93, après neutralisation dans 1M NaOH pendant 45 min.	99

Figure 2.25 (a) Taux de gonflement des films réticulés pendant leur immersion dans l'eau déionisée; (b) Photos des échantillons après 30 min d'immersion l'eau déionisée; (c) Films réticulés avec de la génipine avec des ratios molaires (de gauche à droite) 1 : 370, 1 : 185 et 1 : 93.	100
Figure 3.1 Spectres d'absorption et d'émission fluorescente du fluorophore Alexa Fluor [®] 555 (a) [3] et de la fluorescéine (b) [4].	109
Figure 3.2 Schéma de pressage à chaud sur un film de chitosane.	110
Figure 3.3 Schéma du fonctionnement de micro-gravure de film de chitosane : (a) Vue de coupe avec le chemin prévisionnel de la micro-fraise avec plusieurs passes en profondeur; (b) Vue de dessus avec les chemins prévisionnels pour différents recouvrements.	111
Figure 3.4 (a) Impression sur un film de chitosane par pressage à chaud à 65°C et à 4,0 MPa (soit une force de pressage de 11,4 kN) pendant 30 min avec un moule en nickel; Images prises au microscope optique d'un détail du moule (b) et de l'empreinte correspondante sur le film (c).	114
Figure 3.5 (a) Photos des moules en laiton avec des motifs de 88 µm de haut; (b) Photo prise au microscope optique du canal de 521 ± 3 µm de large.	115
Figure 3.6 Photos prises au microscope optique de films de chitosane après pressage à chaud à T_{amb} (a) et à 65°C (b) et à 4,5 MPa pendant 1h avec le Moule 1.	117
Figure 3.7 Photos prises au microscope optique de films de chitosane après pressage à chaud à 65°C pendant 1h avec une pression de 4,5 MPa (a) ou 6,8 MPa (b) avec le Moule 3.	118
Figure 3.8 Photo prise au microscope optique (a) et profil en profondeur (b) d'un film de chitosane après pressage à chaud à 65°C et à 4,5 MPa pendant 1h du canal de 521 µm de large (Moule 2).	119
Figure 3.9 Photos prises au microscope optique de canaux gravés avec une fraise de 500 µm de diamètre sur des films de chitosane avec un recouvrement de 475 µm (a) et de 100 µm (b).	122
Figure 3.10 (a) Profil de la profondeur d'un canal mesurée au proflidomètre; (b) Photo prise au microscope optique d'un canal micro-gravé sur un film de chitosane; (c) Photo prise au microscope optique du fond d'un canal de 1000 µm de large gravé avec une fraise de 200 µm.	123
Figure 3.11 (a) Protocole de collage de films de chitosane; (b) Photos prises au microscope optique d'un film de chitosane gravé (i), après dépôt de la résine sèche (ii) et après collage sur une lame de verre (iii); Photos de systèmes microfluidiques collés sur une lame de verre (c) et sur un autre film de chitosane (d) avec canaux de 350 µm de largeur et 150 µm de hauteur sous injection à 1 mL.h ⁻¹	126
Figure 3.12 Dimensions de canaux (profondeurs et largeurs) répartis selon la présence ou l'absence de résine au fond du canal après lamination de la résine Ordyl SY 310 à 50°C.	127
Figure 3.13 Système microfluidique avec des solutions aqueuses rouge et bleue injectée à 1 mL.h ⁻¹ dans des canaux de 500 µm de largeur et 150 µm de hauteur dans une puce entièrement en chitosane.	128
Figure 3.14 Photo de systèmes chitosane/verre après la rupture du collage du connectique pendant l'injection d'eau déionisée à 400 mL.h ⁻¹ dans un canal de 300 µm de large et 200 µm de haut (a); Photos prises par un microscope optique de ce canal montrant le maintien du collage chitosane/verre (b) et l'intégrité du canal (c); Photo de collages de connectiques avec différentes quantités de colle (d).	129
Figure 3.15 Photos prises au microscope optique de canaux de 500 µm de large et 150 µm de haut dans des systèmes microfluidiques chitosane/verre (a, b) et chitosane (c, d) respectivement à t=0h et à t=24h de l'injection d'eau déionisée à 100 µL.h ⁻¹	130
Figure 3.16 Photos prises au microscope optique du Canal 1 (a-b) et du Canal 2 (c-d) : (a, c) après 5 min en lumière blanche; (b, d) après 60 min d'injection de la solution fluorescente à 1 mL.h ⁻¹ en lumière blanche seule (b.i, d.i) et avec superposition des signaux fluorescents (b.ii, d.ii.); (e) Schéma de la section d'un canal après gonflement.	132

Figure 3.17 Mesures sur le Canal 1 (a,b) et sur le Canal 2 (c-d) : (a, c) Largeurs du canal au cours du temps, de la zone occupée par la fluorescéine et la BSA marquée; (b, d) Diffusion à travers le film de chitosane de fluorescéine en fonction du temps avec les résultats d'une régression linéaire pondérée par les écarts-types.	133
Figure 4.1 Protocole de préparation des films de chitosane pour la culture cellulaire.	140
Figure 4.2 Protocole de culture des cellules ML-2 dans une boîte de Petri de diamètre 60 mm. 141	
Figure 4.3 Protocole de culture de cellules MDA-MB-231 dans une boîte de Petri de 60 mm de diamètre.	142
Figure 4.4 (a) Photo du système microfluidique; (b) Photo prise par microscope optique du système microfluidique avec 2 chambres de culture (200 μm de profondeur et 3 mm de diamètre) reliées par des canaux (100 μm de profondeur et 500 μm de large).	143
Figure 4.5 Photo de l'installation expérimentale.	144
Figure 4.6 Spectres FTIR des films de chitosane avant et après stérilisation : (a) Stérilisation par Ethanol (EtOH) et par autoclave; (b) Stérilisation par irradiation aux UV.	147
Figure 4.7 Images prises au microscope (x20) à J4 de cellules MDA-MB-231 cultivées sur : (a) sur une boîte de Petri témoin, (b) sur un film de chitosane et (c) sur un film de chitosane micro-gravé.	151
Figure 4.8 Vidéos prises au microscope (x10) entre J2 et J3 de cellules MDA-MB-231 cultivées sur : (a) sur une boîte de Petri témoin (lien), (b) sur un film de chitosane (lien) et (c) sur un film de chitosane micro-gravé (lien). A télécharger pour un meilleur visionnage.	152
Figure 4.9 Photo prise au microscope optique (20x) en lumière blanche et fluorescence (CellMask TM rouge profond en magenta sur les images) à J2,5.	155
Figure 4.10 Photos prises au microscope optique (20x) de la seconde chambre de culture en lumière blanche et fluorescence (CellMask TM rouge profond en magenta sur les images) avec les histogrammes de la répartition des pixels de la chambre selon leur intensité : (a-b) après sédimentation des cellules MDA-MB-231 (J0); (c-d) à J1; (e-f) à J2; (g-h) à J2,5.	156
Figure 4.11 Photo du système microfluidique sous l'objectif du microscope maintenu sur une lame de verre par des adhésifs double face à J2,5.	157
Figure A.1 Protocole de purification du chitosane.	II

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Comparaison des matériaux standards pour la production de LoC (N/D pour données non disponibles).	18
Tableau 1.2	Comparaison des biomatériaux utilisés pour la fabrication de LoC (N/D pour données non disponibles ou non applicables).	31
Tableau 1.3	Comparaison de méthodes de fabrication communément utilisés pour micro-structurer les films de chitosane (N/D pour données non disponibles).	44
Tableau 2.1	Caractéristiques des lots de chitosane utilisés (N/D pour données non disponibles).	69
Tableau 2.2	Concentrations de chitosane et d'acide acétique utilisées pour fabriquer des films de chitosane.	70
Tableau 2.3	Concentrations et volumes de glycérol utilisés pour une solution de 20 mL de chitosane à 4% (m/v).	71
Tableau 2.4	Ratios molaires et volumes de glutaraldéhyde utilisés dans cette étude pour une solution de 20 mL de chitosane.	73
Tableau 2.5	Ratios molaires et volumes de génipine utilisés dans cette étude pour une solution de 5 mL de chitosane.	74
Tableau 2.6	Caractéristiques des solutions analysées par viscosimétrie cône-plan.	75
Tableau 2.7	Viscosité de solutions de 6% (m/v) de chitosane selon le ratio molaire d'acide acétique et de groupes amine du chitosane et de leur durée de conservation.	80
Tableau 2.8	Épaisseurs de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG (double couche) avec différentes concentrations massiques de glycérol par rapport à la masse de chitosane.	80
Tableau 2.9	Transparences, épaisseurs et transparences normalisées de films de chitosane (double couche, neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min) en fonction de la concentration en chitosane et leur M_w	86
Tableau 2.10	Caractéristiques des films de chitosane selon la stratégie adaptée (N/D pour données non mesurées).	94
Tableau 2.11	Transparences, épaisseurs de films et transparences normalisées pour 100 μm d'épaisseur de chitosane réticulés avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane.	97
Tableau 2.12	Caractéristiques des films de chitosane selon la stratégie adaptée (N/D pour données non mesurées).	101
Tableau 3.1	Dimensions des moules en laiton pour le pressage à chaud.	116
Tableau 3.2	Dimensions des canaux obtenus sur des films de chitosane par pressage à 65°C ou T_{amb} pendant 1h avec une pression de 4,5 MPa en utilisant le Moule 1.	117
Tableau 3.3	Dimensions des canaux obtenus sur des films de chitosane après pressage à chaud à 65°C pendant 1h avec une pression de 4,5 MPa ou 6,8 MPa en utilisant le Moule 3.	118

Tableau 3.4	Caractérisation du pressage à chaud : Mesures de la largeur par microscopie optique et mesures de la hauteur par profilomètre, toutes deux moyennées sur la longueur des canaux. Pour chacune des 5 tailles, le moule et 3 canaux pressés à chaud à 65°C et 4,5 MPa pendant 1 h ont été examinés. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque ensemble de canaux pressés à chaud. Si aucune valeur n'est donnée, la valeur p est négligeable.	120
Tableau 3.5	Caractérisation de la micro-gravure : Mesures de largeur (a) par microscopie optique en moyenne sur la longueur du canal (5 mesures par canal) et mesures de profondeur (b) par profilomètre au point d'étalonnage. Pour chaque essai, les canaux sont réalisés en trois exemplaires. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque série de canaux gravés. Si aucune valeur n'est donnée, la valeur p est négligeable.	124
Tableau 3.6	Dimensions des canaux microfluidiques avant et après 1h d'injection d'une solution aqueuse à 1 mL.h ⁻¹ , mesurées par microscope optique en lumière blanche.	131
Tableau 4.1	Evolution de la masses des film de chitosane avant et après stérilisation en fonction de la technique de stérilisation.	146
Tableau 4.2	Concentration des cellules ML-2 après 4 jours de culture dans des boîtes témoin (sans film de chitosane) et des boîtes contenant des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH ou 1M NaOH/EtOH ((1) et (2) représentant des boîtes différentes).	150
Tableau 4.3	Concentration des cellules MDA-MB-231 après 4 jours de culture dans des puits (Ø 22 mm) témoin (sans film de chitosane), contenant des films de chitosane ou des films de chitosane micro-gravés. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque catégorie.	153
Tableau B.1	Absorbance de la solution diluée à 10% de BSA fonctionnalisée avec Alexa Fluo [®] 555.	III
Tableau C.2	Résolution et dimensions des scans 3D.	IV
Tableau C.3	Caractéristiques des lumières utilisées pour les scans 3D.	IV
Tableau C.4	Résolution et dimensions des vidéos (N/D pour données non disponibles ou non applicables).	V
Tableau C.5	Caractéristiques des lumières utilisées pour les vidéos.	V
Tableau D.6	Résolution et dimensions des vidéos (N/D pour données non disponibles ou non applicables).	VI
Tableau D.7	Caractéristiques des lumières utilisées pour les vidéos.	VI
Tableau D.8	Résolution et dimensions des photos.	VII
Tableau D.9	Caractéristiques des lumières utilisées pour les photos.	VII
Tableau E.10	Résolution et dimensions des scans 3D.	VIII
Tableau E.11	Caractéristiques des lumières utilisées pour les scans 3D.	VIII

Listes des abréviations

AFM	Microscope à Force Atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
ATR	Réflectance Totale Atténuée (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
CMR	Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique
COC	Copolymère d'oléfine cyclique
DA	Degré d'acétylation
DMS	Diméthylchlorosilane
EG	Ethylène glycol
FTIR	(Spectres / Spectroscopie) Infrarouge à Transformée de Fourier
GLY	Glycérol
Gt	Milliard(s) de tonnes
LoC	Laboratoire sur puce (Lab-on-a-chip)
M_w	Masse molaire en masse
Mt	Million(s) de tonnes
N/D	Données non disponibles
NaA	Alginate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaTPP	Tripolyphosphate de sodium
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
PBS	Solution tampon phosphate
PC	Polycarbonate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Poly(éthylène glycol)
PG	Propylène glycol
PGA	Alginate de propylène glycol
PLA	Acide polylactique
PLL	Poly-L-lysine
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PS	Polystyrène
P-S	Pénicilline-streptomycine
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SVF	Sérum bovin foetal
T_{amb}	Température ambiante
T_G	Température de transition vitreuse
UV	Ultra-violet
WLS	Moindres Carrés Pondérés (<i>Weighted Least Squares</i>)



Introduction générale

Les laboratoires sur puce ou *Lab-on-a-chip* (LoC), ou systèmes microfluidiques, permettent l'analyse et le traitement de fluides à une échelle microscopique grâce à des réseaux complexes de micro-canaux et de chambres de réaction. En intégrant plusieurs fonctions de laboratoire sur une seule puce, ces dispositifs réduisent considérablement la consommation de réactifs et le temps d'analyse, tout en étant portable et permettant un diagnostic délocalisé. Les applications des laboratoires sur puce sont vastes, allant de la détection précoce des maladies à celle de contaminants dans la nourriture ou l'environnement. C'est pourquoi le marché des LoC est en expansion depuis ces dernières années, notamment dans le domaine des applications médicales.

Le développement académique des LoC repose principalement sur l'utilisation du polydiméthylsiloxane (PDMS), tandis que les systèmes commerciaux sont majoritairement fabriqués à partir de thermoplastiques comme le copolymère d'oléfine cyclique (COC) et le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). En raison des risques infectieux, dans le cas des applications biomédicales, les déchets sont souvent incinérés pour garantir l'élimination de contaminants biologiques, mais selon les ressources disponibles, peuvent aussi être déposés dans des décharges publiques. Comme le marché des LoC est grandissant, ils représentent une source de déchets plastiques contribuant à la pollution de l'air et des eaux, ainsi qu'à la consommation de ressources non-renouvelables liées à leur origine pétrochimique.

Pour répondre à des ambitions durables et éco-responsables, des études ont été effectuées pour développer des protocoles de fabrication de LoC à partir de polymères bio-sourcés et biodégradables. Ainsi plusieurs méthodes, intégrant par exemple, l'acide polylactique (PLA) obtenu par la fermentation de maïs, la soie produite à partir de cocons ou les alginate dérivés des algues brunes, ont été publiées. Cependant, ces approches ne satisfont pas actuellement toutes les spécifications requises pour la fabrication durable de LoC et ne couvrent pas la totalité des applications des systèmes microfluidiques. Pour élargir la gamme des applications, l'étude d'autres matériaux est une solution.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse qui se concentre sur le développement d'une méthode de fabrication de systèmes microfluidiques à partir de chitosane. Il s'agit d'un polysaccharide issu de la valorisation des déchets de l'industrie agro-alimentaire marine tels que les carapaces des crustacés. Le chitosane est un biopolymère naturel déjà très utilisé dans l'industrie (de la cosmétique, de la pharmacologie et de l'agroalimentaire par exemple). Il présente de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes : il est filmogène, non-toxique, biodégradable et biocompatible. Ce sont ces mêmes propriétés qui font du chitosane un candidat prometteur pour la fabrication de LoC.

Le chitosane n'ayant jamais été utilisé pour la fabrication de LoC, il reste donc plusieurs défis à surmonter pour produire un système microfluidique fonctionnel. Comme les

applications actuelles du chitosane requièrent des épaisseurs fines de films de chitosane, il faut pouvoir adapter les méthodes de fabrication des films de chitosane pour obtenir une épaisseur suffisante pour intégrer des canaux microfluidiques tout en conservant la transparence des films pour pouvoir observer les canaux au microscope. Le comportement des films de chitosane au contact de solutions aqueuses doit être étudié pour garantir des canaux étanches et stables durant l'utilisation des LoC. De plus, un protocole de micro-structuration adapté doit aussi être mis en place pour former ces canaux, ainsi qu'une technique de collage pour sceller les canaux permettant ainsi l'injection de solutions aqueuses. Ce travail vise à développer, à partir de chitosane, un système microfluidique bio-sourcé, biodégradable et biocompatible permettant la culture cellulaires.

Le manuscrit de thèse se divise en 4 chapitres :

- Le CHAPITRE 1 présente un état de l'art des matériaux et méthodes mises en œuvre pour la fabrication de LoC. Les matériaux standards comme le PDMS et les thermoplastiques y sont discutés. De plus, les systèmes microfluidiques fabriqués à partir de matériaux bio-sourcés sont examinés dans l'optique d'un procédé éco-responsable pour des dispositifs dédiés à des applications médicales. Enfin, le chitosane est décrit en fonction de ses différentes propriétés et de sa potentielle utilisation pour produire des LoC.
- Dans le CHAPITRE 2, les procédés de fabrication des films de chitosane et les méthodes de caractérisation mises en œuvre sont présentés. Plusieurs stratégies sont évaluées pour obtenir des films épais, transparents ainsi que présentant un gonflement limité au contact de l'eau.
- Le CHAPITRE 3 décrit l'élaboration de systèmes microfluidiques à partir des films de chitosane sélectionnés précédemment. Ce chapitre inclut une comparaison de deux méthodes de micro-structuration, le pressage à chaud et la micro-gravure, ainsi que la méthode de collage permettant d'obtenir des canaux étanches.
- Enfin, le CHAPITRE 4 s'intéresse au développement d'une application de LoC pour la culture cellulaire. Ce chapitre comporte une étude sur la stérilisation des films de chitosane et leur compatibilité avec la culture de cellules adhérentes ou en suspension. Les premiers essais de culture de cellules en système microfluidique en chitosane sont présentés.

Une conclusion générale ainsi que les perspectives de la thèse viennent clore le manuscrit.

Matériaux et méthodes de fabrication des laboratoires sur puce

Au début des années 1990, il a été suggéré pour la première fois que les méthodes conventionnelles de la chimie analytique et bioanalytique pouvaient être miniaturisées, afin de réduire à la fois le volume d'échantillons et la quantité de réactifs nécessaires à l'analyse [1]. Le dispositif qui intègre une ou plusieurs fonctions de laboratoire sur quelques centimètres carrés est défini comme un LoC. Ce micro-dispositif permet de manipuler avec précision des fluides et des micro-objets (cellules, microbilles...) en associant des fonctions passives basées sur des forces hydrodynamiques et des fonctions actives basées sur l'application d'un champ externe (électrique, magnétique, optique, acoustique). Cette approche permet de manipuler les échantillons à l'échelle de la cellule et contrôler leur environnement tout en limitant l'intervention d'opérateurs. Dû aux faibles volumes nécessaires de réactifs et d'échantillons et à la potentielle automatisation des mesures, il est possible de réduire les coûts pour effectuer une analyse. Ainsi, les LoC offrent des propriétés séduisantes pour des applications variées, particulièrement dans le développement de médicaments [2], les analyses agro-alimentaires et environnementales [3, 4], les techniques de bioanalyse [5] ou les études à l'échelle de la cellule unique [6].

Pour éliminer le risque de contamination des échantillons, en particulier dans les applications biomédicales, la plupart des LoC sont dédiés à un usage unique [7], ce qui pose le problème de la gestion des déchets générés. À l'heure actuelle, 71% des LoC commercialisés sont réalisés à partir de polymères non-biodégradables dérivés d'hydrocarbures [8] : des élastomères comme le polydiméthylsiloxane (PDMS) [9] ou des thermoplastiques [10] tels que le COC et le PMMA. Pour répondre aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé dans la gestion de déchets présentant des risques infectieux [11], les déchets plastiques générés par le secteur biomédical sont généralement détruits par incinération, ce qui émet des gaz à effet de serre et des produits chimiques toxiques qui doivent être filtrés [12]. En l'absence d'une gestion appropriée de ces déchets, comme dans de nombreux pays en développement, leur élimination incomplète a des conséquences déplorables pour l'environnement et la santé humaine. Il est donc nécessaire de développer une chaîne de fabrication durable pour les microsystèmes fluidiques en introduisant des matériaux bio-sourcés et biodégradables qui répondent à la fois aux préoccupations environnementales et possèdent les propriétés fondamentales requises pour la fabrication de LoC. Idéalement, ces matériaux devraient être micro-structurables, non solubles dans les solutions aqueuses pour permettre le transport de ces solutions, transparents pour permettre une observation microscopique et biocompatibles pour la manipulation de cellules.

Ces dernières années, quelques études concernant des biopolymères, tels que la cellulose et ses dérivées, le PLA, la zéine, la soie et l'alginate, ont fait état de leur utilisation pour la production de LoC. Leurs méthodes de fabrication et mise en forme ont été développées pour conserver les propriétés des biomatériaux comme la biocompatibilité ou la transparence. Cependant, en l'état actuel, aucun de ces biopolymères ne répond à toutes les spécifications requises pour la fabrication durable de LoC pour une application médicale. De plus, cette thématique de recherche reste confidentielle et peu de travaux ont été publiés. Pour obtenir des LoC éco-responsables, il faudrait soit améliorer les procédés de micro-fabrication des biopolymères déjà étudiés, soit envisager d'autres biopolymères.

Parmi les candidats potentiels, le chitosane est un polysaccharide très abondant [13] issu de la valorisation des déchets de l'industrie agroalimentaire. Il possède de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes : il est filmogène, non toxique, biodégradable, biocompatible et antimicrobien.

Ce chapitre présente tout d'abord l'impact actuel de la gestion des déchets plastiques issus du domaine biomédical dont font partie les LoC. Dans un deuxième temps, les méthodes standards de fabrication de LoC à partir de PDMS et de certains thermoplastiques sont décrites, ainsi qu'une évaluation de leur impact environnemental. Par la suite, les biopolymères qui sont utilisés comme matériaux de fabrication des LoC sont présentés et évalués à la lumière des critères nécessaires pour obtenir un LoC fonctionnel et éco-responsable. Dans la dernière section, les propriétés du chitosane sont examinées et discutées pour la fabrication de systèmes microfluidiques.

I. Contexte de la production et gestion des déchets plastiques médicaux

La production de plastique et la gestion des déchets associés est un problème d'importance mondiale. Les 9,2 milliards de tonnes (Gt) de plastiques produits entre 1950 et 2017 ont conduit à 7 Gt de déchets [14]. D'après un rapport de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) de 2022 [15], la production mondiale de plastique a doublé en 20 ans pour atteindre 460 millions de tonnes (Mt) en 2019 pour 353 Mt de déchets plastiques la même année. 15% de ces déchets sont collectés pour le recyclage, même si seulement 9% réussiront à être recyclés. Le reste des déchets est incinéré (19%), enfoui dans des décharges (50%) ou sorti du système de gestion de déchets (22%) pour être abandonné dans des décharges sauvages. Il en résulte une pollution de l'environnement et des eaux, soit directement, soit par infiltration des sols et sources souterraines. Il a été estimé que 30 Mt de ces déchets se sont accumulés dans les mers et océans, et 109 Mt dans les cours d'eau.

Tandis que la pandémie mondiale de Covid-19 a fait baisser la consommation de plastiques mondiale de 2,2% [15], elle a exacerbé la quantité de déchets plastiques produits en milieu hospitalier jusqu'à quadrupler la quantité usuelle [12] (FIG 1.1-a). Les déchets plastiques générés par le monde médical sont généralement contaminés par des échantillons biologiques de patients, même s'ils représentent différents niveaux de risque infectieux. Pour cette raison, leur gestion diffère des déchets plastiques ménagers et industriels. La méthode la plus fréquemment appliquée pour éliminer les contaminants biologiques est l'incinération. L'incinération des plastiques contribue aux émissions de polluants comme des gaz à effet de serre et des dioxines, très persistantes et très toxiques [16]. Il est donc nécessaire de l'effectuer dans des incinérateurs permettant de filtrer ces gaz. Cependant, dans les pays en développement, ces conditions sont rarement disponibles. Ainsi, près de 90% des déchets médicaux finissent dans des décharges à ciel ouvert ou sont incinérées sans filtration ou respect des températures recommandées [16]. En plus des problèmes écologiques, la mauvaise gestion de ces plastiques est à l'origine de la propagation de maladies infectieuses causant 0,4 à 1 million de morts par an [16].

En réponse à la demande croissante de tests rapides, individualisés et portables, les LoC offrent des possibilités pour effectuer des analyses, en particulier dans des zones à ressources limitées. Le marché du diagnostic médical miniaturisé devrait représenter 75,5 milliards de dollars d'ici 2027 [17], avec déjà plus d'un milliard de tests utilisés par an pour le diagnostic du COVID-19 [18], environ 412 millions pour le paludisme [19], et 3 millions pour la tuberculose [20]. Cependant, les LoC contribuent aux déchets plastiques produits par les centres hospitaliers. Il est donc primordial de considérer leurs impacts sur l'environnement.

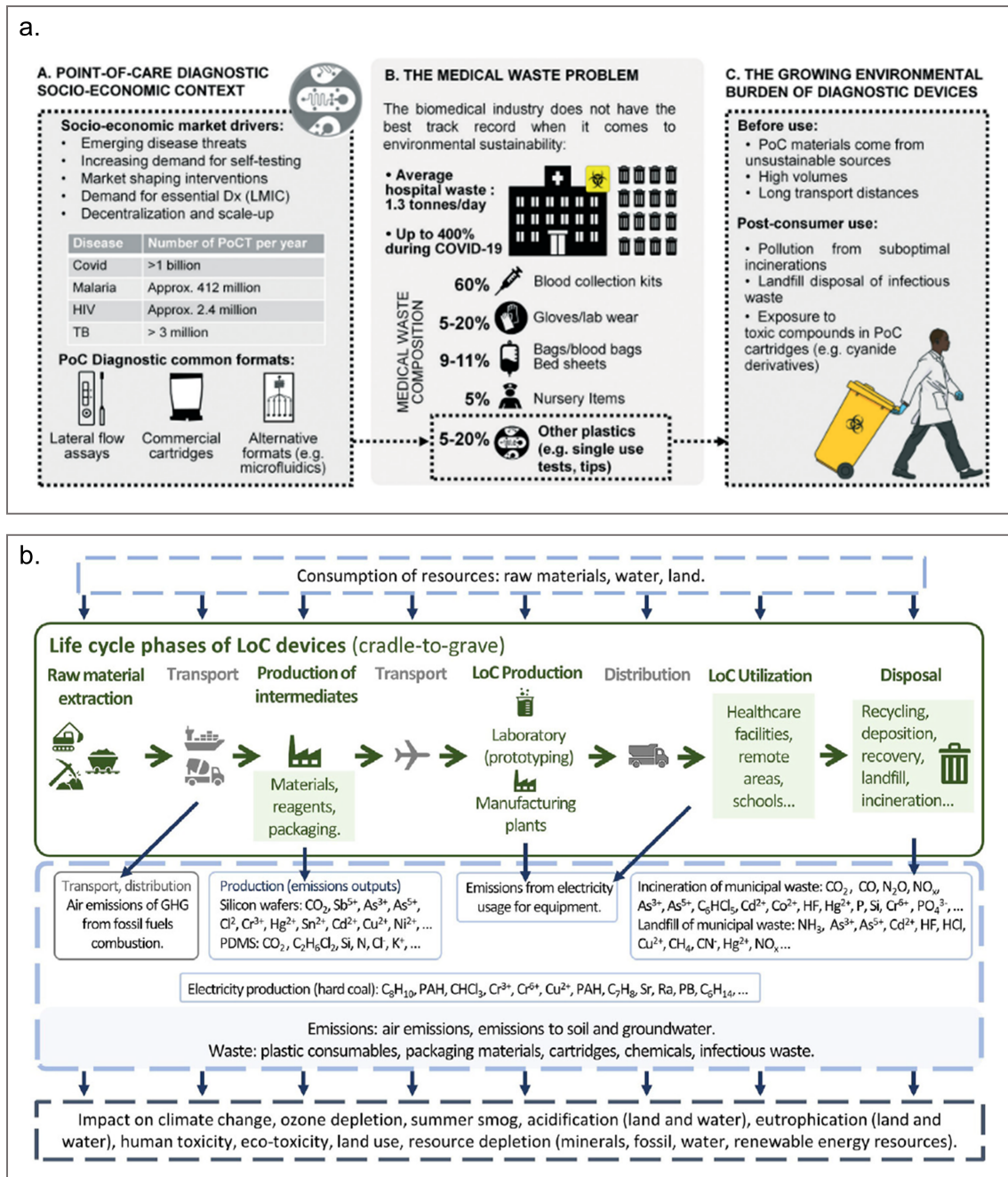


FIGURE 1.1 – (a) Aperçu des défis en matière de dispositifs de diagnostic à usage unique [12]; (b) Schéma du cycle de vie d'un LoC [21].

En se basant sur une analyse du cycle de vie (FIG 1.1-b), il est possible d'identifier les étapes clés et de les intégrer à la réflexion lors du développement de ces dispositifs. L'analyse du cycle de vie répertorie et quantifie les flux de matières et d'énergie associés à l'activité humaine, tout au long de l'existence d'un produit, depuis l'extraction des matières premières nécessaires à sa fabrication jusqu'à son élimination finale, en passant par sa production, sa distribution et son utilisation. Une analyse détaillée évalue les impacts environnementaux de chaque étape du cycle de vie en utilisant des indicateurs comme les émissions de gaz à effet de serre et de particules fines, la consommation d'eau et de ressources non renouvelables ainsi que l'écotoxicité aquatique et la toxicité pour

l'Homme. Ces informations permettent de prendre des décisions éclairées afin de réduire l'empreinte environnementale globale d'un produit.

Dans le cas des LoC [21], un avantage notable est la réduction de la quantité de matériaux nécessaires à leur fabrication et leur emballage grâce à la miniaturisation des systèmes analytiques. Cette réduction s'applique aussi à l'énergie et aux réactifs, souvent toxiques et polluants, utilisés pour effectuer des analyses. Néanmoins, en plus d'optimiser la méthode de fabrication des LoC, il faut considérer l'impact du matériau choisi en fonction de son mode de production et d'extraction, les transports nécessaires et la pollution résultant de sa dégradation.

Dans les sections suivantes, nous nous efforcerons de replacer les matériaux utilisés pour la fabrication de LoC dans le contexte de leur impact environnemental. Toutefois, il convient de noter que ces analyses ne prétendent pas être exhaustives. Elles viseront à fournir une vue d'ensemble, pour chaque matériau discuté, de leurs sources potentielles, de leurs processus de fabrication, de leur gestion après élimination et des implications environnementales générales associées à leur utilisation dans la production de LoC. Cette approche permettra de comparer les matériaux à la fois selon les propriétés qu'ils apportent aux LoCs et selon leurs impacts environnementaux. Ainsi il sera plus aisé d'identifier si des alternatives plus durables pourraient être envisagées.

II. Matériaux et méthodes de fabrication standards des LoC

Le développement de la microélectronique dans les années 1960 [22] a permis l'apparition des premiers LoC à partir de matériaux tels que le verre [23], le quartz ou le silicium [24]. Malgré la maturité des techniques de micro-fabrication pour ces matériaux, la nécessité d'utiliser un environnement propre (salle blanche) a limité leurs applications dans la recherche et l'industrie. Avec la découverte des avantages du PDMS pour la micro-fabrication [25], la microfluidique et donc la fabrication des LoC se sont démocratisées. Par la suite, des matériaux à bas coûts comme les thermoplastiques, et dont les méthodes de moulage étaient déjà répandues dans l'industrie, ont été utilisés pour fabriquer des LoC [26]. Aujourd'hui, nous observons un schisme entre les matériaux dominants le monde de la recherche et celui de l'industrie. Le développement académique des LoC repose principalement sur le PDMS représentant 55% des systèmes publiés [12], tandis qu'après une étude de 2013, les systèmes commerciaux sont à 59% à base de thermoplastiques contre 6% d'élastomères comprenant le PDMS [8]. Il est à noter que les autres systèmes commercialisés sont réalisés à 12% de verre et 12% de papier. Le verre n'est pas discuté dans cette section car les dispositifs sont coûteux et dédiés à des applications spécifiques nécessitant par exemple une haute pression ou température. Les dispositifs en papier seront présentés dans §III.A (Chap. 1).

II.A. PDMS et lithographie douce

Le PDMS (FIG 1.2-a) est capable de répliquer des motifs de quelques nm et peut être collé de manière irréversible à du PDMS, du verre ou du silicium. Il est par ailleurs transparent jusqu'à 300 nm, biocompatible et perméable au dioxygène et au dioxyde de carbone [7, 9]. Ces propriétés font que le PDMS est le matériau à partir duquel la majorité des LoC sont fabriqués en laboratoire.

La fabrication de LoC à partir de PDMS repose sur la lithographie douce dont le processus est illustré sur la FIG 1.2-a [27]. Un moule est préparé avec le négatif de la structure finale voulue. Une base liquide de l'élastomère mélangée à l'agent de réticulation est versée sur le moule, puis la solution est dégazée pour enlever les bulles d'air issues du mélange et permettre au PDMS de remplir toutes les cavités. La réaction de réticulation entre les groupes hydride de silicium de l'agent de réticulation et les groupes vinyle de la base se produit dans un four à 70°C en 2h, ou à plus basse température pour une durée plus longue. En formant un réseau 3D avec les chaînes du polymère, le PDMS réticulé reproduit la géométrie du moule. La faible énergie de surface du PDMS lui permet de démouler des motifs de résolution inférieure à 10 nm [28].

Comme illustré sur la FIG 1.2-b, un traitement au plasma oxygène de quelques minutes permet une modification à la surface des groupes méthyle du PDMS en groupes hydroxyle. Au contact d'une surface présentant des groupes similaires, des liaisons covalentes de type Si-O-Si se forment [29]. Ainsi un collage irréversible peut être obtenu entre un bloc de

PDMS et un substrat en PDMS, silicium ou verre [30]. La FIG 1.2-c présente un exemple de collage irréversible réussi sur une lame de verre.

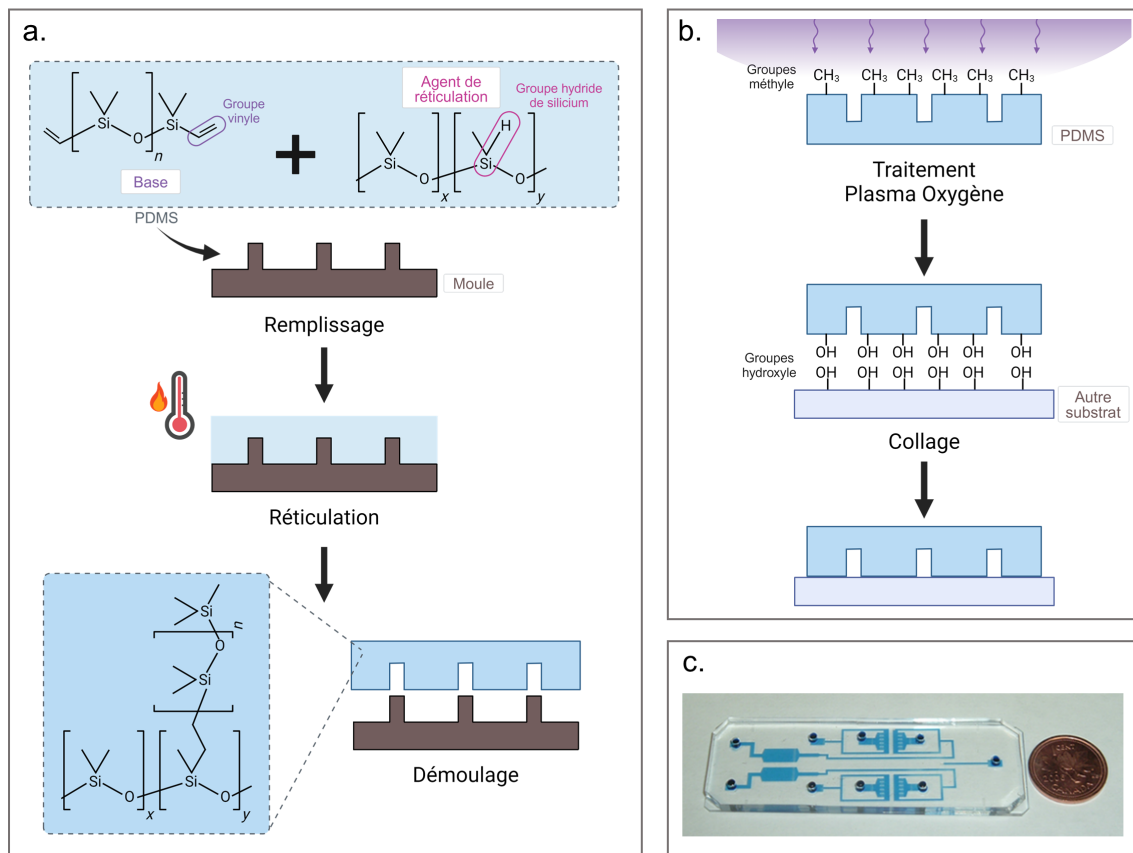


FIGURE 1.2 – (a) Lithographie douce de PDMS; (b) Collage de PDMS avec un autre substrat; (c) Photo d'un système microfluidique en PDMS sur une lame de verre pour l'analyse de cellules [31].

D'un côté, la lithographie douce, associée à la micro-structuration du PDMS, offre un protocole de fabrication simple, efficace et à bas coût pour de faibles volumes ce qui explique sa prévalence dans les laboratoires de recherche. Concernant les applications biomédicales, la biocompatibilité et la perméabilité du PDMS permettent les échanges gazeux et la respiration cellulaire.

De l'autre côté, le PDMS présente certains désavantages [32]. Il a été reporté que des chaînes de PDMS non réticulées sont relarguées, ce qui peut interférer avec les membranes cellulaires et le comportement normal des cellules [32, 33]. De plus, la grande perméabilité du PDMS induit également l'absorption de petites molécules hydrophobes [32]. Dans le cas d'études de chimio-sensibilité, la concentration réelle des molécules testées peut varier et invalider les études.

De plus, la lithographie douce et le PDMS se prêtent difficilement à de larges volumes de production, notamment à cause de la difficulté de mouler et démouler du PDMS sur de grandes surfaces, de l'encrassement lié à sa manipulation à l'état liquide et du coût relativement élevé du PDMS par rapport à d'autres polymères (entre 30 et 60 €/kg) [34].

Par conséquent, les LoC en PDMS sortent peu du domaine de la recherche universitaire, sauf si ses propriétés mécaniques ou sa perméabilité sont exploitées dans l'application.

II.B. Thermoplastiques

Puisque le PDMS se retrouve limité en termes de potentiel d'industrialisation, des thermoplastiques tels que le PMMA, le polycarbonate (PC) et le COC (FIG 1.3-a) ont été utilisés pour la micro-fabrication. Le polystyrène (PS) a été aussi proposé pour la fabrication de LoC par les biologistes, car il s'agit d'un matériau couramment utilisé pour la culture cellulaire en laboratoire, comme les boîtes de Petri ou les flasques de culture [32].

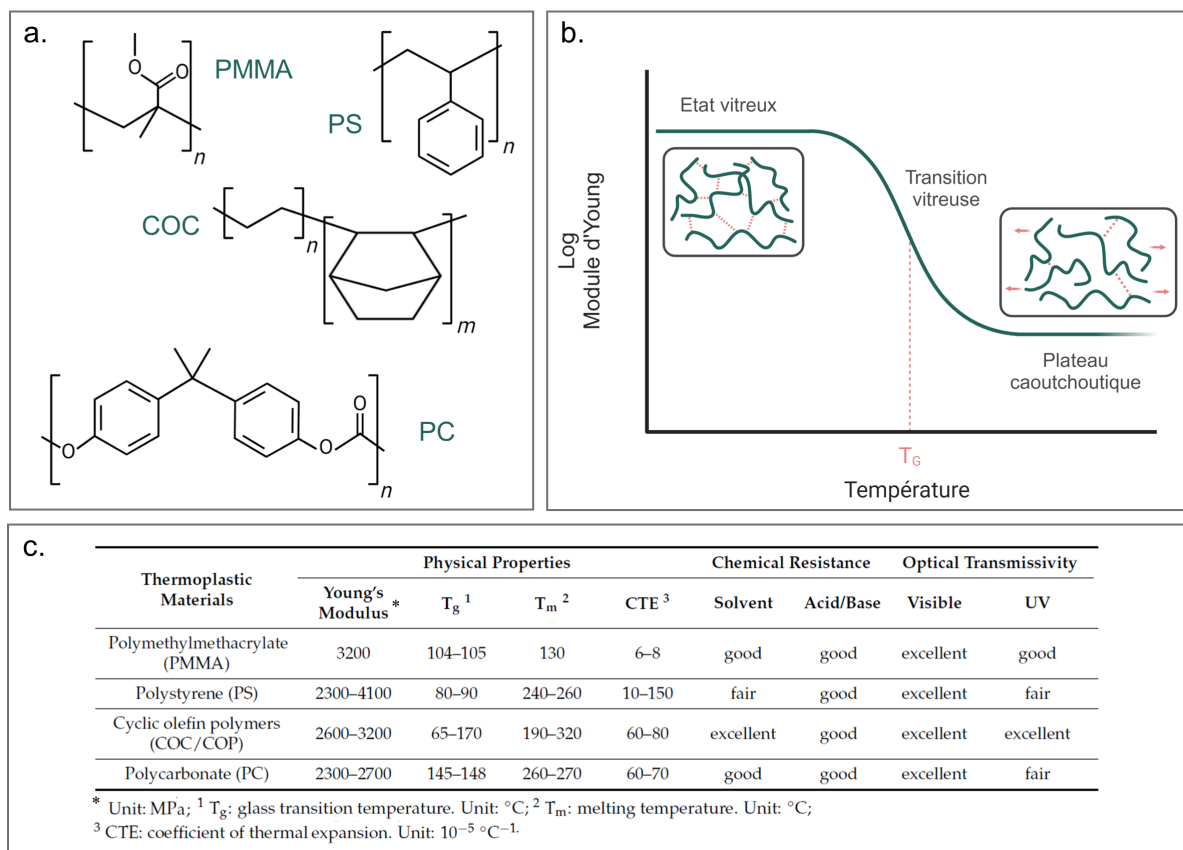


FIGURE 1.3 – (a) Thermoplastiques utilisés pour la fabrication de LoC : Polyméthacrylate de méthyle (PMMA), Polystyrène (PS), Copolymère d'oléfine cyclique (COC) et Polycarbonate (PC) ; (b) Schéma de la transition vitreuse des thermoplastiques ; (c) Propriétés optiques, physiques et chimiques des thermoplastiques couramment utilisés [35].

Ces polymères ont attiré l'attention grâce à leur résistance vis à vis de différents solvants tels que l'eau et leurs propriétés optiques favorables avec une transparence supérieure à 90% dans le visible [10] (FIG 1.3-c). Ils sont micro-structurables par plusieurs méthodes de moulage, dont certaines déjà utilisées dans l'industrie. Avec des prix moyens entre 5 et 15 €/kg et diminuant avec la quantité achetée, les thermoplastiques permettent des avantages économiques pour des grands volumes de production. Cependant, même si

ces thermoplastiques sont bioinertes en tant que substrat, leurs produits de dégradation peuvent être toxiques [36].

Les thermoplastiques sont une classe de polymères qui peuvent se ramollir à une température supérieure à leur température de transition vitreuse (T_G), puis se solidifier de façon réversible après refroidissement. En effet, comme sur la FIG 1.3-b, au-delà d'une certaine température, les interactions de faibles énergies entre les chaînes de polymères deviennent fragiles sous l'action de l'agitation thermique, ce qui permet aux chaînes de se déplacer plus librement. A l'échelle macroscopique, cela se traduit par un ramollissement du matériau. En dessous de T_G , les interactions intermoléculaires se reforment et le polymère se comporte comme un verre amorphe rigide. Cette propriété est exploitée pour mouler les thermoplastiques [7]. Les thermoplastiques peuvent être transformés en LoC par diverses méthodes de fabrication, décrites ci-dessous [37].

II.B.1. Méthodes de micro-fabrication

II.B.1.a. Pressage à chaud

Le pressage à chaud ou *hot-embossing* [38] repose sur un processus simple avec peu de paramètres à sélectionner. Tout d'abord, le substrat polymère est chauffé légèrement au-dessus de T_G , ramollissant le matériau. Ensuite, le moule est pressé dans le substrat polymère avec une force d'environ 500 N.cm^{-2} [7]. Enfin, le système est refroidi en dessous de T_G , pour durcir le substrat avant le démoulage. Le processus est illustré sur la FIG 1.4-a.

Cette méthode permet un transfert rapide du motif (entre 4 et 15 minutes pour des thermoplastiques sur un wafer de 4 pouces). La précision de la méthode atteint les dizaines de nanomètres, avec l'utilisation de la nano-impression [39] Elle nécessite cependant un contrôle précis de la température et de la pression appliquées.

II.B.1.b. Moulage par injection

Le moulage par injection [40] est un procédé très répandu dans l'industrie, mais rarement utilisé en laboratoire, à cause du coût des équipements requis. Le schéma d'un processus de moulage par injection est présenté à la FIG 1.4-b. Les granulés de polymère pré-séchés sont chauffés jusqu'à ce qu'ils deviennent liquides (à $200\text{-}350^\circ\text{C}$) pendant qu'ils sont acheminés vers l'orifice d'injection. Le polymère est ensuite injecté à haute pression (600-1000 bar) dans un moule contenant le motif souhaité. Le système est ensuite refroidi en dessous de la T_G , le moule est ouvert et le thermoplastique est éjecté. Le processus dure entre 30 secondes et 5 minutes.

Cette méthode permet de fabriquer des objets en 3D en intégrant des ports de connexion. De plus, grâce à l'implémentation étendue dans l'industrie du moulage par injection, il est possible d'automatiser la production de grands volumes. La résolution de la reproduction des motifs est limitée par le remplissage incomplet des cavités du moule et la présence de bulles. La même résolution que le pressage à chaud peut être obtenue si le polymère injecté est comprimé par un piston pour assurer un remplissage complet [7]. Cependant, cela augmente également la complexité de la machine d'injection et du processus de fabrication.

Malgré son efficacité, cette méthode de fabrication est très exigeante en termes d'équipement, qu'il s'agisse du prix ou des conditions extrêmes de température et de pression. Ce coût peut être amorti pour un volume de production élevé mais n'est pas envisageable pour le prototypage.

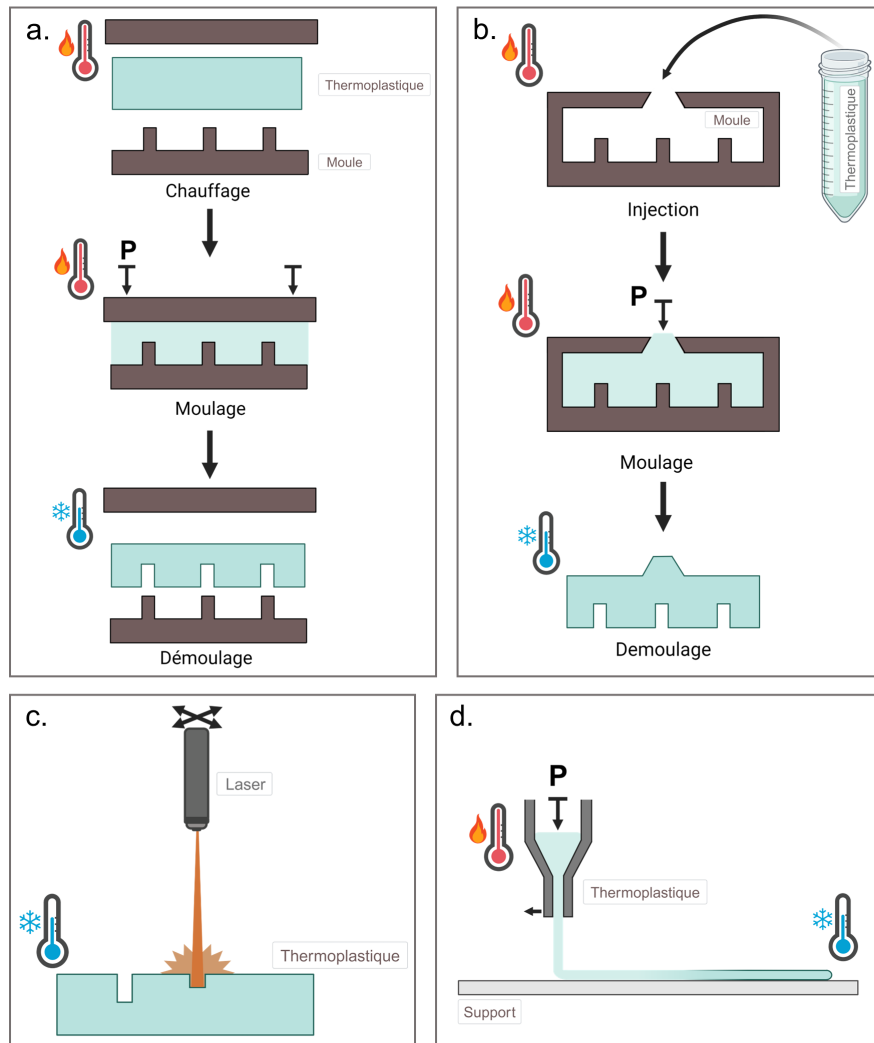


FIGURE 1.4 – Schémas des méthodes de mise en forme des thermoplastiques : (a) Pressage à chaud ; (b) Moulage par injection ; (c) Ablation par laser ; (d) Impression 3D.

II.B.1.c. Ablation par laser

Une méthode de prototypage rapide des structures microfluidiques est l'ablation laser [41, 42]. Un faisceau laser de haute intensité est focalisé sur le polymère et, en raison de l'énergie concentrée, le matériau au point focal est décomposé (FIG 1.4-c). La profondeur d'ablation dépend du matériau, de la longueur d'onde du laser et de son intensité. Le motif souhaité peut être obtenu soit en exposant le substrat à l'aide d'un masque, soit en déplaçant le laser sur la surface. Le plus petit motif obtenu est de l'ordre du micromètre [41, 42].

Cette méthode a un impact sur l'état de la surface car elle augmente la rugosité de la

surface et modifie la chimie et la charge de surface [43] par rapport au matériau brut. Ces effets sont difficiles à contrôler et posent un problème pour les applications sensibles à l'état de surface.

II.B.1.d. Impression 3D

L'impression 3D est une technologie émergente pour la fabrication de systèmes microfluidiques. Elle permet une production à bas coût avec un prototypage rapide. L'impression 3D de thermoplastiques se fait par une technique appelée le dépôt de fil fondu [44] où une buse dépose et superpose des filaments fondus à une température supérieure à T_G qui durcissent en refroidissant (FIG 1.4-d). Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir des systèmes à géométrie complexe et de combiner plusieurs matériaux compatibles avec l'impression 3D comme des métaux pour les détecteurs ou divers polymères. Ainsi, il est possible de fabriquer des systèmes microfluidiques complets en peu d'étapes, notamment en évitant l'étape de collage.

La résolution minimale obtenue dépend du diamètre de la buse [45]. Un système en polyuréthane a été réalisé par cette technique avec des canaux d'une largeur de 40 μm [46]. Les plus petits canaux en PMMA présentent une largeur de 300 μm [47]. D'autres techniques, n'impliquant pas les thermoplastiques, ont été développées comme la stéréolithographie où un laser polymérise une résine liquide pour former un objet 3D. Ainsi des résolutions de l'ordre du micromètre à 100 nm peuvent être obtenues [44].

L'impression 3D offre des avantages indéniables pour la production de LoC, mais elle pose aussi des contraintes sur les objets produits. Notamment, les objets imprimés sont anisotropes avec des propriétés mécaniques faibles et des problèmes au niveau du collage entre chaque couche. De plus, les surfaces sont irrégulières.

C'est pourquoi l'impression 3D est principalement utilisée pour le prototypage et la production rapide de moules pour la lithographie douce.

II.B.2. Collage des thermoplastiques

L'étape de collage de deux substrats pour sceller le microsystème reste un défi [35, 7]. De nombreuses méthodes ont été développées et sont séparées en deux catégories : les méthodes directes ou indirectes, selon qu'elles impliquent un matériau supplémentaire ou pas. Selon les exigences des applications, il est nécessaire de considérer la force d'adhésion pour éviter des fuites selon le débit appliqué, la transparence optique pour des applications nécessitant une observation microscopique et le rendement de fabrication notamment dans le cas de systèmes commerciaux. Un résumé des performances des différentes méthodes de collage est reporté sur la FIG 1.5.

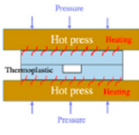
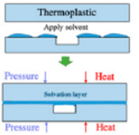
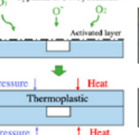
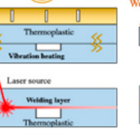
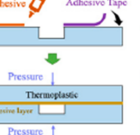
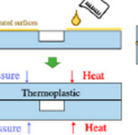
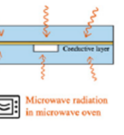
Thermoplastic bonding for microfluidics	Direct bonding Bonding without additional material				Indirect bonding Bonding involves using additional material		
	Thermal bonding	Solvent bonding	Physical surface modification	Ultrasonic welding Laser welding	Adhesive bonding (Wet) (Dry)	Chemical surface modification	Microwave bonding
Category							
Process							
Facilities	Hydraulic hot press, bonder, hot plate, or custom-made heater	Beakers, sprayer; hot plate, hot press bonder, ...	O ₂ plasma, UV/O ₃ chamber, or UV light; hot press bonder	Ultrasonic horn; Laser source	Dry adhesive tape, or wet adhesives; Bonding machine	Wet bench; hot press bonder	Microwave oven; conductive layer coater
Key process parameters	Bonding temperature, pressure and time	Solvent time; Bonding temperature, pressure and time	Treatment time; Bonding temperature, pressure and time	Ultrasonic frequency; laser intensity	Adhesive selection, bonding temperature, pressure and time	Chemical selection, bonding temperature, pressure and time	Conductive layer selection, microwave power and time
Bond Strength	Low ~ Moderate	Moderate ~ High	Moderate	Low ~ Moderate	Low ~ Moderate	Moderate ~ High	Low ~ Moderate
Optical transmissivity	Will not affect	Will not affect	May degrade depending on treatment conditions	Will not affect (ultrasonic) Opaque or degrades depending on interface layer (laser)	May degrade depending on tape selection	May degrade depending on chemical selection	May degrade depending on conductive layer
Fabrication Throughput	Low	Moderate	Moderate ~ High	Moderate ~ High	High	Moderate ~ High	High

FIGURE 1.5 – Résumé des méthodes de collage directes et indirectes pour les LoC en thermoplastiques [35].

Les méthodes directes regroupent les techniques sans matériaux additionnels. L'utilisation d'un solvant permettant de dissoudre la surface de 2 substrats conduit à leur collage sous faible pression lors de l'évaporation du solvant à température ambiante (T_{amb}). Une autre solution est de chauffer les surfaces au-dessus de leur T_G , ce qui permet aux chaînes polymères de part et d'autre de s'interpénétrer. Cependant, ces 2 méthodes sont susceptibles de provoquer des déformations des micro-structures. Il est également possible de modifier la chimie de surface par traitement plasma ou insolation par UV. Les groupes fonctionnels polaires ainsi créés permettent la formation de liaisons covalentes ou hydrogène lors du collage ce qui réduit la température et pression nécessaires pour le collage.

Un collage indirect est aussi réalisable en utilisant des adhésifs entre les deux substrats. Le problème d'obstruer les microcanaux demeure mais est moins important pour les adhésifs secs que ceux liquides. Cette méthode offre la possibilité de pouvoir coller ensemble des matériaux différents.

II.C. Impacts sur l'environnement

Produits à partir d'hydrocarbures, le PDMS et les thermoplastiques mentionnés dans §II.B (Chap. 1), sont non-biodégradables et contribuent à la quantité croissante de déchets plastiques [48]. La tendance générale en faveur des dispositifs de diagnostic personnalisé et portables augmente également la pression sur la production des matières premières et sur les systèmes de gestion des déchets. Pour relever ce défi sociétal, lors de la mise au point d'un dispositif, il est important de tenir compte non seulement des propriétés des matériaux et de la méthode de fabrication, mais aussi de la manière dont les matériaux sont produits et éliminés.

II.C.1. Production des polymères

Tous les polymères présentés dans les sections précédentes sont obtenus à partir de la polymérisation d'un ou plusieurs monomères issus de la pétrochimie.

Par exemple, le PDMS est obtenu par polycondensation du diméthylchlorosilane (DMS) en présence d'eau, avec production d'acide chlorhydrique (FIG 1.6) [49]. Le DMS, un liquide volatil, inflammable et irritant, est quant à lui obtenu à partir de chlorométhane, un fluide frigorigène inflammable et CMR (cancérogène, mutagène et reprotoxique), par le procédé de Müller-Rochow. Une fois fabriqué, le PDMS se sédimente en milieu aqueux à cause de sa faible solubilité et s'accumule dans les sols et boues [50]. La toxicité du PDMS reste débattue car malgré l'absence de toxicité aigüe, le polymère peut diffuser dans l'organisme et s'accumuler dans les organes, augmentant les risques sur le long terme, comme le développement de cancers [51].

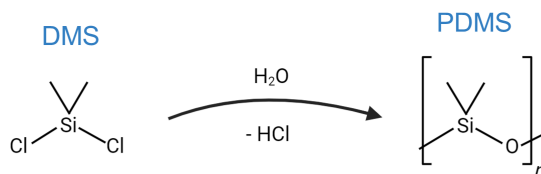


FIGURE 1.6 – Polymérisation du PDMS à partir du DMS.

Concernant les thermoplastiques étudiés, les précurseurs du PMMA, PC, PS et COC sont respectivement le méthyl méthacrylate (inflammable, toxique et irritant), le bisphénol A (corrosif, CMR et écotoxique), le styrène (inflammable, irritant et CMR) et l'association du norbornène avec l'éthène (irritant et inflammable). De plus, la production de ces monomères nécessite des conditions de pression, température ou des catalyseurs extrêmes [52, 53, 54, 55]. Contrairement à leurs précurseurs, les thermoplastiques ne présentent pas de toxicité directe pour la santé humaine et leur impact sur l'environnement est principalement dû à des temps de dégradation de plusieurs siècles.

II.C.2. Eliminations des déchets

L'incinération est la principale méthode de traitement des déchets médicaux. Ce processus libère des quantités importantes de CO₂ et CO mais également des sous-produits de combustion cancérigènes et toxiques tels que les polychlorobiphényles de types furanes et dioxines [12]. Ces molécules sont le résultat de réactions entre des molécules chlorées et les sous-produits de la combustion des thermoplastiques et du PDMS comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques [56]. Les incinérateurs des pays développés sont équipés généralement de filtres permettant de piéger ces polluants. Dans le cas des pays en voie de développement, les installations sont souvent dépourvues de ces filtres exposant la population aux polluants. De plus, certains incinérateurs ne permettent pas d'atteindre les températures nécessaires à la destruction de ces plastiques. Une grande partie des déchets médicaux est aussi déversée dans des décharges publiques entraînant une forte pollution de l'environnement due à la durée

très longue nécessaire à la dégradation des plastiques (plusieurs centaines d'années) [12]. Dans ces pays, 90% des déchets médicaux ne sont pas gérés correctement [56].

Pour résoudre ce problème, une option serait le recyclage des matériaux, en particulier pour les thermoplastiques. Pour des déchets médicaux, cette méthode nécessiterait une stérilisation des déchets auparavant. En ce qui concerne la production de LoC, la recherche est principalement axée sur le recyclage du PMMA via un processus mécanique [57] ou chimique [58]. Le recyclage mécanique consiste à fondre, remouler et mélanger le matériau obtenu avec les matériaux vierges. Ce processus est limité à quelques cycles de recyclage car l'accumulation de débris physiques détériore les propriétés optiques et mécaniques. Au bout de 4 cycles de recyclages, le PMMA a perdu 50% de transparence [57] et 14% de sa dureté [59]. Une autre méthode est le recyclage chimique où les chaînes de polymères sont décomposées en monomères. Ces monomères sont ensuite polymérisés à nouveau pour obtenir un polymère ayant les mêmes propriétés optiques, thermiques et mécaniques que le polymère vierge. De manière générale, 30 à 50% des déchets plastiques ne peuvent pas être recyclés. Cela inclut les déchets provenant des LoC. Le prix plus élevé des matériaux recyclés, l'absence de systèmes logistiques, indispensables pour collecter ces polymères spécifiques auprès des utilisateurs après usage, est actuellement un frein pour leur recyclage. Par ailleurs, le recyclage ne supprime pas la dépendance à l'égard des matières premières non renouvelables, ni les polluants générés par l'incinération. Le recyclage n'est donc à l'heure actuelle pas une solution mature et serait insuffisant à lui seul. De plus, le recyclage de déchets médicaux demanderait une évolution des pratiques et de la réglementation concernant la gestion de ce type de déchets, et les risques de contaminations associés.

II.D. Résumé et perspectives

Le PDMS et les thermoplastiques, ainsi que leurs méthodes de fabrication, sont bien étudiés et se sont établis comme des standards pour la production de LoC, dans le monde universitaire ou industriel. Leur transparence, étanchéité et capacité à être micro-structuré ont permis le développement de nombreuses applications en laboratoire [60, 61, 62, 63, 64, 65]. Un résumé des matériaux standards et de leurs méthodes de mise en forme est donné dans le TAB 1.1.

TABLEAU 1.1 – Comparaison des matériaux standards pour la production de LoC (N/D pour données non disponibles).

	PDMS	Thermoplastiques			
Méthodes de fabrication	Lithographie douce	Pressage à chaud	Moulage par injection	Ablation par laser	Impression 3D
Temps de fabrication	3-4 heures	15 min	5 min	N/D	30 min
Résolution (taille des canaux)	<dizaine de nm	Dizaine de nm	>dizaine de nm	1 μm	40 μm
Méthodes de collage	Traitement plasma oxygène	Traitement thermique Dissolution partielle Adhésifs			
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> · Micro-fabrication facile et peu chère · Perméable aux gaz 	<ul style="list-style-type: none"> · Matériaux peu chers · Possibilité de recycler mécaniquement et chimiquement · Micro-fabrication compatible avec la production de masse 			
Désavantages	<ul style="list-style-type: none"> · Absorption de petites molécules · Incompatible avec la production de masse · Source non durable de matières premières · Fumées toxiques lors de l'incinération 	<ul style="list-style-type: none"> · Source non durable de matières premières · Fumées toxiques lors de l'incinération · Difficulté de collage 			

L'émergence des LoC a un impact sur l'environnement. Leur production et utilisation contribuent à la fois à l'épuisement de nos ressources naturelles (origine pétro-chimique), à la pollution de nos écosystèmes (méthodes de production et d'élimination) et à la mise en danger de la santé de la population (gestion des déchets). Afin de limiter l'impact environnemental et sanitaire des LoC, une solution consiste à remplacer les polymères pétro-sourcés par des polymères bio-sourcés, qui soient également biocompatibles et biodégradables.

III. Matériaux bio-sourcés pour la microfluidique

Ces dernières années, les biopolymères sont apparus comme des candidats prometteurs pour la fabrication de LoC. En plus d'être biodégradables et intrinsèquement biocompatibles, les biopolymères peuvent être mis en forme sans solvant organique et dans des conditions de température et de pression proches des conditions ambiantes. Les premiers LoC fabriqués à partir de biopolymères ont été rapportés dans la littérature principalement à partir des années 2010. Dans cette section, nous présenterons une liste non-exhaustive mais variée des biopolymères utilisés, comme le papier, le PLA, la soie, la zéine, l'alginate, la gomme-laque et le bois. Afin de proposer une fabrication éco-responsable des LoC, les biopolymères doivent pouvoir former des films ou hydrogels d'une épaisseur supérieure à 200 μm dans lequel il est possible de micro-structurer des canaux étanches et scellable par collage. Pour des applications dans le domaine biomédical, les LoC doivent être biocompatibles et transparents afin de permettre une observation au microscope.

Nous avons comparé les matériaux en fonction de l'impact environnemental de la fabrication des LoC et des propriétés des LoC obtenus. Les méthodes de micro-structuration seront également discutées en termes de résolution et de complexité des designs. Ces matériaux seront aussi jugés sur leur biocompatibilité et leur transparence.

III.A. Papier

Les tests sur papier sont commercialisés depuis des dizaines d'années sous la forme de papier pH, tests de grosseur ou plus récemment avec les tests antigéniques de détection du Covid-19. Ils représentent 12% des dispositifs microfluidiques commercialisés d'après une étude de 2013 [8]. Le papier est fabriqué à partir de fibres végétales, donc principalement de la cellulose (FIG 1.7-a) ou un composite de cellulose. Contrairement aux papiers communément utilisés qui contiennent des additifs maintenus secrets, la microfluidique sur papier utilise du papier de chromatographie ou des filtres papiers dont la composition exacte est connue avec un prix d'environ 1-3 €/kg [66].

Le papier étant hydrophile, les fluides sont transportés passivement par force capillaire et ne nécessitent pas d'équipement d'injection extérieur tels que des pompes ou des pousse-seringues. Afin de contrôler spatialement et diriger le flux des solutions, les zones hydrophiles sont séparées par des barrières hydrophobes (FIG 1.7-b). La méthode la plus courante est l'impression de cire suivi d'un traitement thermique pour assurer la diffusion de la cire à travers l'épaisseur du papier [67]. D'autres méthodes comme la photolithographie, la découpe laser ou la gravure par jet d'encre sont également possibles [66]. Les canaux mesurent de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres de large [68].

Les différents marqueurs ou réactifs peuvent être déposés grâce à une imprimante conventionnelle permettant un contrôle de la résolution spatiale et de la quantité déposée. Cependant une modification chimique de la cellulose est souvent nécessaire pour immobiliser des protéines ou acides nucléiques permettant la capture des analytes [69].

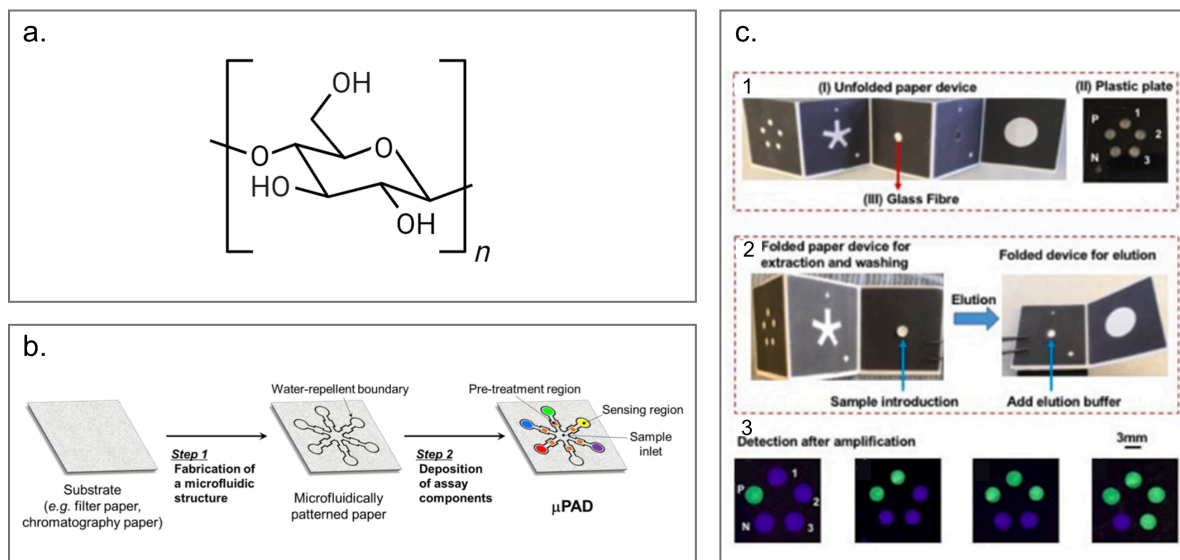


FIGURE 1.7 – (a) Molécule de cellulose; (b) Schéma du procédé de fabrication de microfluidique en papier [66]; (c) Photos d'un système papier multiplexé pour la détection de 3 cibles (1, 2 et 3) avec un contrôle positif (P) et négatif (N) dont le résultat est donné par colorimétrie visuelle [70].

Les méthodes de détection utilisées en microfluidique sur papier sont principalement basées sur la colorimétrie (FIG 1.7-c), la chimiluminescence [71] ou l'électrochimie en intégrant des électrodes métalliques ou en carbone [72], et permettant d'obtenir des réponses qualitatives ou semi-quantitatives. Concernant les signaux colorés, l'interprétation des résultats peut être dépendante de l'observateur et des conditions ambiantes comme la lumière [73]. Pour améliorer la sensibilité, il est possible d'ajouter un détecteur externe comme une caméra.

Les coûts réduits et la facilité d'utilisation des systèmes par des opérateurs non-formés facilitent leur diffusion auprès du public. Les dispositifs microfluidiques en papier sont de plus en plus déployés pour des procédures de diagnostics complexes, combinant le traitement d'échantillons de sang total avec une visualisation facile des résultats. Bien que ces systèmes soient les plus avancés en termes d'industrialisation, ils ne peuvent pas couvrir toutes les applications notamment la manipulation et l'analyse de cellules en microsystème. De plus, l'effet des conditions environnementales sur ces systèmes ouverts, telles que la température et l'humidité ambiante, peut entraîner une variabilité impactant la reproductibilité des résultats [66].

La production de papier est fortement consommatrice d'eau, notamment pendant la production de la pâte à papier. En moyenne, il faut 500 m^3 d'eau pour produire une tonne de papier [74]. L'utilisation de produits de blanchiment à base de chlore contribue à la pollution de l'eau, de l'air et des sols. Le recyclage du papier permet de diminuer la

consommation de ces matières premières mais il y a une perte de 10% de papier à chaque cycle de recyclage. Le papier est biodégradable et inflammable, ce qui permet son élimination par incinération ou dans une décharge avec peu d'impacts environnementaux. Par contre, les dispositifs microfluidiques en papier sont souvent emboîtés dans du plastique, dont l'impact a été discuté en §II.C (Chap. 1).

III.B. Acide Polylactique (PLA)

Extrait de la fermentation par des bactéries des sucres provenant de maïs ou de canne à sucre, l'acide lactique est transformé en PLA de masse molaire élevée via la polymérisation par ouverture de cycle du lactide catalysée par l'octoate d'étain (voir FIG 1.8-a). Avec un prix moyen de 5-15 €/kg, le PLA est un polyester thermoplastique dont la température de transition vitreuse T_G se situe à 60-65°C.

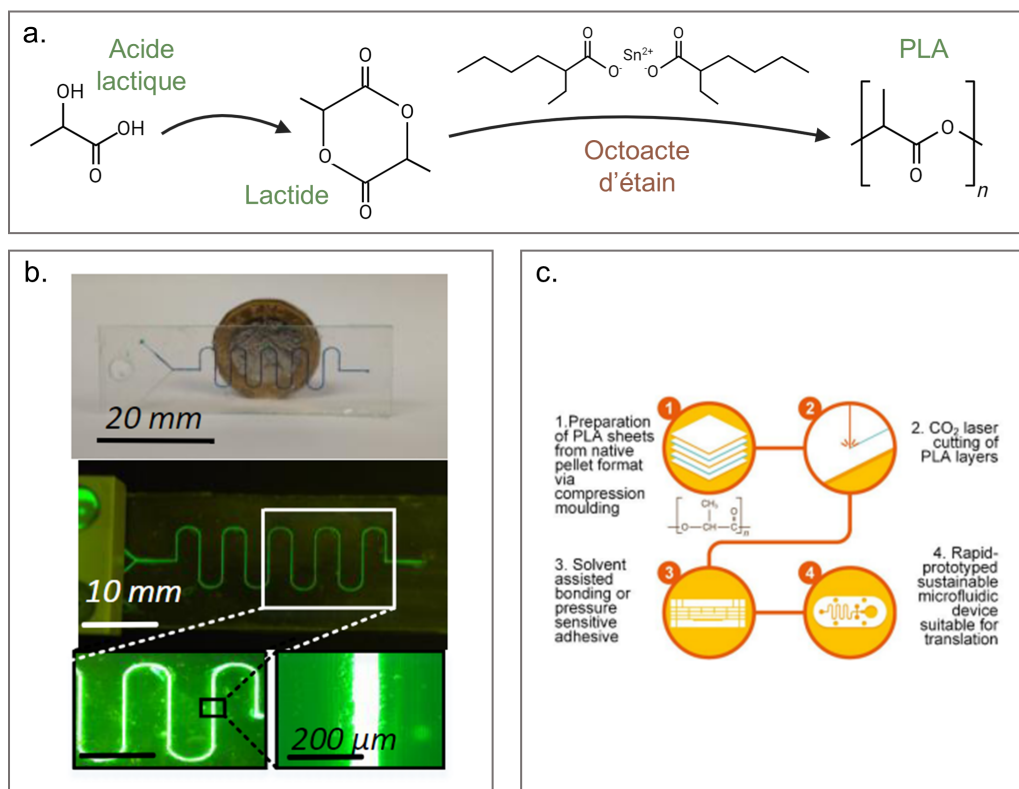


FIGURE 1.8 – (a) Schéma de synthèse du PLA ; (b) Photo d'un système microfluidique en PLA micro-structuré par ablation laser (adapté de [75]) ; (c) Schéma de prototypage rapide pour la production de systèmes en PLA [76].

Plusieurs études ont démontré la biocompatibilité du PLA avec la culture de cellules endothéliales [77] ainsi que de différentes lignées cellulaires (C3A de l'hépatoblastome humain, A549 de cancer du sein) [78]. Par ailleurs, Ongaro *et al.* ont montré que le PLA absorbe moins de petites molécules que le PDMS et que sa transparence est comparable à celles des matériaux standards avec une transmittance de 92% [78]. L'auto-fluorescence du PLA est un peu plus élevée mais ne gêne pas l'imagerie de fluorescence (FIG 1.8-b).

Le PLA est compatible avec de multiples méthodes de fabrication comme l'impression 3D [79], le moulage par injection, le pressage à chaud et l'ablation laser [76]. En ce qui concerne l'ablation laser, une couche sacrificielle est utilisée pour améliorer la qualité de la surface du substrat, comme illustré sur la FIG 1.8-c. De plus, l'intégration d'électrodes en graphène par impression a été démontrée par Ongaro *et al.* [76]. L'impression 3D a permis de réaliser une cavité de 100 μm , tandis que l'ablation laser a créé un canal de 1 mm de large. A notre connaissance, la résolution obtenue avec les autres méthodes n'est pas indiquée. La variété des méthodes de micro-structuration permet à la fois un prototypage rapide avec l'ablation laser ou l'impression 3D, ainsi que la production à l'échelle industrielle, comme le moulage par injection ou le pressage à chaud.

Différentes méthodes sont décrites dans la littérature pour sceller des LoC en PLA telles que le collage thermique [75], l'activation chimique sous exposition aux UV [78] et la fonctionnalisation par absorption laser CO_2 [75]. Un système fonctionnel collé avec cette dernière est montré en FIG 1.8-b.

Concernant l'impact environnemental du PLA, sa production implique des catalyseurs à base d'étain, catégorisés comme toxiques, CMR et écotoxiques. Il faut aussi prendre en compte le fait que la production de l'acide lactique rentre en compétition avec la production de nourriture. De plus, même si le PLA est un polymère bio-sourcé, après un an dans l'eau de mer et l'eau douce, à 25°C, il n'est pas dégradé [80]. Plusieurs siècles sont nécessaires à sa dégradation dans des conditions naturelles. Cependant, il est possible de composter le PLA en plusieurs mois dans des installations industrielles capables de dépasser 60°C avec une humidité contrôlée [81]. Le compostage du PLA émet du méthane [21], un puissant gaz à un effet de serre. Ainsi l'impact environnemental de PLA, bien qu'inférieur à celui des polymères pétro-sourcés, n'est pas négligeable.

III.C. Soie

La soie est produite à partir des cocons de bombyx mori qui sont d'abord bouillis pour retirer la séricine, protéine ou gomme recouvrant les fibres de soie. Les traitements de dégommeage peuvent faire intervenir des solutions acides, basiques, savonneuses ou enzymatiques [82]. La dissolution des cocons s'effectue dans une solution de bromure de lithium (LiBr). Une dialyse est alors nécessaire pour isoler la soie des ions inorganiques comme Li^+ et Br^- . Finalement, une étape de purification permet de retenir les polymères non dissous. Le prix de la soie de grade médicale est estimé entre 100 et 300 € le kg.

En mélangeant la solution aqueuse de soie avec la peroxydase de raifort et H_2O_2 , la soie est réticulée et forme un hydrogel [83]. En utilisant la lithographie douce, il est possible de micro-structurer des canaux dans l'hydrogel. En réticulant la soie autour d'un moule en gélatine qui sera fondu par la suite, Zhao *et al.* ont réalisé un système microfluidique comme illustré dans la FIG 1.9-a, avec une résolution de 100 μm [84]. Les motifs peuvent également être générés à l'intérieur de l'hydrogel avec une impulsion laser ultrarapide sans réticulant [85]. Cela permet de contourner l'étape de collage pour sceller les microsystèmes.

L'hydrogel de soie offre des propriétés mécaniques ajustables (module de conservation de 1 kPa à 1 MPa) en fonction de la concentration de l'enzyme de réticulation, la peroxydase de raifort [86]. L'hydrogel de soie présente une transparence optique de plus de 90 % entre 400 et 700 nm [86], une excellente biocompatibilité et une vitesse de dégradation prévisible selon le diamètre des fibres de soie (de quelques heures à plusieurs années) [87]. La biocompatibilité a été testée en cultivant des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine dans des microtubes poreux en soie obtenus à partir d'un mélange de solution de fibroïne de soie et de poly(oxyde d'éthylène) qui est ensuite dissous dans l'eau chaude pour créer des pores [88].

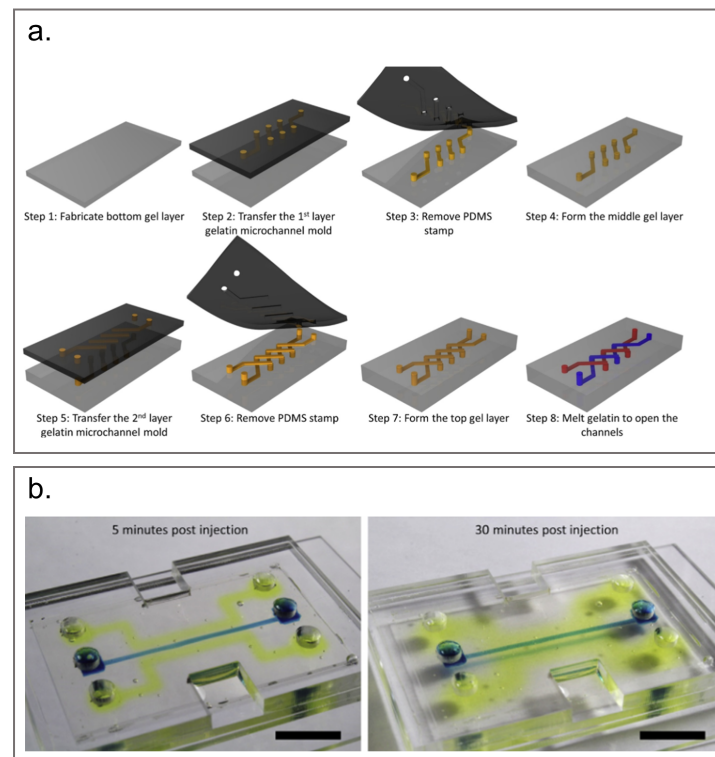


FIGURE 1.9 – (a) Schéma de fabrication d'un hydrogel de soie en 2 couches à partir de moulage sacrificielle en gélatine et de superposition de couches [86]; (b) Système microfluidique en hydrogel de soie avec 3 canaux 5 min après l'injection de para-nitrophényle (à gauche) et après 30 min (à droite) [86].

Dans l'étude de de Zhao *et al.* [86], des cellules ont été incorporées dans l'hydrogel de soie au cours du processus de fabrication. Les canaux microfluidiques permettent la perfusion de solutions contenant des molécules qui diffusent à travers l'hydrogel et qui sont nécessaires aux cellules. Ainsi, après 30 minutes de perfusion d'une solution contenant du phosphate de para-nitrophényle (en jaune) dans les canaux latéraux, il apparaît que la solution a largement diffusé dans l'hydrogel pour atteindre le canal contenant un précipité de phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolye et chlorure de tétrazolium (en bleu) (FIG 1.9-b) [86]. Ce phénomène de diffusion dans l'hydrogel est un problème important pour les applications où les fluides doivent rester confinés dans les canaux.

En dehors de la question éthique de la production de la soie, l'utilisation de réactifs comme LiBr (corrosif, effets psychoactifs) et H_2O_2 (comburant, toxique, corrosif) a un fort impact négatif sur l'environnement et la santé humaine. Par ailleurs, afin de limiter l'impact environnemental de la production de la soie, Lu *et al.* ont suggéré d'utiliser le recyclage de textiles en soie dont l'incinération produit 10 tonnes de CO_2 par tonne de textiles brûlés [89]. L'élimination de dispositifs en soie par incinération poserait le même problème pour l'environnement. Dans la nature, la soie est dégradée par des bactéries en quelques mois [90].

III.D. Zéine

Protéine prolamine présente dans le maïs, la zéine peut être extraite comme sous-produit de la production d'éthanol à partir du maïs et transformée en résine. Cette protéine [91] forme un thermoplastique hydrophobe dont la T_G se situe entre $139^\circ C$ et $165^\circ C$. Avec un prix d'environ 20-50 €/kg, la zéine est non-toxique, biocompatible et biodégradable. La biocompatibilité du film de zéine a été étudiée en cultivant des cellules hépatiques humaines et des cellules de fibroblastes de souris par Dong *et al.* [92]. La formulation en tant qu'agent de revêtement pour retarder la dégradation des aliments est l'une des applications les plus développées [93].

Insoluble dans l'eau, la zéine est dissoute dans l'éthanol, l'isopropanol ou l'acétone aqueux [94] avant d'être coulée dans un moule. Les motifs sont ainsi transférés par lithographie douce. Le collage à un autre film de zéine ou à une lame de verre, comme illustré à la FIG 1.10-a [95], pour sceller le microsysteme, repose sur la dissolution partielle de la surface au contact d'un solvant, comme illustrée en FIG 1.10-b et c. Les premiers résultats montrent une résolution du transfert de motifs jusqu'à $30 \mu m$ [96]. Un film de zéine peut également être produit par pressage à chaud à $140^\circ C$ [97], mais la température élevée peut induire une dénaturation des protéines. Ce procédé n'a pas encore été appliqué à la micro-structuration.

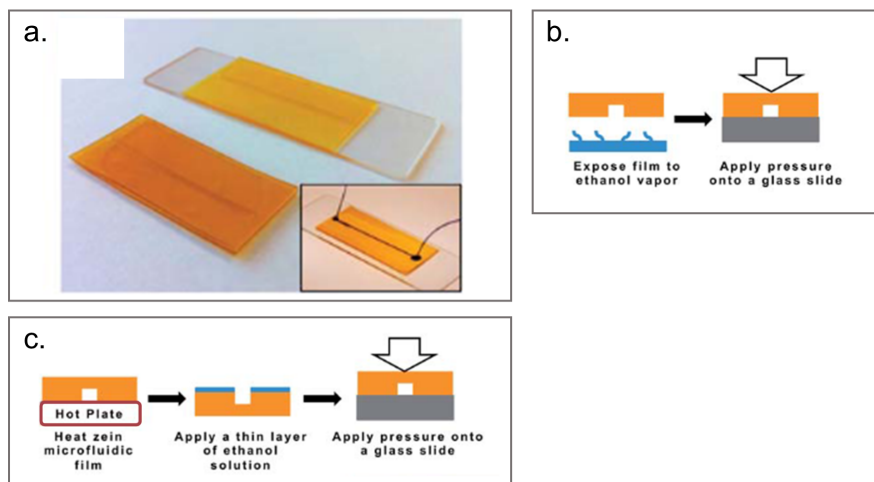


FIGURE 1.10 – (a) Photos de systèmes microfluidiques en zéine sur verre ou sur un autre film de zéine (adapté de [95]); (b) Collage de films de zéine par vapeur d'éthanol (adapté de [95]); (c) Collage par solvant (adapté de [95]).

Il est possible de sélectivement modifier l'hydrophilie sur la surface d'un film de zéine, en changeant les propriétés surfaciques des moules utilisés [98]. De plus, l'absorption d'eau de ces films est dépendante du type et de la concentration du plastifiant utilisé, comme le glycérol [99].

Le principal inconvénient de la zéine vient de son opacité au contact de l'eau. En effet, alors qu'un film sec de 100 μm d'épaisseur a une transmittance supérieure à 92% entre 450 et 800 nm, la transmittance de ce film hydraté est inférieure à 20%. Han *et al.* ont proposé un traitement de 20 min à 121°C, 100% d'humidité relative et 103,4 kPa, afin de conserver la transparence des films hydratés [100] et de réduire le gonflement des films. Ce traitement n'a pas encore été appliqué à la fabrication d'un LoC.

La dégradation de la zéine s'effectue en quelques mois, grâce aux micro-organismes présents dans les sols [101]. *In vivo*, la zéine se dégrade en 2 semaines [102].

III.E. Alginate

Extrait de diverses espèces d'algues dont les algues brunes, l'acide alginique est généralement obtenu après un prétraitement de la biomasse algale avec une solution acide, puis une extraction alcaline. La solution résultante est alors précipitée, blanchie et finalement séchée. L'alginate est un copolymère polysaccharidique linéaire de monomères d'acide β -D-mannuronique (M) et d'acide α -L-guluronique (G) représentés sur la FIG 1.11-a. L'alginate de qualité médicale est estimé à un prix de 50 à 100 €/kg. Un polysaccharide est une chaîne polymérique composée d'unités monosaccharidiques liées entre elles par des liaisons glycosidiques qui peuvent être clivées par voie enzymatique. Des méthodes enzymatiques d'extraction et de pré-traitement ont été proposées afin d'améliorer leur impact environnemental [103].

Les chaînes d'alginate, chargées négativement, produisent un hydrogel en formant des liaisons ioniques. Les cations les plus couramment utilisés sont Ca^{2+} , mais des ions métalliques plus volumineux comme Cu^{2+} ont été signalés comme produisant des hydrogels plus compacts, diminuant ainsi la diffusion de liquides ou gaz à travers l'hydrogel [104, 105]. En raison de la réticulation ionique, les propriétés mécaniques de ces hydrogels d'alginate sont stables dans le temps mais imprévisibles [106].

Pour fabriquer des canaux, Yajima *et al.* ont utilisé la lithographie douce (FIG 1.11-b) pour gélifier une solution de NaA et PGA avec une solution de CaCl_2 sur un moule en SU-8 [107]. Contrairement à NaA, le PGA est non gélifiant et généralement utilisé pour ajuster la rigidité physique des hydrogels. Les canaux microfluidiques obtenus avaient 200 μm de largeur pour 100 μm de profondeur [107]. L'hydrogel semble visuellement transparent (FIG 1.11-c) mais aucune valeur de transmittance n'a été donnée par Yajima *et al.* L'alginate peut également être structuré par l'impression 3D en immergeant les filaments de solution d'alginate dans l'agent de gélification [108].

Le microsystème peut être scellé en empilant une autre couche d'hydrogel avec des pinces pour renforcer un contact mécanique [109] ou en dissolvant partiellement leurs interfaces [110]. Finalement, recouvrir les hydrogels avec de la poly-L-lysine (PLL) permet de créer des liaisons électrostatiques entre eux (FIG 1.11-b et -c) [107]. Cette méthode de collage

évite les déformations potentielles des canaux présentes dans les deux autres méthodes et résiste à des injections à une pression d'environ 3 kPa.

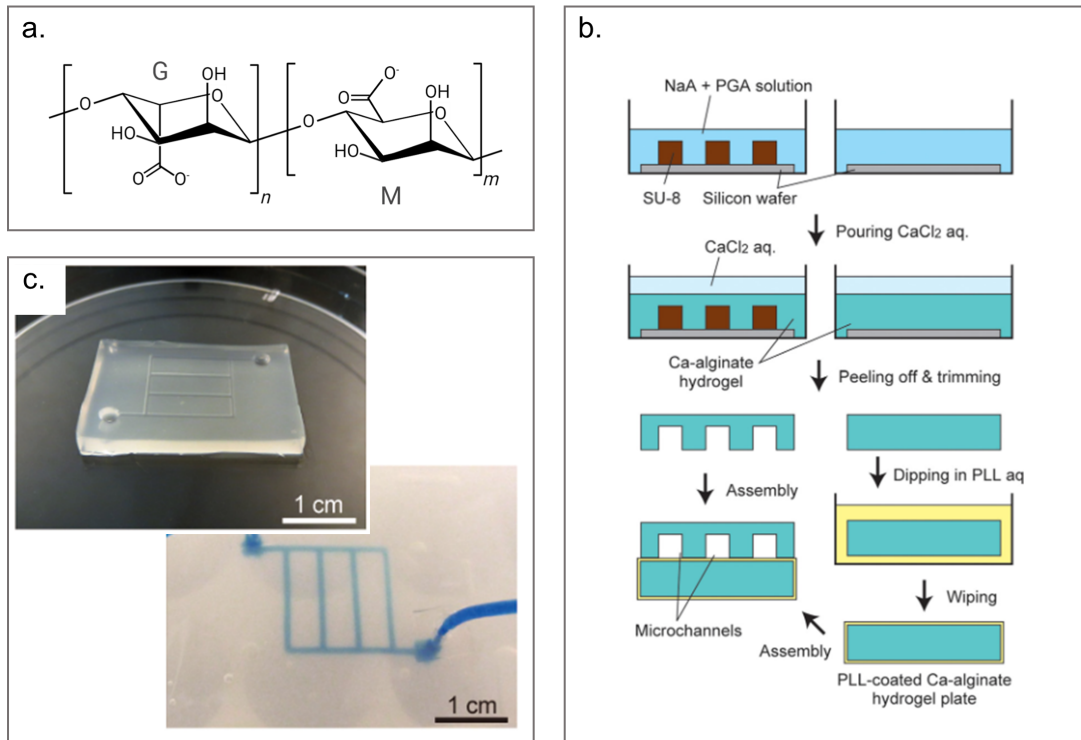


FIGURE 1.11 – (a) Structure chimique de l'alginate composé des unités de répétition G et M ; (b) Schéma de la fabrication de canaux dans un hydrogel d'alginate de calcium à partir d'une solution d'alginate de sodium (NaA) et d'alginate de propylène glycol (PGA), puis scellement du microsystème avec poly-L-lysine (PLL) [107] ; (c) Photos d'un système en hydrogel d'alginate après lithographie douce et pendant l'injection d'une solution aqueuse contenant un colorant bleu (adapté de [107]).

La gélification de l'hydrogel se produisant à T_{amb} , Yajima *et al.* [107] ont proposé d'incorporer des cellules dans la matrice de l'hydrogel. Les microcanaux à l'intérieur des hydrogels agiraient comme un réseau vasculaire qui apporterait l'oxygène et la nutrition aux cellules. Cependant, une perte des ions métalliques a été observée dans les hydrogels, ce qui se traduit par une légère cytotoxicité [104, 111].

L'alginate forme un hydrogel biodégradable et insoluble dans l'eau grâce à son maillage ionique. *In vivo*, l'hydrogel d'alginate subit une chute du module de cisaillement en 2 jours alors que la structure superficielle est maintenue pendant 28 jours [112]. L'alginate est dégradé par réaction enzymatique produite par des bactéries vivant dans les sols et eaux avec une perte de plus de 45% de masse en 40 jours [113, 114]. Son incinération n'a pas d'impact notable sur l'environnement [115].

III.F. Gomme-Laque

Lors de son cycle de vie, l'insecte *Kerria Lacca*, une espèce de cochenille, sécrète une résine appelée laque. En raffinant cette laque par chauffage, on obtient la gomme-laque, un thermoplastique avec une T_G de 42°C. Elle est principalement composée d'acide aleuritique, d'acide jalarique, d'acide shellolique et d'autres cires naturelles (FIG 1.12-a). Le prix de la gomme-laque de grade médical est de 3 à 50 €/kg en moyenne.

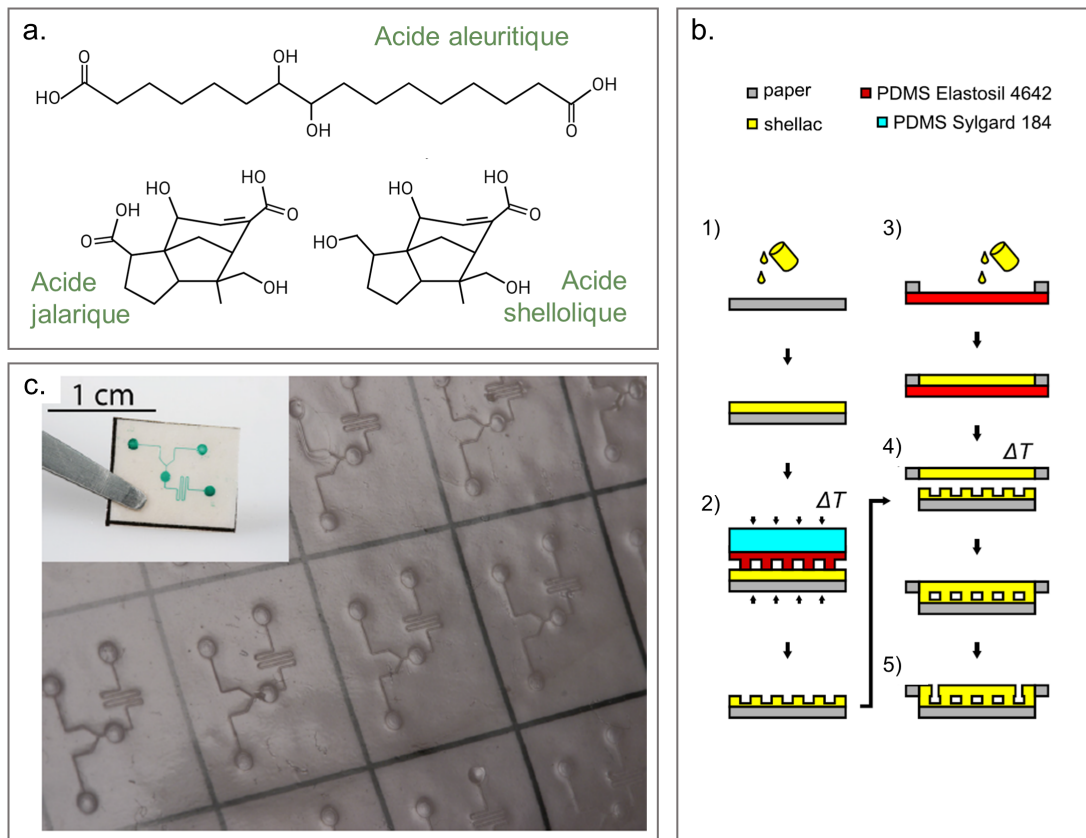


FIGURE 1.12 – (a) Molécules constituant la gomme-laque; (b) Schéma du protocole de préparation de microsystemes en gomme-laque : 1 & 3) Filmification, 2) Pressage à chaud, 4) Collage par traitement thermique, 5) Perforations d'entrée et sortie pour fluides (adapté de [68]); (c) Photos de systemes en gomme-laque sur papier [68].

La gomme-laque est naturellement insoluble dans l'eau, mais soluble dans certaines solutions alcalines et solvants organiques [116]. Le solvant le plus utilisé est l'éthanol, permettant de produire des films fins (de la dizaine de nm à la dizaine de μm d'épaisseurs), souvent utilisés comme couche protectrice sur des objets.

Pour produire des systemes microfluidiques, la gomme-laque peut être mise en forme par pressage à chaud, comme illustré sur la FIG 1.12-b. Pour protéger les films de gomme-laque pendant ce processus, ils sont préalablement déposés sur du papier [68]. Ensuite, un moule est pressé à 50°C et 4 kN pour imprimer des motifs allant de 30 à 100 μm de large. Le systeme est finalisé en collant par traitement thermique un autre film de gomme-laque à 58°C pendant 10 min. Un exemple de systeme microfluidique obtenu est présenté sur la FIG 1.12-c. Les films en gomme-laque sont hydrophiles et transparents

mais la présence du support en papier diminue la transparence du système.

La gomme-laque est un matériau biocompatible et non-toxique. Elle se dégrade naturellement dans le sol avec une perte d'environ 10% en masse par mois [117]. Elle est également utilisée dans de nombreuses applications comme revêtement pour limiter, voire empêcher l'adhésion et prolifération de cellules de mammifères [118]. Il est possible de l'utiliser comme surface de culture en greffant des groupes favorisant l'adhésion cellulaire sur des groupes d'acide carboxylique de la gomme-laque [119].

III.G. Bois

Le bois est un matériau apprécié pour ses propriétés mécaniques, d'isolation thermique et calorifique dans de nombreux secteurs industriels. Il est principalement constitué de cellulose, d'hémicellulose et de lignine (FIG 1.13-a). De nombreux paramètres influencent ses propriétés telles que son espèce d'origine ou son taux d'humidité. Biocompatible, biodégradable et versatile, le bois peut être structuré et fonctionnalisé pour obtenir les propriétés désirées [120]. La biocompatibilité du bois a notamment été prouvée par Song *et al.* sur des cellules HEK293 cultivées sur des membranes flexibles en bois [121].

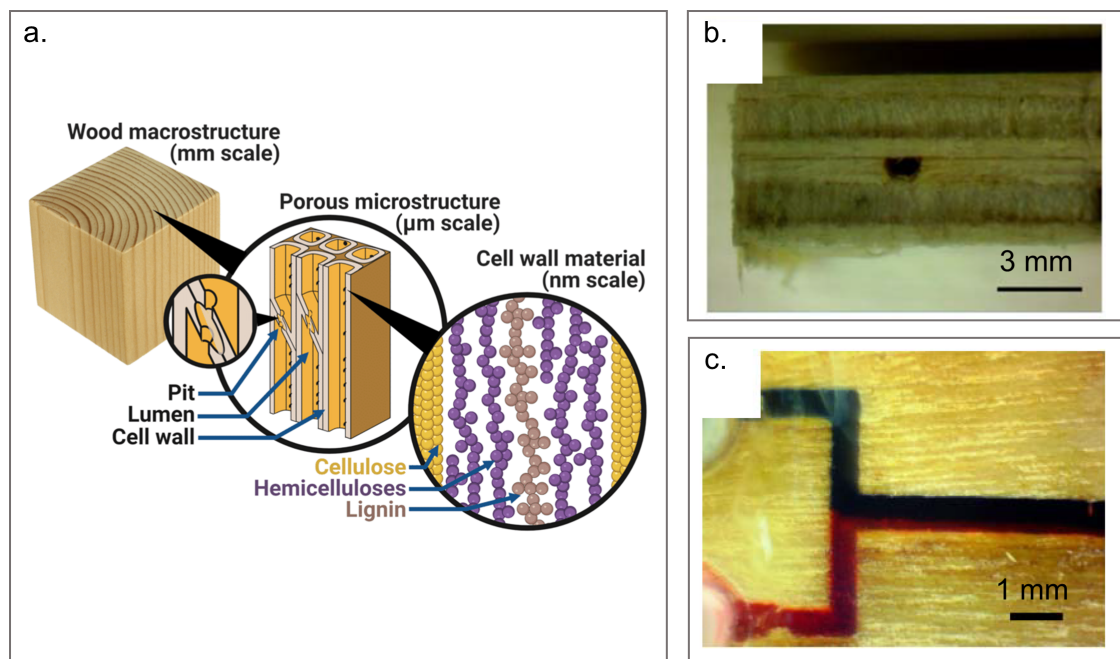


FIGURE 1.13 – (a) Schéma de la structure du bois à différentes échelles [122] ; (b) Section transversale d'un canal dans un dispositif microfluidique en bois gravé par laser CO_2 et scellé par colle cyanoacrylate [123] ; (c) Dispositif microfluidique en bois et PMMA perfusé à $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ [123].

Andar *et al.* ont utilisé du contreplaqué de bouleau pour réaliser un système microfluidique [123]. Le contreplaqué est un assemblage de couches de bois de quelques millimètres d'épaisseur pour 2-5 €/kg. Des canaux peuvent être gravés par ablation

laser. Les résolutions en largeur obtenus jusqu'à 100 μm pour 250 μm de profondeur. Pour éviter l'infiltration des analytes à travers le bois, un traitement surfacique est nécessaire. Des revêtements de PMMA, d'acétate de cellulose et de Teflon peuvent être déposés afin de rendre les canaux hydrophobes et étanches.

Le collage du bois peut être effectué avec une colle cyanoacrylate de grade médicale sur une autre plaque de contreplaqué (FIG 1.13-b) ou avec un adhésif à double face sur une plaque de PMMA permettant la visualisation des fluides (FIG 1.13-c). Dans un LoC en bois intégrant une fenêtre d'observation en verre, des signaux fluorescents ont pu être observés en présence de bactéries. Leur détection a été améliorée en éliminant les signaux parasites générés en dehors de la zone de mesure [123]. Cependant, pour d'autres applications nécessitant une transparence du dispositif, l'opacité du bois est un problème. Zhu *et al.* ont développé des bois composites transparents en retirant la lignine colorée avec une solution de soude ou de H_2O_2 et en la remplaçant par un polymère transparent optiquement [124].

Le bois est un matériau biodégradable, souvent utilisé pour générer de l'énergie à partir de son incinération. Il s'agit aussi d'un matériau abondant, déjà fortement utilisé dans l'industrie. Dans le cas de systèmes microfluidiques, il est nécessaire de déposer un revêtement étanche pour éviter la forte absorption d'eau par le bois. Toutefois, le Teflon est un polluant persistant s'accumulant dans l'environnement et dont l'incinération émet des gaz à effet de serre mille fois plus nocif que le CO_2 . Actuellement, des études sont menées pour proposer des alternatives plus éco-responsables comme des huiles végétales ou de la cire d'abeille [125].

III.H. Résumé et perspectives

Les matériaux bio-sourcés, biocompatibles et biodégradables, représentent une alternative séduisante aux polymères standards de l'industrie pétrochimique pour la fabrication des LoC. Différents matériaux ont été évalués pour fabriquer des LoC et leurs caractéristiques pour cette application sont rassemblées dans le TAB 1.2. En dehors de la microfluidique sur papier qui est déjà une technologie avancée, les développements sur ces matériaux restent à poursuivre et ils pourraient adresser différentes applications des LoC selon leurs propriétés.

Actuellement, aucun biomatériau étudié ne présente toutes les propriétés nécessaires à la fabrication de LoC dédiés à la manipulation de cellules (TAB 1.2). La microfluidique sur papier ne permet pas le transport de cellules ou leur observation directe. Le post-traitement des dispositifs en PLA doit encore être amélioré. Ce matériau nécessite des conditions contrôlées que ce soit dans des décharges ou par incinération pour être détruit. Les hydrogels de soie ne sont pas imperméables aux solutions. Bien qu'utiles dans certaines applications, c'est un inconvénient pour les systèmes microfluidiques nécessitant des canaux étanches. La zéine est opaque au contact de l'eau, ce qui pose un problème pour l'observation au microscope. Les hydrogels d'alginate sont formés à l'aide d'ions métalliques qui peuvent être cytotoxiques. Enfin, pour le bois et la gomme-laque, les microsystèmes obtenus sont respectivement opaques et fragiles. De plus, les deux matériaux requièrent des traitements surfaciques pour rendre leurs LoC étanches.

Ces études montrent la difficulté à répondre au cahier des charges des LoC et à ainsi remplacer les plastiques. De plus, leur prix généralement plus élevé pourrait être un frein, mais il devrait diminuer avec une production à grande échelle. De même, les méthodes de micro-structuration étudiées restent principalement restreintes à des volumes de production faibles ou moyens. Il est néanmoins très positif de voir la diversité des biopolymères évalués. Les perspectives se portent soit sur la poursuite des travaux menés et des défis technologiques associés, soit vers la recherche de nouveaux biomatériaux afin de fournir un panel de solutions complémentaires pour la fabrication de LoC.

TABLEAU 1.2 – Comparaison des biomatériaux utilisés pour la fabrication de LoC (N/D pour données non disponibles ou non applicables).

	Papier	PLA	Soie	Zéïne	Alginate	Gomme-Laque	Bois
Méthodes de fabrication	<ul style="list-style-type: none"> · Impression de cire · Impression de réactifs 	<ul style="list-style-type: none"> · Impression 3D · Moulage par injection · Pressage à chaud · Ablation par laser 	<ul style="list-style-type: none"> · Lithographie douce · Ablation par laser 	<ul style="list-style-type: none"> · Lithographie douce · Pressage à chaud 	<ul style="list-style-type: none"> · Lithographie douce 	<ul style="list-style-type: none"> · Pressage à chaud 	<ul style="list-style-type: none"> · Ablation par laser
Transparence	N/D	92%	90%	92% (sec) 20% (humide)	Oui mais non mesuré	Oui mais pas le support papier	Non
Biodégradabilité	Plusieurs jours	Quelques siècles	Contrôlable entre heures et années	Plusieurs semaines	Plusieurs jours	Plusieurs mois	Plusieurs mois
Biocompatibilité	Oui	Oui	Oui	Oui	Agent de gélation cytotoxique	Oui mais pas d'adhésion cellulaire	Oui
Etanchéité	N/D	Oui	Non	Oui mais opaque	Non	Oui	Non
Résolution (Largeur des canaux)	100 μm	100 μm 1 mm	100 μm	30 μm	200 μm	30 μm	100 μm
Méthodes de collage	N/D	<ul style="list-style-type: none"> · Traitement thermique · Activation chimique · Activation par laser CO₂ 	N/D	<ul style="list-style-type: none"> · Dissolution partielle 	<ul style="list-style-type: none"> · Pincés mécaniques · Dissolution partielle · Traitement avec PLL 	<ul style="list-style-type: none"> · Traitement thermique 	<ul style="list-style-type: none"> · Colle · Adhésif doux · Adhésif face

IV. Chitosane : un biopolymère pour la fabrication de laboratoires-sur-puce

Le chitosane a été identifié pour la première fois en 1859 par C. Rouget, lors d'un traitement de la chitine à haute température avec du KOH [126, 127, 128]. Ce n'est que dans les années 1970 que les scientifiques se sont intéressés de nouveau au chitosane et qu'il a commencé à être produit industriellement. De nos jours, les propriétés du chitosane lui permettent d'être incorporé dans des applications allant des cosmétiques aux produits agricoles en passant par la gestion des déchets industriels et la médecine [126, 129]. En effet, le chitosane est filmogène, non-toxique, biodégradable, biocompatible et antimicrobien. Ce sont ces mêmes propriétés qui font du chitosane un candidat prometteur pour la fabrication de LoC.

Cette section décrit les propriétés du chitosane et s'efforce de souligner le potentiel du chitosane en tant que matériau naturel pour la fabrication de systèmes microfluidiques. En effet, pour rappel, pour permettre la réalisation de LoC, le chitosane doit être mis sous forme de films suffisamment épais pour pouvoir être micro-structurés. De plus, pour des applications biomédicales, il est important que ces films permettent le transport de solutions aqueuses sans modification des micro-structures, et qu'ils soient suffisamment transparents pour permettre l'observation au microscope des micro-canaux.

IV.A. Production de chitosane

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, le polysaccharide le plus abondant dans l'environnement marin et le deuxième après la cellulose sur Terre. Outre les parois cellulaires des champignons, la chitine est très présente dans les exosquelettes des arthropodes (crustacés, insectes), et de l'endosquelette des céphalopodes (calamars, seiches). En d'autres termes, la chitine peut être extraite des déchets générés par l'industrie des produits de la mer. Sachant que 6 à 8 millions de tonnes de carapaces de crustacés sont produites par an [13], cela signifie que la production de chitine, et par conséquent de chitosane, valoriserait des déchets déjà existants. Comme seule une petite quantité de ces ressources naturelles est exploitée par l'industrie alimentaire marine, le chitosane se révèle être une ressource abondante et renouvelable, dont l'extraction est une activité secondaire liée à l'industrie alimentaire marine. Son prix avoisine les 50 à 100 €/kg mais dépend de l'origine du chitosane (crevettes, crabes, calamar...), de son pays de production et de la qualité désirée.

Le procédé standard de production du chitosane à partir de la chitine [130, 131, 132, 133, 134] est illustré dans la FIG 1.14.

Un premier traitement acide appelé décalcification décompose la phase minérale CaCO_3 présente dans la matière première en produits solubles dans l'eau. En général, la déminéralisation est réalisée en utilisant de l'acide chlorhydrique dilué à différentes concentrations (jusqu'à 10% m/v) à T_{amb} , pendant différents temps d'incubation allant d'une heure à plusieurs jours. Cette étape est suivie par la déprotéinisation qui décompose les protéines en acides aminés solubles en phase aqueuse via un traitement alcalin. La soude est principalement utilisée à des concentrations de 0,125 à 5,0 M, à une température variable (jusqu'à 120°C) et pendant une durée de traitement variable (de quelques minutes à quelques jours). Enfin, la chitine peut subir un traitement supplémentaire pour la décolorer en dissolvant les restes de pigments et de lipides dans un solvant comme l'éthanol. La conversion de la chitine en chitosane se fait par un traitement alcalin, communément avec une solution aqueuse de NaOH (12M) à une température élevée (90-110°C) pendant quelques dizaines de minutes à plusieurs heures, qui induit une désacétylation partielle de la chitine. Les groupes acétamide deviennent des groupes amine en perdant la partie acétyle du groupe. Après purification, le chitosane est produit et stocké sous forme de poudre.

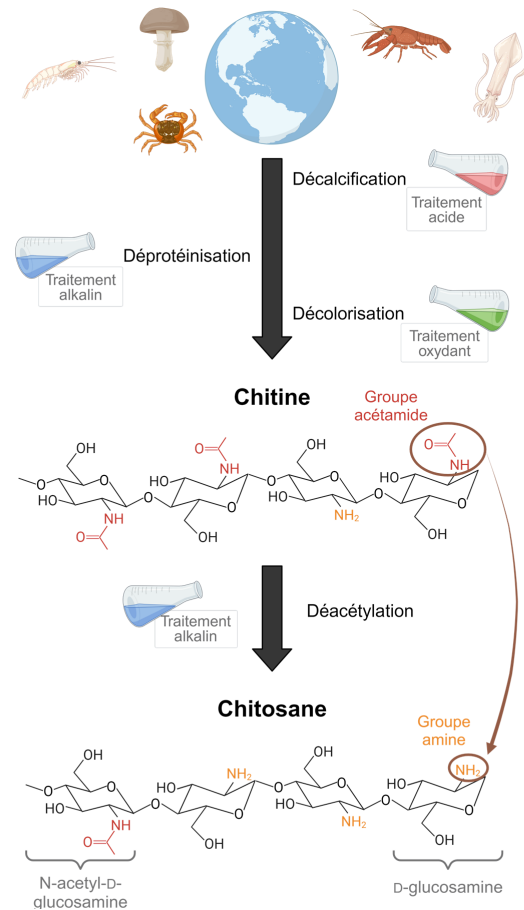


FIGURE 1.14 – Schéma des étapes pour la production de chitine et chitosane.

L'analyse du cycle de vie de la production de chitosane [135] a permis de mettre en évidence des différences importantes selon l'origine du chitosane et la zone de collecte des matières premières. De plus, le chitosane produit à partir de carapaces de crevettes entre en concurrence avec le marché de la nourriture animale, ce qui n'est pas le cas de celui produit à partir des carapaces de crabes. Enfin, la production et l'utilisation des acides et bases nécessaires au processus de production de chitine sont un enjeu majeur de l'impact environnemental de la production de chitosane. C'est pourquoi certaines solutions sont déjà étudiées pour remplacer certains produits chimiques par des enzymes ou des bactéries comme lors de la déprotéinisation, la décalcification ou la désacétylation [131, 136].

IV.B. Propriétés du chitosane

Le processus de production et l'origine du chitosane ont un impact sur les propriétés du chitosane comme sa masse molaire et son degré d'acétylation (DA).

IV.B.1. Degré d'acétylation et solubilité

Le chitosane est un copolymère composé d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en $\beta(1 \rightarrow 4)$, comme le montre la FIG 1.14. Le ratio molaire des unités de N-acétyl-D-glucosamine dans la chaîne macromoléculaire est défini comme le degré d'acétylation. On définit le polymère comme du chitosane à partir d'un DA inférieur à $\sim 60\%$. Pour un DA supérieur, il s'agit de chitine. Les conditions de l'étape de désacétylation peuvent être contrôlées pour obtenir un DA précis dans le produit final [137].

$$\text{Degré d'acétylation (DA)} = \frac{N_{N\text{-acétyl-D-glucosamine}}}{N_{D\text{-glucosamine}} + N_{N\text{-acétyl-D-glucosamine}}} \quad (1.1)$$

Le DA a un impact sur les propriétés chimiques et biologiques du chitosane car il caractérise les groupes chimiques amine et acétamide disponibles sur les chaînes du polymère. La RMN ^1H (e.g. méthode de Hirai) et la spectrophotométrie infrarouge (e.g. méthode Miya) sont les 2 techniques principalement utilisées pour déterminer le DA moyen d'un échantillon de chitosane [138].

La chitine a la même structure chimique que le chitosane mais avec un DA supérieure à $\sim 60\%$. Les liaisons hydrogène très fortes entre les groupes acétamide et les groupes carbonyle des chaînes voisines rendent la chitine insoluble dans les solutions aqueuses [139]. En revanche, le chitosane peut être dissous dans une solution aqueuse acidifiée (pH $< \sim 5$). En effet, les groupes amine ont un pKa proche de 6,5. Ainsi, à faible pH, le groupe amine est protoné. Le chitosane devient alors un polyélectrolyte cationique soluble dans l'eau [140]. A l'opposé, une déprotonation des groupes amine se produit à pH élevé, ce qui rend le polymère insoluble en solution aqueuse à pH neutre et basique. Ce phénomène est illustré à la FIG 1.15.

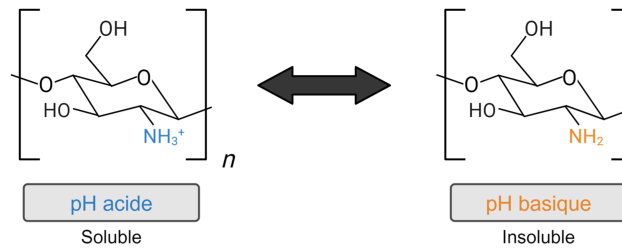


FIGURE 1.15 – Etats de protonation du chitosane.

Pour dissoudre une masse m_{CH} de chitosane, il faut une solution aqueuse contenant, au minimum, une quantité stœchiométrique de molécules acides par rapport aux groupes amine du polymère. Pour l'acide acétique, solution la plus fréquemment utilisée, cela représente une masse m_{AA} respectant la relation suivante :

$$m_{AA} = \frac{m_{CH} \times (1 - t_{eau}) \times (1 - DA) \times M_{AA}}{M_{D\text{-glucosamine}} \times (1 - DA) + M_{N\text{-acétyl-D-glucosamine}} \times DA} \quad (1.2)$$

avec t_{eau} la teneur en eau du chitosane, $M_{AA} = 60 \text{ g.mol}^{-1}$ la masse molaire de l'acide acétique, $M_{D\text{-glucosamine}} = 161 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{N\text{-acétyl-D-glucosamine}} = 203 \text{ g.mol}^{-1}$ les masses molaires respectives des unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine.

Cependant, le chitosane en solution acide s'hydrolyse et se dégrade avec une vitesse dépendante, notamment, du DA du chitosane, de la concentration en acide ou de la température [141, 142]. Ainsi, pour la conservation du chitosane en solution, il est préférable de minimiser la concentration d'acide et de le stocker à 4°C.

IV.B.2. Masse molaire et viscosité

Les chaînes polymères de chitosane produites par la méthode décrite précédemment ont une masse molaire moyenne en masse (M_w) comprise entre environ 100 et 700 kg.mol⁻¹ [130]. Des valeurs plus faibles peuvent être obtenus par dépolymérisation du chitosane [143]. Cette M_w et la masse molaire moyenne en nombre (M_n) peuvent être déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) [144]. Ces valeurs sont reliées par la dispersité du polymère : $D = M_w/M_n$.

De plus, la masse molaire est étroitement corrélée à la viscosité $[\eta]$ de la solution de chitosane [145] par l'équation semi-empirique de Mark-Houwink : $[\eta] = K M_v^\alpha$. Les deux constantes K et α varient selon le couple solvant/polymère et la température de la solution [130, 146]. Cette relation est utilisée pour estimer la masse molaire moyenne viscosimétrique (M_v) d'un lot de chitosane à partir d'une mesure de la viscosité d'une solution de ce chitosane [147, 148, 149]. De manière générale, les masses molaires suivent la relation suivante : $M_n < M_v < M_w$. Par la suite, la masse molaire évoquée sera M_w .

IV.B.3. Biocompatibilité et bioactivité

Un matériau est dit biocompatible s'il ne provoque pas de réactions indésirables (inflammation, dégradation, modification) au milieu biologique avec lequel il est en contact, que ce soit des cellules ou un organisme complet.

De nombreuses études de cultures cellulaires *in vitro* en présence de chitosane ont permis de vérifier sa biocompatibilité. Par exemple, la culture de cellules endothéliales vasculaires HMEC-1 sur des films de chitosane ont démontré leur adhésion et prolifération sans fonctionnalisation préalable de la surface des films [150]. Mattotti *et al.* [151] ont cultivé des cellules gliales et neuronales sur des films de chitosane plats ou micro-structurés qui favorisent même la maturation des cellules gliales. Dans des puits en chitosane photoréticulable, des cellules d'hépatoblastome humain ont été cultivées en sphéroïdes avec des fibroblastes NIH-3T3 [152]. Ainsi le chitosane peut servir de support pour la culture de cellules adhérentes ou en suspension. Dans cette optique, l'effet de méthodes de stérilisation comme l'autoclave ou les radiations gamma a été analysé par Rao *et al.* [153], avec des propriétés mécaniques moins dégradées pour l'autoclave.

Le chitosane peut être implanté *in vivo* sans provoquer de réponses immunitaires de l'organisme [145]. Le DA semble influencer la biocompatibilité car un DA faible présente une meilleure prolifération cellulaire chez les rats [154]. Cependant d'autres études indiquent plutôt une différence d'adhésion et de prolifération selon le type de cellules mais ne change pas la biocompatibilité du chitosane [155]. Ainsi, le chitosane est étudié pour servir de support à la régénération de tissus.

A l'opposé, le chitosane a montré des activités antibactériennes et antifongiques qui pourraient être dues aux interactions entre les groupes chargés positivement du

chitosane et les parois cellulaires chargées négativement des bactéries [127]. C'est pourquoi il est intensément étudié pour l'emballage alimentaire [156] et les applications d'ingénierie tissulaire [145]. En fonction du DA et de la concentration du chitosane, il peut également présenter des propriétés antioxydantes, en raison des groupes amine et hydroxyde libres [127, 157].

IV.B.4. Biodégradabilité

De manière générale, les matériaux biodégradables peuvent être décomposés, sous l'effet d'organismes vivants, en éléments dépourvus d'effet négatif sur le milieu naturel. Cela couvre leur dégradation par des micro-organismes, par des réactions biochimiques en milieu naturel ou *in vivo* dans le cas de biomatériaux implantés.

Lors d'une implantation *in vivo*, plusieurs enzymes peuvent induire la dégradation du chitosane, telles que le lysozyme, une hydrolase glycosidique qui rompt les liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ du chitosane [158]. Les sous-produits sont non toxiques et non antigéniques [127, 145, 159]. De manière similaire, des bactéries présentes dans les sols produisent des enzymes dégradant le chitosane [160]. Au bout de 6 mois en sol, le chitosane est complètement dégradé [161].

Dans le cas de biomatériaux en chitosane utilisés *in vitro* au contact de milieux biologiques, leur élimination s'effectue par incinération. Des études thermogravimétriques [162, 163] ont été effectuées et ont montré de légères variations des températures caractéristiques selon le DA et la M_w du chitosane. Sur les courbes (FIG 1.16-a et -b), il est possible d'identifier trois intervalles caractéristiques de températures. Le premier entre 25°C et 199°C consiste en l'évaporation de l'eau contenue dans le biomatériau. Le deuxième intervalle de 200°C à 497°C comprend la dépolymérisation des chaînes par rupture des liaisons glycosidiques et décomposition des groupes amine et acétamide. Le dernier intervalle pour des températures supérieures à 498°C est une oxydation thermique des restes avec aucun résidu notable. Aucun sous-produit toxique n'est généré lors de l'incinération.

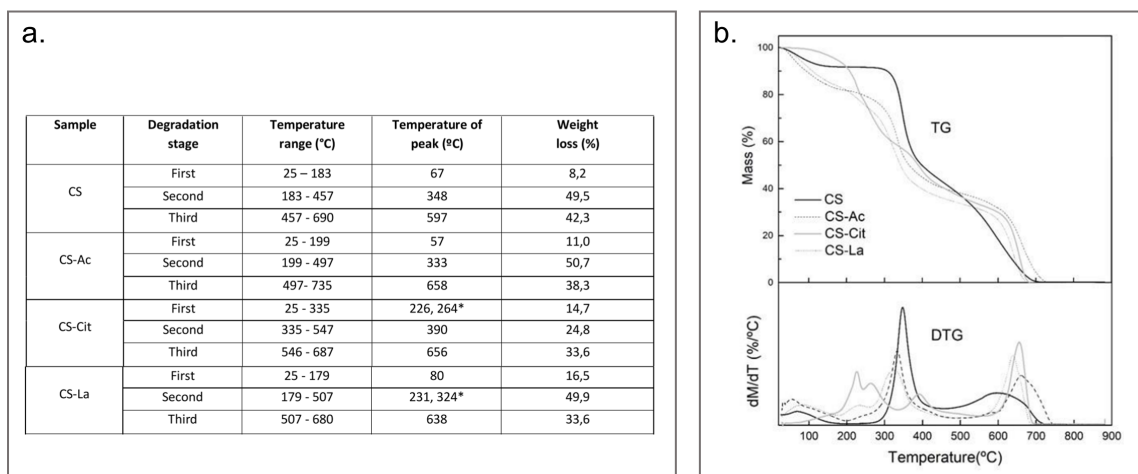


FIGURE 1.16 – (a) Analyses des courbes thermogravimétriques et (b) Courbes différentielles du chitosane en poudre (CS) et des films de chitosane avec de l'acide acétique, acide citrique et acide lactique, respectivement CS-Ac, CS-Cit et CS-La [163].

IV.C. Mise en forme du chitosane

Nous avons vu que le chitosane présente plusieurs propriétés intrinsèques intéressantes pour la fabrication écoresponsable de LoC, en particulier dans le domaine biomédical. En effet, il est bio-sourcé, biocompatible et biodégradable. Nous allons maintenant aborder différentes méthodes de mise en forme du chitosane, que ce soit en films ou en hydrogels.

IV.C.1. Films de chitosane

IV.C.1.a. Méthodes de fabrication

Le chitosane est un biopolymère filmogène. Ainsi, en laissant le solvant s'évaporer d'une solution de chitosane, il est possible d'obtenir des films (FIG 1.17). Ces films sont généralement préparés selon deux techniques : le spin-coating pour des épaisseurs contrôlées entre la centaine de nanomètres et quelques micromètres et le coulage d'une solution de chitosane dans un moule pour obtenir des épaisseurs allant jusqu'à 0,5 mm.

Le chitosane n'étant soluble qu'en solution acide, il faut dissoudre la poudre de chitosane dans de l'eau déionisée acidifiée. Différents acides peuvent être utilisés à cet effet. La solution la plus couramment utilisée est l'acide acétique dilué dans de l'eau déionisée [119, 147, 149], mais des films produits à partir de solutions d'acide chlorhydrique, malique ou citrique ont aussi été réalisés [164, 165, 166]. Des additifs peuvent être ajoutés à la solution pour modifier les propriétés finales des films, tels que des plastifiants comme le glycérol (GLY) ou le poly(éthylène glycol) (PEG) [149, 167, 168].

L'évaporation du solvant peut se faire à T_{amb} ou être accélérée en chauffant le système dans une étuve à une température inférieure à 60°C. En effet, une température trop élevée accélérerait l'hydrolyse du polymère. Les films obtenus sont généralement transparents avec une légère coloration jaune [162, 169].

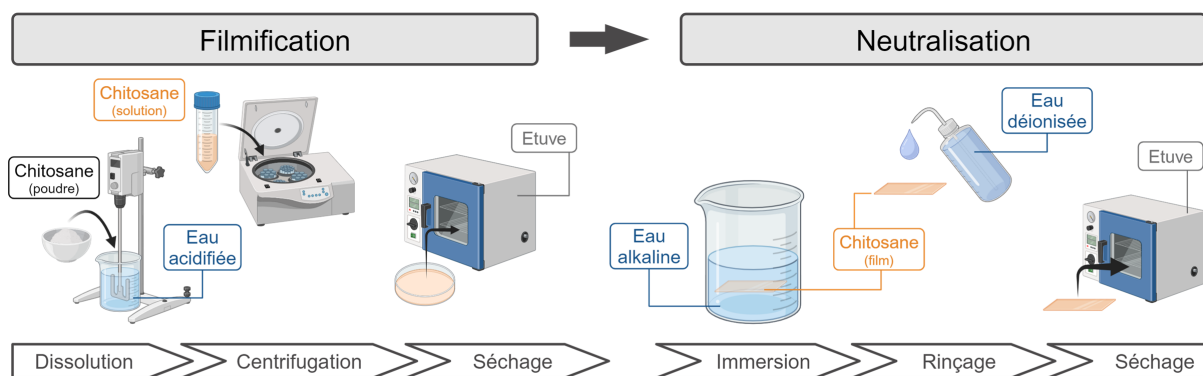


FIGURE 1.17 – Protocole de fabrication de film de chitosane.

Une fois secs, les films restent solubles au contact de l'eau car les groupes amine du chitosane restent sous forme protoné. Pour être utilisé dans des applications nécessitant un contact avec l'eau comme la culture cellulaire ou des fonctionnalisations de capteurs, une étape de neutralisation est souvent adjointe pour déprotoner les groupes amine et ramener

le film à un pH neutre. Cette étape est obligatoire pour obtenir un réseau insoluble de chaînes de polymères dans l'eau. Cette neutralisation est réalisée en immergeant le film de chitosane dans une solution ou un gaz alcalin. De manière générale, une solution aqueuse de NaOH est utilisée [151, 170], mais d'autres pistes ont été explorées comme le NH_3 gazeux [171] ou une solution de Na_2CO_3 [172]. Les films sont ensuite rincés avec de l'eau déionisée pour retirer toutes les molécules indésirables et ramener le pH à 7.

IV.C.1.b. Propriétés des films de chitosane

Les propriétés mécaniques et de barrière des films de chitosane sont étudiées depuis longtemps. Cependant, ces propriétés dépendent de multiples paramètres allant de la M_w et du DA du chitosane aux conditions de fabrication. Les recherches se sont concentrées sur ces paramètres et ont étudié les variations des propriétés des films principalement sans neutralisation dans l'optique de produire des films d'emballage alimentaire. Les propriétés les plus étudiées sont la résistance à la traction et l'élongation dans le cas des propriétés mécaniques, et la perméabilité à la vapeur d'eau et le gonflement pour les propriétés dites de barrière. Cette sous-section propose un aperçu de certaines corrélations entre les paramètres et leurs effets sur ces propriétés. Les films de chitosane étudiés ont des épaisseurs allant de 10 à 80 μm .

Concernant l'influence des caractéristiques du chitosane utilisé, la M_w a un impact important sur les propriétés mécaniques (FIG 1.18). La résistance à la traction de films de chitosane se trouve dans une gamme allant de 20 MPa à 150 MPa [158, 167]. En effet, une augmentation de la M_w est corrélée à une augmentation de la résistance à la traction [149, 164] due à l'augmentation des liaisons hydrogène entre les chaînes polymères. Cela s'accompagne d'une augmentation de l'élongation [149] due à l'extension de l'enchevêtrement du réseau. En ce qui concerne la perméabilité à la vapeur d'eau, les résultats ne sont pas concluants car Fernandez *et al.* [149] affirment qu'elle est inversement corrélée à la M_w alors que Kerch *et al.* [164] et Park *et al.* [165] suggèrent le contraire.

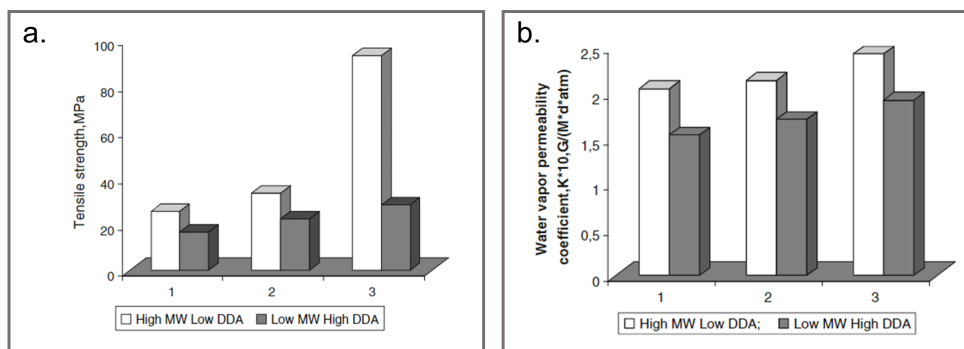


FIGURE 1.18 – (a) Résistance à la traction et (b) Perméabilité à la vapeur d'eau de films de chitosane avec différentes M_w et degré de désacétylation ($\text{DDA} = 1 - \text{DA}$) après stockage à T_{amb} : 1 - 1 jour, 2 - 7 jours et 3 - 30 jours [164].

Dans les articles de Kim *et al.* [166] et Ziani *et al.* [167], les auteurs ne concluent pas sur

les impacts du DA sur les propriétés mécaniques et de barrière des films. En effet, les changements pourraient également être expliqués par le changement de M_w entre les différents DA. Cependant, Hamdi *et al.* [173] ont montré que la résistance à la traction et l'élongation des films de chitosane augmentent avec la diminution du DA.

Le type d'acide a un impact sur les propriétés mécaniques et de barrière du film [164, 165, 166, 174] en modifiant la force de la liaison avec le chitosane (FIG 1.19). Selon la structure de l'acide, la configuration et la densité de jonctions changent. Par exemple, Park *et al.* ont constaté que les films de chitosane réalisés à partir d'acide acétique sont plus résistants à la traction que ceux réalisés avec des acides malique, lactique ou citrique [165]. Par ailleurs, la concentration de l'acide ne provoque pas de changements significatifs sur les différentes propriétés [174] mais peut endommager le chitosane à long terme.

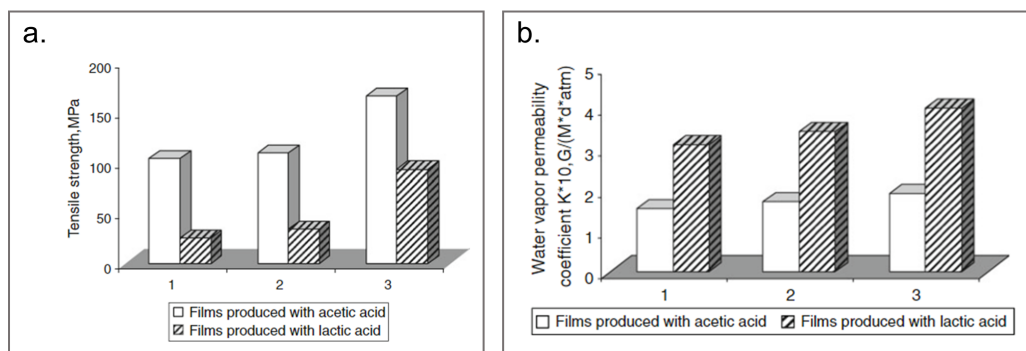


FIGURE 1.19 – (a) Résistance à la traction et (b) Perméabilité à la vapeur d'eau de films de chitosane produit avec acide acétique et lactique après stockage à T_{amb} : 1 - 1 jour, 2 - 7 jours et 3 - 30 jours [164].

Comme pour les acides, le type de plastifiants a également un impact sur les interactions entre les chaînes de chitosane [167, 168]. Suyatma *et al.* ont comparé le GLY, l'éthylèneglycol (EG), le PEG et le propylène glycol (PG) (FIG 1.20-a). Pour tous ces plastifiants, leur concentration affecte les propriétés mécaniques [164, 174, 168]. Leurs molécules s'insèrent entre les chaînes de polymères et empêchent la formation de liaisons intermoléculaires (FIG 1.20-b). Ainsi, la résistance à la traction diminue lorsque la concentration en plastifiants augmente. Pour l'élongation, les plastifiants aident à la réorganisation des chaînes lors la traction du film [175]. Par conséquent, l'élongation maximale augmente avec la concentration de plastifiants.

En outre, les conditions de séchage affectent également les propriétés du chitosane. Selon Fernandez *et al.* [149], une température plus élevée pendant l'évaporation diminue la résistance à la traction et l'élongation, tandis que l'humidité relative n'a pas d'impact visible. Enfin, les conditions de stockage modifient les propriétés mécaniques en raison de la réorganisation des chaînes polymères au fil du temps. Ainsi, la résistance à la traction et la perméabilité à la vapeur d'eau augmentent tandis que l'élongation diminue au fil du temps, comme le montrent les FIG 1.18 et 1.19 [164, 174, 168].

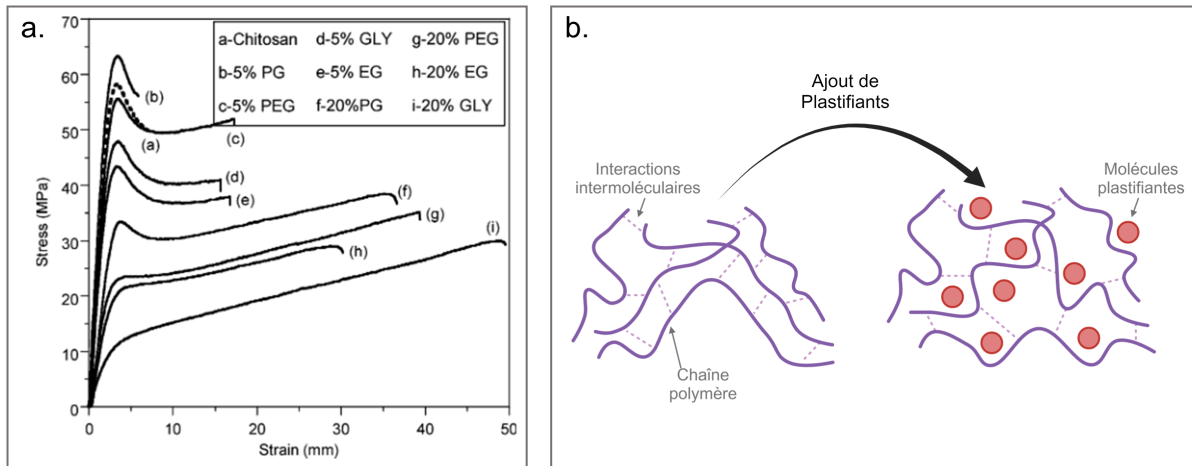


FIGURE 1.20 – (a) Courbes de contraintes en fonction de la déformation de films plastifiés avec x% (w/w) de glycérol (GLY), d'éthylèneglycol (EG), de poly(éthylène glycol) (PEG) ou de propylène glycol (PG) après stockage pendant 3 semaines [168]; (b) Schéma de l'effet des plastifiants.

Concernant la neutralisation, la méthode choisie influence les propriétés des films de chitosane. Une augmentation de la concentration de NaOH ou du temps de neutralisation entraîne une augmentation de la résistance à la traction, une diminution de l'élongation et une diminution de la perméabilité à la vapeur d'eau et à l'oxygène, comme illustré dans la FIG 1.21 [170]. Avec une tendance similaire, l'absorption d'eau par les films de chitosane diminue [170].

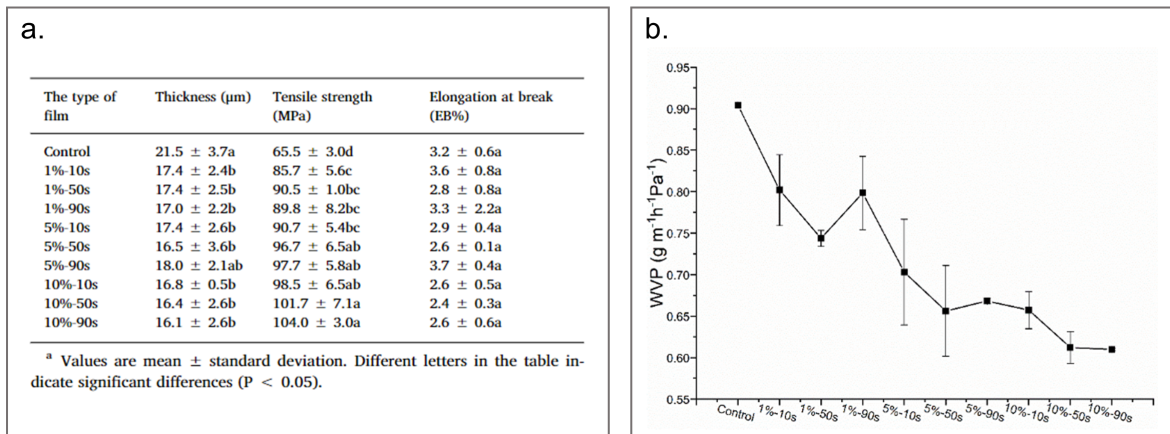


FIGURE 1.21 – Tableau des résistances en traction et élongation à la rupture (a) et courbe de perméabilité à la vapeur d'eau (b) de films de chitosane neutralisés avec différentes concentrations de NaOH pour différents temps de neutralisation : x%-ys avec x la concentration de NaOH et y le temps de neutralisation [170].

Ainsi, de nombreux paramètres : la M_w du chitosane, l'acide utilisé pour le dissoudre, l'ajout éventuel de plastifiants, les conditions de séchage et de neutralisation affectent les propriétés mécaniques et de barrière des films.

IV.C.1.c. Micro-structuration de films de chitosane

Plusieurs méthodes sont employées pour micro-structurer la surface des films de chitosane. Elles sont basées sur des stimuli externes localisés comme un signal optique, mécanique ou électrique pour créer des motifs dans la zone sélectionnée. La plupart des films discutés dans cette section n'ont pas été neutralisés, ce qui serait nécessaire pour la manipulation de solutions aqueuses. Or la neutralisation modifierait la forme des films et la micro-structuration [176].

La première méthode est la lithographie douce où la résolution dépend à la fois de la résolution du moule et des propriétés du polymère en solution. Mattotti *et al.* [151] ont utilisé cette technique pour comparer la croissance de cellules sur des films de chitosane avec ou sans motifs. Ils ont reproduit fidèlement des sillons de 2 et 10 μm de largeur et de 1 μm de hauteur. Pour obtenir des résolutions plus faibles, Fernandez *et al.* [177] ont suggéré de modifier la méthode de fabrication en lithographie douce forcée. La solution de chitosane est pressée pendant 1 min contre le moule pour la forcer à remplir les plus petites cavités. Puis la solution est laissée à sécher, comme illustré en FIG 1.22-a. En évitant la formation de bulles, le remplissage des cavités passe de 8% à 95% (FIG 1.22-c).

Une autre méthode de fabrication est la photolithographie, qui consiste à recouvrir le substrat d'une résine chimique sensible à la lumière (FIG 1.22-b). En exposant la surface à l'irradiation à travers un masque à motifs, les différentes propriétés des zones irradiées et non irradiées créent un motif sur la surface du film en éliminant l'une ou l'autre. Servin *et al.* [178] ont utilisé le chitosane comme bio-résine de 100 nm d'épaisseur développable à l'eau pour tracer des lignes de 50 nm sur un substrat de silice (FIG 1.22-d). Ils ont structuré d'abord la résine de chitosane par lithographie avec des longueurs d'onde entre 200 et 300 nm avant de graver la silice à travers ces motifs. Pour obtenir une gravure avec des doses raisonnables, le chitosane doit être modifié chimiquement pour être sensible à la lumière [152] ou des photoinitiateurs doivent être ajoutés aux films de chitosane [179].

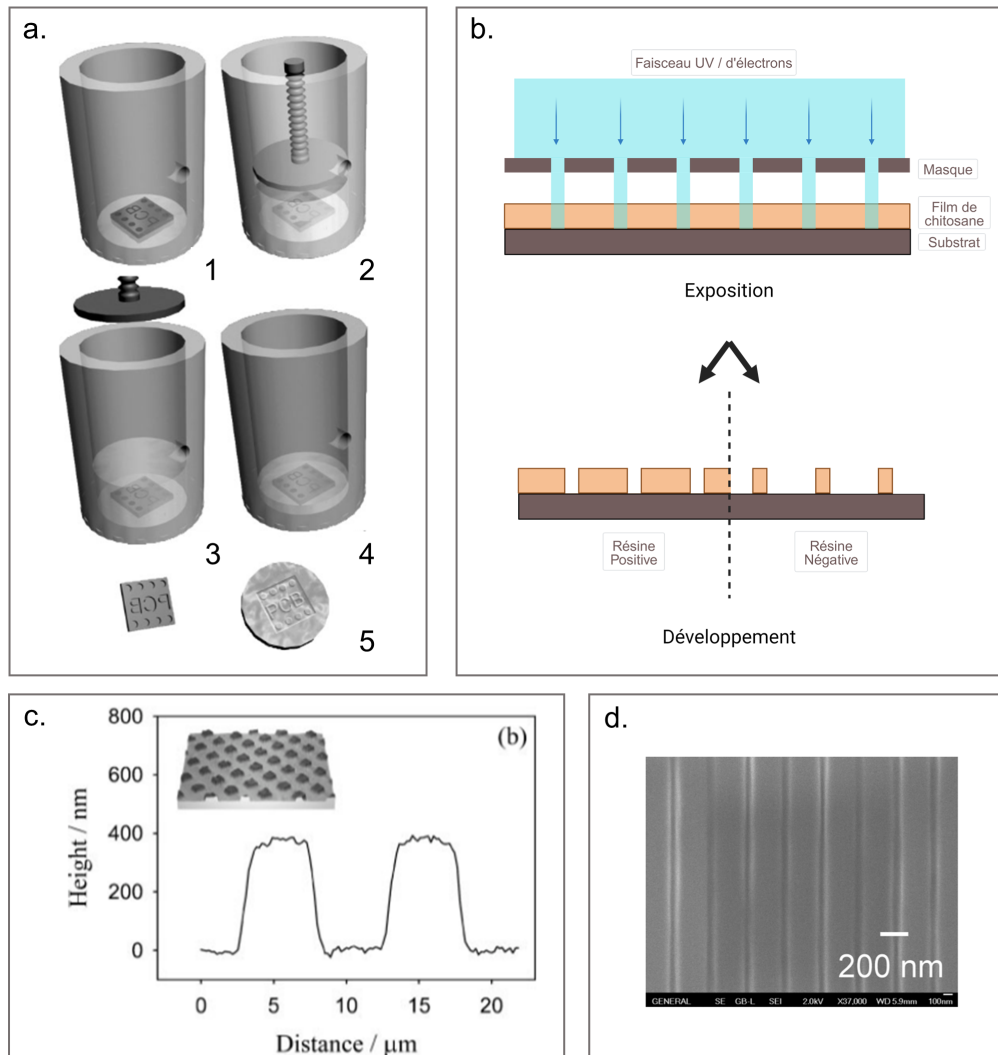


FIGURE 1.22 – (a) Schéma de lithographie douce forcée [177]; (b) Schéma de photolithographie avec résine positive et négative; (c) Profil et image de micro-structures produites sur des films de chitosane de 500 μm d'épaisseur par lithographie douce avec une périodicité de 10 μm [177]; (d) Image MEB de structures obtenues par photolithographie sur chitosane (ligne de 47 nm line avec 332 nm d'espace) [180].

La gravure sèche par plasma oxygène a été proposée par Cheng *et al.* [147, 181] comme procédé de micro-structuration du chitosane pour détecter l'activité électrique des protéines (FIG 1.23-a). Le film de chitosane est déposé sur un substrat, suivi par le spin-coating d'une couche de PMMA et d'une résine photosensible. La résine photosensible est ensuite micro-structurée par photolithographie. Avec un plasma oxygène, la zone de PMMA et de chitosane non-couverte par la résine photosensible est gravée avec des vitesses de 168 à 330 nm.sec⁻¹, le PMMA servant de couche protectrice supplémentaire pour le chitosane. Le PMMA et la résine photosensible sont ensuite éliminés à l'acétone. Les motifs gravés vont de 100 nm à 2 μm de large (FIG 1.23-b).

La dernière méthode décrite dans cette sous-section exploite la conductivité du chitosane soluble. L'électrodéposition (FIG 1.23-c) utilise les charges positives du chitosane pour attirer les chaînes de polymères vers la surface d'une cathode en appliquant une tension.

Un gradient de pH est créé à proximité de la surface de la cathode, ce qui déprotone le chitosane une fois à proximité de la surface. Ainsi, un film mince est déposé sur la surface de l'électrode, dont l'épaisseur est contrôlée par la tension et le temps d'application [140]. La résolution dépend de la configuration de la surface de la cathode et a été reportée pour des motifs de 100 nm. Ce film peut être produit sur une électrode à l'intérieur d'un dispositif microfluidique scellé. Un tel film sur une électrode peut améliorer la sélectivité de la détection en repoussant certaines molécules comme dans un capteur optique MEMS (systèmes micro-électroniques) pour la détection du catéchol, un sous-produit de déchets industriels posant des risques sanitaires, illustré sur la FIG 1.23-d [182].

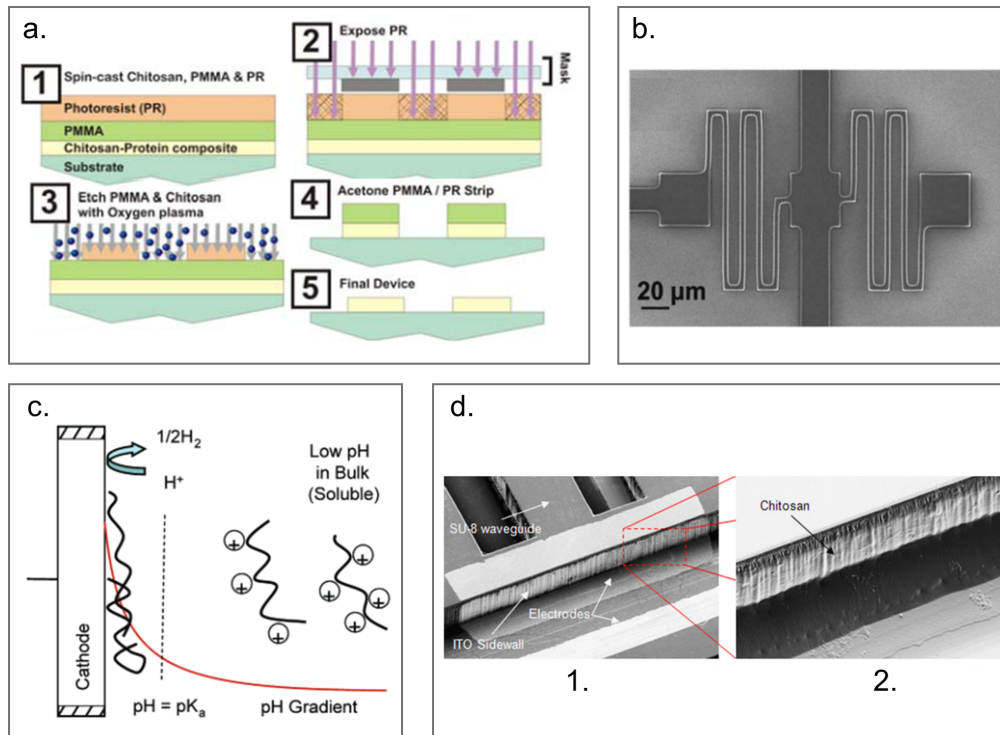


FIGURE 1.23 – (a) Schéma de gravure par plasma oxygène de films de chitosane [147]; (b) Image MEB de ressorts serpentine gravés en chitosane [181]; (c) Assemblage direct du chitosane en réponse à un stimuli électrique [140]; (d) Déposition de chitosane à 4 A.m^{-2} pendant 10 min sur les parois d'un canal microfluidique sur un détecteur optique [182].

Chacune des méthodes présentées peut être caractérisée par ses performances, résumées dans le TAB 1.3. Dans le cas de la production de systèmes microfluidiques, les principaux critères sont les résolutions en largeur des motifs gravés ainsi que les épaisseurs de film atteignables. Les canaux microfluidiques pouvant avoir des hauteurs de quelques dizaines à quelques centaines de μm selon l'application, une épaisseur minimale de 200 μm est nécessaire.

TABLEAU 1.3 – Comparaison de méthodes de fabrication communément utilisés pour micro-structurer les films de chitosane (N/D pour données non disponibles).

	Lithographie douce	Photolithographie	Gravure par plasma	Electro-déposition
Résolution en largeur	2 – 60 μm (5 μm pour FSL)	50 nm – 100 μm	100 nm – 2 μm	100 nm – 20 μm
Résolution en hauteur	1 μm	80 nm – 100 μm	200 nm – 3 μm	N/D
Épaisseur maximale des films	0,5 mm	100 nm – 2 μm (contrôlé par spin-coating)	100 nm – 3 μm (contrôlé par spin-coating)	10 – 125 μm (contrôlé par le voltage)
Avantages	Fonctionnalisation modulable de surfaces par structuration partielle du moule	Résine positive ou négative	Introduction de groupes chimiques sur la surface	Déposition extrêmement sélective
Désavantages	Fabrication de moules	Modification chimique du chitosane	Utilisation de produits toxiques	Déposition uniquement sur électrodes
Applications	<ul style="list-style-type: none"> · Culture cellulaire sur surface structurée · Régénération tissulaire 	<ul style="list-style-type: none"> · Régénération tissulaire · Masque "vert" pour lithographie 	<ul style="list-style-type: none"> · Masque "vert" pour lithographie · Biocapteurs par immobilisation de protéines 	<ul style="list-style-type: none"> · Déposition sur surface non planaire · Diffusion contrôlée de particules captives
Références	[151, 159, 176] [177, 183]	[159, 180, 183] [184, 185]	[147, 181, 185]	[140, 186, 187] [188, 182, 189]

IV.C.2. Hydrogels de chitosane

Une alternative aux films de chitosane est de produire des hydrogels à partir de chitosane. Un gel est un réseau de chaînes de polymères interconnectées qui ont gonflé dans un solvant. C'est un solide, ce qui signifie qu'il garde sa forme sous son propre poids mais reste déformable et flexible. Pour ce faire, des liaisons chimiques ou physiques sont créées entre les chaînes de polymères afin de limiter leur déplacement relatif. Ces liaisons peuvent permettre aux hydrogels d'être insoluble dans des milieux aqueux.

Les groupes chimiques sur les unités de répétition du chitosane nous informent sur les interactions potentielles pour la réticulation [190]. Les différents groupes sont soulignés dans la FIG 1.24. Dans l'unité D-glucosamine, un groupe amine primaire sur le carbone C-2 est présent alors que dans l'unité N-acétyl-D-glucosamine, un groupe acétamide est à sa place. Les groupes acétamide sont moins réactifs que les groupes amine qui réagissent

facilement avec les groupes d'acide carboxylique ou aldéhyde. Dans les deux unités de répétition, un groupe hydroxyle primaire sur le carbone C-6 et un groupe hydroxyle secondaire sur le carbone C-3 sont disponibles pour des interactions de type liaison hydrogène. En plus de permettre un large panel de liaisons pour la réticulation, les groupes du chitosane sont utiles pour la fixation de biomolécules telles que les protéines, les enzymes ou les anticorps, en particulier les molécules chargées négativement [188].

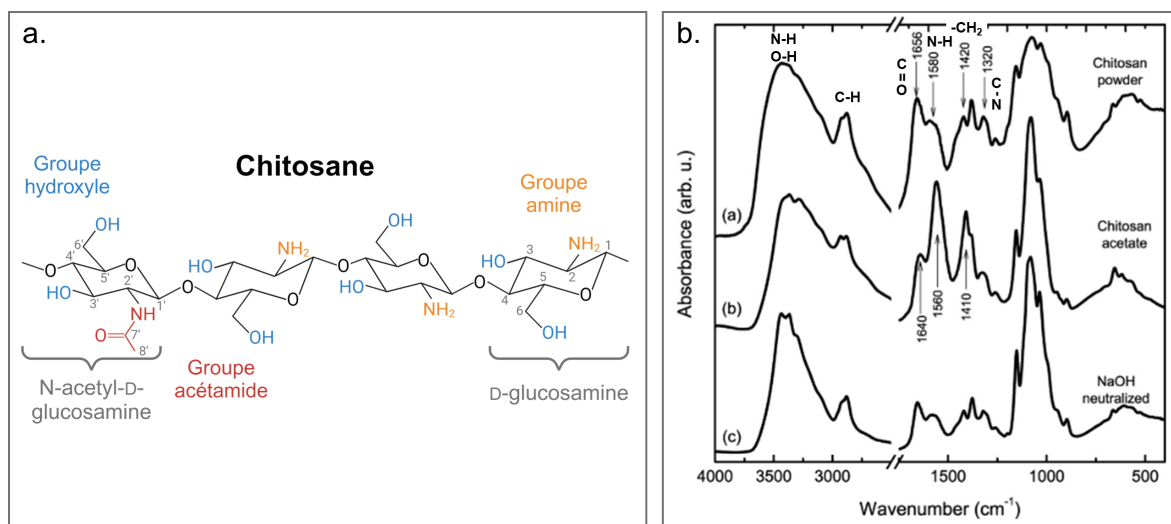


FIGURE 1.24 – (a) Groupes chimiques sur le chitosane ; (b) Spectres FTIR de chitosane en poudre [a], en film non-neutralisé [b] et en film neutralisé [c] (adapté de [191]).

IV.C.2.a. Hydrogels chimiques

Un hydrogel chimique est obtenu par liaisons covalentes entre les chaînes de polymères et un agent de réticulation. Celui-ci doit donc présenter deux ou plusieurs groupes chimiques pouvant réagir avec les groupes présents sur le chitosane. Une liste exhaustive des différents réticulants et de leur type de liaisons chimiques avec le chitosane a été établie par Fu *et al.* pour préparer des hydrogels intelligents qui réagissent à leur environnement ou se réparent [192]. Pellá *et al.* ont, quant à eux, analysé les hydrogels de chitosane pour les applications biomédicales [193]. Cette section présente une sélection d'entre eux et leurs applications.

Le type de liaison le plus courant est la liaison imine, également appelée base de Schiff, où un groupe aldéhyde réagit avec un groupe amine (FIG 1.25-a). Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde connu pour sa facilité de synthèse, son temps de réaction rapide et les conditions expérimentales peu contraignantes qu'il requiert. En effet, la réaction peut se faire à T_{amb} , sous agitation en quelques minutes pour des ratio molaires par rapport aux groupes amine du chitosane allant jusqu'à 0,307 [194]. Malheureusement, le glutaraldéhyde n'est pas bio-sourcé et présente une neurotoxicité en cas d'excès. Il a été démontré qu'une concentration de glutaraldéhyde supérieure à 8% en masse par rapport à la masse de polymère a des conséquences nocives sur la culture cellulaire [195]. Par conséquent, l'hydrogel doit être soigneusement purifié et contrôlé avant d'être utilisé dans un contexte biochimique, notamment dans des applications microfluidiques

biomédicales [194]. Un autre dialdéhyde qui a été envisagé est le PEG à terminaison dibenzaldéhyde, composé d'une chaîne PEG greffée avec des groupes aldéhyde à chaque extrémité de la chaîne polymère (FIG 1.25-a). Cet agent de réticulation a été utilisé pour fabriquer des hydrogels auto-cicatrisants [196] qui peuvent se réarranger pour compléter les parties manquantes de l'hydrogel. La réaction se fait en moins d'une minute en mélangeant 0,27 g de solution de 20% (w/v) de PEG avec 0,70 g d'une solution à 3% (w/v) de chitosane.

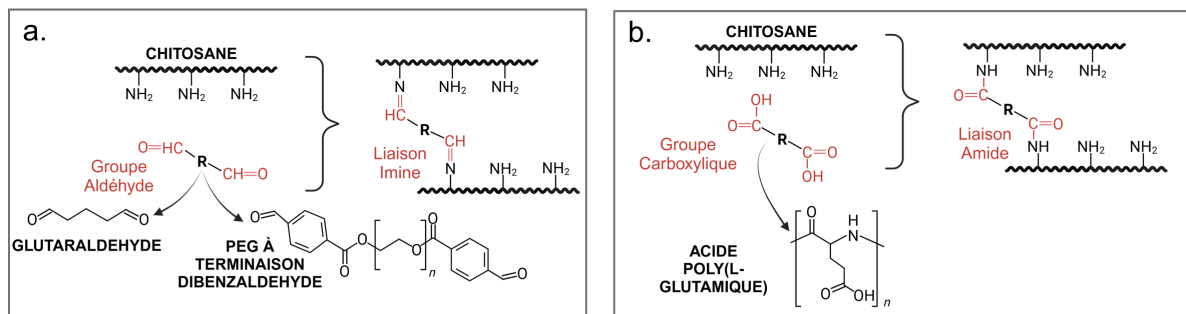


FIGURE 1.25 – (a) Réticulation du chitosane par un dialdéhyde; (b) Réticulation du chitosane par un diacide carboxylique.

Le groupe amine du chitosane peut également réagir avec un groupe acide carboxylique pour former une liaison amide (FIG 1.25-b). Un réticulant biocompatible est l'acide poly(L-glutamique) qui possède plusieurs fonctions d'acide carboxylique le long de sa chaîne. Ce dernier est dissous dans une solution basique dont le pH est ensuite ajusté à 6. Après activation des groupes carboxylique, la solution est mélangée avec une solution de chitosane pour un ratio molaire des groupes actifs de 1, conduisant à une gélification instantanée. L'hydrogel qui en résulte [197] est un matériau poreux, biodégradable, utilisé pour l'ingénierie spécifique des tissus cartilagineux en encourageant cette différenciation des cellules.

Le dernier type de liaison chimique permettant d'obtenir un hydrogel chimique est une amine secondaire. Elle est formée entre un groupe amine du chitosane et un groupe époxyde de l'agent de réticulation (FIG 1.26-a). Les hydrogels fabriqués à partir du 1,4-butanediol diglycidyl éther [198] ou du diepoxy-PEG [199] sont difficiles à utiliser en raison de la toxicité des groupes qui n'ont pas réagi.

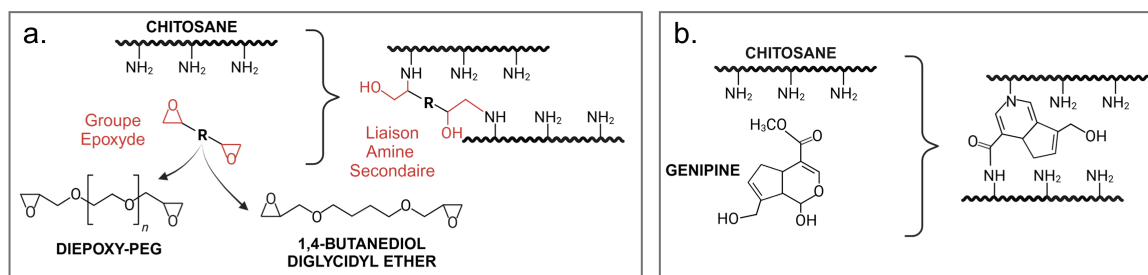


FIGURE 1.26 – (a) Réticulation du chitosane avec un diépoxyde; (b) Réticulation du chitosane avec de la génipine.

La génipine (FIG 1.26-b), un réticulant biocompatible et bio-sourcé extrait des fruits de gardénia employés dans la médecine traditionnelle orientale, a été aussi utilisé [200]. La liaison amide est formée à partir du groupe ester méthylique de la génipine tandis qu'une amine tertiaire est formée à partir du cycle dihydropyrane. Une solution de génipine est ajoutée à celle de chitosane, avec des ratios molaires en fonction des groupes amine du chitosane allant de 0,003 à 0,02. Après 70h   T_{amb} , un hydrogel qui a été produit présente un réseau plus compact [201] que l'hydrogel de glutaraldéhyde. Cette compacité pourrait permettre une diminution de la diffusion de solutions à travers l'hydrogel. Une autre méthode consiste à préparer des films de chitosane neutralisés avant de les immerger dans une solution au pH contrôlé contenant la génipine [202]. Cependant, la génipine peut également s'auto-polymériser au contact de l'air, ce qui donne à l'hydrogel une couleur bleue et diminue fortement la transparence [203]. Or, la transparence est nécessaire pour l'observation en direct des micro-objets dans des LoC.

IV.C.2.b. Hydrogels physiques

Un hydrogel physique est basé sur un réseau de chaînes polymères maintenues ensemble par des liaisons de faibles énergies qui sont partiellement réversibles. Il en résulte des hydrogels plus facilement biodégradables [204]. Leur assemblage est un équilibre entre les forces compétitives en jeu. De plus, la gélification dépend de l'enchevêtrement des chaînes polymères. Il existe donc une concentration critique en dessous de laquelle le chitosane ne peut pas créer de gel. Elle a été déterminée, pour une M_w supérieure à 350 kg.mol⁻¹, à 0,1% (w/v) de chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique [171].

Le premier type de liaison est basé sur des interactions électrostatiques. En effet, grâce à ses groupes amine proton s, le chitosane peut se lier à des molécules chargées négativement. Une distinction est faite en fonction de leur M_w , car les propriétés des hydrogels en sont dépendantes. D'une part, pour des anions, les propriétés de l'hydrogel ressemblent davantage à celles d'un hydrogel chimiquement réticulé car ils servent de pont entre 2 chaînes de chitosane (FIG 1.27-a). Cela inclut des molécules telles que les sulfates [205], les citrates [206] ou les phosphates [207] comme le tripolyphosphate de sodium (NaTPP). D'autre part, le chitosane peut former un complexe polyélectrolyte avec un polymère poly lectrolytique anionique (FIG 1.27-b). Ce peut être avec d'autres polysaccharides comme l'alginate [208], des protéines comme la fibroïne de soie ou le collagène [209] ou avec des polymères synthétiques comme les polyphosphates. Dans le cas de la fabrication de LoC  co-responsables, le choix d'une molécule ou polymère pour former un hydrogel avec le chitosane doit être réfléchi pour maintenir les propriétés d'origine bio-sourcée, de biocompatibilité et de biodégradabilité. Pour pouvoir obtenir un complexe, le pH des solutions contenant le chitosane et l'espèce chargée négativement doit être choisi dans les intervalles entre les pKa des deux polymères pour qu'ils soient tous les deux chargés électroniquement.

Le deuxième type de liaison est basé sur une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, comme illustré sur la FIG 1.27-c. Ces liaisons peuvent être cr ees selon deux méthodes.

La première méthode consiste à ajouter le même volume de 1,2-propan diol dans une

solution de chitosane [210, 211]. La différence de température d'ébullition conduit à l'évaporation de l'eau avant le 1,2-propanédiol (188°C). La présence d'alcool modifie l'équilibre hydrophile/hydrophobe ce qui favorise la formation d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogènes [171]. L'hydrogel est ensuite neutralisé avec une solution de 1 M NaOH pendant 1h ou par des vapeurs d'ammoniaque pour éviter toute nouvelle solubilisation. L'hydrogel est ensuite rincé pour laisser uniquement le chitosane et l'eau. Ce type d'hydrogels conserve leur biocompatibilité tout en ayant un réseau dense de mailles qui permet une diffusion passive [175, 212].

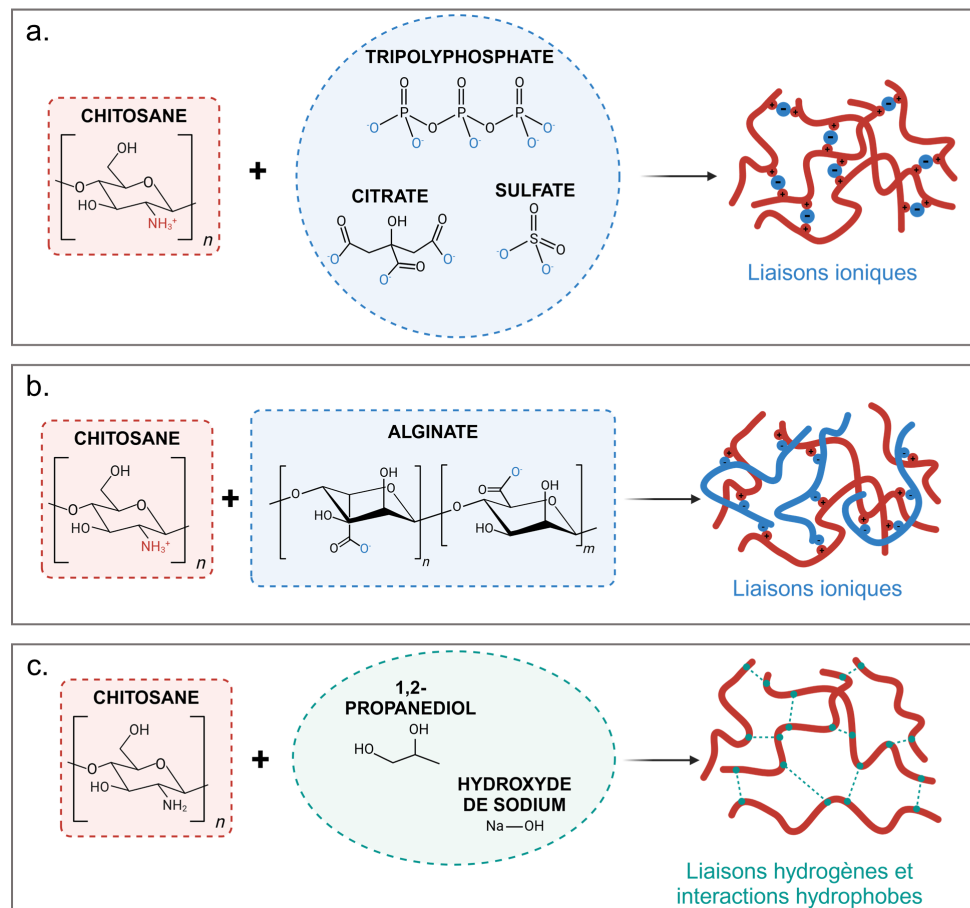


FIGURE 1.27 – Schéma des différentes liaisons physiques pour des hydrogels de chitosane.

La deuxième méthode consiste à ajouter de l'hydroxyde de sodium ou de mettre en contact une solution de chitosane avec des vapeurs d'ammoniaque [212]. L'hydrogel se forme grâce à la modification de l'état d'ionisation du chitosane. Cet hydrogel peut être utilisé pour la conservation du chitosane permettant sa redissolution dans une quantité d'acide plus faible que du chitosane en poudre [213]. Cependant, les bases fortes comme l'hydroxyde de sodium sont plus difficiles à rincer et les résidus diminuent la biocompatibilité, problématique dans le cas d'une application biomédicale [214]. C'est pourquoi Xu *et al.* [214] ont étudié l'utilisation d'une solution saline tampon de phosphate, du chlorure de sodium ou de l'albumine de sérum bovin pour augmenter le pH global de la solution.

IV.C.2.c. Propriétés des hydrogels

Les recherches concernant les hydrogels de chitosane sont principalement centrées autour de sa faculté de gonflement. En effet, en conditions biologiques, cela permet d'imiter la diffusion de nutriments à travers les tissus. De plus, si les propriétés dépendent de facteurs extérieurs comme la température ou le pH, il est possible de créer des systèmes intelligents relarguant des molécules encapsulées sur commande. Ainsi, les études se concentrent sur le gonflement, les propriétés mécaniques ou la porosité des hydrogels pour déterminer leur ressemblance aux tissus humains ou leur capacité à absorber et relarguer des molécules en réponse à des stimuli précis.

Les hydrogels chimiques offrent une stabilité dans le temps [215], une insolubilité dans l'eau ainsi que des propriétés mécaniques contrôlables en fonction des concentrations de réticulants. Par exemple, Mirzaei *et al.* ont observé une diminution considérable du gonflement de leurs hydrogels de chitosane obtenus en fonction de la quantité croissante de glutaraldéhyde, comme illustré dans la FIG 1.28-a [194]. Dans le cas de la réticulation de chitosane en présence de génipine FIG 1.28-b, Mi *et al.* ont également montré que le gonflement de l'hydrogel peut dépendre à la fois du pH de la solution pendant la réticulation [202] car cela influence le taux de réticulation de l'hydrogel, et du pH de la solution dans laquelle est immergé l'hydrogel [202] puisque le chitosane a plus d'affinité avec des solutions acides.

Concernant les propriétés mécaniques des hydrogels, il a été observé que pour une concentration plus importante de génipine, l'élongation des hydrogels augmente alors que la résistance à la traction diminue [194]. Les hydrogels avec PEG à terminaison dibenzaldéhyde utilisés comme capsules pour transporter des molécules captives présentent un relargage complet de ces molécules, rhodamine B ou lysozyme, en 1,5-2h [216].

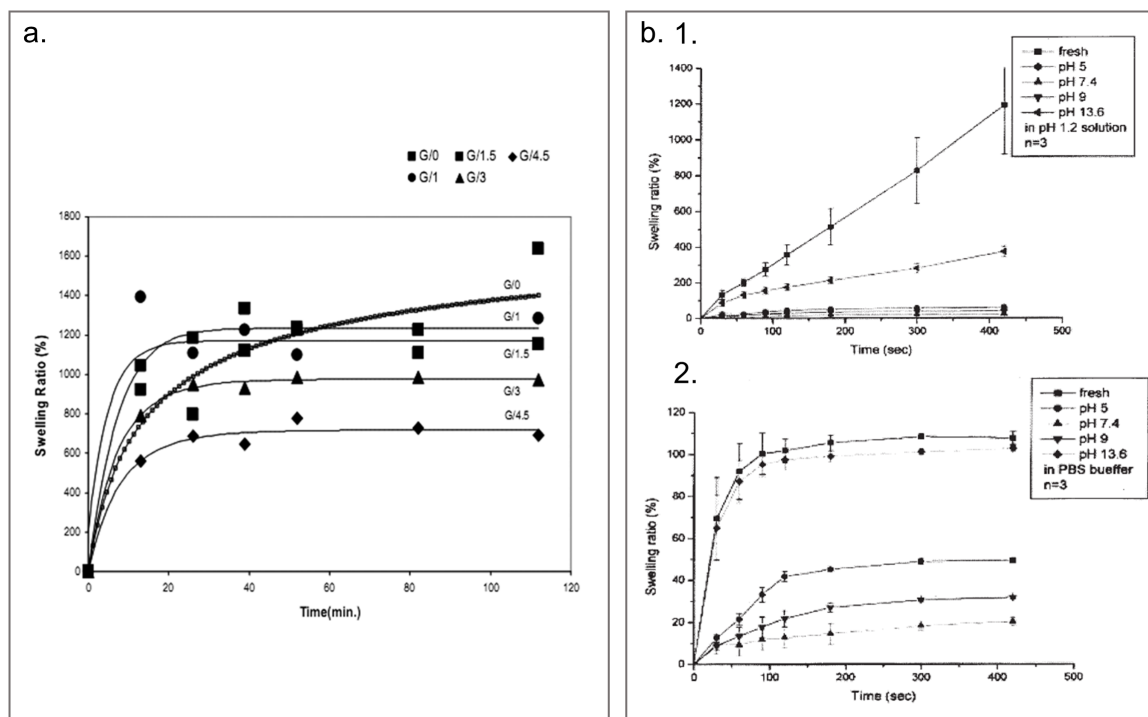


FIGURE 1.28 – (a) Gonflement dans l'eau d'hydrogels de chitosane réticulés avec des ratios de glutaraldéhyde / groupes amine du chitosane égaux à 0 (G/0), 0,068 (G/1), 0,102 (G/1.5), 0,205 (G/3) et 0,307 (G/4.5) [194]; (b) Gonflement pour des films de chitosane neutralisés par 1 M d'hydroxyde de sodium réticulés avec de la génipine à différents pH pendant l'immersion dans [1.] une solution aqueuse à pH=1,2 et [2.] du PBS à pH=7,4 [202].

Les hydrogels physiques sont insolubles tant que l'équilibre établi avec les interactions électrostatiques ou hydrogène/hydrophobes est maintenu. Si cet équilibre est perturbé, les interactions peuvent se rompre et les hydrogels se désagréger. Dans le cas d'hydrogels chitosane/citrate, par exemple, Shu *et al.* [206] ont montré la formation d'hydrogels uniquement dans une gamme de pH restreinte par l'état d'ionisation des deux molécules impliquées (FIG 1.29-a), avec une augmentation de la turbidité de la solution. Ce groupe a aussi confirmé que le relargage de chitosane augmentait dans des solutions à pH acide (FIG 1.29-b), indiquant une désagrégation de l'hydrogel. Ainsi, selon le pH et l'état d'ionisation des molécules, le gonflement de l'hydrogel chitosane/citrate varie (FIG 1.29-c) [206].

Kumar *et al.* [217] ont démontré, sur des hydrogels chitosane/NaTPP/citrate, une bonne corrélation entre la densité de réticulation et la diminution de leur gonflement. Le gonflement d'un hydrogel est lié à son absorption d'une solution. Xiao *et al.* [218] ont mesuré, sur des billes en hydrogel chitosane/alginate, une adsorption de bleu de Coomassie brillant (chargé négativement), de rhodamine B (chargé positivement) et d'hémoglobine avec des ratios respectifs de 1,0, 0,5 et 2,3 mg.g⁻¹.

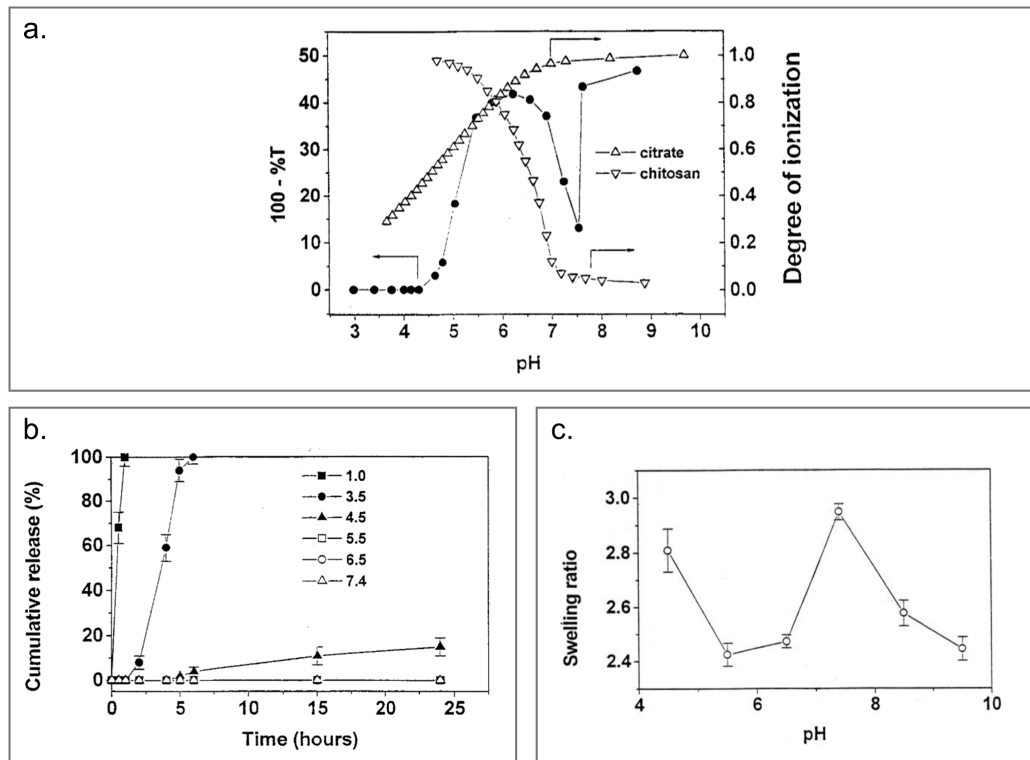


FIGURE 1.29 – (a) Courbes du degré d’ionisation du citrate et du chitosane, et courbe de titrage de la turbidité d’une solution de citrate/chitosane à 420 nm [206]; (b) Relargage de chitosane au cours du temps à partir d’hydrogels de chitosane/citrate dans des solutions de pH différents [206]; (c) Taux de gonflement (après stabilisation du gonflement) de l’hydrogel de citrate/chitosane dans des solutions à différents pH [206].

A notre connaissance, les hydrogels de chitosane n’ont pas été microstructurés, à part pour la formation de micro-capsules. Le gonflement des hydrogels physiques ou chimiques ainsi que leur absorption de molécules pourraient les rendre inadaptés pour la fabrication de canaux microfluidiques étanches. En effet, cela contribue à la diffusion des solutions injectées à travers les parois des canaux. Mais, des systèmes microfluidiques ont déjà été produits à partir d’hydrogels d’alginate et de soie (§III.C (Chap. 1) et §III.E (Chap. 1)), présentant des propriétés similaires.

V. Défis à relever pour fabriquer des LoC en chitosane et positionnement des travaux de thèse

Alors que les matériaux standards comme le PDMS ou les thermoplastiques peuvent être mis en forme pour obtenir des LoC avec des fonctions similaires, ils proviennent de l'industrie pétrochimique et leur dégradation par incinération ou dans des décharges contribuent au problème de pollution mondiale. Sachant que les LoC pour des applications biomédicales sont souvent destinés à un usage unique, le contexte environnemental oblige à rechercher une autre solution pour leur fabrication.

Dans ce chapitre, nous avons passé en revue quelques polymères bio-sourcés à partir desquels des systèmes microfluidiques ont déjà été fabriqués. Malgré leurs avantages respectifs, chaque matériau est limité dans sa gamme d'applications par certaines propriétés intrinsèques. Par conséquent, de nouveaux biomatériaux peuvent faire l'objet de recherches afin d'enrichir le panel d'applications disponibles.

Dans cette optique, le chitosane est apparu comme un candidat prometteur pour la fabrication de LoC. Ce polymère bio-sourcé est biocompatible, transparent et biodégradable. A notre connaissance, aucun film ou hydrogel de chitosane n'a été utilisé pour la fabrication de LoC.

Les principales applications des films de chitosane décrites précédemment concernent des revêtements de biocapteurs s'appuyant sur la fonctionnalisation du chitosane [219], des échafaudages pour la régénération cellulaire [151, 183] ou des emballages pour la conservation des aliments [220]. Toutefois, ces applications ne nécessitent en majorité que des films très fins (voir TAB 1.3) qui ne sont pas compatibles avec la fabrication de LoC. Ainsi, pour produire des films plus épais, les études ci-dessus apparaissent comme une ligne directrice plutôt que comme des procédés pouvant être directement appliqués à la production de LoC. Plusieurs méthodes de micro-structuration sont déjà effectives sur les films de chitosane. Un autre problème est l'étape de neutralisation nécessaire à leur résistance en présence d'eau mais qui modifie radicalement les propriétés mécaniques des films ainsi que leur forme. Une option serait de micro-structurer les films de chitosane après leur neutralisation pour ne pas déformer les structures. Des films fabriqués par électrodéposition dans les canaux microfluidiques sont capables de résister à des forces de cisaillement élevées, ce qui est prometteur pour les propriétés des canaux entièrement constitués de chitosane [189].

Les applications actuelles des hydrogels de chitosane dépendent de leur capacité de gonflement qui est contrôlée par des facteurs externes tels que le pH ou la température environnante. Cela permet aux hydrogels de délivrer ou de capturer des molécules dans des conditions spécifiques [215]. Le réseau souple de mailles des chaînes de polymères permet la diffusion des cellules et leur culture dans un échafaudage 3D qui offre une biocompatibilité, une résistance mécanique ajustable et une teneur en eau élevée [221, 222]. Cependant, cette perméabilité n'est pas favorable aux systèmes

microfluidiques, où les fluides et particules doivent circuler uniquement à l'intérieur des canaux. L'hydrogel gonfle au contact d'une solution aqueuse car la réticulation s'est produite lorsque les chaînes de polymères étaient déjà éloignées les unes des autres en raison de leur solvant. Ainsi, même après séchage, les chaînes de polymères sont capables de retrouver leur configuration initiale en laissant la solution combler les espaces entre les chaînes. Il serait envisageable de réticuler des films de chitosane après neutralisation [202], ce qui pourrait réduire le gonflement. En ce qui concerne la fabrication de LoC, à notre connaissance, aucune micro-structuration n'a été testée sur des hydrogels de chitosane.

Par conséquent, de nombreux défis restent à relever avant de parvenir à produire un LoC fonctionnel.

- Tout d'abord, le film ou hydrogel doit avoir une épaisseur suffisante (au moins quelques centaines de μm) pour permettre l'intégration de canaux de quelques dizaines de μm de hauteur.
- Le film ou hydrogel de chitosane doit avoir un gonflement faible ou nul en présence d'une solution aqueuse pour fournir des canaux étanches de dimensions constantes. Cela signifie qu'une étape de neutralisation ou de réticulation doit être incluse dans le processus de fabrication.
- Ensuite, un processus de micro-structuration tenant compte des contraintes de fabrication doit être mis en place pour produire des canaux.
- Enfin, une étape de collage pour sceller les canaux est également à développer. Cette dernière doit permettre l'injection de solutions aqueuses à des débits compatibles avec une large gamme d'applications microfluidiques.

L'objectif de cette thèse est de développer un procédé de fabrication d'un système microfluidique bio-sourcé et biodégradable afin de manipuler des cellules. Le système final doit donc être biocompatible. Dans la suite du manuscrit, nous commencerons par étudier les propriétés d'hydrogels et films de chitosane pour déterminer un protocole de fabrication compatible avec la réalisation de systèmes microfluidiques. Par la suite, nous présenterons les méthodes développées pour obtenir des LoC en chitosane. Finalement, nous aborderons le développement d'une application de culture cellulaire avec l'étude des méthodes de stérilisation et de la biocompatibilité du chitosane.

Bibliographie

- [1] A. Agrawal, R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorpbeh, and C. M. Hussain, “Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry,” *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 143, p. 116383, 2021.
- [2] P. S. Dittrich and A. Manz, “Lab-on-a-chip : Microfluidics in drug discovery,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, pp. 210–218, 2006.
- [3] D. Huh, W. Gu, Y. Kamotani, J. B. Grotberg, and S. Takayama, “Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles,” *Physiological Measurement*, vol. 26, 2005.
- [4] S. Büyüktiryaki, Y. Sümbelli, R. Keçili, and C. M. Hussain, *Lab-on-chip platforms for environmental analysis*. Elsevier, 2019, pp. 267–273.
- [5] S. K. Sia and G. M. Whitesides, “Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies,” *Electrophoresis*, vol. 24, pp. 3563–3576, 2003.
- [6] A. R. Wheeler, W. R. Throdsset, R. J. Whelan, A. M. Leach, R. N. Zare, Y. H. Liao, K. Farrell, I. D. Manger, and A. Daridon, “Microfluidic device for single-cell analysis,” *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 3581–3586, 2003.
- [7] H. Becker and C. Gärtner, “Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, pp. 89–111, 2008.
- [8] F. Foret, P. Smejkal, and M. Macka, *Miniaturization and Microfluidics*. Elsevier Inc., 2013, pp. 453–467.
- [9] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, “Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, pp. 491–499, 2002.
- [10] P. Mela, A. van den Berg, Y. Fintschenko, E. B. Cummings, B. A. Simmons, and B. J. Kirby, “The zeta potential of cyclo-olefin polymer microchannels and its effects on insulative (electrodeless) dielectrophoresis particle trapping devices,” *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 1792–1799, 2005.
- [11] Y. Chartier, *Safe management of wastes from health-care activities*. World Health Organization, 2014.
- [12] A. E. Ongaro, Z. Ndlovu, E. Sollier, C. Otieno, P. Ondoa, A. Street, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Engineering a sustainable future for point-of-care diagnostics and single-use microfluidic devices,” *Lab on a Chip*, vol. 22, pp. 3122–3137, 2022.
- [13] M. Kaisler, L. A. M. V. D. Broek, and C. G. Boeriu, *Chitin and Chitosan as Sources of Bio-Based Building Blocks and Chemicals*, first edition ed. John Wiley & Sons Ltd, 2020, pp. 229–244.
- [14] ONU, “Pollution Plastique,” , Dernier accès : 2024-08-24.
- [15] OCDE, “La pollution plastique ne cesse de croître tandis que la gestion et le recyclage des déchets sont à la traîne, selon l’OCDE,” , 2022, Dernier accès : 2024-08-24.
- [16] N. Singh, O. A. Ogunseitan, and Y. Tang, “Medical waste : Current challenges and future opportunities for sustainable management,” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 52, pp. 2000–2022, 2022.
- [17] Markets and Markets, “Point of Care Diagnostics Market by Product (Glucose,HIV,Hepatitis C,Pregnancy), Platform (Microfluid-ics,Dipstick,Immunoassay), Purchase (OTC,Prescription), Sample (Blood,Urine), End User (Pharma-cy,Hospital,Homecare) & Region - Global Forecast to 2027,” , Dernier accès : 2022-12-01.

- [18] OMS, “Global analysis of health care waste in the context of COVID-19 - Status, impacts and recommendations,” , Dernier accès : 2022-02-01.
- [19] R. Wittenauer, S. Nowak, and N. Luter, “Price, quality, and market dynamics of malaria rapid diagnostic tests : analysis of global fund 2009–2018 data,” *Malaria Journal*, vol. 21, 2022.
- [20] M. Pai and J. Furin, “Point of view : Tuberculosis innovations mean little if they cannot save lives,” *eLife*, vol. 6, p. e25956, 2017.
- [21] G. Core, “Lab-on-a-chip—fostering a sustainable future,” *Frontiers in Lab on a Chip Technologies*, vol. 2, 2023.
- [22] R. E. Oosterbroek and A. Van den Berg, *Lab-on-a-chip : miniaturized systems for (bio) chemical analysis and synthesis*. Elsevier, 2003.
- [23] A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Liidi, and H. M. Widmer, “Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems capillary electrophoresis on a chip,” *Journal of Chromatography*, vol. 593, pp. 253–258, 1992.
- [24] K. F. Jensen, “Silicon-based microchemical systems : characteristics and applications,” *MRS bulletin*, vol. 31, no. 2, pp. 101–107, 2006.
- [25] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, pp. 368–373, 2006.
- [26] A. Manz and H. Becker, *Microsystem technology in chemistry and life sciences*. Springer Science & Business Media, 2003.
- [27] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. Schueller, and G. M. Whitesides, “Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),” *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4974–4984, 1998.
- [28] F. Hua, A. Gaur, Y. Sun, M. Word, N. Jin, I. Adesida, M. Shim, A. Shim, and J. A. Rogers, “Processing dependent behavior of soft imprint lithography on the 1-10-nm scale,” in *IEEE Transactions on Nanotechnology*, vol. 5, 2006, pp. 301–307.
- [29] B. Jiang, H. Guo, D. Chen, and M. Zhou, “Microscale investigation on the wettability and bonding mechanism of oxygen plasma-treated PDMS microfluidic chip,” *Applied Surface Science*, vol. 574, 2022.
- [30] K. Haubert, T. Drier, and D. Beebe, “PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system,” *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 1548–1549, 2006.
- [31] T. Glawdel and C. L. Ren, “Electro-osmotic flow control for living cell analysis in microfluidic PDMS chips,” *Mechanics Research Communications*, vol. 36, pp. 75–81, 2009.
- [32] E. Berthier, E. W. Young, and D. Beebe, “Engineers are from pdms-land, biologists are from polystyrenia,” *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 1224–1237, 2012.
- [33] Y. Wang and T. P. Burghardt, “Uncured PDMS inhibits myosin in vitro motility in a microfluidic flow cell,” *Analytical Biochemistry*, vol. 563, pp. 56–60, 2018.
- [34] M. I. Mohammed, S. Haswell, and I. Gibson, “Lab-on-a-chip or chip-in-a-lab : Challenges of commercialization lost in translation,” *Procedia Technology*, vol. 20, pp. 54–59, 2015.
- [35] K. Giri and C. W. Tsao, “Recent advances in thermoplastic microfluidic bonding,” *Micromachines*, vol. 13, 2022.
- [36] A. Subramaniam and S. Sethuraman, “Biomedical applications of nondegradable polymers,” in *Natural and synthetic biomedical polymers*. Elsevier, 2014, pp. 301–308.
- [37] H. Becker and L. E. Locascio, “Polymer microfluidic devices,” *Talanta*, vol. 56, pp. 267–287, 2002.

- [38] A. Kolew, D. Münch, K. Sikora, and M. Worgull, "Hot embossing of micro and sub-micro structured inserts for polymer replication," *Microsystem technologies*, vol. 17, pp. 609–618, 2011.
- [39] C. A. Mills, E. Martinez, F. Bessueille, G. Villanueva, J. Bausells, J. Samitier, and A. Errachid, "Production of structures for microfluidics using polymer imprint techniques," in *Microelectronic Engineering*, vol. 78-79, 2005, pp. 695–700.
- [40] J. P. Hulme, S. Mohr, N. J. Goddard, and P. R. Fielden, "Rapid prototyping for injection moulded integrated microfluidic devices and diffractive element arrays," *Lab on a Chip*, vol. 2, no. 4, pp. 203–206, 2002.
- [41] C. G. Khan Malek, "Laser processing for bio-microfluidics applications (part 1)," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 385, pp. 1351–1361, 2006.
- [42] —, "Laser processing for bio-microfluidics applications (part 2)," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 385, pp. 1362–1369, 2006.
- [43] D. L. Pugmire, E. A. Waddell, R. Haasch, M. J. Tarlov, and L. E. Locascio, "Surface characterization of laser-ablated polymers used for microfluidics," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 871–878, 2002.
- [44] D. Khorsandi, M. Nodehi, T. Waqar, M. Shabani, B. Kamare, E. N. Zare, S. Ersoy, M. Annabestani, M. F. Çelebi, and A. Kafadenk, "Manufacturing of microfluidic sensors utilizing 3d printing technologies : A production system," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2021, 2021.
- [45] G. Gonzalez, I. Roppolo, C. F. Pirri, and A. Chiappone, "Current and emerging trends in polymeric 3D printed microfluidic devices," *Additive Manufacturing*, vol. 55, 2022.
- [46] M. D. Nelson, N. Ramkumar, and B. K. Gale, "Flexible, transparent, sub-100 µm microfluidic channels with fused deposition modeling 3D-printed thermoplastic polyurethane," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 29, 2019.
- [47] F. Kotz, M. Mader, N. Dellen, P. Risch, A. Kick, D. Helmer, and B. E. Rapp, "Fused deposition modeling of microfluidic chips in polymethylmethacrylate," *Micromachines*, vol. 11, 2020.
- [48] D. E. Powell, R. B. Annelin, and R. H. Gallavan, "Silicone in the environment : A worst-case assessment of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) in sediments," *Environmental Science and Technology*, vol. 33, pp. 3706–3710, 1999.
- [49] J. E. Mark, H. R. Allcock, and R. West, *Inorganic polymers*. Oxford University Press, 2005.
- [50] B. Laubie, "Dégradation bio-physico-chimique des élastomères silicones influence du catalyseur de polycondensation et impacts environnementaux," Ph.D. dissertation, INSA Lyon, 2012. [Online]. Available : <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2012ISAL0095/these.pdf>
- [51] K. Mojsiewicz-Pieńkowska, "Safety and toxicity aspects of polysiloxanes (silicones) applications," in *Concise Encyclopedia of High Performance Silicones*, A. Tiwari, M. D. Soucek, and K. Pieńkowska, Eds. Wiley, 2014, pp. 243–251.
- [52] W. Bauer Jr, "Methacrylic acid and derivatives," *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 2000.
- [53] V. Serini, "Polycarbonates," *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 2000.
- [54] J. Scheirs and D. B. Priddy, *Modern Styrenic Polymers : Polystyrenes and Styrenic Copolymers*. Wiley Online Library, 2003.
- [55] J. U. Shin, J. I. Park, C. Liu, J. He, and S. C. Kim, "Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers (IUPAC technical report)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 77, pp. 801–814, 2005.
- [56] F. Liu, H. Q. Liu, G. X. Wei, R. Zhang, T. T. Zeng, G. S. Liu, and J. H. Zhou, "Characteristics and treatment methods of medical waste incinerator fly ash : A review," *Processes*, vol. 6, 2018.

- [57] A. M. Wan, D. Devadas, and E. W. Young, “Recycled polymethylmethacrylate (PMMA) microfluidic devices,” *Sensors and Actuators, B : Chemical*, vol. 253, pp. 738–744, 2017.
- [58] A. E. Ongaro, N. Howarth, V. La Carrubba, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Rapid prototyping for micro-engineering and microfluidic applications : Recycled PMMA, a sustainable substrate material,” in *Advances in manufacturing technology XXXII*. IOS Press, 2018, pp. 107–112.
- [59] V. Popescu, C. Vasile, M. Brebu, G. L. Popescu, M. Moldovan, C. Prejmerean, L. Stănuț, C. Trișcă-Rusu, and I. Cojocaru, “The characterization of recycled PMMA,” *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 483, pp. 432–436, 2009.
- [60] L. Descamps, D. L. Roy, and A. L. Deman, “Microfluidic-based technologies for CTC isolation : A review of 10 years of intense efforts towards liquid biopsy,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, 2022.
- [61] M. Faivre, C. Renoux, A. Bessaa, L. D. Costa, P. Joly, A. Gauthier, and P. Connes, “Mechanical signature of red blood cells flowing out of a microfluidic constriction is impacted by membrane elasticity, cell surface-to-volume ratio and diseases,” *Frontiers in Physiology*, vol. 11, 2020.
- [62] W. Sun, Z. Luo, J. Lee, H.-J. Kim, K. Lee, P. Tebon, Y. Feng, M. R. Dokmeci, S. Sengupta, and A. Khademhosseini, “Organ-on-a-chip for cancer and immune organs modeling,” *Advanced healthcare materials*, vol. 8, no. 4, p. 1801363, 2019.
- [63] Y. Zhu, X. Meng, Y. Chen, J. Li, H. Shao, Y. Lu, L. Pan, Y. Xu, and J. Cheng, “Self-served and fully automated biochemical detection of finger-prick blood at home using a portable microfluidic analyzer,” *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 303, p. 127235, 2020.
- [64] J. Liu, Z. Geng, Z. Fan, J. Liu, and H. Chen, “Point-of-care testing based on smartphone : The current state-of-the-art (2017-2018),” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 132, pp. 17–37, 2019.
- [65] C. Lee, S. Kumar, J. Park, Y. Choi, E. M. Clarissa, and Y.-K. Cho, “Tonicity-induced cargo loading into extracellular vesicles,” *Lab on a Chip*, vol. 24, no. 7, pp. 2069–2079, 2024.
- [66] D. Citterio, “Paper microfluidics : Design, manufacture, application,” workshop 9 de MicroTAS 2023.
- [67] K. Yamada, H. Shibata, K. Suzuki, and D. Citterio, “Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics : state-of-the-art and challenges,” *Lab on a Chip*, vol. 17, no. 7, pp. 1206–1249, 2017.
- [68] R. Lausecker, V. Badilita, U. Gleißner, and U. Wallrabe, “Introducing natural thermoplastic shellac to microfluidics : A green fabrication method for point-of-care devices,” *Biomicrofluidics*, vol. 10, 2016.
- [69] K. Yamada, T. G. Henares, K. Suzuki, and D. Citterio, “Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 54, no. 18, pp. 5294–5310, 2015.
- [70] R. C. Nnachi, N. Sui, B. Ke, Z. Luo, N. Bhalla, D. He, and Z. Yang, “Biosensors for rapid detection of bacterial pathogens in water, food and environment,” *Environment International*, vol. 166, p. 107357, 2022.
- [71] L. Ge, S. Wang, X. Song, S. Ge, and J. Yu, “3D origami-based multifunction-integrated immunodevice : Low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device,” *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 17, pp. 3150–3158, 2012.
- [72] Z. Nie, F. Deiss, X. Liu, O. Akbulut, and G. M. Whitesides, “Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers,” *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 22, pp. 3163–3169, 2010.
- [73] J. I. Hong and B.-Y. Chang, “Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays,” *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 10, pp. 1725–1732, 2014.

- [74] K. Olejnik, *Water Consumption in Paper Industry – Reduction Capabilities and the Consequences*. Springer Science and Business Media B.V., 2011, pp. 113–129.
- [75] A. E. Ongaro, N. M. Howarth, V. L. Carrubba, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Fast and green : Sustainable rapid-prototyping of microfluidic chips on polylactic acid substrates,” in *MicroTAS*, 2018.
- [76] A. E. Ongaro, I. Keraite, A. Liga, G. Conoscenti, S. Coles, H. Schulze, T. T. Bachmann, K. Parvez, C. Casiraghi, N. Howarth, V. L. Carubba, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Laser ablation of poly(lactic acid) sheets for the rapid prototyping of sustainable, single-use, disposable medical microcomponents,” *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, vol. 6, pp. 4899–4908, 2018.
- [77] J.-H. Huang, J. Kim, Y. Ding, A. Jayaraman, and V. M. Ugaz, “Embedding synthetic microvascular networks in poly (lactic acid) substrates with rounded cross-sections for cell culture applications,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73188, 2013.
- [78] A. E. Ongaro, D. D. Giuseppe, A. Kermanizadeh, A. M. Crespo, A. Mencattini, L. Ghibelli, V. Mancini, K. L. Wlodarczyk, D. P. Hand, E. Martinelli, V. Stone, N. Howarth, V. L. Carrubba, V. Pensabene, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Polylactic is a sustainable, low absorption, low autofluorescence alternative to other plastics for microfluidic and organ-on-chip applications,” *Analytical Chemistry*, vol. 92, pp. 6693–6701, 2020.
- [79] A. M. Tohill, M. Partridge, S. W. James, and R. P. Tatum, “Fabrication and optimisation of a fused filament 3d-printed microfluidic platform,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 27, no. 3, p. 035018, 2017.
- [80] A. R. Bagheri, C. Laforsch, A. Greiner, and S. Agarwal, “Fate of so-called biodegradable polymers in seawater and freshwater,” *Global Challenges*, vol. 1, 2017.
- [81] N. K. Kalita, M. K. Nagar, C. Mudenur, A. Kalamdhad, and V. Katiyar, “Biodegradation of modified poly(lactic acid) based biocomposite films under thermophilic composting conditions,” *Polymer Testing*, vol. 76, pp. 522–536, 2019.
- [82] S. Chen, M. Liu, H. Huang, L. Cheng, and H. P. Zhao, “Mechanical properties of bombyx mori silkworm silk fibre and its corresponding silk fibroin filament : A comparative study,” *Materials and Design*, vol. 181, 2019.
- [83] B. P. Partlow, C. W. Hanna, J. Rnjak-Kovacina, J. E. Moreau, M. B. Applegate, K. A. Burke, B. Marelli, A. N. Mitropoulos, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, “Highly tunable elastomeric silk biomaterials,” *Advanced Functional Materials*, vol. 24, pp. 4615–4624, 2014.
- [84] K. H. Wong, J. M. Chan, R. D. Kamm, and J. Tien, “Microfluidic models of vascular functions,” *Annual review of biomedical engineering*, vol. 14, no. 1, pp. 205–230, 2012.
- [85] M. B. Applegate, J. Coburn, B. P. Partlow, J. E. Moreau, J. P. Mondia, B. Marelli, D. L. Kaplan, and F. G. Omenetto, “Laser-based three-dimensional multiscale micropatterning of biocompatible hydrogels for customized tissue engineering scaffolds,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 39, pp. 12 052–12 057, 2015.
- [86] S. Zhao, Y. Chen, B. P. Partlow, A. S. Golding, P. Tseng, J. Coburn, M. B. Applegate, J. E. Moreau, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, “Bio-functionalized silk hydrogel microfluidic systems,” *Biomaterials*, vol. 93, pp. 60–70, 2016.
- [87] P. Domachuk, K. Tsioris, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, “Bio-microfluidics : Biomaterials and biomimetic designs,” *Advanced Materials*, vol. 22, pp. 249–260, 2010.
- [88] M. L. Lovett, C. M. Cannizzaro, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, “Gel spinning of silk tubes for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 35, pp. 4650–4657, 2008.
- [89] L. Lu, W. Fan, S. Ge, R. K. Liew, Y. Shi, H. Dou, S. Wang, and S. S. Lam, “Progress in recycling and valorization of waste silk,” *Science of the Total Environment*, vol. 830, p. 154812, 2022.

- [90] A. Seves, M. Romano, T. Maifreni, S. Sora, and O. Ciferri, “The microbial degradation of silk : a laboratory investigation,” *International Biodegradation & Biodegradation*, vol. 42, pp. 203–211, 1998.
- [91] C. B. de Almeida, K. T. Catelam, M. L. Cornélio, and J. F. L. Filho, “Morphological and structural characteristics of zein biofilms with added xanthan gum,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 48, pp. 19–27, 2010.
- [92] J. Dong, Q. Sun, and J.-Y. Wang, “Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4691–4697, 2004.
- [93] E. Corradini, P. S. Curti, A. B. Meniqueti, A. F. Martins, A. F. Rubira, and E. C. Muniz, “Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, pp. 22 438–22 470, 2014.
- [94] H. Madeka and J. Kokini, “Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein : Development of a preliminary state diagram,” *Cereal Chemistry*, vol. 73, no. 4, pp. 433–438, 1996.
- [95] J. Luecha, A. Hsiao, S. Brodsky, G. L. Liu, and J. L. Kokini, “Green microfluidic devices made of corn proteins,” *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 3419–3425, 2011.
- [96] B. Altunakar, J. Luecha, and J. Kokini, “Fabrication of biodegradable zein films by using soft lithography,” in *Proceedings of nanotechnology conference, Anaheim*, vol. 2, 2010, pp. 253–256.
- [97] C. Liu, Y. Chen, X. Wang, J. Huang, P. R. Chang, and D. P. Anderson, “Improvement in physical properties and cytocompatibility of zein by incorporation of pea protein isolate,” *Journal of materials science*, vol. 45, pp. 6775–6785, 2010.
- [98] P. G. Gezer, S. Brodsky, A. Hsiao, G. L. Liu, and J. L. Kokini, “Modification of the hydrophilic/hydrophobic characteristic of zein film surfaces by contact with oxygen plasma treated PDMS and oleic acid content,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 135, pp. 433–440, 2015.
- [99] J. W. Lawton, “Plasticizers for zein : Their effect on tensile properties and water absorption of zein films,” *Cereal Chemistry*, vol. 81, pp. 1–5, 2004.
- [100] Y. L. Han, Q. Xu, Z. Q. Lu, and J. Y. Wang, “Preparation of transparent zein films for cell culture applications,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 120, pp. 55–62, 2014.
- [101] K. E. Spence, J.-L. Jane, and A. L. Pometto, “Dialdehyde starch and zein plastic : Mechanical properties and biodegradability,” *Journal of Environmental Polymer Degradation*, vol. 3, pp. 69–74, 1995.
- [102] I. S. Bayer, *Zein in Food Packaging*. Wiley, 2021, pp. 199–224.
- [103] H. Bojorges, A. López-Rubio, A. Martínez-Abad, and M. J. Fabra, “Overview of alginate extraction processes : Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 140, 2023.
- [104] K. Mikula, D. Skrzypczak, B. Ligas, and A. Witek-Krowiak, “Preparation of hydrogel composites using Ca²⁺ and Cu²⁺ ions as crosslinking agents,” *SN Applied Sciences*, vol. 1, 2019.
- [105] J. L. Drury, R. G. Dennis, and D. J. Mooney, “The tensile properties of alginate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 3187–3199, 2004.
- [106] R. Russo, M. Malinconico, and G. Santagata, “Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 3193–3197, 2007.
- [107] Y. Yajima, M. Yamada, E. Yamada, M. Iwase, and M. Seki, “Facile fabrication processes for hydrogel-based microfluidic devices made of natural biopolymers,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, 2014.

- [108] Q. Gao, Y. He, J.-z. Fu, A. Liu, and L. Ma, “Coaxial nozzle-assisted 3d bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery,” *Biomaterials*, vol. 61, pp. 203–215, 2015.
- [109] N. W. Choi, M. Cabodi, B. Held, J. P. Gleghorn, L. J. Bonassar, and A. D. Stroock, “Microfluidic scaffolds for tissue engineering,” *Nature materials*, vol. 6, no. 11, pp. 908–915, 2007.
- [110] M. Cabodi, N. W. Choi, J. P. Gleghorn, C. S. Lee, L. J. Bonassar, and A. D. Stroock, “A microfluidic biomaterial,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 40, pp. 13 788–13 789, 2005.
- [111] C. Lee, J. Shin, J. S. Lee, E. Byun, J. H. Ryu, S. H. Um, D. I. Kim, H. Lee, and S. W. Cho, “Bioinspired, calcium-free alginate hydrogels with tunable physical and mechanical properties and improved biocompatibility,” *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 2004–2013, 2013.
- [112] D. Shahriari, J. Koffler, D. A. Lynam, M. H. Tuszynski, and J. S. Sakamoto, “Characterizing the degradation of alginate hydrogel for use in multilumen scaffolds for spinal cord repair,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 104, no. 3, pp. 611–619, 2016.
- [113] P. Gacesa, “Enzymic degradation of alginates,” *Int. J. Biochem*, vol. 24, pp. 545–552, 1992.
- [114] Y. N. Phang, S. Y. Chee, C. O. Lee, and Y. L. Teh, “Thermal and microbial degradation of alginate-based superabsorbent polymer,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 96, pp. 1653–1661, 2011.
- [115] M. Ayala, M. Thomsen, and M. Pizzol, “Life cycle assessment of pilot scale production of seaweed-based bioplastic,” *Algal Research*, vol. 71, 2023.
- [116] Y. Yuan, N. He, Q. Xue, Q. Guo, L. Dong, M. H. Haruna, X. Zhang, B. Li, and L. Li, “Shellac : A promising natural polymer in the food industry,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 109, pp. 139–153, 2021.
- [117] S. Ghoshal, M. A. Khan, F. Gul-E-Noor, and R. A. Khan, “Gamma radiation induced biodegradable shellac films treated by acrylic monomer and ethylene glycol,” *Journal of Macromolecular Science, Part A : Pure and Applied Chemistry*, vol. 46, pp. 975–982, 2009.
- [118] M. Yang, Y. Wang, F. Yue, F. Jing, L. Qin, D. Xie, Y. Zhao, N. Huang, B. Akhavan, and Y. Leng, “Shellac : a bioactive coating for surface engineering of cardiovascular devices,” *Advanced Materials Interfaces*, vol. 9, no. 19, p. 2200273, 2022.
- [119] Y. Sunakawa, M. Kondo, Y. Yamamoto, T. Inomata, Y. Inoue, D. Mori, and T. Mizuno, “Design of cell-adhesive shellac derivatives and endowment of photoswitchable cell-adhesion properties,” *ACS Applied Bio Materials*, vol. 6, no. 12, pp. 5493–5501, 2023.
- [120] T. Farid, M. I. Rafiq, A. Ali, and W. Tang, “Transforming wood as next-generation structural and functional materials for a sustainable future,” *EcoMat*, vol. 4, 2022.
- [121] J. Song, C. Chen, C. Wang, Y. Kuang, Y. Li, F. Jiang, Y. Li, E. Hitz, Y. Zhang, B. Liu *et al.*, “Superflexible wood,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 9, no. 28, pp. 23 520–23 527, 2017.
- [122] E. E. Thybring and M. Fredriksson, “Wood modification as a tool to understand moisture in wood,” *Forests*, vol. 12, no. 3, p. 372, 2021.
- [123] A. Andar, M. S. Hasan, V. Srinivasan, M. Al-Adhami, E. Gutierrez, D. Burgenson, X. Ge, L. Tolosa, Y. Kostov, and G. Rao, “Wood microfluidics,” *Analytical Chemistry*, vol. 91, pp. 11 004–11 012, 2019.
- [124] M. Zhu, J. Song, T. Li, A. Gong, Y. Wang, J. Dai, Y. Yao, W. Luo, D. Henderson, and L. Hu, “Highly anisotropic, highly transparent wood composites,” *Advanced Materials*, vol. 28, pp. 5181–5187, 2016.
- [125] S. Thakur, M. Misra, and A. K. Mohanty, “Sustainable hydrophobic and moisture-resistant coating derived from downstream corn oil,” *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, vol. 7, pp. 8766–8774, 2019.

- [126] G. Crini, "Historical review on chitin and chitosan biopolymers," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 17, pp. 1623–1643, 2019.
- [127] F. Khoushab and M. Yamabhai, "Chitin research revisited," *Marine Drugs*, vol. 8, pp. 1988–2012, 2010.
- [128] G. Crini, *Historical Landmarks in the Discovery of Chitin*. Cham : Springer International Publishing, 2019, pp. 1–47.
- [129] J. G. Fernandez and D. E. Ingber, "Bioinspired chitinous material solutions for environmental sustainability and medicine," *Advanced Functional Materials*, vol. 23, pp. 4454–4466, 2013.
- [130] M. N. V. R. Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *Reactive & Functional Polymers*, vol. 46, pp. 1–27, 2000.
- [131] I. Younes and M. Rinaudo, "Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications," *Marine Drugs*, vol. 13, pp. 1133–1174, 2015.
- [132] D. Elieh-Ali-Komi, M. R. Hamblin, and E.-A.-K. Daniel, "Chitin and chitosan : Production and application of versatile biomedical nanomaterials," *Int J Adv Res (Indore)*, vol. 4, pp. 411–427, 2016.
- [133] V. Ghormade, E. K. Pathan, and M. V. Deshpande, "Can fungi compete with marine sources for chitosan production?" *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 104, pp. 1415–1421, 2017.
- [134] C. D. Poeloengasih and M. Angwar, "Isolation and characterization of chitin and chitosan note prepared under various processing times," *Indo. J. Chem*, vol. 8, pp. 189–192, 2008.
- [135] I. Muñoz, C. Rodríguez, D. Gillet, and B. M. Moerschbacher, "Life cycle assessment of chitosan production in india and europe," *International Journal of Life Cycle Assessment*, vol. 23, pp. 1151–1160, 2018.
- [136] X. Chen, H. Yang, and N. Yan, "Shell biorefinery : dream or reality?" *Chemistry–A European Journal*, vol. 22, no. 38, pp. 13402–13421, 2016.
- [137] P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, and A. Domard, "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan," *Biomacromolecules*, vol. 2, no. 3, pp. 765–772, 2001.
- [138] R. Roux, "Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane," Ph.D. dissertation, Université Claude Bernard, 2013. [Online]. Available : <https://theses.hal.science/tel-01174097>
- [139] I. Kardas, M. H. Struszczyk, M. Kucharska, L. A. Broek, J. E. van Dam, and D. Ciechańska, *Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications*. Springer-Verlag Vienna, 2012, pp. 329–373.
- [140] H. Yi, L. Q. Wu, W. E. Bentley, R. Ghodssi, G. W. Rubloff, J. N. Culver, and G. F. Payne, "Biofabrication with chitosan," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 2881–2894, 2005.
- [141] K. M. Varum, M. H. Ottoy, and O. Smidsrod, "Acid hydrolysis of chitosans," *Carbohydrate Polymers*, vol. 46, pp. 89–98, 2001.
- [142] A. Osorio-Madrado, L. David, S. Trombotto, J. M. Lucas, C. Peniche-Covas, and A. Domard, "Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan : Evolution of the crystallinity and macromolecular structure," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1376–1386, 2010.
- [143] I. Aranaz, A. R. Alcántara, M. C. Civera, C. Arias, B. Elorza, A. Heras Caballero, and N. Acosta, "Chitosan : An overview of its properties and applications," *Polymers*, vol. 13, no. 19, p. 3256, 2021.

- [144] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, and A. Domard, "Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution," *Biomacromolecules*, vol. 4, pp. 641–648, 2003.
- [145] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, "Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine," *BioMed Research International*, vol. 2015, 2015.
- [146] P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, 1953.
- [147] J. C. Cheng, T. H. Cauley, and A. P. Pisano, "Lithographic patterning of immobilized enzymes in chitosan thin films for multi-layer, chemical/biological sensors," in *2007 7th IEEE International Conference on Nanotechnology - IEEE-NANO 2007, Proceedings*, 2007, pp. 334–337.
- [148] I. Park, J. Cheng, A. P. Pisano, E. S. Lee, and J. H. Jeong, "Low temperature, low pressure nanoimprinting of chitosan as a biomaterial for bionanotechnology applications," *Applied Physics Letters*, vol. 90, 2007.
- [149] I. Fernández-Pan, K. Ziani, R. Pedroza-Islas, and J. I. Maté, "Effect of drying conditions on the mechanical and barrier properties of films based on chitosan," *Drying Technology*, vol. 28, pp. 1350–1358, 2010.
- [150] Q. He, Q. Ao, Y. Gong, and X. Zhang, "Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 22, pp. 2791–2802, 2011.
- [151] M. Mattotti, Z. Alvarez, L. Delgado, M. A. Mateos-Timoneda, C. Aparicio, J. A. Planell, S. Alcántara, and E. Engel, "Differential neuronal and glial behavior on flat and micro patterned chitosan films," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 158, pp. 569–577, 2017.
- [152] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, J. Blumling, C. F. Wang, D. S. Kohane, and R. Langer, "Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5259–5267, 2006.
- [153] S. B. Rao and C. P. Sharma, "Use of chitosan as a biomaterial : Studies on its safety and hemostatic potential," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 34, pp. 21–28, 1997.
- [154] W. Wang, S. Itoh, A. Matsuda, S. Ichinose, K. Shinomiya, Y. Hata, and J. Tanaka, "Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration," *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 84, no. 2, pp. 557–566, 2008.
- [155] C. Chatelet, O. Damour, and A. Domard, "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 261–268, 2001.
- [156] P. Fernandez-Saiz, "Chitosan polysaccharide in food packaging applications," in *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging*. Elsevier, 2011, pp. 571–593.
- [157] D. G. Ivanova and Z. L. Yaneva, "Antioxidant properties and redox-modulating activity of chitosan and its derivatives : Biomaterials with application in cancer therapy," *BioResearch Open Access*, vol. 9, no. 1, pp. 64–72, 2020.
- [158] E. Szymańska and K. Winnicka, "Stability of chitosan—a challenge for pharmaceutical and biomedical applications," *Marine drugs*, vol. 13, no. 4, pp. 1819–1846, 2015.
- [159] S. T. Koev, P. H. Dykstra, X. Luo, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, G. F. Payne, and R. Ghodssi, "Chitosan : An integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 3026–3042, 2010.
- [160] A. Sawaguchi, S. Ono, M. Oomura, K. Inami, Y. Kumeta, K. Honda, R. Sameshima-Saito, K. Sakamoto, A. Ando, and A. Saito, "Chitosan degradation and associated changes in bacterial community structures in two contrasting soils," *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 61, pp. 471–480, 2015.

- [161] I. Makarios-Laham and T.-C. Lee, “Biodegradability of chitin-and chitosan-containing films in soil environment,” *Journal of environmental polymer degradation*, vol. 3, pp. 31–36, 1995.
- [162] J. A. Sirviö, A. M. Kantola, S. Komulainen, and S. Filonenko, “Aqueous modification of chitosan with itaconic acid to produce strong oxygen barrier film,” *Biomacromolecules*, vol. 22, pp. 2119–2128, 2021.
- [163] H. Y. C. Eulalio, J. F. B. Rodrigues, K. O. Santos, C. Peniche, and M. V. LiaFook, “Characterization and thermal properties of chitosan films prepared with different acid solvents,” *Revista Cubana de Química*, vol. 31, pp. 309–323, 2019.
- [164] G. Kerch and V. Korkhov, “Effect of storage time and temperature on structure, mechanical and barrier properties of chitosan-based films,” *European Food Research and Technology*, vol. 232, pp. 17–22, 2011.
- [165] S. Y. Park, K. S. Marsh, and J. W. Rhim, “Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents,” *Journal of Food Science*, vol. 67, pp. 194–197, 2002.
- [166] K. M. Kim, J. H. Son, S.-K. Kim, C. L. Weller, and M. A. Hanna, “Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type,” *Journal of Food Science*, vol. 71, pp. E119–E124, 2006.
- [167] K. Ziani, J. Oses, V. Coma, and J. I. Maté, “Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, pp. 2159–2165, 2008.
- [168] N. E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, and V. Coma, “Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 3950–3957, 2005.
- [169] A. A. Escárcega-Galaz, D. I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, A. Sanches-Silva, T. J. Madera-Santana, and P. Paseiro-Losada, “Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 116, pp. 472–481, 2018.
- [170] W. Chang, F. Liu, H. R. Sharif, Z. Huang, H. D. Goff, and F. Zhong, “Preparation of chitosan films by neutralization for improving their preservation effects on chilled meat,” *Food Hydrocolloids*, vol. 90, pp. 50–61, 2019.
- [171] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, “Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 933–943, 2005.
- [172] V. Korniienko, Y. Husak, A. Yanovska, Şahin Altundal, K. Diedkova, Y. Samokhin, Y. Varava, V. Holubnycha, R. Viter, and M. Pogorielov, “Biological behaviour of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralisation methods,” *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, vol. 27, pp. 135–153, 2022.
- [173] M. Hamdi, R. Nasri, S. Hajji, M. Nigen, S. Li, and M. Nasri, “Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties,” *Food Hydrocolloids*, vol. 87, pp. 48–60, 2019.
- [174] C. Caner, P. J. Vergano, and J. L. Wiles, “Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage,” *Journal of Food Science*, vol. 63, pp. 1049–1053, 1998.
- [175] M. Chen, T. Runge, L. Wang, R. Li, J. Feng, X. L. Shu, and Q. S. Shi, “Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 200, pp. 115–121, 2018.
- [176] J. G. Fernandez, C. A. Mills, and J. Samitier, “Complex microstructured 3d surfaces using chitosan biopolymer,” *Small*, vol. 5, pp. 614–620, 2009.
- [177] J. G. Fernandez, C. A. Mills, E. Martinez, M. J. Lopez-Bosque, X. Sisquella, A. Errachid, and J. Samitier, “Micro- and nanostructuring of freestanding, biodegradable, thin sheets of chitosan via soft lithography,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 85, pp. 242–247, 2007.

- [178] I. Servin, A. Teolis, A. Bazin, P. Durin, O. Sysova, C. Gablin, B. Saudet, D. Leonard, O. Soppera, J. L. Leclercq, Y. Chevolut, R. Tiron, T. Delair, and S. Trombotto, “Water-soluble bio-sourced resists for DUV lithography in a 200/300 mm pilot line environment,” *Micro and Nano Engineering*, vol. 19, 2023.
- [179] O. Sysova, P. Durin, C. Gablin, D. Léonard, A. Téolis, S. Trombotto, T. Delair, D. Berling, I. Servin, R. Tiron, A. Bazin, J. L. Leclercq, Y. Chevolut, and O. Soppera, “Green deep-UV photoresist based on chitosan for microelectronics,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 140, 2023.
- [180] M. Caillau, P. Crémillieu, E. Laurenceau, Y. Chevolut, J.-L. Leclercq, S. Alekseev, C. Chevalier, and T. Delair, “Fifty nanometer lines patterned into silica using water developable chitosan bioresist and electron beam lithography,” *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics : Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*, vol. 35, 2017.
- [181] J. C. Cheng and A. P. Pisano, “Photolithographic process for integration of the biopolymer chitosan into micro/nanostructures,” *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 17, pp. 402–409, 2008.
- [182] P. Dykstra, J. Hao, S. T. Koev, G. F. Payne, L. Yu, and R. Ghodssi, “An optical MEMS sensor utilizing a chitosan film for catechol detection,” *Sensors and Actuators, B : Chemical*, vol. 138, pp. 64–70, 2009.
- [183] T. Jiang, M. Deng, R. James, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, “Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering,” *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 1632–1645, 2014.
- [184] S. Pradhan, K. M. Moore, K. M. Ainslie, and V. K. Yadavalli, “Flexible, microstructured surfaces using chitin-derived biopolymers,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 35, pp. 5328–5335, 2019.
- [185] A. Grebenko, A. Bubis, K. Motovilov, V. Dremov, E. Korostylev, I. Kindiak, F. S. Fedorov, S. Luchkin, Y. Zhuikova, A. Trofimenko, G. Filkov, G. Sviridov, A. Ivanov, J. T. Dull, R. Mozhchil, A. Ionov, V. Varlamov, B. P. Rand, V. Podzorov, and A. G. Nasibulin, “Green lithography for delicate materials,” *Advanced Functional Materials*, vol. 31, 2021.
- [186] R. A. Zangmeister, J. J. Park, G. W. Rubloff, and M. J. Tarlov, “Electrochemical study of chitosan films deposited from solution at reducing potentials,” *Electrochimica Acta*, vol. 51, pp. 5324–5333, 2006.
- [187] L. Q. Wu, H. Yi, S. Li, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, R. Ghodssi, and G. F. Payne, “Spatially selective deposition of a reactive polysaccharide layer onto a patterned template,” *Langmuir*, vol. 19, pp. 519–524, 2003.
- [188] S. T. Koev, M. A. Powers, H. Yi, L. Q. Wu, W. E. Bentley, G. W. Rubloff, G. F. Payne, and R. Ghodssi, “Mechano-transduction of DNA hybridization and dopamine oxidation through electrodeposited chitosan network,” *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 103–111, 2007.
- [189] J. J. Park, X. Luo, H. Yi, T. M. Valentine, G. F. Payne, W. E. Bentley, R. Ghodssi, and G. W. Rubloff, “Chitosan-mediated in situ biomolecule assembly in completely packaged microfluidic devices,” *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 1315–1321, 2006.
- [190] V. K. Mourya and N. N. Inamdar, “Chitosan-modifications and applications : Opportunities galore,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 68, pp. 1013–1051, 2008.
- [191] R. A. Mauricio-Sánchez, R. Salazar, J. G. Luna-Bárceñas, and A. Mendoza-Galván, “FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 94, pp. 1–6, 2018.
- [192] J. Fu, F. Yang, and Z. Guo, “The chitosan hydrogels : from structure to function,” *New Journal of Chemistry*, vol. 42, pp. 17 162–17 180, 2018.
- [193] M. C. Pellá, M. K. Lima-Tenório, E. T. Tenório-Neto, M. R. Guilherme, E. C. Muniz, and A. F. Rubira, “Chitosan-based hydrogels : From preparation to biomedical applications,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 196, pp. 233–245, 2018.

- [194] E. M. B., A. Ramazani, M. Shafiee, and M. Danaei, “Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems,” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 62, pp. 605–611, 2013.
- [195] F.-H. Lin, C.-H. Yao, J.-S. Sun, H.-C. Liu, and C.-W. Huang, “Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin,” *Biomaterials*, vol. 19, pp. 905–917, 1998.
- [196] Y. Li, X. Wang, Y. Wei, and L. Tao, “Chitosan-based self-healing hydrogel for bioapplications,” *Chinese Chemical Letters*, vol. 28, pp. 2053–2057, 2017.
- [197] K. Zhang, S. Yan, G. Li, L. Cui, and J. Yin, “In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration,” *Biomaterials*, vol. 71, pp. 24–34, 2015.
- [198] A. Subramanian and H. Y. Lin, “Crosslinked chitosan : Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 75, pp. 742–753, 2005.
- [199] H. Kiuchi, W. Kai, and Y. Inoue, “Preparation and characterization of polyethylene glycol crosslinked chitosan films,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 107, pp. 3823–3830, 2008.
- [200] R. A. Muzzarelli, “Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 77, no. 1, pp. 1–9, 2009.
- [201] R. Nayak, J. Philip, F. C. Rodrigues, and G. Thakur, “Transport of curcumin from cross-linked chitosan matrices : A comparative study,” in *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering*, vol. 561. Institute of Physics Publishing, 2019.
- [202] F. L. Mi, S. S. Shyu, and C. K. Peng, “Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin,” *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, vol. 43, pp. 1985–2000, 2005.
- [203] N. Kildeeva, A. Chalykh, M. Belokon, T. Petrova, V. Matveev, E. Svidchenko, N. Surin, and N. Sazhnev, “Influence of genipin crosslinking on the properties of chitosan-based films,” *Polymers*, vol. 12, 2020.
- [204] S. K. Gulrez, S. Al-Assaf, and G. O. Phillips, “Hydrogels : methods of preparation, characterisation and applications,” *Progress in molecular and environmental bioengineering-from analysis and modeling to technology applications*, vol. 117150, 2011.
- [205] Z. Cui, Y. Xiang, J. Si, M. Yang, Q. Zhang, and T. Zhang, “Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, no. 1, pp. 111–116, 2008.
- [206] X. Z. Shu, K. J. Zhu, and W. Song, “Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 212, pp. 19–28, 2001.
- [207] E.-C. Shen, C. Wang, E. Fu, C.-Y. Chiang, T.-T. Chen, and S. Nieh, “Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan cross-linked sponge : a preliminary in vitro study,” *Journal of periodontal research*, vol. 43, no. 6, pp. 642–648, 2008.
- [208] G. Conzatti, D. Faucon, M. Castel, F. Ayadi, S. Cavalie, and A. Tourrette, “Alginate/chitosan polyelectrolyte complexes : A comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties,” *Carbohydrate polymers*, vol. 172, pp. 142–151, 2017.
- [209] L. A. Reis, L. L. Chiu, Y. Liang, K. Hyunh, A. Momen, and M. Radisic, “A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery,” *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 1022–1036, 2012.
- [210] A. Montebault, “Elaboration d’hydrogels physiques de chitosane : application à l’ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage,” Ph.D. dissertation, Université Claude Bernard Lyon 1, 2004.

- [211] N. Vizio-Boucard, “Élaboration et caractérisation d’hydrogels physiques de chitosane pour la cicatrisation thérapeutique des brûlures,” Ph.D. dissertation, Université Claude Bernard Lyon 1, 2005.
- [212] F. Dupasquier, “Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré,” Ph.D. dissertation, Université Claude Bernard, 2011. [Online]. Available : <https://theses.hal.science/tel-00830801>
- [213] T. Furuike, D. Komoto, H. Hashimoto, and H. Tamura, “Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 104, pp. 1620–1625, 2017.
- [214] Y. Xu, J. Han, and H. Lin, “Fabrication and characterization of a self-crosslinking chitosan hydrogel under mild conditions without the use of strong bases,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 156, pp. 372–379, 2017.
- [215] M. K. Lima-Tenório, E. T. Tenório-Neto, M. R. Guilherme, F. P. Garcia, C. V. Nakamura, E. A. Pineda, and A. F. Rubira, “Water transport properties through starch-based hydrogel nanocomposites responding to both pH and a remote magnetic field,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 259, pp. 620–629, 2015.
- [216] Y. Zhang, L. Tao, S. Li, and Y. Wei, “Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules,” *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 2894–2901, 2011.
- [217] A. Kumar and V. Rana, “Cross-linked chitosan films : Effect of cross-linking density on swelling parameters,” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 23, pp. 443–448, 2010.
- [218] C. Xiao, R. You, Y. Fan, and Y. Zhang, “Tunable functional hydrogels formed from a versatile water-soluble chitosan,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 85, pp. 386–390, 2016.
- [219] M. L. Verma, S. Kumar, A. Das, J. S. Randhawa, and M. Chamundeeswari, “Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications,” *Environmental Chemistry Letters*, vol. 18, pp. 315–323, 2020.
- [220] J. Moura, B. Farias, T. Cadaval, and L. Pinto, *Chitin/Chitosan Based Films for Packaging Applications*. Wiley, 2021, pp. 69–83.
- [221] M. Fujita, M. Ishihara, M. Simizu, K. Obara, T. Ishizuka, Y. Saito, H. Yura, Y. Morimoto, B. Takase, T. Matsui *et al.*, “Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 699–706, 2004.
- [222] X. Li, S. Chen, B. Zhang, M. Li, K. Diao, Z. Zhang, J. Li, Y. Xu, X. Wang, and H. Chen, “In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N, O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 437, no. 1-2, pp. 110–119, 2012.

Préparation et Caractérisation des films de chitosane

L'état de l'art a montré que les polymères d'origine pétrochimique utilisés usuellement pour la fabrication de LoC, comme le PDMS et certains thermoplastiques, contribuent à la consommation de matières pétro-sourcées ainsi qu'à la production croissante de déchets plastiques [1]. En réponse à la sensibilisation croissante de la société aux problèmes environnementaux, des polymères bio-sourcés ont été envisagés pour la fabrication de ces LoC, tels que la cellulose [2], le PLA [3] ou la soie [4]. Dans le CHAPITRE 1, il a été montré qu'en l'état actuel des connaissances, ces polymères rencontrent des verrous technologiques pour adresser l'ensemble des applications microfluidiques à partir d'un procédé de fabrication éco-responsable. Une solution sera de compléter le panel des polymères bio-sourcés, notamment dans le domaine biomédical. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au chitosane, un polysaccharide qui possède plusieurs propriétés nécessaires pour l'élaboration de LoC (§IV (Chap. 1)). En effet, il est filmogène, hydrosoluble, non-toxique, biocompatible [5, 6, 7], biodégradable [8, 9] et antimicrobien [10].

La première étape pour fabriquer des systèmes microfluidiques consiste à obtenir des films de chitosane respectant le cahier des charges pour cette application. Un film d'une épaisseur supérieure à 200 μm est essentiel pour intégrer des canaux microfluidiques. De plus, ces films doivent être transparents et biocompatibles pour permettre l'observation et la manipulation de cellules dans ces microsystèmes. Finalement, pour obtenir des systèmes microfluidiques étanches, il faut que les films n'absorbent pas ou peu les solutions aqueuses.

Dans le cas du chitosane, les films décrits dans la littérature (§IV (Chap. 1)) présentent majoritairement une épaisseur de quelques μm . Dans §IV.C.1 (Chap. 1), il a été montré que des épaisseurs plus importantes peuvent être obtenues à partir du coulage de la solution de chitosane dans un moule suivi de l'évaporation du solvant. D'autre part, le gonflement considérable des films de chitosane dans l'eau est un problème pour développer des dispositifs microfluidiques. Pour résoudre ce problème et empêcher la dissolution du film, deux stratégies sont évoquées dans la littérature et discutées dans ce chapitre : la réticulation des chaînes de chitosane [11] ou la neutralisation des films [12].

Dans ce chapitre, une première section décrit les méthodes de fabrication et de caractérisation des films de chitosane. La seconde section est consacrée à l'analyse des résultats obtenus concernant l'élaboration de films épais en chitosane. Par la suite, plusieurs stratégies permettant de diminuer la solubilité de ces films sont décrites. Les films ont été caractérisés selon leur propension à gonfler au contact de solutions aqueuses, leur transparence, et pour les plus prometteurs leurs propriétés mécaniques et leur état de surface.

I. Matériels & Méthodes

I.A. Matériels

Les différents lots de chitosane utilisés dans cette étude ont été fournis par la société Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (Veraval, Inde). Leurs masses molaires moyennes en masse (M_w) et en nombre (M_n) ainsi que leur dispersité ($\mathfrak{D} = M_w/M_n$) ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) selon la méthode décrite par Schatz *et al.* [13]. Leur DA a été calculé par spectrométrie RMN ^1H selon la méthode de Hirai *et al.* [14]. Leurs teneurs en eau et en cendre ont été déterminées par analyse thermogravimétrique selon une méthode développée au laboratoire IMP (UMR 5223)[15]. Les caractéristiques des lots de chitosane utilisés sont résumées dans le TAB 2.1. Dans la suite du chapitre, les différents chitosanes seront référés par leur M_w ou par leur lot.

TABLEAU 2.1 – Caractéristiques des lots de chitosane utilisés (N/D pour données non disponibles).

Lot	Date de Production	Origine	M_w [kg.mol $^{-1}$]	M_n [kg.mol $^{-1}$]	\mathfrak{D}	DA [%]	Teneur en eau [% (w/w)]	Teneur en cendre [% (w/w)]
144	05/06/2009	Calamar	132	51	2,61	3,5	N/D	N/D
244LG	03/05/2014	Crevette	192	104	1,85	0,8	8,4	0,6
114	02/10/2017	Calamar	538	320	1,69	3,5	N/D	N/D

L'acide acétique glacial (>99 %), l'anhydride acétique (>98 %), l'éthanol (>99 %), la génipine (poudre, >98%), le glutaraldéhyde (25% dans l'eau), le glycérol (>99%), l'anhydride acétique (>98%), l'hydroxyde d'ammonium (28-30 % dans l'eau), l'hydroxyde de sodium (pastilles, >97 %) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, États-Unis).

L'eau déionisée a été obtenue à partir d'un appareil Purelab Chorus d'Elga Veolia (High Wycombe, Royaume-Uni) avec une résistance de 18,2 M Ω .

I.B. Protocoles de fabrication des films de chitosane

I.B.1. Filmification du chitosane

Comme illustré sur la FIG 2.1, le chitosane est dissous dans une solution aqueuse d'acide acétique dilué à T_{amb} pendant 4h. La quantité massique d'acide acétique m_{AA} est en proportion stœchiométrique par rapport au nombre de groupe amine du chitosane à dissoudre, et a été calculée selon la formule ci-dessous :

$$m_{AA} = \frac{m_{CH} \times (1 - t_{eau}) \times (1 - DA) \times M_{AA}}{M_D \times (1 - DA) + M_{N-D} \times DA} \quad (2.1)$$

avec t_{eau} la teneur en eau du chitosane, $M_{AA} = 60 \text{ g.mol}^{-1}$ la masse molaire de l'acide acétique, m_{CH} la masse de chitosane à dissoudre, $M_D = 161 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{N-D} = 203 \text{ g.mol}^{-1}$ les masses molaires respectives des unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. Les concentrations utilisées sont reportées dans le TAB 2.2.

TABLEAU 2.2 – Concentrations de chitosane et d'acide acétique utilisées pour fabriquer des films de chitosane.

Concentration de chitosane [% (m/v)]	Concentration d'acide acétique [% (v/v)]	Ratio molaire Acide acétique : NH ₂ du chitosane
2	1,2	1,90 : 1
4	2,4	1,90 : 1
6	3,5	1,90 : 1

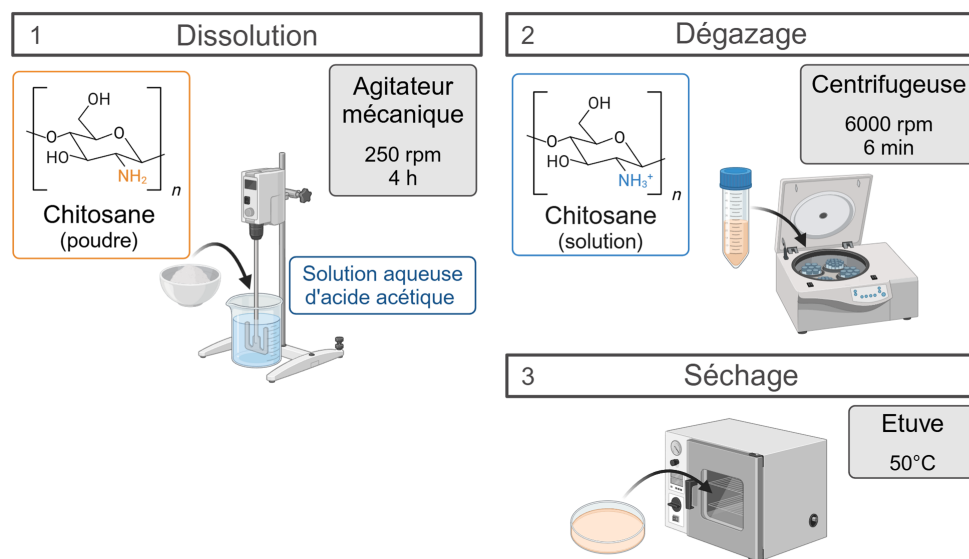


FIGURE 2.1 – Protocole de préparation de films de chitosane.

Le glycérol, jouant un rôle de plastifiant, peut être ajouté à la solution avec une concentration calculée par rapport à la masse de chitosane présente en solution. Le mélange est alors agité pendant quelques minutes. Les différentes concentrations de glycérol étudiées sont reportées dans le TAB 2.3.

TABLEAU 2.3 – Concentrations et volumes de glycérol utilisés pour une solution de 20 mL de chitosane à 4% (m/v).

Concentration de glycérol [% (m/m)]	Volume de glycérol [mL]
0	0
30	0,18
50	0,31
100	0,62

La solution de chitosane est centrifugée à 6000 rpm pendant 6 min pour éliminer les bulles d'air formées lors du mélange. La solution est ensuite coulée dans une boîte de Petri (Référence 353004, Falcon Corning, Glendale, USA) et laissée dans une étuve à 50°C pendant 24h pour évaporer le solvant aqueux. Dans certains cas, une seconde couche de chitosane est coulée sur la première après 15h30 (une nuit) de séchage à 50°C, puis remis à l'étuve à 50°C pour 24h.

I.B.2. Neutralisation des films de chitosane

Comme illustré sur la FIG 2.2, les films de chitosane séchés sont neutralisés par immersion dans une solution aqueuse ou hydroalcoolique d'hydroxyde de sodium (NaOH). Pour la préparation de la solution aqueuse de NaOH, les pastilles d'hydroxyde de sodium sont directement dissoutes dans l'eau déionisée à T_{amb} sous agitation magnétique. Dans le cas de la solution hydroalcoolique de NaOH à 70% (v/v) d'éthanol, une fois la dissolution complète de NaOH dans l'eau, l'éthanol est ajouté et mélangé pour obtenir la solution de neutralisation. La concentration molaire d'hydroxyde de sodium est indiquée pour la solution finale. Les solutions de neutralisation seront identifiées par leur concentration molaire (x) en NaOH : x M NaOH pour les solutions aqueuses et x M NaOH/EtOH pour les solutions à 70% (v/v) d'éthanol. Pour chaque neutralisation sera précisé le temps d'immersion dans la solution d'hydroxyde de sodium. Les films sont ensuite rincés au moins 3 fois avec de l'eau déionisée jusqu'à ce que le pH de l'eau de rinçage atteigne 7. Enfin, les films de chitosane neutralisés sont séchés à T_{amb} pendant 16h.

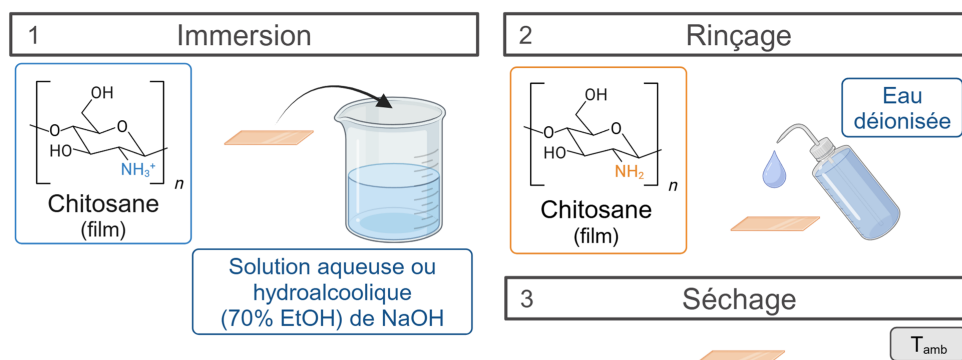


FIGURE 2.2 – Protocole de neutralisation de films de chitosane.

I.B.3. Ré-acétylation des films de chitosane

Une solution de 5 mL d'éthanol anhydre et 1 mL d'anhydride acétique est préparée dans une boîte à gant LABstar pro (MBRAUN, Garching, Allemagne) sous atmosphère d'azote. Comme montré sur la FIG 2.3, les films ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) à 4% (m/v) de chitosane 244LG et 2,4% (v/v) d'acide acétique non-neutralisés sont immergés dans l'eau déionisée pendant 30s, tandis que ceux neutralisés (1M NaOH pendant 45 min) le sont pendant 10 min. Les films sont ensuite immergés dans la solution d'anhydride acétique et d'éthanol chauffée à 40°C sur une plaque chauffante. Après 24h d'immersion, les films sont plongés dans l'ammoniaque pendant 10 min. Les films sont ensuite rincés à l'eau déionisée, puis à l'éthanol. Finalement, les films sont laissés à sécher à T_{amb} (une nuit).

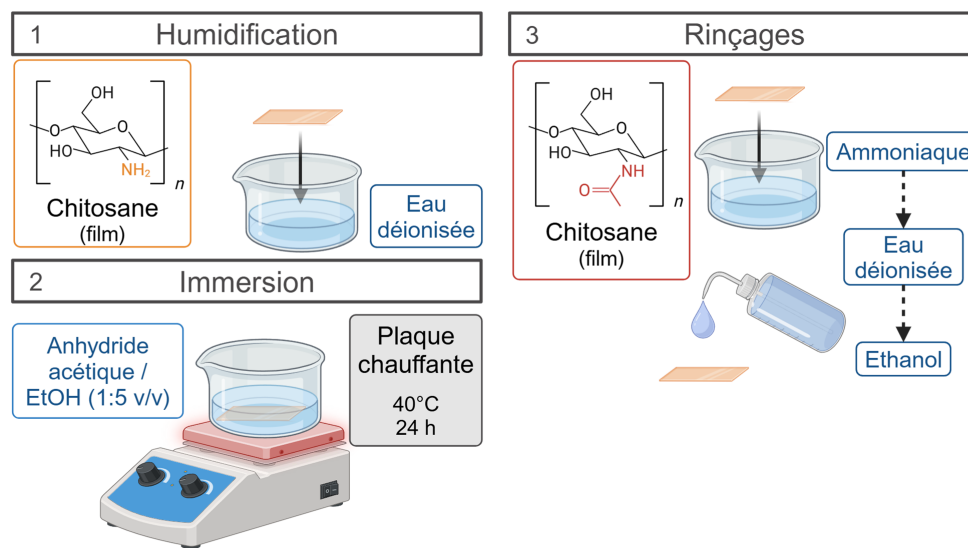


FIGURE 2.3 – Protocole de ré-acétylation de films de chitosane.

I.B.4. Réticulation avec le glutaraldéhyde

Une solution à 4% (m/v) de chitosane 244LG et 2,4% (v/v) d'acide acétique est préparée selon le protocole de filmification précédemment décrit.

Un volume précis V_{Gl} de glutaraldéhyde de masse molaire $M_{Gl} = 100 \text{ g.mol}^{-1}$ et de concentration molaire C_{Gl} est prélevé et dilué dans l'eau déionisée pour obtenir une solution de 1 mL.

Le volume à prélever est calculé à partir du ratio molaire n_{Gl}/n_{NH_2} de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane, selon la formule suivante :

$$n_{Gl}/n_{NH_2} = \frac{C_{Gl} \times V_{Gl} \times (M_D \times (1 - DA) + M_{N-D} \times DA)}{M_{Gl} \times m_{CH} \times (1 - DA)} \quad (2.2)$$

Les ratios utilisés sont rapportés dans le TAB 2.4.

TABLEAU 2.4 – Ratios molaires et volumes de glutaraldéhyde utilisés dans cette étude pour une solution de 20 mL de chitosane.

Ratio molaire Glutaraldéhyde : NH ₂ du chitosane	Volume de glutaraldéhyde [μL]
1 : 10	160
1 : 20	80
1 : 50	40
1 : 100	16
1 : 200	8

Comme représenté sur la FIG 2.4, la solution aqueuse diluée de glutaraldéhyde est ajoutée goutte à goutte dans 20 mL de chitosane sous agitation mécanique à 300 rpm. Par la suite, la solution est centrifugée à 9000 rpm à 4°C pendant 4 min. Finalement, la solution est versée dans un compartiment d'une boîte rectangulaire à 8 puits (Référence 267062, Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA), puis laissée à T_{amb} pendant une semaine.

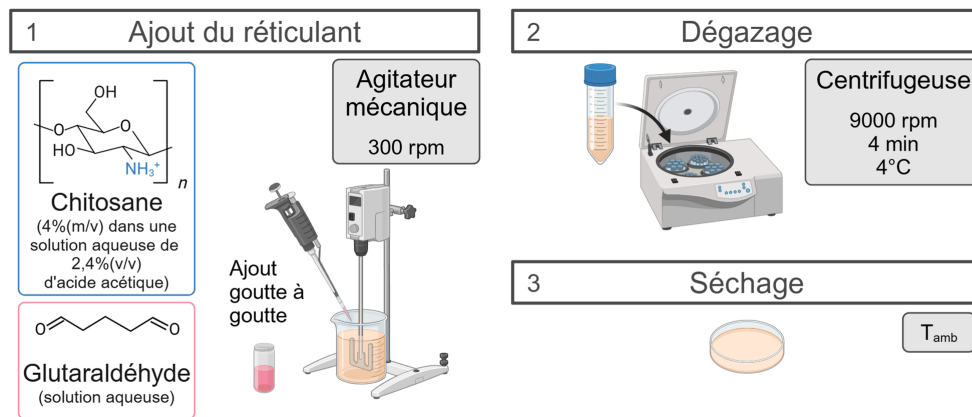


FIGURE 2.4 – Protocole de réticulation du chitosane avec du glutaraldéhyde.

I.B.5. Réticulation avec la génipine

Une solution à 4% (m/v) de chitosane 244LG et 2,4% (v/v) d'acide acétique est préparée selon le protocole de filmification précédemment décrit.

Une solution de génipine de concentration $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ est préparée avec de l'eau déionisée. Un volume précis V_{Gn} de génipine de masse molaire $M_{Gn} = 226 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et de concentration molaire C_{Gn} est ajouté à 5 mL de la solution de chitosane. Le volume à prélever est calculé à partir du ratio molaire n_{Gn}/n_{NH_2} de génipine par rapport aux groupes amine du chitosane, selon la formule suivante :

$$n_{Gn}/n_{NH_2} = \frac{C_{Gn} \times V_{Gn} \times (M_D \times (1 - DA) + M_{N-D} \times DA)}{M_{Gn} \times m_{CH} \times (1 - DA)} \quad (2.3)$$

Les concentrations utilisées sont rapportées dans le TAB 2.5.

TABLEAU 2.5 – Ratios molaires et volumes de génipine utilisés dans cette étude pour une solution de 5 mL de chitosane.

Ratio molaire Génipine : NH ₂ du chitosane	Volume de génipine [μL]
1 : 93	200
1 : 185	100
1 : 370	50

Comme illustré sur la FIG 2.5, la solution est mélangée pendant 10 min, puis versée dans une boîte de Petri de 35 mm de diamètre (Référence 353001, Falcon Corning, Glendale, USA). Les échantillons sont mis à sécher dans une étuve à 50°C pendant la nuit (16h).

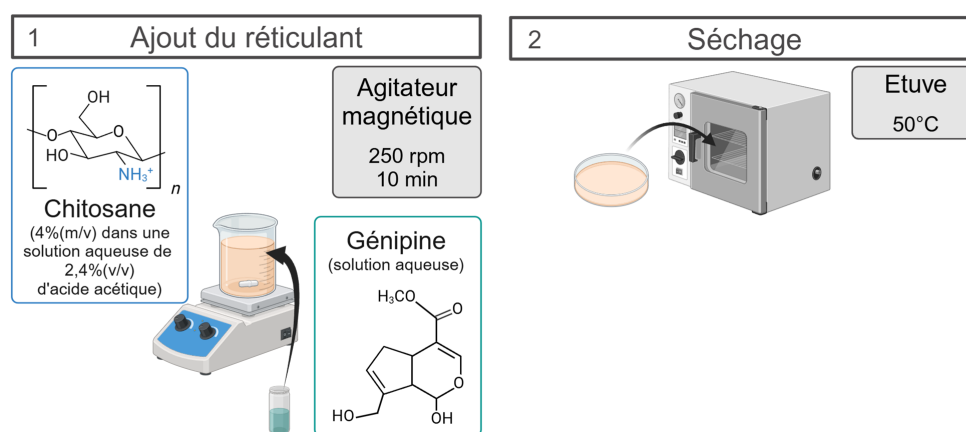


FIGURE 2.5 – Protocole de réticulation du chitosane avec du glutaraldéhyde.

I.C. Caractérisations des solutions et films de chitosane

I.C.1. Viscosité de solutions

Un rhéomètre AR2000 (TA Instruments, New Castle, USA) avec une géométrie cône-plan est composé d'un rotor de 25 mm de rayon et un angle de 4° au-dessus d'une plateforme (stator). Un volume de 2 mL de la solution de chitosane à tester est déposé sous le rotor qui est descendu à 0,116 mm de la surface de la plateforme. La viscosité de la solution est mesurée trois fois à T_{amb} (23°C) pour des vitesses de cisaillement allant de 10^{-3} à 10^2 s⁻¹ avec 5 points par décade. Cette technique est illustrée sur la FIG 2.6.

Sur la courbe résultante, la valeur du plateau newtonien donne une estimation de la viscosité de la solution en absence de cisaillement. Les caractéristiques des solutions étudiées sont résumées dans le TAB 2.6. Après leur préparation, chaque solution est conservée à 4°C et les mesures de viscosité ont été réalisées après 1 jour ou 2 semaines de stockage des solutions.

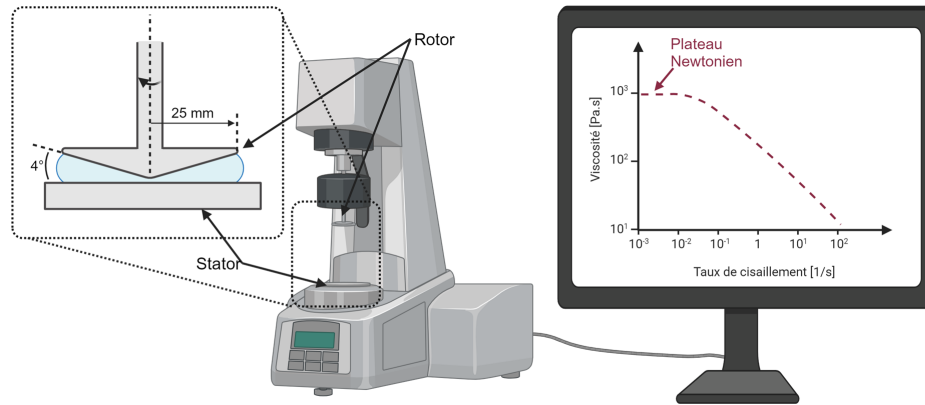


FIGURE 2.6 – Schéma de mesure de la viscosité à l'aide d'un viscosimètre cône-plan.

TABLEAU 2.6 – Caractéristiques des solutions analysées par viscosimétrie cône-plan.

Solutions	Concentration de chitosane [% (m/v)]	Concentration d'acide acétique [% (v/v)]	Ratio molaire Acide acétique : NH ₂ du chitosane	Durée de conservation
S1	6	2,23	1,21 :1	1 jour
S2	6	2,23	1,21 :1	2 semaines
S3	6	3,5	1,90 :1	1 jour
S4	6	3,5	1,90 :1	2 semaines

I.C.2. Absorption d'eau et solubilisation du chitosane

La caractérisation de l'absorption d'eau et de la solubilisation de films de chitosane est effectuée selon la méthode suivante. Tout d'abord, les films de chitosane séchés sont découpés en morceaux de $2 \times 3 \text{ cm}^2$. Leur masse initiale m_0 est mesurée à l'aide d'une balance ayant une précision de 10^{-5} g . Les films sont ensuite immergés dans de l'eau déionisée. A différents temps t , ces films sont essuyés en surface et leur masse m_t est mesurée avec cette balance. Le taux de gonflement est ensuite calculé à partir de l'équation suivante :

$$G_t[\%] = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (2.4)$$

Après la dernière mesure, les films sont séchés à T_{amb} pendant 3 jours, puis leur masse m_f est mesurée à nouveau. La quantité de chitosane solubilisée par l'immersion en solution aqueuse est calculée à partir de la relation suivante :

$$S[\%] = \frac{m_f - m_0}{m_0} \times 100 \quad (2.5)$$

I.C.3. Epaisseurs et transparence

L'épaisseur des films de chitosane est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Mitutoyo, Roissy, France) avec une résolution de 0,01 mm.

L'absorbance des films de chitosane est mesurée dans le domaine ultraviolet-visible avec un spectrophotomètre UVmc (Safas, Monaco, Monaco) ayant une résolution de 1 nm. Cette dernière est convertie pour obtenir le spectre en transmittance des films de chitosane entre 200 et 800 nm. La transparence correspondante est ensuite calculée en faisant la moyenne de la transmittance entre 400 et 800 nm.

De plus, la transparence normalisée pour des films d'une épaisseur de 100 μm est calculée à partir des mêmes spectres en absorbance. L'absorbance A de chaque film est d'abord divisée par son épaisseur moyenne e pour obtenir l'absorbance spécifique $A_s = A/e$. Puis la transmittance normalisée T_{norm} pour 100 μm d'épaisseur est calculée à partir de la formule suivante :

$$T_{norm} [\%] = 10^{-A_s \times 100 [\mu\text{m}]} \times 100 \quad (2.6)$$

La transparence normalisée pour 100 μm d'épaisseur est finalement calculée en moyennant la transmittance entre 400 et 800 nm.

I.C.4. Spectrométrie Infrarouge

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) sont obtenus avec le spectromètre IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, USA) équipé d'un accessoire en diamant pour la réflectance totale atténuée (ATR). L'échantillon de films de chitosane est maintenu entre la pointe et le support en diamant. Une combinaison de longueurs d'onde est dirigée vers l'échantillon avec un angle permettant leur réflexion totale. Sur la profondeur de pénétration de la lumière IR dans l'échantillon, cette dernière est partiellement absorbée. En effectuant la transformée de Fourier sur la lumière récoltée par le détecteur, il est possible d'attribuer l'absorbance correspondant à chaque longueur d'onde. Plusieurs combinaisons sont envoyées pour reconstituer le spectre complet. 64 balayages sont effectués dans la gamme de 4000-500 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le principe de mesure est montré sur la FIG 2.7.

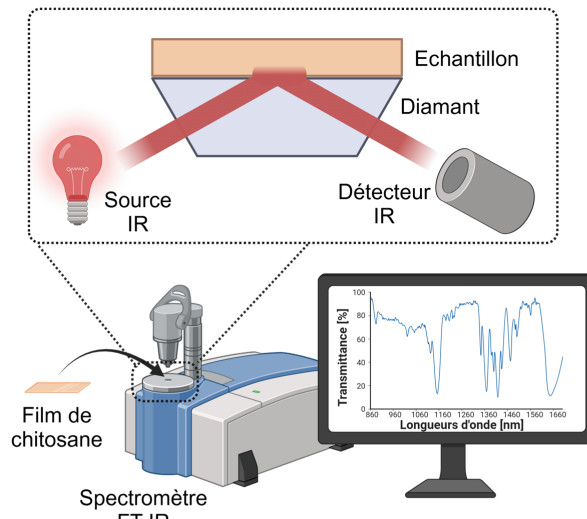


FIGURE 2.7 – Schéma de mesure de spectre infrarouge par FTIR.

I.C.5. Angle de contact

Ainsi que représenté sur la FIG 2.8, un échantillon de film de chitosane neutralisé est positionné sous une seringue remplie d'eau déionisée. Une goutte d'eau de $0,8 \mu\text{L}$ est déposée sur la surface du film. A l'aide de la caméra PixeLINK avec un objectif AF Micro Nikkor 60 mm, le logiciel Windrop++ permet de calculer l'angle de contact de la goutte sur le film. La mesure est répétée sur 5 zones différentes du film.

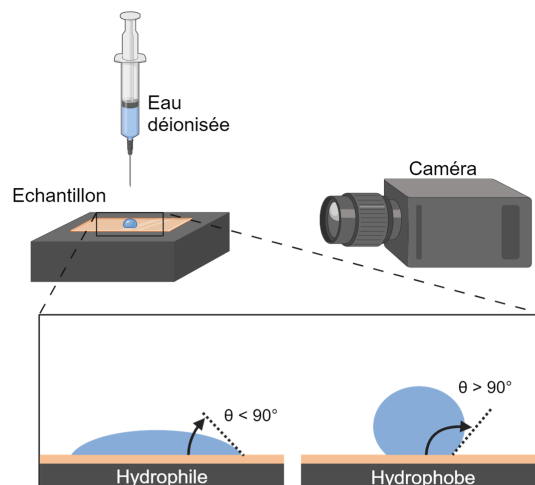


FIGURE 2.8 – Schéma de mesure d'angle de contact.

I.C.6. Module d'Young et dureté

La dureté et le module d'Young des films de chitosane neutralisés et non neutralisés sont mesurés avec un nano-indenteur G200 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) équipé d'une pointe Berkovich en diamant. La pointe est enfoncée dans l'échantillon avec une vitesse de déformation constante de $0,05 \text{ s}^{-1}$ jusqu'à une profondeur de $h=4000 \text{ nm}$

(Charge). Puis la pointe est retirée (Décharge). La courbe à analyser est représentée sur la FIG 2.9. La raideur S est mesurée tout au long de l'essai.

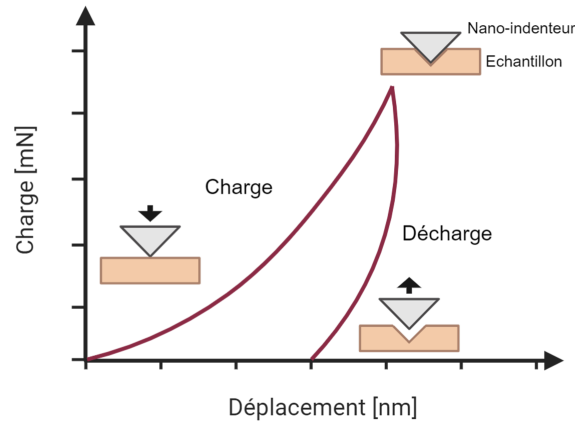


FIGURE 2.9 – Schéma d'une mesure de nano-indentation.

Les formules d'Oliver et Pharr sont utilisées pour remonter au module d'Young E de l'échantillon :

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i}{E_i} \quad (2.7)$$

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\beta\sqrt{A_c}} \quad (2.8)$$

Avec $E_i=1140$ GPa et $\nu_i= 0,07$ respectivement le module élastique et le coefficient de Poisson de la pointe ainsi que $\nu=0,33$ le coefficient de Poisson de l'échantillon. Le module réduit E_r dépend du facteur géométrique associé à la pointe $\beta=1.034$ et l'aire de contact $A_C = 24,4 \times h^2$.

La dureté H est calculée à partir de la charge maximale appliquée P_{max} et de l'aire de la marque laissée après l'indentation A_r selon la formule suivante :

$$H = \frac{P_{max}}{A_r} \quad (2.9)$$

Pour chaque échantillon, quinze mesures de nano-indentation sont effectuées pour obtenir leur module d'Young et leur dureté. Ces mesures et calculs ont été effectués par Rémy Gauthier du laboratoire MATEIS (UMR 5510) à Villeurbanne.

I.C.7. Rugosité de surface

La rugosité de la surface des films neutralisés de chitosane est estimée à partir de l'écart quadratique moyen mesuré sur 3 zones de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ cartographiées avec un microscope à force atomique (AFM MFP-3D Asylum Research, Oxford Instrument) équipé d'une sonde Arrow NCR de 40 N.m^{-1} (Mode sans contact / de tapotement - Revêtement reflex). Marie-Charlotte Audry du laboratoire INL (UMR 5270) a effectué ces mesures.

II. Résultats & Discussions

II.A. Elaboration de films épais de chitosane

Dans le but de fabriquer des systèmes microfluidiques, il est essentiel de produire des films suffisamment épais pour contenir des canaux d'au moins 100 μm de profondeur. Or, les films de chitosane sont obtenus en évaporant le solvant, ce qui réduit fortement leur épaisseur pendant le séchage car la proportion de chitosane reste faible dans les solutions par rapport à celle du solvant. D'après l'étude bibliographique effectuée au CHAPITRE 1, il existe 3 méthodes principales pour obtenir des films de chitosane : le coulage de la solution dans un moule, le spin-coating et l'électrodéposition. D'après les épaisseurs de films rapportés dans la littérature, couler la solution de chitosane dans un moule permet d'obtenir des épaisseurs plus importantes qu'avec les deux autres méthodes. Ainsi, c'est cette méthode qui a été choisie pour produire des films.

Au cours des études suivantes, nous allons comparer différents protocoles de fabrication de films de chitosane. Deux ratios molaires d'acide acétique sont comparés en terme de viscosité. Trois chitosanes ayant un DA faible ($\leq 3,5\%$) et différentes M_w (132, 192 ou 538 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) sont testés avec des concentrations de chitosane comprises entre 2 et 6% (m/v). L'ajout d'un plastifiant, le glycerol a également été évalué.

II.A.1. Etude de films de chitosane avant neutralisation

Le chitosane est insoluble dans l'eau dans des conditions neutres et basiques à cause des groupes amine de ses unités D-glucosamine sous forme $-\text{NH}_2$. Il est nécessaire d'être en conditions acides pour protoner ces groupes en $-\text{NH}_3^+$ et le rendre soluble dans des solutions aqueuses. Ainsi, la poudre de chitosane est dissoute dans une solution aqueuse d'acide acétique. Nous allons discuter les impacts du ratio molaire d'acide acétique et de chitosane sur les solutions pour déterminer celui à utiliser par la suite.

Un ratio molaire stœchiométrique d'acide acétique (1 : 1) par rapport aux amines du chitosane est nécessaire à sa dissolution complète. Augmenter ce ratio permet d'augmenter la vitesse de dissolution du chitosane en passant de 24h d'agitation nécessaires à seulement 4h. Deux solutions avec des ratios molaires différents, 1,21 : 1 et 1,90 : 1, ont été préparées pour une concentration de chitosane 244LG de 6% (m/v) et leurs viscosités ont été mesurées après 1 jour et 2 semaines de conservation à 4°C. Les valeurs de viscosité sont présentées dans le TAB 2.7.

Une augmentation du ratio molaire de 1,21 : 1 à 1,90 : 1 diminue la viscosité de $909 \pm 5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ à $140 \pm 2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Avec une viscosité réduite, il est plus facile de manipuler les solutions de chitosane et cela permet d'éviter la formation de bulles lors du séchage. Cette tendance a été confirmée par d'autres études pour des concentrations d'acide supérieures à celle nécessaire à la solubilisation du chitosane [16]. L'excès de fonctions acides réduit les interactions électrostatiques entre les chaînes du chitosane ce qui conduit à une viscosité plus faible des solutions.

Cependant, la viscosité tend à diminuer au cours du temps. En effet, pour un ratio molaire de 1,21 : 1, la viscosité de la solution passe de 909 ± 5 Pa.s à 447 ± 7 Pa.s après 2 semaines de stockage. En effet, au cours du temps, le chitosane s'hydrolyse et se dégrade avec une vitesse qui dépend, notamment, de la concentration en acide [17, 18]. Ainsi, les solutions de chitosane ne peuvent être conservées à 4°C que sur des durées inférieures à deux semaines, sans quoi le chitosane se dégrade et cela modifie les propriétés des films produits. Avec des valeurs de viscosité allant de 100 Pa.s à 909 Pa.s, ces solutions de chitosane sont considérées comme des solutions très visqueuses selon les critères de la lithographie douce [19]. Pour comparaison, le PDMS a une viscosité à 25°C de 5,5 Pa.s [20]. Pour faciliter la fabrication de films, il a été décidé d'utiliser des solutions de chitosane avec des ratios molaires d'acide acétique proche de 1,90 : 1. Pour les prochaines expériences, la quantité d'acide acétique sera ajustée pour maintenir ce ratio de 1,90 : 1 pour toutes les concentrations de chitosane.

TABLEAU 2.7 – Viscosité de solutions de 6% (m/v) de chitosane selon le ratio molaire d'acide acétique et de groupes amine du chitosane et de leur durée de conservation.

Solutions	Ratio molaire Acide acétique : NH ₂ du chitosane	Durée de conservation	Viscosité [Pa.s]
S1	1,21 : 1	1 jour	909 ± 5
S2	1,21 : 1	2 semaines	447 ± 7
S3	1,90 : 1	1 jour	140 ± 2
S4	1,90 : 1	2 semaines	100 ± 6

Par la suite, des films sont obtenus par séchage de solutions de 4% (m/v) chitosane 244LG à 50°C. La concentration de chitosane en solution a été diminuée pour réduire sa viscosité et faciliter sa manipulation. L'impact de la concentration de chitosane sera discutée dans §II.A.2 (Chap. 2). En réalisant des films avec deux couches, les films mesurent 470 ± 60 µm d'épaisseur. De plus, les films de chitosane présentent un module d'Young de $5,59 \pm 0,11$ GPa et une dureté de $0,18 \pm 0,01$ GPa, mesurés par nano-indentation.

Nous avons évalué l'ajout de glycérol, un plastifiant, qui est usuellement utilisé pour modifier les propriétés mécaniques des films [21]. Après la dissolution du chitosane à 4% (m/v) 244LG dans une solution aqueuse d'acide acétique, le glycérol a été ajouté avec des concentrations de 30% (m/m) à 100% (m/m) par rapport à la masse de chitosane en solution. Les films ont été ensuite obtenus par coulage de la solution. Les épaisseurs des films ont été mesurées et rassemblées dans le TAB 2.8. L'épaisseur des films augmente avec la concentration de glycérol passant de 470 ± 60 µm pour 0% (m/m) de glycérol à 690 ± 51 µm pour 100% (m/m). En plus, il n'y a pas de différence d'épaisseur significative entre un film de chitosane sans glycérol et celui contenant 30% (m/m) de glycérol.

TABLEAU 2.8 – Epaisseurs de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG (double couche) avec différentes concentrations massiques de glycérol par rapport à la masse de chitosane.

Concentration de glycérol [% (m/m)]	0	30	50	100
Epaisseurs des films [µm]	470 ± 60	460 ± 16	550 ± 54	690 ± 51

II.A.2. Etude de films de chitosane après neutralisation

La neutralisation doit permettre d'empêcher la dissolution des films de chitosane au contact de solutions aqueuses. Les films de chitosane ont été entièrement immergés dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), pour retourner à un état de protonation de $-NH_2$. Ensuite, les films ont été abondamment rincés jusqu'à obtenir un pH neutre. Une étude préliminaire de cette neutralisation, avec des concentrations de 0,1 ou 1M NaOH et des temps d'immersion de 10 ou 45 min, a été effectuée ainsi qu'une étude de son impact sur l'épaisseur des films.

Les films de chitosane avant et après neutralisation ont été caractérisés par FTIR (FIG 2.10). Le changement d'état de protonation est marqué par un déplacement du pic N-H de l'amide II à 1538 cm^{-1} vers 1551 cm^{-1} , caractéristique du processus de neutralisation du chitosane [22, 23]. La disparition du pic $-COO^-$ à 1637 cm^{-1} est le résultat de l'élimination des ions acétate lors du rinçage des films. Ces modifications ont un impact sur les interactions intermoléculaires, ce qui est observé par le déplacement de la bande de vibrations N-H et O-H autour de 3171 cm^{-1} vers 3287 cm^{-1} [22, 23].

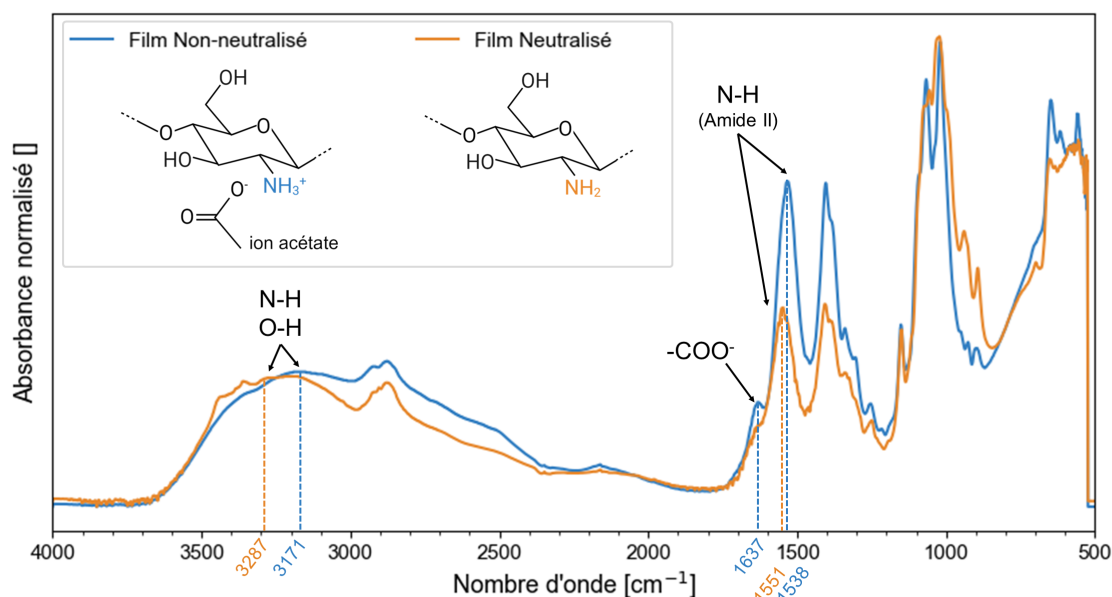


FIGURE 2.10 – Spectres FTIR de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG avant et après neutralisation avec 1M NaOH pendant 45 min.

Après neutralisation, l'épaisseur de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG sans glycérol a été mesurée à $400\text{ }\mu\text{m}$ en moyenne, avec un écart-type de $50\text{ }\mu\text{m}$ entre les échantillons, tandis qu'avant la neutralisation, les films mesuraient $470\text{ }\mu\text{m}$ en moyenne avec $60\text{ }\mu\text{m}$ d'écart-type. En plus de l'élimination des molécules d'acide acétique, la déprotonation des groupes amine a augmenté les interactions et diminué la distance entre les chaînes de chitosane, réduisant ainsi l'épaisseur du film pendant le traitement de neutralisation [12].

La neutralisation a été aussi étudiée sur des films à 6% (m/v) de chitosane 244LG contenant du glycérol. Sur ces films, la perte d'épaisseur s'accompagne d'une augmentation de leur rigidité. En effet, pour des films avec 200% (m/m) de glycérol dont

l'épaisseur est de $1330 \pm 55 \mu\text{m}$, une neutralisation de 10 min dans 1M NaOH réduit l'épaisseur à $1100 \pm 250 \mu\text{m}$. De plus, pendant la neutralisation, les films de chitosane se déforment (FIG 2.11). Sachant que les films doivent être plats pour fabriquer des systèmes microfluidiques, il faut empêcher leur déformation pendant toutes les phases de la neutralisation, particulièrement le séchage final. Sans glycérol, les films de chitosane ont naturellement tendance à rester attachés aux boîtes de Petri utilisées comme moule et donc à rester plats. Ainsi, en évitant de détacher les films avant la neutralisation, il est possible de conserver la planéité des films à travers cette étape. Cependant, cette solution n'est pas applicable aux films avec du glycérol qui se détachent de leur moule. Ces comportements problématiques ont été la raison pour laquelle nous avons choisi de ne plus poursuivre les travaux sur les films contenant du glycérol.

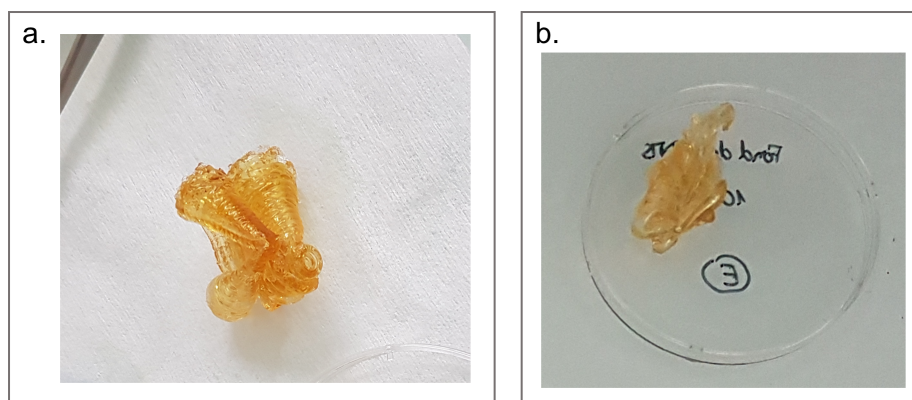


FIGURE 2.11 – Films de chitosane après rinçage lors d'une neutralisation à 1M NaOH pendant 10 min : (a) 6% (m/v) de chitosane 144, 200% (m/m) de glycérol par rapport à la masse de chitosane; (b) 6% (m/v) de chitosane 244LG, 200% (m/m) de glycérol par rapport à la masse de chitosane.

Afin d'étudier l'efficacité de l'étape de neutralisation, nous avons étudié le comportement des films neutralisés au contact de l'eau. Nous avons immergé dans de l'eau déionisée pendant 1h des films de $2 \times 3 \text{ cm}^2$ neutralisés, selon différentes conditions, et non neutralisés et nous avons mesuré leur taux de gonflement au cours du temps. Les résultats préliminaires sont présentés dans la FIG 2.12. Comme attendu, sans neutralisation, les films de chitosane présentent le gonflement le plus rapide jusqu'à ce qu'ils perdent leur cohésion et se dissolvent partiellement après 30 minutes. En fonction de la concentration de NaOH et du temps de neutralisation, les films de chitosane neutralisés ont des comportements différents une fois immergés dans l'eau déionisée. Pour tous les films neutralisés, l'absorption d'eau est plus rapide dans les 10 premières minutes avant de ralentir. Dans l'ensemble, le taux de gonflement diminue pour une concentration plus élevée de NaOH et pour un temps de neutralisation plus long dans la solution basique. Le taux de gonflement minimal de $70\% \pm 2\%$ a été obtenu pour une neutralisation de 45 minutes dans une solution de 1M NaOH. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Chang et al. [12]. Il est également intéressant de noter que les écart-types du gonflement sont plus faibles pour une concentration plus élevée et un temps de neutralisation plus long. Cela indique une meilleure reproductibilité d'un échantillon à l'autre.

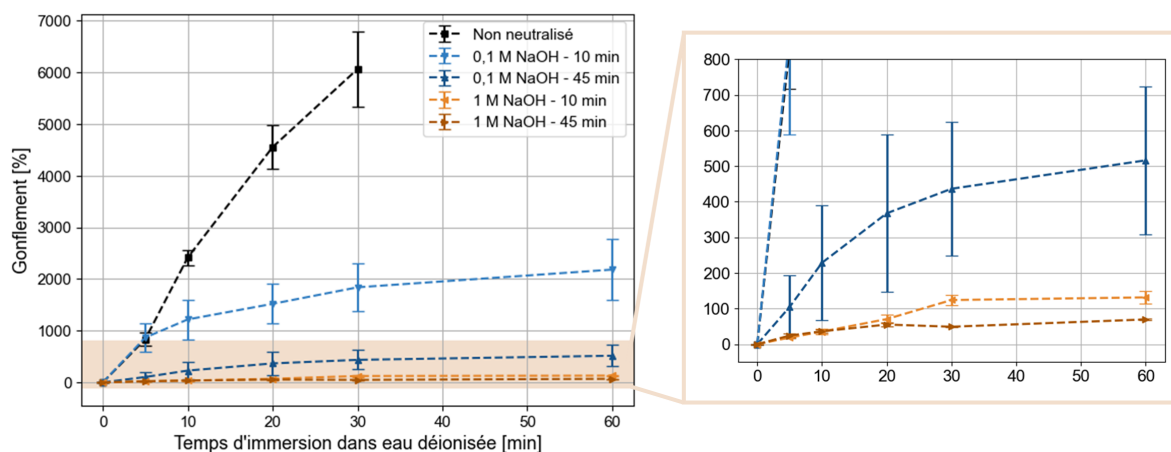


FIGURE 2.12 – Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG non-neutralisés ou neutralisés avec différentes concentrations de NaOH et différents temps d'immersion dans les solutions basiques (mesures en triplicate).

Puisqu'une étape de neutralisation est nécessaire pour empêcher la dissolution des films de chitosane dans des solutions aqueuses, les prochaines études sur les épaisseurs des films de chitosane ont été effectués sur des films de chitosane après leur neutralisation à 1M NaOH pendant 45 min.

Une première piste pour augmenter l'épaisseur d'un film est d'ajouter une seconde couche de solution de chitosane sur l'échantillon en cours de séchage. Cela permet d'augmenter le volume de solution par échantillon et donc leur épaisseur. Ainsi, des films de 4% (m/v) de chitosane 244LG simple couche après neutralisation ont une épaisseur de $260 \pm 20 \mu\text{m}$ tandis que des films à double couche neutralisés ont une épaisseur de $400 \pm 50 \mu\text{m}$. En contrepartie, le temps de séchage des films passe de 24h à 40h. L'ajout de la seconde couche se fait alors que la première couche n'est pas complètement sèche pour éviter la réaction des films secs de chitosane au contact d'une solution acide (gonflement et dissolution). Pour les films suivants, sauf si cela est précisé, les films auront 2 couches.

De même que l'épaisseur des films est un facteur important, l'uniformité de cette épaisseur sur la surface du film est nécessaire pour fabriquer des systèmes microfluidiques. Cette dernière se reflète sur l'écart-type de l'épaisseur. Nous avons évalué l'effet d'un couvercle percé de petits trous sur l'épaisseur des films. Deux films pour chaque méthode (avec ou sans couvercle) ont été préparés avec une solution à 4% (m/v) de chitosane 244LG, avec un séchage dans une étuve à 50°C . Ces films ont ensuite été neutralisés avant de mesurer l'épaisseur des films à différents endroits de la surface.

Dans une boîte de Petri sans couvercle, nous avons obtenu une épaisseur plus fine près des bords avec un plateau au milieu du film. La surface d'échange gazeux est plus importante au centre de la boîte de Petri, impliquant une évaporation de la solution plus rapide que celle des bords. Ainsi, à cause de la viscosité de la solution, la solution proche des bords y reste collée. Cela conduit à son séchage le long des parois verticales de la boîte et non à son fond (FIG 2.13-a). Sur une boîte de 3 cm de diamètre, l'épaisseur est relativement constante sur la partie centrale (zone circulaire de 1,5 cm de diamètre)

avant de diminuer. Les mesures d'épaisseur pour les autres expériences avaient été effectuées sur cette zone car il s'agit de la surface utilisable pour produire des systèmes microfluidiques. En mesurant l'épaisseur sur toute la surface, nous obtenons, pour les deux films, un écart-type important de 100 μm .

En ajoutant un couvercle percé pendant le séchage, l'humidité à la surface de la solution de chitosane est homogénéisée, diminuant les effets de bords sur l'évaporation du solvant (FIG 2.13-b). Ainsi, l'évaporation est plus uniforme et les écart-types se réduisent à 15 et 29 μm . Cependant, elle se trouve aussi ralentie, résultant en un temps de séchage pour 2 couches à 88h au lieu de 40h. L'utilisation des couvercles sera donc limitée pour les applications nécessitant des surfaces de travail supérieures à 1,5 cm de diamètre.

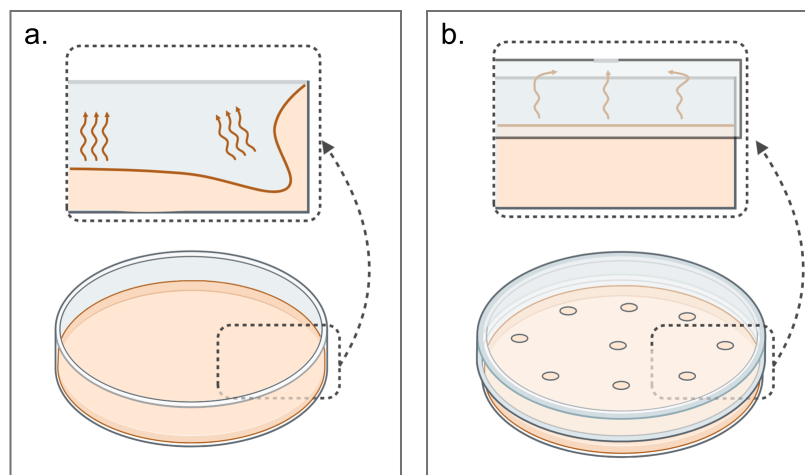


FIGURE 2.13 – Schéma du séchage de solutions de chitosane dans des boîtes de Petri sans (a) ou avec (b) un couvercle percé.

Les caractéristiques (M_w , concentration) du chitosane ont également un effet sur l'épaisseur et la transparence des films à double couche et neutralisés. Nous avons donc évalués 3 lots de chitosane (propriétés décrites en §I (Chap. 2)) à différentes concentrations (2%, 4% et 6% (m/v)) avec un ratio molaire d'acide acétique maintenu à 1,90 : 1. Les résultats sont présentés sur la FIG 2.14 et le TAB 2.9. Comme illustré sur la FIG 2.14-a, l'épaisseur des films de chitosane varie de 160 ± 21 à 588 ± 74 μm . L'épaisseur des films augmente avec la concentration en chitosane. Ainsi pour le chitosane ayant une M_w de $132 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, l'épaisseur passe de 218 ± 13 μm à 588 ± 74 μm pour des concentrations de 2% et 6% (m/v). Cependant, cela augmente aussi la viscosité des solutions [24] et complique leur manipulation. Par conséquent, il a été impossible de réaliser des films avec 6% (m/v) de chitosane de la M_w la plus élevée, $538 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ car la viscosité de la solution empêche la dissolution complète de tout le chitosane.

Mais l'épaisseur dépend aussi de la M_w et, pour une même concentration, elle diminue quand la M_w augmente. En effet, avec des chaînes de chitosane plus longues, leur organisation spatiale permet d'avoir des structures plus compactes, avec une distance intermoléculaires plus faible.

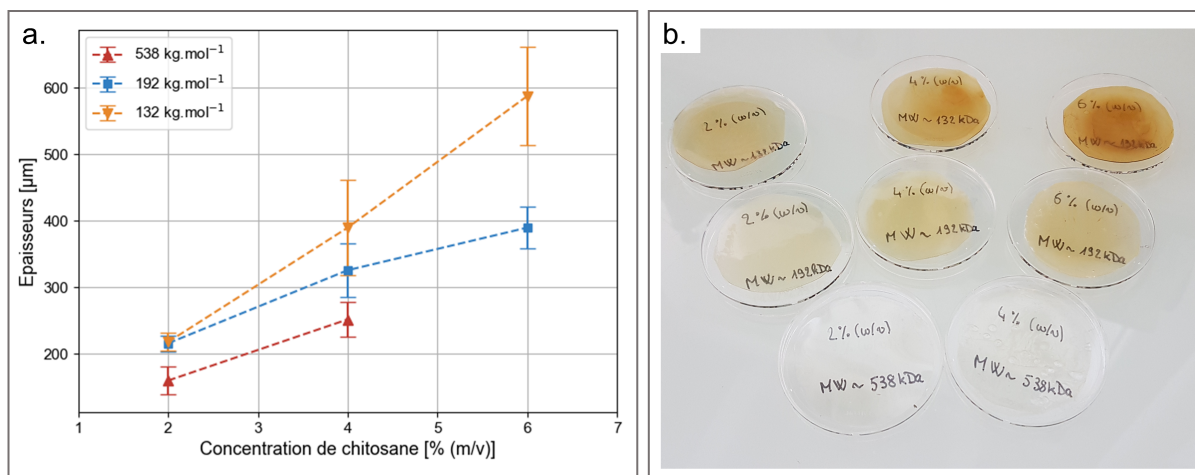


FIGURE 2.14 – (a) Epaisseurs de films de chitosane (double couche, neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min) en fonction de la concentration de la solution de chitosane et de leur M_w ; (b) Photos des mêmes films.

Sur la FIG 2.14-b, les films de chitosane apparaissent optiquement transparents avec une coloration jaune clair. La coloration et la transparence des films de chitosane ne se trouvent pas modifiées par leur neutralisation, si le rinçage est rigoureux car il permet l'élimination de tous les sels produits lors du contact avec NaOH. La concentration en chitosane et le type de chitosane influent la transparence des films. Les transparences calculées sont reportées dans le TAB 2.9. Afin de comparer les transparences mesurées pour des films d'épaisseur différentes, nous les avons normalisées pour 100 μm d'épaisseur (TAB 2.9). Les spectres en transmittance normalisée sont en FIG 2.15. D'après ces spectres, les films de chitosane absorbent plus fortement les longueurs d'onde inférieures à 500 nm [25], ce qui correspond à leur coloration jaune.

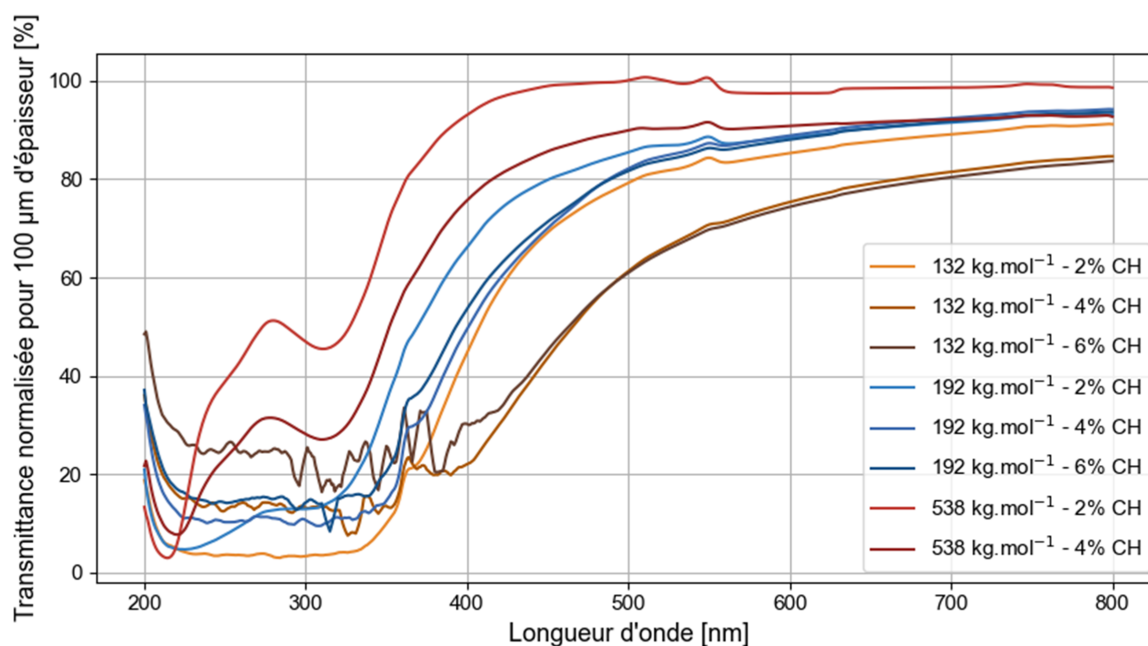


FIGURE 2.15 – Spectres UV-visible normalisés pour 100 μm d'épaisseur de films de chitosane (double couches, neutralisés avec 1M NaOH pendant 45 min) selon la concentration et la M_w du chitosane.

Des concentrations plus élevées de chitosane réduisent la transparence effective des films. Par exemple, pour le chitosane avec 192 kg.mol^{-1} de M_w , la transparence est de 75% pour des films à 2% (m/v) de chitosane mais uniquement de 55% pour des films à 6% (m/v). En prenant en compte leur épaisseur, les transparences normalisées des films sont similaires, entre 85-87% pour le chitosane avec 192 kg.mol^{-1} . Ainsi, la concentration de chitosane, dans la gamme testée, est sans impact notable sur la transparence normalisée. Donc la diminution de la transparence des films de chitosane pour une concentration plus élevée est uniquement liée à leur épaisseur croissante.

Cependant, la transparence normalisée diminue pour des chitosanes ayant des M_w plus faibles. Cette coloration pourrait être dû à la présence d'impuretés dans la poudre de chitosane. Pour les éliminer, une étape de purification du chitosane est réalisée telle que décrite dans Annexe A. La transparence normalisée de films de 4% (m/v) de chitosane à 192 kg.mol^{-1} a été mesurée à 87% pour du chitosane purifié, relativement similaire au 85% pour du chitosane non purifié. Donc, la coloration jaune des films demeure identique. Cela semble montrer que des pigments demeurent liés aux chaînes de chitosane. Sachant qu'une étape de décoloration lors de la production du chitosane n'est pas toujours appliquée, cela peut indiquer une différence de traitements entre ces trois lots de chitosane. Ainsi, la transparence varie aussi en fonction de la méthode de production du chitosane.

TABLEAU 2.9 – Transparences, épaisseurs et transparences normalisées de films de chitosane (double couche, neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min) en fonction de la concentration en chitosane et leur M_w .

M_w [kg.mol^{-1}]	132			192				538	
Concentration de chitosane [% (m/v)]	2	4	6	2	4	4	6	2	4
Transparence [%]	66	30	17	75	62	72	55	98	77
Epaisseur [μm]	218 ± 13	390 ± 72	588 ± 74	216 ± 12	326 ± 40	240 ± 28	390 ± 32	160 ± 21	252 ± 26
Transparence normalisée pour 100 μm d'épaisseur [%]	82	69	68	87	85	87	85	99	90

Finalement, en tenant compte à la fois de l'épaisseur des films de chitosane et de leur transparence effective, nous avons choisi d'utiliser des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG de M_w 192 kg.mol^{-1} , ce qui correspond à une transparence de 62% pour une épaisseur de $326 \pm 40 \mu\text{m}$.

II.A.3. Conclusion

En faisant un compromis entre l'épaisseur des films nécessaire pour fabriquer des systèmes microfluidiques et leur transparence optique essentielle pour l'observation au microscope de micro-objets comme des cellules, nous avons décidé de travailler avec des films en

doubles couches à 4% (m/v) de chitosane de $192 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, soit le chitosane 244LG. De plus, pour faciliter le coulage des solutions de chitosane, le ratio molaire d'acide acétique est fixé à 1,90 : 1. Selon la surface de travail nécessaire, le séchage sera réalisé avec ou sans couvercle.

De plus, nous avons introduit une étape de neutralisation dans la fabrication des films de chitosane, afin de réduire le gonflement et la dissolution des films au contact de solutions aqueuses. Nous avons obtenus des films de $400 \pm 50 \mu\text{m}$ d'épaisseur présentant une transparence de 85% normalisée pour une épaisseur de $100 \mu\text{m}$. Cependant, un taux de gonflement des films de l'ordre de $70\% \pm 2\%$ persiste. Nous avons donc expérimenté différents protocoles pour le réduire, qui sont décrits dans la section suivante.

II.B. Stratégies pour limiter le gonflement des films de chitosane

Dans une application microfluidique, des solutions aqueuses doivent pouvoir circuler dans le système. Il est donc primordial de rendre les films de chitosane insolubles et de diminuer leur gonflement au contact de solutions aqueuses. Nous avons séparé les stratégies explorées en deux catégories selon si elles emploient ou non des agents réticulants. Dans les expériences de caractérisation suivantes, le séchage est réalisé sans couvercle.

II.B.1. Stratégies sans réticulation

Les trois premières stratégies évaluées sont la ré-acétylation, la neutralisation avec des solutions aqueuses pour des temps de neutralisation plus longs et la neutralisation avec des solutions hydroalcooliques.

II.B.1.a. Ré-acétylation de films de chitosane

Une méthode alternative permettant d'empêcher la solubilisation et réduire le gonflement de films de chitosane est de rapprocher la structure chimique du chitosane à celle de la chitine, en transformant certains groupes amine du chitosane en groupes amide. On parle alors de ré-acétylation (FIG 2.16-a). En effet, plus le DA du chitosane est élevé, moins le chitosane est soluble dans l'eau, jusqu'à un DA supérieur à $\sim 60\%$ où le polymère est considéré comme étant de la chitine [26, 25]. La chitine est insoluble dans l'eau car les groupes amide sont moins hydrophiles que les groupes amine et forment plus d'interactions entre les chaînes de polymère par liaisons hydrogènes.

La ré-acétylation du chitosane a été décrite par Lim *et al.* [27] et Dias *et al.* [28]. Une solution alcoolique d'anhydride acétique, dont le ratio molaire par rapport au nombre de groupes amine dépend du DA du polymère, est ajoutée à une solution de chitosane. Nous avons adapté cette méthode au chitosane sous forme de films non-neutralisés et neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min. Comme l'anhydride acétique s'hydrolyse plus rapidement

dans l'eau que dans l'éthanol, la réaction se passe dans une solution alcoolique. Or, les films de chitosane n'absorbent pas l'éthanol, ce qui limite la diffusion des molécules d'anhydride acétique. Donc les films sont préalablement légèrement gonflés dans l'eau déionisée afin de faciliter leur diffusion dans l'épaisseur du film. Un excès d'anhydride acétique par rapport aux groupes amine des films de chitosane a été utilisé pour obtenir une ré-acétylation du plus de groupes amine possibles.

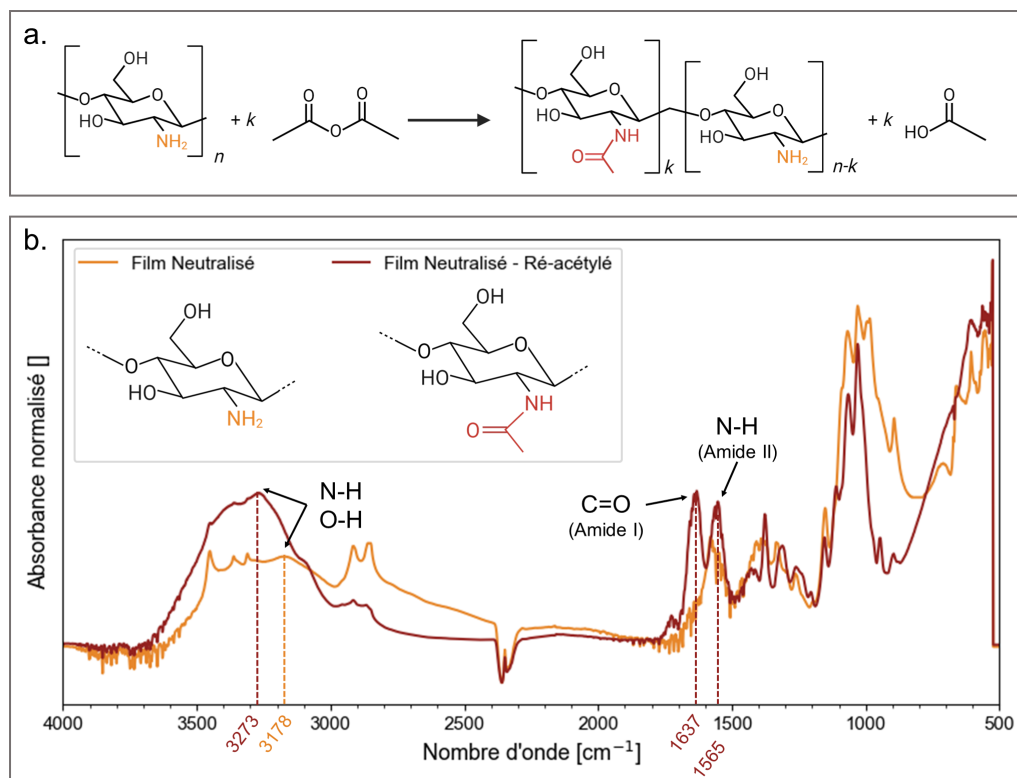


FIGURE 2.16 – (a) Réaction de ré-acétylation de chitosane avec de l'anhydride acétique ; (b) Spectres FTIR de films de 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés (1M NaOH pendant 45 min) avant et après ré-acétylation.

En comparant les spectres FTIR avant et après la ré-acétylation sur FIG 2.16-b pour des films neutralisés, nous pouvons vérifier l'impact de cette étape sur la structure du polymère. L'apparition du pic C=O de l'amide I, à côté du pic N-H de l'amide II à 1637 cm^{-1} témoigne de la ré-acétylation de certains groupes amine dans le chitosane. En effet, le pic N-H est présent pour les groupes amine du chitosane alors que sa combinaison avec le pic C=O indique la présence de groupes amide. Ce changement s'accompagne aussi d'un décalage de la bande de vibrations N-H et O-H de 3178 cm^{-1} à 3273 cm^{-1} à cause de la modification des interactions intermoléculaires liée à celle des groupes présents sur les chaînes du chitosane. Nous pouvons observer les mêmes changements sur les spectres des films non-neutralisés.

Le taux de gonflement, dans l'eau déionisée, des films ré-acétylés a été étudié et comparé avec celui d'un film neutralisé sur la FIG 2.17. Il apparaît que le taux de gonflement de films non-neutralisés et ré-acétylés est plus élevé que celui de films neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min. Par contre, la ré-acétylation d'un film de chitosane neutralisé

pourrait permettre de réduire le taux de gonflement, comme pour les échantillons testés de 72% à 61%. Il serait donc intéressant d'ajouter cette étape de ré-acétylation après la neutralisation. Mais cela se fait au prix d'une étape supplémentaire de plus d'un jour.

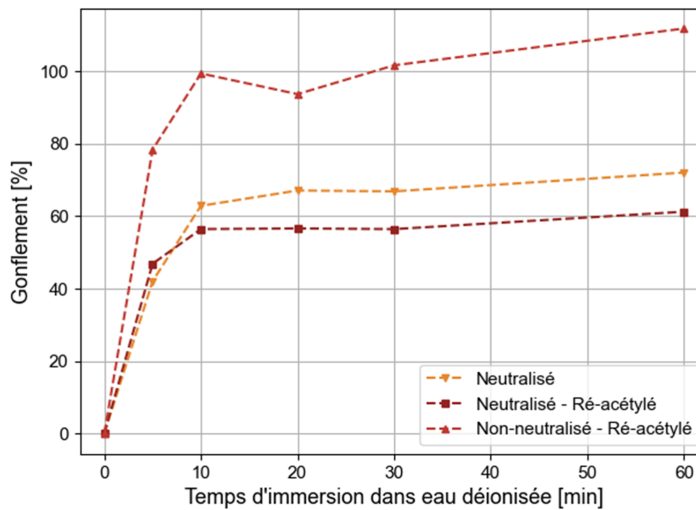


FIGURE 2.17 – Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG après ré-acétylation (mesures sans réplication).

II.B.1.b. Neutralisation à partir de solutions aqueuses basiques

La neutralisation des films de chitosane a déjà été entreprise dans la §II.A.2 (Chap. 2). Lors de cette étude préliminaire, nous avons identifié que le gonflement des films de chitosane diminue avec une augmentation de la concentration en NaOH ainsi qu'avec une augmentation du temps de neutralisation. Ainsi, pour réduire le gonflement, nous avons approfondi les tests de neutralisation en suivant les tendances pointées précédemment. Ainsi nous avons testé des concentrations de NaOH de 1M et 5M et des temps de neutralisation de 1h, 3h, 15h30 et 24h. De plus, nous avons choisi d'observer le taux de gonflement pendant 48h pour déterminer le comportement des films lors d'un contact prolongé avec des solutions aqueuses. Sur toutes les courbes de la FIG 2.18, nous observons que les films neutralisés atteignent un plateau de gonflement après une immersion dans l'eau déionisée comprise entre 2 et 3h qui reste stable pendant plusieurs jours. Ce plateau correspond à un équilibre entre les interactions entre les chaînes de chitosane qui maintiennent la structure du film et l'absorption de molécules d'eau qui s'insèrent entre les chaînes.

En augmentant la durée de neutralisation dans 1M NaOH de 1h à 24h (FIG 2.18-a), le taux de gonflement maximal diminue jusqu'à atteindre $65\% \pm 4\%$. La neutralisation avec le taux de gonflement le plus faible est atteinte à partir de 3h de neutralisation. Cela correspond donc au temps qu'il faut pour que la solution basique diffuse à travers l'épaisseur du film. Un temps de neutralisation plus long ne modifie pas le gonflement. Cependant, les films utilisés pour ces caractérisations ont été neutralisés sans être maintenus attachés à leur moule. Or, ce maintien permet d'obtenir des films plats, nécessaires pour la fabrication de LoC mais cela peut ralentir la diffusion de la solution

basique à travers le film. Donc par la suite, le temps de neutralisation est fixé à 15h30 (une nuit) à T_{amb} .

Sur la FIG 2.18-b, les taux de gonflements mesurés avec une neutralisation avec 1M NaOH et avec 5M NaOH sont comparés. L'augmentation de la concentration de NaOH diminue légèrement le taux de gonflement maximal atteint pour atteindre $59\% \pm 3\%$. Cependant, avec 5M NaOH, le rinçage des films de chitosane est allongé (15-20 cycles au lieu de 4-5 cycles pour atteindre un pH neutre) pour une très faible amélioration du taux de gonflement. La neutralisation avec 5M NaOH n'a donc pas été retenue. Les caractérisations des films sont par la suite réalisées sur des films neutralisés avec 1M NaOH pendant 15h30.

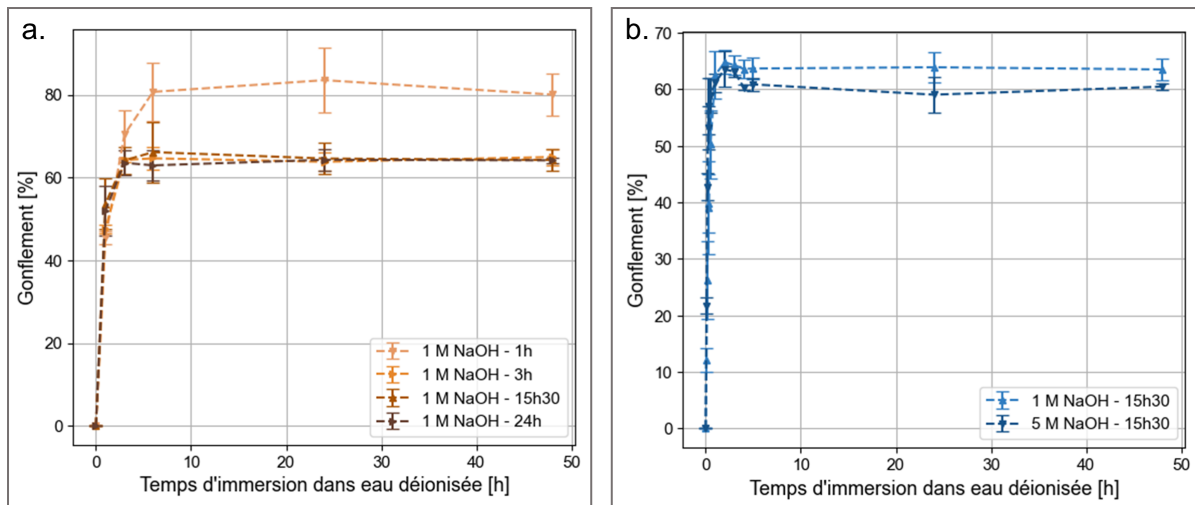


FIGURE 2.18 – Taux de gonflement des films de chitosane 244LG à 4% (m/v) neutralisés (a) pour différents temps de neutralisation dans 1M NaOH et (b) avec différentes concentrations de NaOH pendant 1 nuit (mesures en triplicate).

Pour déterminer la quantité de chitosane solubilisée lors du contact des films de chitosane neutralisés avec des solutions aqueuses, la masse à sec des films est comparée avant et après leur immersion dans l'eau déionisée pendant 48h. Il apparaît que les films présentent une perte de masse de $4,5\% \pm 0,3\%$ à cause de la solubilisation partielle du chitosane dans la solution aqueuse. Cette dissolution du chitosane est relativement faible et son impact sur les systèmes microfluidiques et sur la manipulation de cellules sera discuté respectivement aux CHAPITRE 3 et CHAPITRE 4.

Les films de chitosane neutralisés avec les conditions optimales de 1M NaOH pendant 15h30 possèdent une transparence et des épaisseurs similaires à celles discutées dans §II.A.2 (Chap. 2) pour les films neutralisés pendant 45 min. Des caractérisations plus avancées de ces films ont été effectuées afin de vérifier leur compatibilité avec la fabrication de systèmes microfluidiques. Comme l'état de surface des films impacte la circulation de liquides dans des systèmes microfluidiques, ce dernier est caractérisé pour les films de chitosane par son hydrophobicité et sa rugosité. De plus, afin de guider le choix de méthodes de micro-structuration dans les chapitres suivants, les propriétés mécaniques des films sont caractérisées par nano-indentation.

L'état de surface des films a été caractérisé par sa rugosité et son hydrophobicité, mesurés respectivement par AFM (FIG 2.19) et par leur angle de contact avec de l'eau déionisée. La rugosité de la surface est d'environ 72 ± 15 nm. La surface des films de chitosane neutralisés présente un angle de contact avec l'eau de $99,5^\circ \pm 2,4^\circ$, ce qui confirme leur caractère hydrophobe déjà identifié dans la littérature [12].

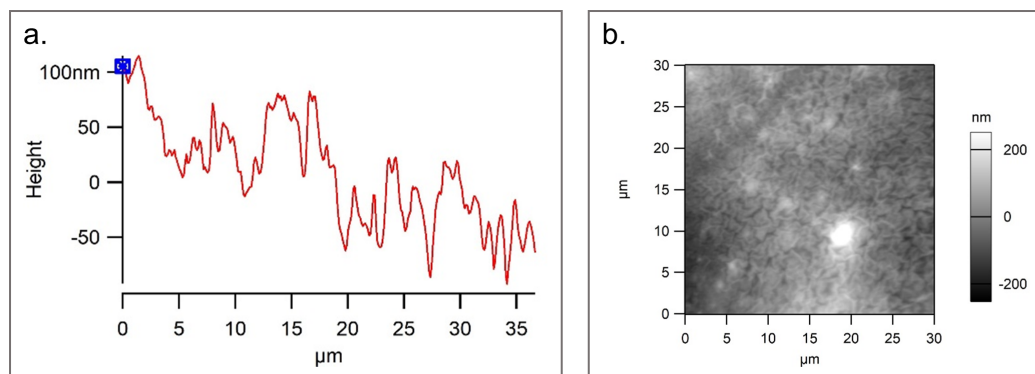


FIGURE 2.19 – Mesures AFM sur un film de chitosane neutralisé : Profil linéaire (a) de la hauteur extraite depuis la carte de la surface (b).

Les films de chitosane neutralisés ont un module d'Young de $6,49 \pm 0,11$ GPa et une dureté de $0,28 \pm 0,01$ GPa, mesurés à $23,9^\circ\text{C}$. Pour rappel, ceux des films de chitosane non neutralisés sont de $5,59 \pm 0,11$ GPa et de $0,18 \pm 0,01$ GPa. L'augmentation de la résistance après neutralisation peut être expliquée par l'élimination des molécules d'eau et d'acide acétique restant dans les films de chitosane ainsi que par l'augmentation des interactions entre les chaînes de chitosane qui en résulte [12, 29]. En effet, ces petites molécules agissent comme des plastifiants et réduisent les interactions entre les chaînes de polymères.

II.B.1.c. Neutralisation à partir de solutions hydroalcooliques basiques

D'après la littérature [30], la neutralisation de films de chitosane peut s'effectuer à partir de solutions hydroalcooliques basiques. Le protocole est similaire à une neutralisation avec une solution aqueuse basique mais l'hydroxyde de sodium est dissout dans une solution d'éthanol à 70% (v/v). Des concentrations de 1M à 3M NaOH/EtOH ont été étudiées et comparées avec la neutralisation avec 1M NaOH.

D'après l'analyse des spectres FTIR (FIG 2.20), la neutralisation hydroalcoolique conduit aux mêmes déplacements et disparitions de pics que la neutralisation aqueuse (déplacement du pic N-H de l'amide II à 1538 cm^{-1} vers 1582 cm^{-1} , disparition du pic COO^- à 1637 cm^{-1} , déplacement de la bande de vibrations N-H et O-H autour de 3200 cm^{-1}). Cela confirme l'efficacité de la neutralisation avec la déprotonation des groupes amine du chitosane et l'élimination des molécules d'acide acétique.

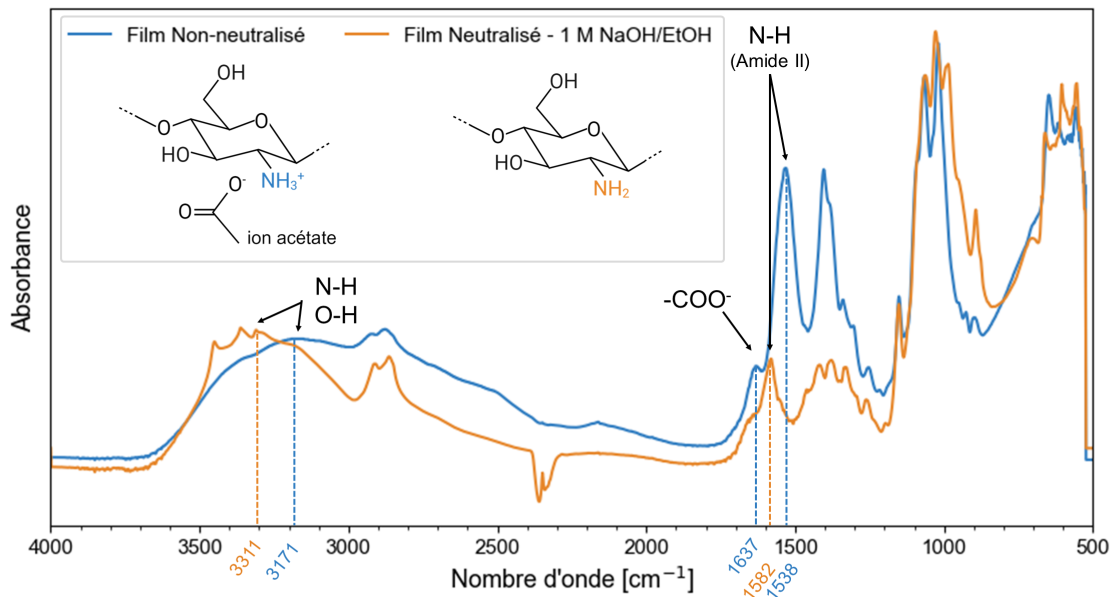


FIGURE 2.20 – Spectres FTIR de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG avant et après neutralisation avec 1M NaOH/EtOH pendant 15h30.

Nous avons mesuré le taux de gonflement du chitosane après 15h30 (une nuit) de neutralisation dans différentes solutions hydroalcooliques. Les résultats sont présentés en FIG 2.21-a. La cinétique de gonflement des neutralisations hydroalcooliques est semblable à celle observée pour les neutralisations aqueuses avec une absorption d'eau rapide dans les premières minutes, puis se stabilisant au cours du temps jusqu'à présenter un plateau à partir de 3h d'immersion dans de l'eau déionisée, stable sur plusieurs jours.

Contrairement à la tendance observée pour les neutralisations en solutions aqueuses, le taux de gonflement des films de chitosane après 24h d'immersion dans de l'eau déionisée augmente avec la concentration de NaOH utilisée pendant leur neutralisation, passant de $56,6\% \pm 0,8\%$ pour 1M NaOH/EtOH à $68,3\% \pm 0,2\%$ pour 3M NaOH/EtOH. Cela peut être dû au fait que les solutions hydroalcooliques semblent instables et se dégrader avec des vitesses différentes selon la concentration en NaOH. Initialement transparentes, les solutions prennent une coloration jaune après un certain temps indiquant une dégradation des constituants qui réagissent pour produire des espèces chimiques colorées. Ainsi, une solution de 1M NaOH/EtOH présente des signes extérieurs de dégradation uniquement après plusieurs semaines de stockage tandis qu'une solution de 2M NaOH/EtOH en aura après 2 jours. Par conséquent, un état plus avancé de dégradation de la solution hydroalcoolique pourrait diminuer l'effet de la neutralisation des films de chitosane, à cause de la disparition des constituants ou de l'apparition des produits secondaires.

D'après ces expériences, une neutralisation avec une solution hydroalcoolique de 1M NaOH/EtOH permet d'avoir un taux de gonflement maximal ($56,6\% \pm 0,8\%$) inférieur à celui obtenu avec une neutralisation avec une solution aqueuse de concentration 1M NaOH ($65\% \pm 4\%$). Dans la littérature, He *et al.* [30] ont mesuré, eux aussi, un taux de gonflement inférieur pour une neutralisation avec 0,5M NaOH dans une solution hydroalcoolique à 80%(v/v) d'éthanol que pour une neutralisation avec 0,5M NaOH. Pour eux, les solutions hydroalcooliques produisent des films avec des configurations

plus compactes, réduisant le gonflement. De plus, Korniienko *et al.* [31] ont montré que la neutralisation avec des solutions hydroalcooliques permet de préserver les structures nanofibreuses de membranes de chitosane réalisées à partir de nano-fibres.

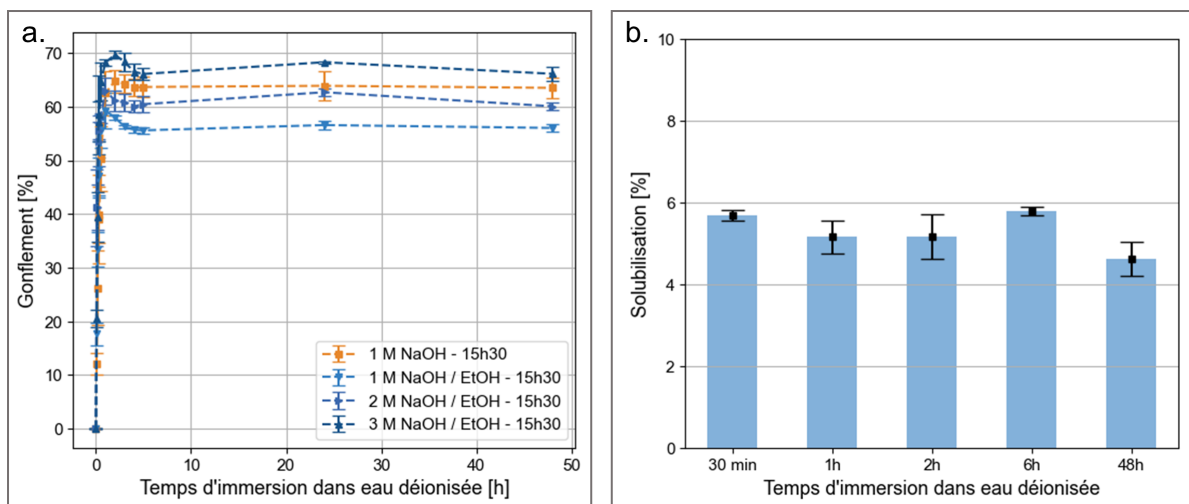


FIGURE 2.21 – (a) Taux de gonflement des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés avec des solutions basiques hydroalcooliques à 70% (v/v) d'éthanol pendant 15h30 (mesures en triplicate); (b) Solubilisation des films à 4% (m/v) de chitosane 244LG neutralisés avec 1M NaOH/EtOH pendant 15h30 (mesures en triplicate).

Les films neutralisés avec 1M NaOH/EtOH présentent une épaisseur de $412 \pm 48 \mu\text{m}$ comparable à celle obtenue avec la neutralisation à 1M NaOH. De plus, leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques sont également du même ordre de grandeur. En effet, leur module d'Young est de $5,96 \pm 0,11 \text{ GPa}$ et leur dureté de $0,23 \pm 0,01 \text{ GPa}$, mesurés par nano-indentation. Leur transparence est de 62% et l'angle de contact de $92,7^\circ \pm 1,8^\circ$ indiquant leur caractère hydrophobe. La rugosité mesurée par AFM est de $10 \pm 2 \text{ nm}$, ce qui est fortement inférieure à celle des films avec une neutralisation avec les solutions aqueuses ($72 \pm 15 \text{ nm}$). Cette différence pourrait refléter une configuration différente des chaînes de chitosane, comme relevé sur des fibres de chitosane par Korniienko *et al.* [31]. Pour déterminer la raison, il faudrait procéder à des caractérisations plus détaillées, comprenant des images de chacune des surfaces.

De plus, ces films ont une solubilisation après 48h d'immersion dans l'eau déionisée, de $4,6\% \pm 0,4\%$ similaire à celle mesurée avec une neutralisation en solution aqueuse ($4,5\% \pm 0,33\%$). La solubilisation de plusieurs films de chitosane a aussi été mesurée en fonction du temps d'immersion dans l'eau déionisée. D'après la FIG 2.21-b, nous pouvons observer qu'au bout de 30 min, $5,7\% \pm 0,1\%$ de la masse initiale des films chitosane a déjà été solubilisé. Cette quantité n'augmente pas au cours du temps. Ainsi, la solubilisation du chitosane s'effectue uniquement au cours des premières 30 minutes d'immersion dans l'eau déionisée. Cela pourrait indiquer une resolubilisation quasiment immédiate de cette petite quantité de chitosane (incomplètement neutralisée ou peu retenue par le réseau de chaînes), tandis que le reste du chitosane ne se dissout pas sur ces échelles de temps.

En conclusion, les films neutralisés avec une solution basique hydroalcoolique présentent des caractéristiques similaires à ceux neutralisés avec une solution aqueuse. Cependant, le taux de gonflement, après 24h d'immersion dans l'eau déionisée, des films neutralisés

avec 1M NaOH/EtOH, soit $56,6\% \pm 0,8\%$, est préférable à celui des films neutralisés à 1M NaOH ($65\% \pm 4\%$). Ainsi, pour des applications microfluidiques, la neutralisation à 1M NaOH/EtOH pendant 15h30 est à privilégier.

II.B.1.d. Discussion et conclusion

Afin de minimiser le gonflement des films de chitosane pour les utiliser dans des applications microfluidiques, plusieurs stratégies ont été testées, sans utiliser d'agent de réticulation. Le taux de gonflement des films a été utilisé comme critère principal pour sélectionner les méthodes les plus prometteuses. Les valeurs sont résumées dans le TAB 2.10. Le temps de neutralisation optimale est fixé à 15h30. Le taux de gonflement le plus faible, $56,6\% \pm 0,8\%$, a été obtenu avec une neutralisation à 1M NaOH/EtOH. La ré-acétylation permet de réduire le taux de gonflement de films de chitosane neutralisés à 1M NaOH pendant 45 min. Des caractérisations supplémentaires sont nécessaires afin d'optimiser ce procédé.

Un résumé des caractérisations mécaniques et de l'état de surface des films de chitosane présentant les taux de gonflement les plus faibles sont reportées dans le TAB 2.10.

TABLEAU 2.10 – Caractéristiques des films de chitosane selon la stratégie adaptée (N/D pour données non mesurées).

	Film après séchage	1M NaOH 15h30	1M NaOH/EtOH 15h30	Ré-acétylation
Epaisseurs [µm]	470 ± 60	400 ± 50	412 ± 48	N/D
Taux de gonflement [%]	6024 ± 722 à 30min	65 ± 4 à 24h	56,6 ± 0,8 à 24h	61 à 1h
Transparence [%]	62	62	62	N/D
Taux de solubilisation [%]	N/D	4,5 ± 0,3 à 48h	4,6 ± 0,4 à 48h	2 à 1h
Angle de contact [°]	N/D	99,5 ± 2,4	92,7 ± 1,8	N/D
Module d'Young [GPa]	5,59 ± 0,11	6,49 ± 0,11	5,96 ± 0,11	N/D
Dureté [GPa]	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,01	N/D
Rugosité [nm]	N/D	72 ± 15	10 ± 2	N/D

A titre de comparaison avec les matériaux standards utilisés en microfluidique, les films de chitosane neutralisés ont une transparence inférieure à celle du PDMS et des thermoplastiques qui a été reportée à plus de 90% [32, 33]. De plus, les lames de verre [34, 35] ou les tranches de PMMA et de COC disponibles dans le commerce [36] présentent une rugosité de surface comprise entre 5 et 30 nm, tandis que le chitosane à une rugosité de surface de l'ordre de 72 ± 15 nm ou 10 ± 2 nm selon la neutralisation.

Les films neutralisés de chitosane présentent un caractère hydrophobe avec des angles de contact avec l'eau ($92,7^\circ$ - $99,7^\circ$) compris entre celui du PMMA (68° - 76°) [37] et du PS (66°) [38] et celui du PDMS (107°) [39]. Ils ont montré des propriétés mécaniques plus proches des thermoplastiques comme le PMMA [40] et le COC [41] qui possèdent respectivement un module d'Young de 5 GPa et de 3 GPa alors que le PDMS [42] a un module d'Young compris entre 1,61 et 2,01 MPa.

II.B.2. Stratégies basée sur la réticulation

Une autre stratégie pour empêcher la dissolution de films de chitosane et contrôler leur gonflement est de réticuler les chaînes de chitosane. La réticulation de films de chitosane crée des points d'ancrage entre les différentes chaînes du chitosane et limite leur déplacement les unes par rapport aux autres. La réticulation chimique des chaînes de chitosane est la méthode la plus courante car elle permet de créer des liaisons covalentes, plus fortes que des liaisons physiques entre les chaînes de chitosane et les molécules réticulantes. Deux agents de réticulation ont été étudiés dans cette partie : le glutaraldéhyde et la génipine.

II.B.2.a. Glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est largement utilisé pour réticuler le chitosane en raison de sa facilité de synthèse et la vitesse de réaction sous des conditions expérimentales douces. Cependant, le principal désavantage reste la cytotoxicité du glutaraldéhyde, surtout si ces groupes n'ont pas réagi [43].

Différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane (entre 1 : 10 et 1 : 200) ont été testés. Cette gamme a été choisie suite à une étude préliminaire réalisée lors d'un projet d'étudiants de 2^{ème} année de l'Ecole Centrale de Lyon au sein de notre laboratoire [44]. Les solutions de glutaraldéhyde ont été ajoutées goutte à goutte à une solution de chitosane 244LG à 4% (m/v). Les groupes aldéhyde du glutaraldéhyde réagissent en quelques minutes à T_{amb} [45] avec les groupes amine du chitosane pour former une liaison imine (FIG 2.22-a), ce qui s'observe à l'échelle macroscopique par un changement de couleur et une solidification de la solution de chitosane. Pour ralentir la réaction de réticulation, la centrifugation de la solution a été effectuée à 4°C , nécessaire pour retirer les bulles formées lors du mélange. Les films de chitosane réticulés avec les différents ratios molaires de glutaraldéhyde ont été obtenus après un séchage à T_{amb} . Cependant, les solutions de chitosane avec un ratio molaire de 1 : 10 en glutaraldéhyde ont réticulé dès leur mélange. Après séchage, ces films présentaient une réticulation non uniforme (coloration non-uniforme) et une non-planéité. Par conséquent, ce ratio ne sera pas étudié par la suite.

Le taux de gonflement des films réticulés a été mesuré et les résultats sont présentés sur la FIG 2.22-b. Les films de chitosane réticulés avec des ratios de 1 : 100 et 1 : 200 ont un taux de gonflement atteignant 895% et 1892% respectivement en 5h et ont ensuite été dissous partiellement dans l'eau déionisée. Pour les films à 1 : 50 et 1 : 20, le gonflement

ralentit fortement à partir de 5h d'immersion dans l'eau déionisée (respectivement 559% et 398%) mais ne se stabilise pas complètement sur 100h d'observation. Sur l'ensemble des films, l'augmentation de la concentration en glutaraldéhyde se traduit par une réduction du taux de gonflement. Cette tendance a également été décrite dans la littérature [45]. Ainsi, le film obtenu avec un ratio de 1 : 20 montre la réticulation la plus efficace avec un taux de gonflement de 411% après 24h d'immersion.

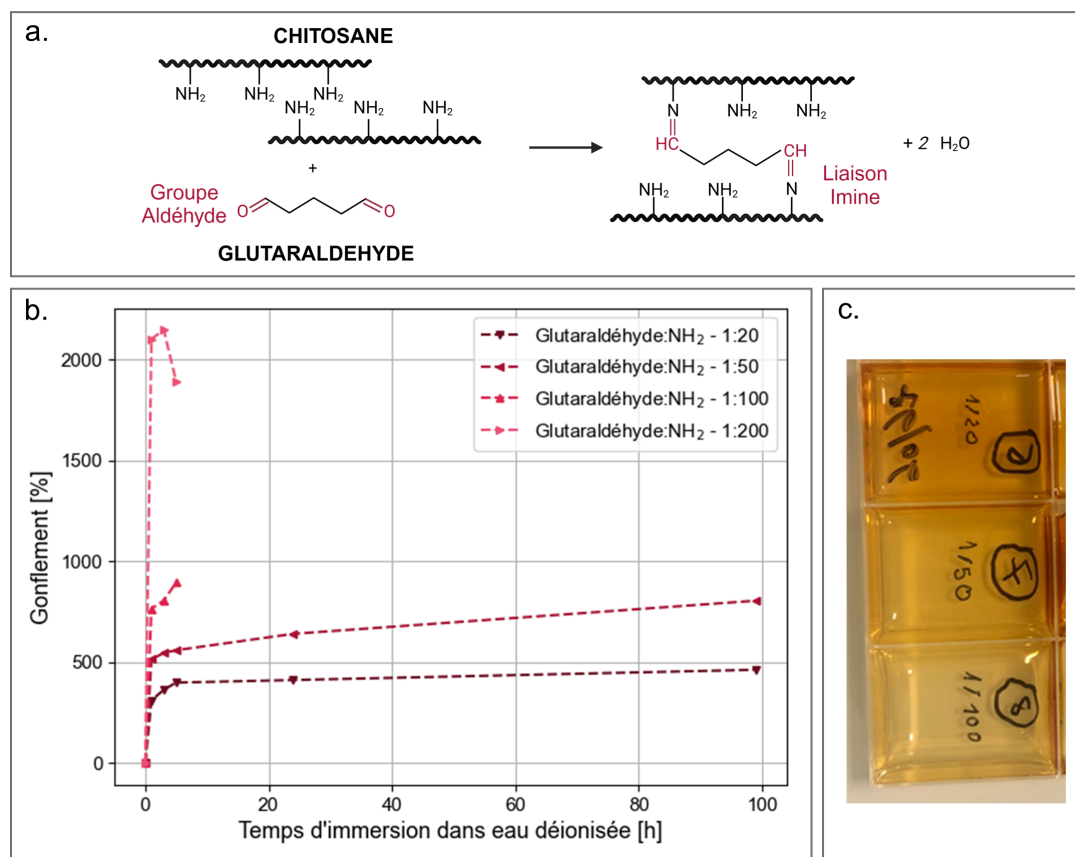


FIGURE 2.22 – (a) Réaction de réticulation entre chitosane et glutaraldéhyde ; (b) Taux de gonflement de films de chitosane réticulé avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane (mesures sans réplication) ; (c) Photos des solutions de chitosane et glutaraldéhyde avec des ratios molaires de 1 : 20, 1 : 50 et 1 : 100 (de haut en bas) après 24h de séchage.

L'épaisseur et la transparence des films réticulés avec le glutaraldéhyde ont été caractérisées et comparés dans le TAB 2.11. Les épaisseurs des films obtenus sont comprises entre $152 \pm 32 \mu\text{m}$ et $310 \pm 14 \mu\text{m}$. La transparence des films est calculée à partir des spectres en transmittance entre 400 et 800 nm. Les spectres en transmittances normalisées pour 100 μm d'épaisseur sont en FIG 2.23. Lors de la réticulation avec le glutaraldéhyde, les solutions de chitosane ainsi que les films réticulés prennent une coloration brune, comme le montre la FIG 2.22-c. En effet, les liaisons imine créées lors de la réticulation ont des pics d'absorption situés entre 200 et 300 nm [46] donc l'augmentation du nombre de ces liaisons implique une absorption plus importante. Ainsi, la transparence normalisée des films diminue avec l'augmentation de la concentration en glutaraldéhyde, allant de 78% pour le ratio de 1 : 200 à 59% pour le ratio 1 : 20.

TABLEAU 2.11 – Transparences, épaisseurs de films et transparences normalisées pour 100 μm d'épaisseur de chitosane réticulés avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane.

Ratio molaire Glutaraldéhyde : NH_2	1 : 20	1 : 50	1 : 100	1 : 200
Transparence [%]	29	52	66	67
Epaisseur [μm]	310 ± 14	270 ± 36	152 ± 32	170 ± 38
Transparence normalisée pour 100 μm d'épaisseur [%]	59	72	76	78

En comparant ces propriétés avec le cahier des charges pour la fabrication de systèmes microfluidiques, les taux de gonflement obtenus avec cette méthode de réticulation du chitosane sont beaucoup trop élevés. Il serait sans doute possible de réduire le taux de gonflement en optimisant la concentration en glutaraldéhyde ainsi que le protocole actuel. Cependant, nous avons observé qu'à mesure que la concentration de glutaraldéhyde augmente la transparence diminue, ce qui risque d'empêcher l'observation microscopique des micro-canaux.

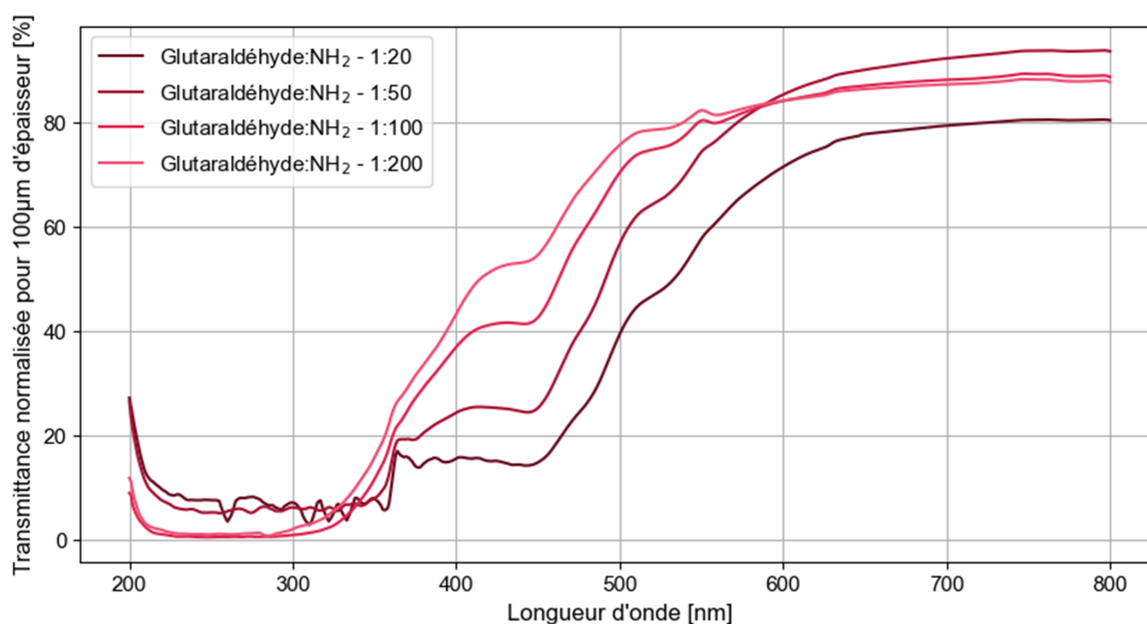


FIGURE 2.23 – Spectres UV-visible normalisés pour 100 μm d'épaisseur de films à 4% (m/v) de chitosane 244LG réticulé avec différents ratios molaires de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane.

De plus, le glutaraldéhyde demeure cytotoxique, à partir de 8% en masse par rapport à la masse de polymère [43], ce qui est problématique pour les applications envisagées impliquant la manipulation de cellules. Ainsi, il faudrait, au moins, ajouter une étape de rinçage des films réticulés pour retirer les molécules de glutaraldéhyde non liées et l'acide acétique encore présent.

Plus largement, dans le cadre d'un procédé de fabrication éco-responsable, le glutaraldéhyde pose plusieurs problèmes. Sa production industrielle fait intervenir des réactifs pétrochimiques et peut générer des sous-produits nocifs. De plus, le glutaraldéhyde est dangereux pour la santé humaine et l'environnement, particulièrement marin [47].

II.B.2.b. Génipine

La génipine est une molécule que l'on trouve dans divers fruits et plantes médicinales auxquelles elle confère des effets thérapeutiques. En plus de ses propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-fongiques, la génipine est un réticulant qui est 5000 à 10000 fois moins cytotoxique que le glutaraldéhyde [48]. Elle représente donc une alternative bio-sourcée et biocompatible pour réticuler le chitosane.

La réticulation du chitosane avec la génipine se produit en condition acide selon deux mécanismes mettant en jeu deux sites distincts de la molécule de la génipine (FIG 2.24-a) [49]. Dans un premier temps, un groupe amine du chitosane attaque par nucléophilie l'atome de carbone oléfinique lié à un groupe hydroxyle et à l'oxygène du cycle, puis le cycle s'ouvre pour former une amine tertiaire. Dans un second temps, le groupe ester méthylique de la génipine réagit d'abord avec une autre amine du chitosane pour former un amide.

Nous avons étudié la réticulation du chitosane avec différents ratios molaires (1 : 93, 1 : 185 et 1 : 370) de génipine par rapport aux groupes amine du chitosane. Le spectre FTIR de la FIG 2.24-b d'un film réticulé avec de la génipine à 1 : 93 après neutralisation est comparé au spectre d'un film de chitosane sans génipine. Il apparait des décalages de certains pics caractéristiques après réticulation. Les bandes d'absorbance observées dans le spectre du chitosane à 1059 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} et 939 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation de C-N et de C-O [49]. Ils sont à 1071 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} et 995 cm^{-1} avec des intensités relatives modifiées dans le chitosane réticulé, à cause de la formation de liaisons C-N. Le pic à 1387 cm^{-1} est dû aux vibrations d'élongation de C-N dans l'amine hétérocyclique nouvellement formée, ce qui explique l'augmentation de l'intensité relative. A 1551 cm^{-1} , le pic N-H de l'amide II est décalé et plus étalé dans le chitosane avec génipine car il se chevauche avec le pic d'étirement des doubles liaisons C=O et C=C de la génipine [50].

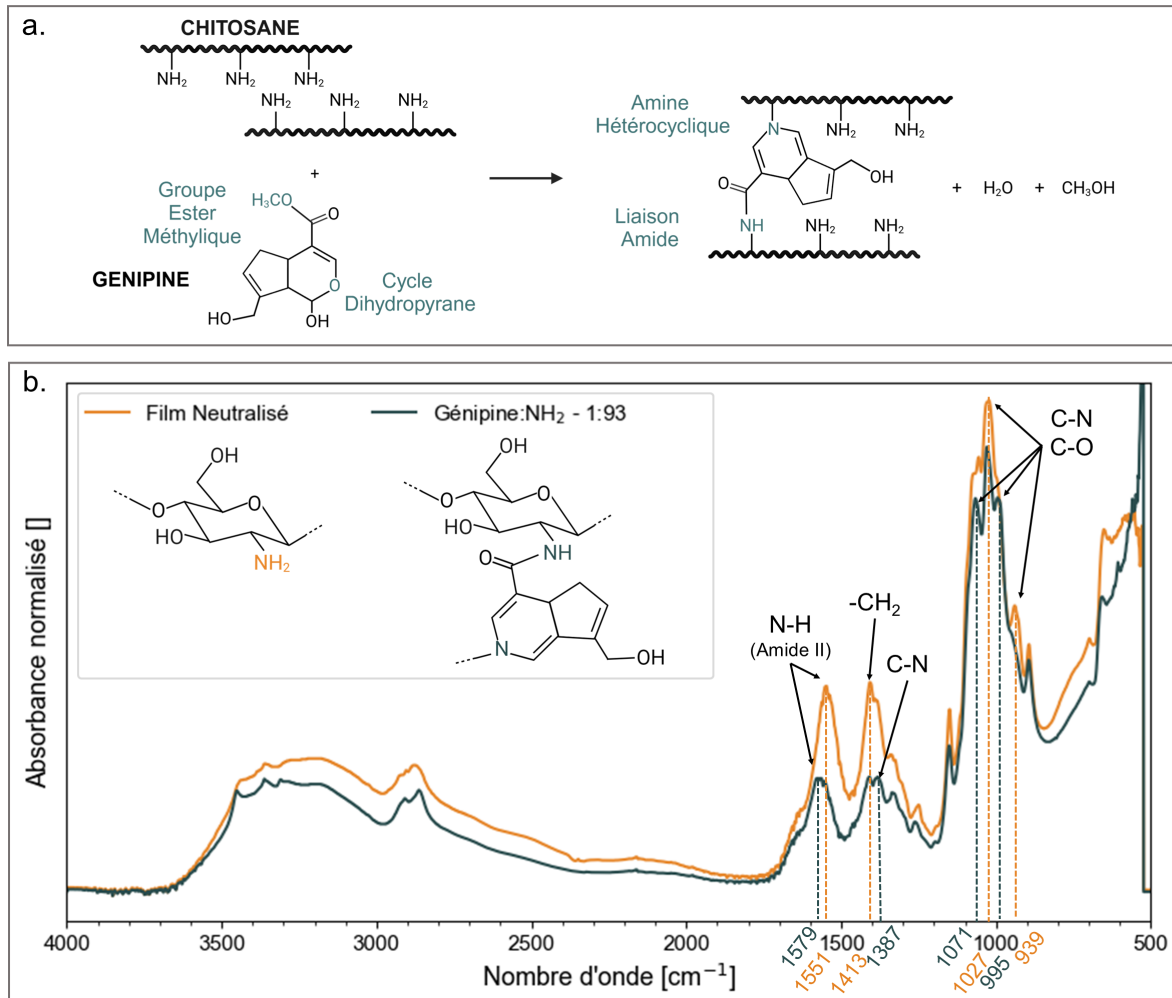


FIGURE 2.24 – (a) Réaction de réticulation entre chitosane et génipine; (b) Spectres FTIR de films de chitosane sans et avec réticulation avec génipine à un ratio molaire de 1 : 93, après neutralisation dans 1M NaOH pendant 45 min.

Le taux de gonflement des films de chitosane réticulés avec de la génipine dans l'eau déionisée a été étudié au cours du temps (FIG 2.25-a). Avec une augmentation du ratio molaire de génipine, nous observons une diminution du taux de gonflement. Cette tendance est confirmée par la littérature [51]. Cependant, après 30 min d'immersion dans l'eau déionisée, les films avec des ratios molaires de 1 : 370 et 1 : 185 se sont séparés en plusieurs morceaux lors de leur manipulation indiquant une fragilisation de sa structure (FIG 2.25-b.i et ii.). Ainsi, ces ratios molaires de réticulant ne sont pas suffisants pour empêcher la dissolution des films de chitosane, mais peuvent seulement la ralentir. Pour le ratio molaire de génipine de 1 : 93, le taux de gonflement est de 566% à 30 min. Le gonflement pourrait potentiellement être diminué en ayant des concentrations de génipine supérieures à celles étudiées ici.

Cependant, les films de chitosane réticulés avec la génipine sont fortement colorés en bleu. En effet, sur la FIG 2.25-c, nous pouvons constater que la transparence diminue quand la quantité de génipine augmente, au point de devenir opaque pour un ratio molaire de 1 : 93. Cette coloration provient d'une réaction de polymérisation de la génipine au contact de l'air en parallèle à la réaction de réticulation avec le chitosane [52]. Or, la transparence

des films est un critère important pour la fabrication de systèmes microfluidiques. Par conséquent, cette méthode ne semble pas produire des films compatibles avec la fabrication de systèmes microfluidiques.

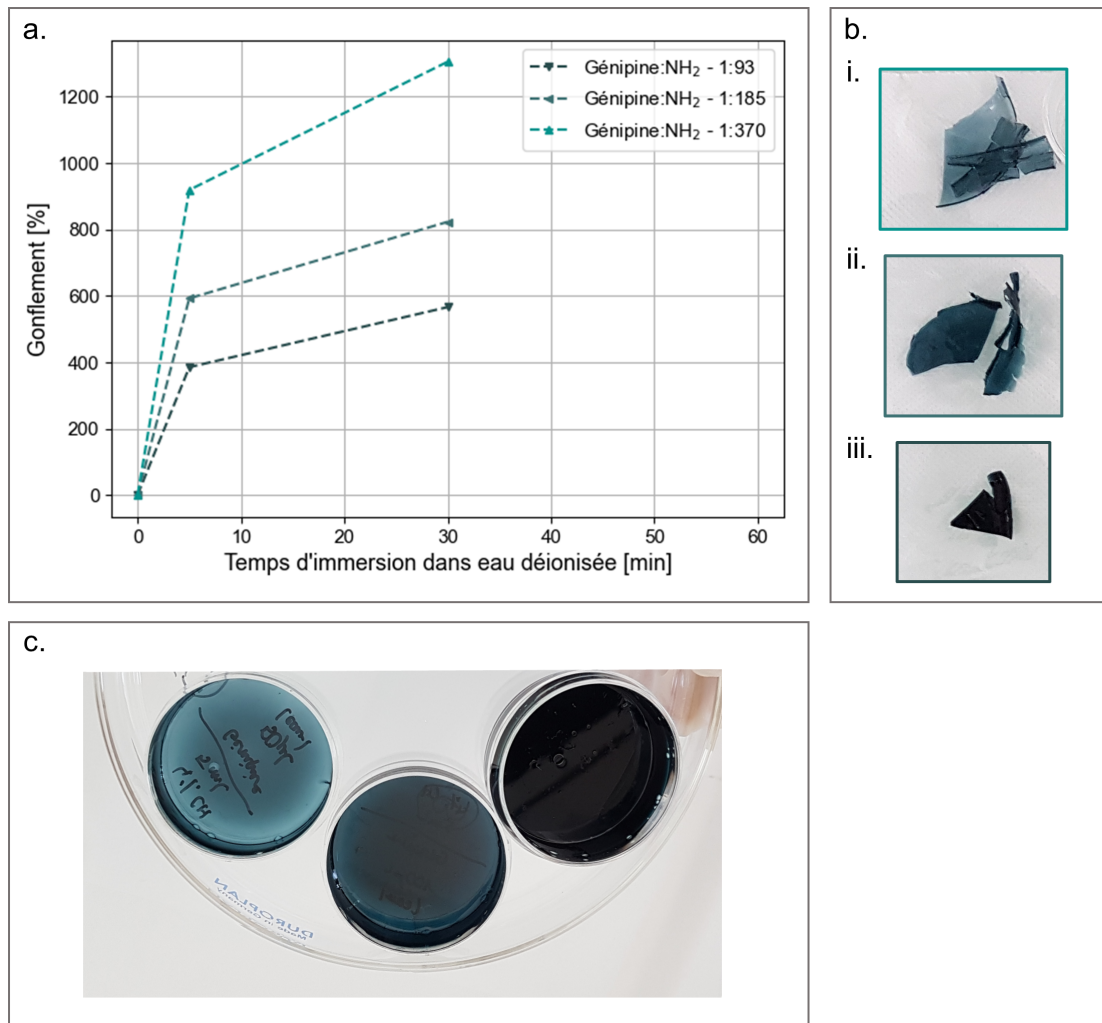


FIGURE 2.25 – (a) Taux de gonflement des films réticulés pendant leur immersion dans l'eau déionisée ; (b) Photos des échantillons après 30 min d'immersion l'eau déionisée ; (c) Films réticulés avec de la génipine avec des ratios molaires (de gauche à droite) 1 : 370, 1 : 185 et 1 : 93.

II.B.2.c. Conclusion

Pour empêcher la dissolution des films de chitosane et diminuer leur gonflement, deux agents de réticulation ont été évalués. La réticulation avec le glutaraldéhyde ou avec la génipine résulte en des films dont le taux de gonflement diminue avec l'augmentation de la concentration en réticulant. Cependant, la transparence des films diminue aussi. Les résultats sont résumés dans le TAB 2.12. En conclusion, ces stratégies de réticulation du chitosane dans les conditions testées ne permettent pas d'obtenir des films qui répondent au cahier des charges pour des applications microfluidiques.

TABLEAU 2.12 – Caractéristiques des films de chitosane selon la stratégie adaptée (N/D pour données non mesurées).

	Film après séchage	Glutaraldéhyde 1 : 20	Génipine 1 : 93
Epaisseurs [μm]	470 \pm 60	310 \pm 14	N/D
Taux de gonflement [%]	6024 \pm 722 à 30min	411 à 24h	566 à 30min
Transparence [%]	62	29	Opaque
Taux de solubilisation [%]	N/D	N/D	10 à 30min

III. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié différents protocoles d'élaboration de films de chitosane destinés à être utilisés pour fabriquer des systèmes microfluidiques. Dans un premier temps, nous avons étudié la filmification du chitosane selon sa M_w et sa concentration en chitosane pour obtenir des films épais et transparents. La solution de chitosane est coulée dans un moule et séchée dans une étuve à 50°C. Or, les films les plus transparents étaient aussi les plus fins. Ainsi, nous avons choisi un compromis entre ces différentes caractéristiques pour obtenir des films d'épaisseur suffisante de 400 ± 50 μm pour réaliser des systèmes microfluidiques tout en conservant une transparence de 62% permettant l'observation au microscope. Les paramètres sélectionnés sont une concentration de 4% (m/v) de chitosane de $192 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ (244LG) et 2,4% (v/v) d'acide acétique pour faire des films avec double couche. De plus, pour empêcher la dissolution des films de chitosane au contact de solutions aqueuses, ces films ont été neutralisés avec 1M NaOH pendant 45 min. Cependant, ces films de chitosane neutralisés ont montré un taux de gonflement de $70\% \pm 2\%$.

Dans un second temps, nous avons comparé différentes stratégies pour réduire le gonflement des films de chitosane dans des solutions aqueuses. Si la réticulation des films avec le glutaraldéhyde ou la génipine empêche aussi la dissolution des films, le taux de gonflement reste élevé (respectivement 411% et 566%) et la transparence des films diminue. Ainsi les stratégies présentant le taux de gonflement le plus faible reposent sur la neutralisation des films à partir de solutions aqueuses ou hydroalcoolique. En conclusion, la stratégie proposant le plus faible taux de gonflement ($56,6\% \pm 0,8\%$) est une neutralisation pendant 15h30 avec 1M NaOH/EtOH.

En plus des mesures de gonflement, ces films de chitosane neutralisés à 1M NaOH/EtOH ont été caractérisés par leur transparence (62% pour 412 ± 48 μm). Nous avons effectué des caractérisations de leur module d'Young ($5,96 \pm 0,11$ GPa) et leur dureté ($0,23 \pm 0,01$ GPa) mesurés par nano-indentation ainsi que de leur état de surface comme leur rugosité mesurée par AFM (10 ± 2 nm) et leur angle de contact ($92,7^\circ \pm 1,8^\circ$).

Ces films seront étudiés dans le prochain chapitre pour la fabrication de systèmes microfluidiques. La caractérisation des propriétés mécaniques des films permettra de sélectionner des méthodes de micro-fabrication adaptées.

Bibliographie

- [1] A. E. Ongaro, Z. Ndlovu, E. Sollier, C. Otieno, P. Ondoa, A. Street, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Engineering a sustainable future for point-of-care diagnostics and single-use microfluidic devices,” *Lab on a Chip*, vol. 22, pp. 3122–3137, 2022.
- [2] R. Lausecker, V. Badilita, U. Gleißner, and U. Wallrabe, “Introducing natural thermoplastic shellac to microfluidics : A green fabrication method for point-of-care devices,” *Biomicrofluidics*, vol. 10, 2016.
- [3] A. E. Ongaro, N. M. Howarth, V. L. Carrubba, and M. Kersaudy-Kerhoas, “Fast and green : Sustainable rapid-prototyping of microfluidic chips on polylactic acid substrates,” in *MicroTAS*, 2018.
- [4] S. Zhao, Y. Chen, B. P. Partlow, A. S. Golding, P. Tseng, J. Coburn, M. B. Applegate, J. E. Moreau, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, “Bio-functionalized silk hydrogel microfluidic systems,” *Biomaterials*, vol. 93, pp. 60–70, 2016.
- [5] M. Mattotti, Z. Alvarez, L. Delgado, M. A. Mateos-Timoneda, C. Aparicio, J. A. Planell, S. Alcántara, and E. Engel, “Differential neuronal and glial behavior on flat and micro patterned chitosan films,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 158, pp. 569–577, 2017.
- [6] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, J. Blumling, C. F. Wang, D. S. Kohane, and R. Langer, “Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5259–5267, 2006.
- [7] J. Oh, K. Kim, S. W. Won, C. Cha, A. K. Gaharwar, Šeila Selimović, H. Bae, K. H. Lee, D. H. Lee, S. H. Lee, and A. Khademhosseini, “Microfluidic fabrication of cell adhesive chitosan microtubes,” *Biomedical Microdevices*, vol. 15, pp. 465–472, 2013.
- [8] S. T. Koev, P. H. Dykstra, X. Luo, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, G. F. Payne, and R. Ghodssi, “Chitosan : An integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices,” *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 3026–3042, 2010.
- [9] H. Y. C. Eulalio, J. F. B. Rodrigues, K. O. Santos, C. Peniche, and M. V. LiaFook, “Characterization and thermal properties of chitosan films prepared with different acid solvents,” *Revista Cubana de Química*, vol. 31, pp. 309–323, 2019.
- [10] F. Khoushab and M. Yamabhai, “Chitin research revisited,” *Marine Drugs*, vol. 8, pp. 1988–2012, 2010.
- [11] J. Fu, F. Yang, and Z. Guo, “The chitosan hydrogels : from structure to function,” *New Journal of Chemistry*, vol. 42, pp. 17 162–17 180, 2018.
- [12] W. Chang, F. Liu, H. R. Sharif, Z. Huang, H. D. Goff, and F. Zhong, “Preparation of chitosan films by neutralization for improving their preservation effects on chilled meat,” *Food Hydrocolloids*, vol. 90, pp. 50–61, 2019.
- [13] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, and A. Domard, “Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution,” *Biomacromolecules*, vol. 4, pp. 641–648, 2003.
- [14] A. Hirai, H. Odani, and A. Nakajima, “Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy,” *Polymer Bulletin*, vol. 26, pp. 87–94, 1991.
- [15] C. Garreau, L. Chiappisi, S. Micciulla, N. Blanc, I. Morfin, A. Desorme, T. Mignot, S. Trombotto, T. Delair, and G. Sudre, “Grafted chitosan thin films of various degrees of acetylation as a reusable platform for the investigation of biological interactions,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 245, p. 125565, 2023.

- [16] M. Rinaudo, G. Pavlov, and J. Desbrières, "Solubilization of chitosan in strong acid medium," *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, vol. 5, pp. 267–276, 1999.
- [17] K. M. Varum, M. H. Ottoy, and O. Smidsrod, "Acid hydrolysis of chitosans," *Carbohydrate Polymers*, vol. 46, pp. 89–98, 2001.
- [18] A. Osorio-Madrado, L. David, S. Trombotto, J. M. Lucas, C. Peniche-Covas, and A. Domard, "Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan : Evolution of the crystallinity and macromolecular structure," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1376–1386, 2010.
- [19] Y. Cui, J. Lu, X. X. Fu, J. Bian, C. Yuan, H. Ge, and Y. Chen, "Near-zero-residual layer nanoimprint based on hybrid nanoimprint soft lithography," *Applied Physics A : Materials Science and Processing*, vol. 121, pp. 371–375, 2015.
- [20] G. Lee, D. Ortmann, M. J. Hancock, H. Bae, and A. Khademhosseini, "A hollow sphere soft lithography approach for long-term hanging drop methods," *Tissue Engineering*, vol. 16, pp. 249–259, 2010.
- [21] N. E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, and V. Coma, "Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 3950–3957, 2005.
- [22] F. Gabriele, A. Donnadio, M. Casciola, R. Germani, and N. Spreti, "Ionic and covalent crosslinking in chitosan-succinic acid membranes : Effect on physicochemical properties," *Carbohydrate Polymers*, vol. 251, 2021.
- [23] N. Ismillayli, S. Hadi, N. K. T. Dharmayani, R. K. Sanjaya, and D. Hermanto, "Characterization of alginate-chitosan membrane as potential edible film," in *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering*, vol. 833. Institute of Physics Publishing, 2020.
- [24] I. Fernández-Pan, K. Ziani, R. Pedroza-Islas, and J. I. Maté, "Effect of drying conditions on the mechanical and barrier properties of films based on chitosan," *Drying Technology*, vol. 28, pp. 1350–1358, 2010.
- [25] I. Kardas, M. H. Struszczyk, M. Kucharska, L. A. Broek, J. E. van Dam, and D. Ciechańska, *Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications*. Springer-Verlag Vienna, 2012, pp. 329–373.
- [26] C. Brasselet, G. Pierre, P. Dubessay, M. Dols-Lafargue, J. Coulon, J. Maupeu, A. Vallet-Courbin, H. de Baynast, T. Doco, P. Michaud, and C. Delattre, "Modification of chitosan for the generation of functional derivatives," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 9, 2019.
- [27] C. Lim, D. S. Hwang, and D. W. Lee, "Intermolecular interactions of chitosan : Degree of acetylation and molecular weight," *Carbohydrate Polymers*, vol. 259, 2021.
- [28] C. Dias, L. Commin, C. Bonnefont-Rebeix, S. Buff, P. Bruyère, and S. Trombotto, "Comparative evaluation of the in vitro cytotoxicity of a series of chitosans and chitoooligosaccharides water-soluble at physiological pH," *Polymers*, vol. 15, 2023.
- [29] P. Sangsanoh and P. Supaphol, "Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 2710–2714, 2006.
- [30] Q. He, Q. Ao, Y. Gong, and X. Zhang, "Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 22, pp. 2791–2802, 2011.
- [31] V. Korniienko, Y. Husak, A. Yanovska, Şahin Altundal, K. Diedkova, Y. Samokhin, Y. Varava, V. Holubnycha, R. Viter, and M. Pogorielov, "Biological behaviour of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralisation methods," *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, vol. 27, pp. 135–153, 2022.

- [32] H. Becker and C. Gärtner, “Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, pp. 89–111, 2008.
- [33] P. Mela, A. van den Berg, Y. Fintschenko, E. B. Cummings, B. A. Simmons, and B. J. Kirby, “The zeta potential of cyclo-olefin polymer microchannels and its effects on insulative (electrodeless) dielectrophoresis particle trapping devices,” *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 1792–1799, 2005.
- [34] M. N. Rush, S. Brambilla, S. Speckart, G. A. Montaña, and M. J. Brown, “Glass-particle adhesion-force-distribution on clean (laboratory) and contaminated (outdoor) surfaces,” *Journal of Aerosol Science*, vol. 123, pp. 231–244, 2018.
- [35] A. Rasmuson, E. Pazmino, S. Assemi, and W. P. Johnson, “Contribution of nano- to microscale roughness to heterogeneity : Closing the gap between unfavorable and favorable colloid attachment conditions,” *Environmental Science and Technology*, vol. 51, pp. 2151–2160, 2017.
- [36] I. R. Ogilvie, V. J. Sieben, C. F. Floquet, R. Zmijan, M. C. Mowlem, and H. Morgan, “Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, 2010.
- [37] S. Hassanpour-Tamrin, A. Sanati-Nezhad, and A. Sen, “A simple and low-cost approach for irreversible bonding of polymethylmethacrylate and polydimethylsiloxane at room temperature for high-pressure hybrid microfluidics,” *Scientific Reports*, vol. 11, 2021.
- [38] S. Guruvenket, G. M. Rao, M. Komath, and A. M. Raichur, “Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene,” *Applied Surface Science*, vol. 236, pp. 278–284, 2004.
- [39] B. Ruben, M. Elisa, L. Leandro, M. Victor, G. Gloria, S. Marina, S. K. Mian, R. Pandiyan, and L. Nadhira, “Oxygen plasma treatments of polydimethylsiloxane surfaces : Effect of the atomic oxygen on capillary flow in the microchannels,” *Micro and Nano Letters*, vol. 12, pp. 754–757, 2017.
- [40] A. A. Abdel-Wahab, S. Ataya, and V. V. Silberschmidt, “Temperature-dependent mechanical behaviour of PMMA : Experimental analysis and modelling,” *Polymer Testing*, vol. 58, pp. 86–95, 2017.
- [41] J. A. Brydson, *Plastics materials*. Elsevier, 1999.
- [42] M. Kim, B. U. Moon, and C. H. Hidrovo, “Enhancement of the thermo-mechanical properties of PDMS molds for the hot embossing of PMMA microfluidic devices,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 23, 2013.
- [43] F.-H. Lin, C.-H. Yao, J.-S. Sun, H.-C. Liu, and C.-W. Huang, “Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin,” *Biomaterials*, vol. 19, pp. 905–917, 1998.
- [44] L. Alfano Cheffe and R. Matte Rios Fernandez, “Formulation et élaboration de bioplastiques,” Rapport de Projet d’Elevés - Ecole Centrale de Lyon, Tech. Rep., 2023.
- [45] E. M. B., A. Ramazani, M. Shafiee, and M. Danaei, “Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems,” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 62, pp. 605–611, 2013.
- [46] N. R. Kildeeva, P. A. Perminov, L. V. Vladimirov, V. V. Novikov, and S. N. Mikhailov, “About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde,” *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, vol. 35, pp. 360–369, 2009.
- [47] H. W. Leung, “Ecotoxicology of glutaraldehyde : Review of environmental fate and effects studies,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 49, pp. 26–39, 2001.
- [48] H. W. Sung, R. N. Huang, L. H. Huang, and C. C. Tsai, “In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 10, pp. 63–78, 1999.

- [49] M. F. Butler, Y.-F. Ng, and P. D. A. Pudney, "Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin," *Journal of Polymer Science - Part A : Polymer Chemistry*, vol. 41, pp. 3941–3953, 2003.
- [50] S. L. Reay, E. L. Jackson, A. M. Ferreira, C. M. Hilken, and K. Novakovic, "In vitro evaluation of the biodegradability of chitosan-genipin hydrogels," *Materials Advances*, vol. 3, pp. 7946–7959, 2022.
- [51] F. L. Mi, S. S. Shyu, and C. K. Peng, "Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin," *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, vol. 43, pp. 1985–2000, 2005.
- [52] N. Kildeeva, A. Chalykh, M. Belokon, T. Petrova, V. Matveev, E. Svidchenko, N. Surin, and N. Sazhnev, "Influence of genipin crosslinking on the properties of chitosan-based films," *Polymers*, vol. 12, 2020.



Elaboration de systèmes microfluidiques en chitosane

Dans le CHAPITRE 2, nous avons développé une méthode de fabrication de films de chitosane avec des propriétés compatibles avec la production de systèmes microfluidiques. Dans ce chapitre, nous allons étudier l'élaboration de systèmes microfluidiques à partir de ces films.

Deux méthodes différentes de micro-structuration ont été comparées pour produire des canaux microfluidiques sur des films de chitosane : le pressage à chaud et la micro-gravure. Ces méthodes ont été choisies car elles sont déjà utilisées pour micro-structurer des thermoplastiques, qui ont des propriétés mécaniques similaires à nos films de chitosane. Le pressage à chaud est une méthode répandue dans l'industrie tandis que la micro-gravure a été récemment appliquée aux thermoplastiques [1, 2]. De plus, ces techniques permettent de micro-structurer les films de chitosane après leur neutralisation et ainsi éviter de déformer les motifs pendant cette étape.

Les systèmes microfluidiques ont été finalisés avec une étape de collage entre le film micro-structuré et une autre surface. Ce collage doit être parfaitement étanche pour assurer une injection de solutions aqueuses sans fuite dans le microsystème.

Ce chapitre commence par une description détaillée du matériel utilisé, des deux méthodes de microstructuration mises en œuvre ainsi que des techniques de caractérisation. Dans un second temps, les résultats obtenus sont décrits et discutés. Après avoir développé une méthode de collage des films de chitosane, des premiers systèmes microfluidiques ont été fabriqués et caractérisés en fonction des conditions d'utilisation.

I. Matériels & Méthodes

I.A. Matériels

Les films de chitosane ont été préparés selon le protocole décrit dans le CHAPITRE 2, à partir d'une solution à 4% (m/v) de chitosane 244LG à $192 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ et 2,4% (v/v) d'acide acétique. Ils ont été neutralisés pendant 15h30 avec des solutions basiques à 1M NaOH dans de l'eau déionisée ou 1M NaOH dans une solution à 70% (v/v) d'éthanol, qui sera référée dans la suite du manuscrit comme 1M NaOH/EtOH.

L'acide acétique glacial (>99%), l'hydroxyde de sodium (pastilles, >97%), l'éthanol (>99%) et l'albumine de sérum bovin (BSA) (poudre, >96%) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA).

L'eau déionisée a été obtenue à partir d'un appareil Purelab Chorus d'Elga Veolia (High Wycombe, Royaume-Uni) avec une résistance de $18,2 \text{ M}\Omega$.

La résine photosensible Ordyl SY 310 (MicroChemicals GmbH, Ulm, Allemagne) qui a été utilisée pour l'étape de collage présente une épaisseur de $10 \mu\text{m}$.

Pour les expériences en microsystèmes fluidiques, la BSA ($66,4 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a été marquée avec l'Alexa Fluor[®] 555 grâce au kit de Life Technologies (Carlsbad, USA). La concentration de marqueurs dans la solution était $30 \mu\text{M}$ pour un degré de marquage de 1,08. Sa caractérisation est détaillée en Annexe B. Une solution de fluorescéine ($332,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a été préparée à $28,5 \times 10^3 \text{ M}$ à partir de fluorescéine en poudre (Niveau de qualité 100, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Les spectres d'absorption et d'émission du fluorophore Alexa Fluor[®] 555 et de la fluorescéine sont présentés sur la FIG 3.1.

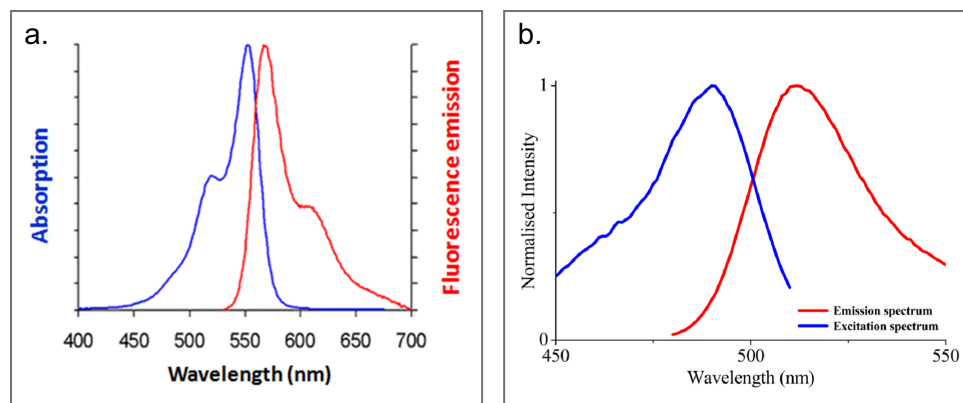


FIGURE 3.1 – Spectres d'absorption et d'émission fluorescente du fluorophore Alexa Fluor[®] 555 (a) [3] et de la fluorescéine (b) [4].

I.B. Méthodes de Micro-structuration

I.B.1. Pressage à chaud de films de chitosane

Pour le pressage à chaud, des moules en nickel déjà présents en laboratoire et des moules en laiton fabriqués par micro-usinage avec la micro-fraiseuse Desktop à 3 axes (Minitech Machinery Corp., Norcross, USA) et une fraise de 500 μm de diamètre, ont été utilisés. Les moules en laiton usinés pour ce projet présentaient le motif négatif de microcanaux droits de différentes largeurs (entre 105 et 1000 μm) et hauteurs (100 μm ou 200 μm).

Pour transférer les motifs sur des films de chitosane, le moule a été pressé sur le film à l'aide d'une presse hydraulique (JAS 105 BM 6181 RONDOL Hi-Force Hydraulic tools, Northants, UK) comme illustré sur la FIG 3.2. Plusieurs paramètres ont été testés comme la force de pressage appliquée (5,7 kN ou 8,6 kN correspondant respectivement à une pression de 4,5 MPa et 6,8 MPa) et la température du système (T_{amb} ou 65°C). Après 1h, les films de chitosane imprimés étaient démoulés. Si le système était chauffé, il était refroidi à une température inférieure à 40°C avant le démoulage.

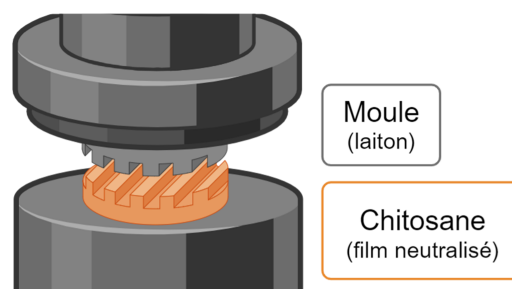


FIGURE 3.2 – Schéma de pressage à chaud sur un film de chitosane.

I.B.2. Micro-gravure de films de chitosane

Pour la micro-gravure, les films de chitosane neutralisés ont été gravés directement à l'aide de micro-fraises de 100, 200 ou 300 μm de diamètre, pilotées par la micro-fraiseuse Desktop à 3 axes (Minitech Machinery Corp., Norcross, USA), contrôlée par un contrôleur Naknishi E3000.

Plusieurs paramètres de gravure ont été étudiés et sont décrits sur la FIG 3.3. La vitesse de rotation de la fraise, c'est-à-dire la vitesse de broche, peut varier de 1200 à 10000 rpm. L'avance de coupe (de 100 à 200 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$) représente la vitesse de déplacement de la fraise sur le plan horizontal. La gravure s'effectue en plusieurs passes de profondeurs croissantes comme sur la FIG 3.3-a. Pour graver une zone plus vaste que le diamètre de la micro-fraise, la fraise effectue des allers-retours à une même profondeur comme en FIG 3.3-b. Le recouvrement correspond à la distance horizontale entre ces allers-retours. Le cas de la FIG 3.3-b.i présente un recouvrement plus important que le cas en FIG 3.3-b.ii.

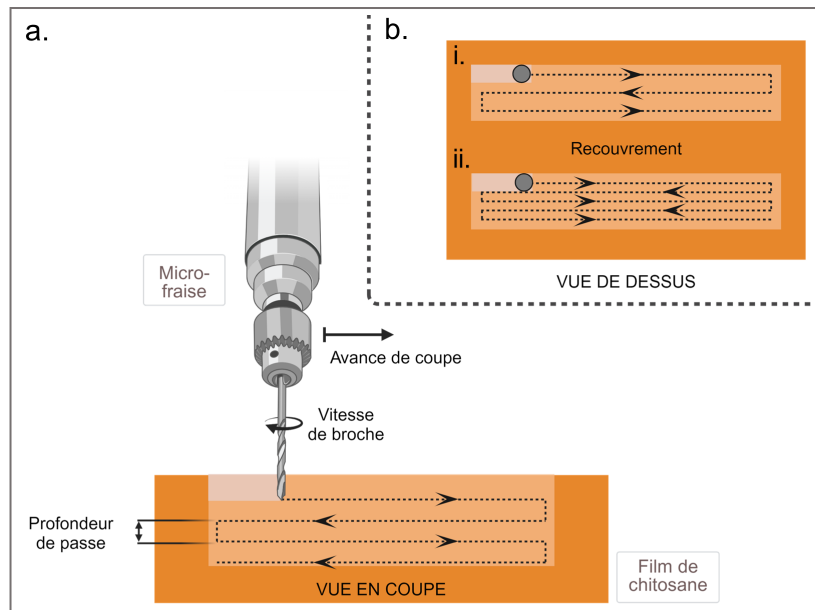


FIGURE 3.3 – Schéma du fonctionnement de micro-gravure de film de chitosane : (a) Vue de coupe avec le chemin prévisionnel de la micro-fraise avec plusieurs passes en profondeur ; (b) Vue de dessus avec les chemins prévisionnels pour différents recouvrements.

I.B.3. Assemblage de dispositifs en chitosane

Après la micro-structuration des films de chitosane, les systèmes microfluidiques ont été scellés en collant les films micro-structurés avec un autre substrat. La résine photosensible solide Ordyl SY 310 (MicroChemicals GmbH, Ulm, Allemagne) a été laminée sur le film micro-structuré à 50°C. Dans le cas d'un collage sur lame de verre, la surface de cette dernière a été activée par un plasma O₂ généré à 230 V (PDC 002 CE, Harrick Plasma, Ithaca, USA) pendant 3 min à 800 mT. Ensuite, le film recouvert de résine photosensible a été pressé sur la lame de verre activée ou sur un autre film de chitosane à l'aide d'une presse hydraulique à 60°C et 0,5 kN (soit une pression de 0,2 MPa) pendant 10 min (presse hydraulique, JAS 105 BM 6181 RONDOL Hi-Force Hydraulic tools, Northants, UK). Une fois le système refroidi à moins de 40°C, la résine photosensible a été réticulée par une lumière UV à 365 ± 5 nm (UV-KUB 2, KLOE, Saint-Mathieu-de-Trévières, France) pendant 1 min à 35 mW.cm⁻². A chaque étape, le dépôt de la résine photosensible a été contrôlé à l'aide d'un microscope optique.

I.B.4. Injection de fluides dans des microsystèmes fluidiques

Les systèmes microfluidiques en chitosane ont été reliés aux tubes (PTFE ou silicone) permettant l'injection de liquide par des connecteurs en PC (ChipShop, Jena, Allemagne) comprenant le connecteur Luer femelle court (Fluidic 1615, ChipShop), le connecteur Luer femelle avec une base large (Fluidic 303, ChipShop) ou une olive isolée (Fluidic 630, ChipShop). Ces connecteurs ont été fixés sur les films de chitosane avec des anneaux

adhésifs (Fluidic 698, ChipShop) ou avec une colle en silicone CAF 4 (Rhodia, Roussillon, France).

Les liquides ont été injectés à l'aide d'un pousse-seringue PHD Ultra (Harvard Apparatus, Holliston, USA) ou un pousse-seringue LSPone (Advanced Microfluidics, Lausanne, Suisse) contrôlé par le logiciel associé LSPone Quick. Le LSPone est équipé de plusieurs entrées et d'une valve sans volume mort, qui permet de changer facilement de solutions dans la seringue en limitant la présence de bulles d'air. Il permet d'injecter des liquides avec des débits allant de $120 \mu\text{L.h}^{-1}$ à 400mL.h^{-1} .

I.C. Méthodes de caractérisation

I.C.1. Caractérisation des micro-structures

Les largeurs des micro-structures obtenues ont été déterminées à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX51M) équipé d'une caméra (Olympus SC50). Pour analyser la résolution des deux techniques de micro-fabrication, sur chaque canal, la largeur a été mesurée à cinq positions le long du canal de 1 cm.

Leurs profondeurs ont été mesurées avec un profilomètre (Dektak 150 Stylus profiler, Veeco Instruments Inc., Tucson, USA) équipé d'une pointe de $12,5 \mu\text{m}$ de rayon. Un profil en profondeur a été pris sur la longueur du canal, puis la profondeur a été moyennée sur $300 \mu\text{m}$.

Ainsi, la justesse et la précision des largeurs et profondeurs ont été calculées à partir, respectivement, de la différence de la moyenne des valeurs mesurées avec la consigne (les dimensions du moule dans le cas du pressage à chaud et la consigne donnée à la micro-fraiseuse pour l'usinage direct) et de l'écart-type des valeurs mesurées. Comme chaque taille de canal a été répliquée trois fois, des analyses ANOVA ont été réalisées entre les mesures effectuées sur des canaux similaires afin de déterminer si les méthodes de micro-structuration sont reproductibles. Les valeurs p sont indiquées dans §II (Chap. 3).

La rugosité au fond des canaux micro-gravés ou pressés à chaud a été estimée à partir de l'écart quadratique moyen mesuré sur la largeur du canal avec le profilomètre Dektak ou sur 3 zones de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ cartographiées par AFM (MFP-3D Asylum Research, Oxford Instrument) équipée d'une sonde Arrow NCR de 40N.m^{-1} (Mode sans contact / de tapotement – Revêtement reflex). Marie-Charlotte Audry du laboratoire INL (UMR 5270) a effectué ces mesures.

I.C.2. Caractérisation des microstructures sous-flux

Un microscope numérique AD409 (Andonstar, Shenzhen, Chine) a été utilisé pour observer les microcanaux au cours de l'injection.

Pour mesurer l'évolution de la section du canal au cours de l'injection, des mesures en fluorescence ont été réalisées avec le microscope DMI8 inversé (Leica Thunder Imager 3D Cell culture, Leica). Une solution aqueuse comprenant de la fluorescéine diluée à 1% (v/v) et de la BSA marquée diluée à 10% (v/v) a été injectée. Des scans 3D de 2 sections de

chaque canal sont pris avant et après 1h d'injection, ainsi qu'une vidéo (1 image/min). Les paramètres de ces acquisitions sont détaillés dans Annexe C. Les profondeurs et largeurs des canaux ont été mesurées à partir de ces scans 3D réalisés en l'absence de liquide.

A partir de la vidéo, la largeur w_{canal} du canal ainsi que la largeur w_{fluo} de la zone occupée par les molécules fluorescentes ont été mesurées au cours de l'injection, respectivement en lumière blanche ou par fluorescence. La diffusion des molécules fluorescentes a été ensuite calculée à partir de la formule suivante : $d = (w_{fluo} - w_{canal})/2$. La vitesse de diffusion a été estimée à partir de régressions linéaires des valeurs moyennes pondérées par leurs écarts-types à partir d'un modèle WLS (Moindres Carrés Pondérés).

Afin de déterminer la perte de chitosane par circulation de solutions aqueuses, l'eau déionisée ayant circulé lors d'une injection de 24h dans des systèmes en chitosane a été récoltée et analysée après lyophilisation par SEC pour déterminer sa contenance en chitosane.

II. Résultats & Discussions

II.A. Micro-structuration de films de chitosane par pressage à chaud

Le pressage à chaud consiste à chauffer un moule portant un motif précis, puis à appliquer une pression sur ce moule contre un substrat thermoplastique chauffé. La chaleur permet au polymère de devenir malléable, tandis que la pression force le matériau à épouser les motifs du moule. Une fois le polymère refroidi et solidifié, le moule est retiré, laissant une réplique précise du motif imprimé sur le substrat. Cette méthode est très utilisée avec les thermoplastiques pour sa capacité à produire des structures de haute résolution de manière répétitive et économique [1, 2].

Des premiers tests utilisant des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH ont permis de montrer un transfert de motifs entre un moule en nickel et le film de chitosane. Le moule et le film imprimé sont illustrés sur la FIG 3.4-a.

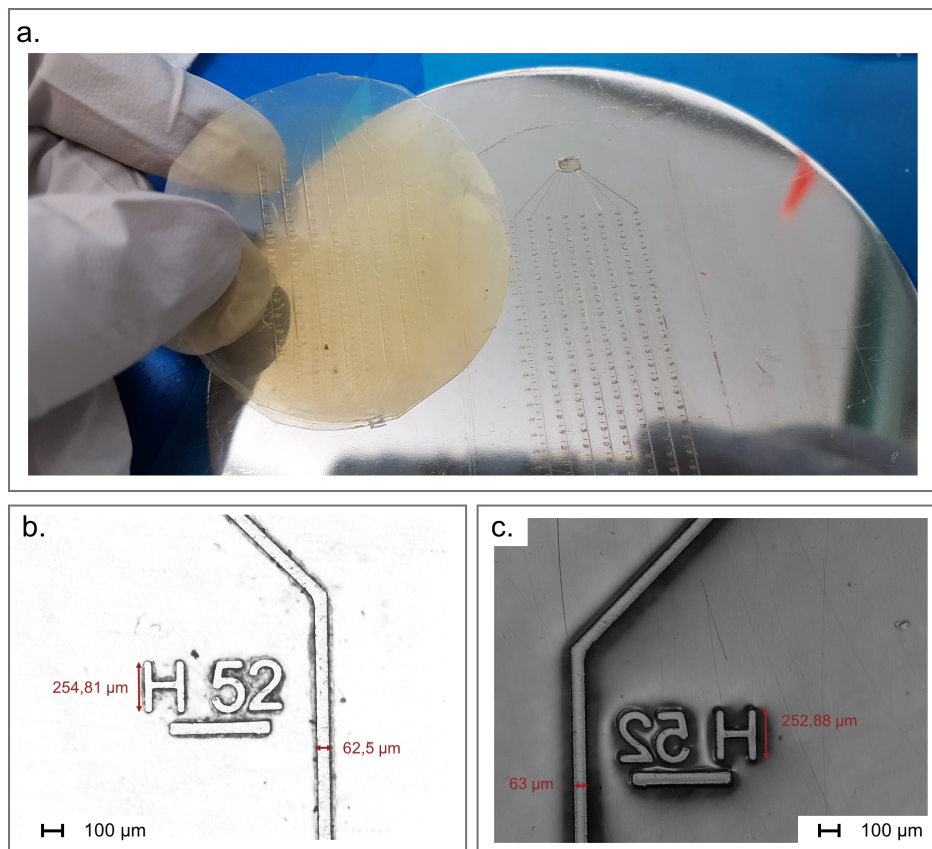


FIGURE 3.4 – (a) Impression sur un film de chitosane par pressage à chaud à 65°C et à 4,0 MPa (soit une force de pressage de 11,4 kN) pendant 30 min avec un moule en nickel ; Images prises au microscope optique d'un détail du moule (b) et de l'empreinte correspondante sur le film (c).

Le canal de $61 \pm 1 \mu\text{m}$ de large sur le moule (FIG 3.4-b) se transfère avec une largeur de $63,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ sur le film de chitosane (FIG 3.4-c). La longueur des lettres passe de $257 \pm 3 \mu\text{m}$ sur le moule à $254 \pm 3 \mu\text{m}$ sur le film de chitosane. Par la suite, en utilisant de nouveaux moules en laiton obtenus par micro-usinage, l'influence de la température et de la pression appliquées a été étudiée pour optimiser la résolution du pressage à chaud.

II.A.1. Etude préliminaire des paramètres du pressage à chaud

II.A.1.a. Caractérisation des moules

Les moules ont été fabriqués par micro-gravure des motifs négatifs de micro-canaux sur des disques de laiton à l'aide d'une micro-fraise de $500 \mu\text{m}$ de diamètre. La micro-gravure offre une méthode plus rapide et moins complexe pour la fabrication des moules que l'UV-LIGA qui produit des motifs en transférant ceux d'un masque sur une résine photosensible par photolithographie [5]. La FIG 3.5-a montre deux moules sur lesquels le négatif de 2 ou 3 canaux droits de 1 cm de long avec une seule entrée et une seule sortie a été réalisé. Pour des consignes de $105 \mu\text{m}$ à $1000 \mu\text{m}$ en largeur et 100 ou $200 \mu\text{m}$ de hauteur, la largeur des canaux des moules varie de 123 à $1016 \mu\text{m}$ avec des hauteurs de 88 ou $179 \mu\text{m}$. Cette différence entre la consigne et le motif obtenu peut s'expliquer en partie par le fait que le diamètre des fraises peut varier de 10% par rapport à son diamètre nominale. Ainsi d'un fraise à l'autre, la trace de la fraise n'enlèvera pas la même quantité de matière pour une même consigne. Leurs dimensions sont indiquées dans le TAB 3.1. Une image microscopique d'un moule en laiton d'une largeur de $521 \mu\text{m}$ est présentée à la FIG 3.5-b.

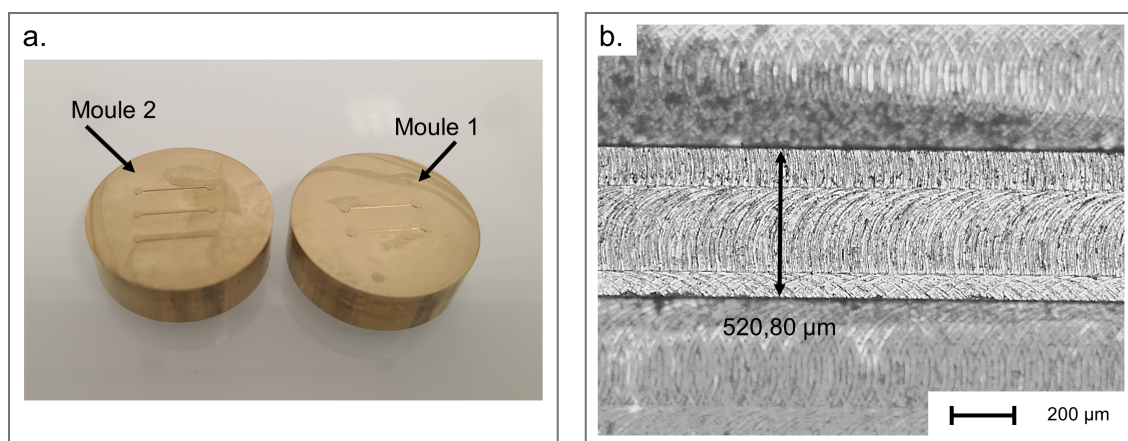


FIGURE 3.5 – (a) Photos des moules en laiton avec des motifs de $88 \mu\text{m}$ de haut; (b) Photo prise au microscope optique du canal de $521 \pm 3 \mu\text{m}$ de large.

Les moules obtenus par micro-gravure présentent les marques d'usinage du passage de la micro-fraise. La rugosité du motif du canal de $1016 \pm 2 \mu\text{m}$ de large et $88,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de haut a été mesurée par AFM et est de $137 \pm 70 \text{nm}$. Il est possible de la diminuer en ajoutant des étapes de surfacage à l'aide de fraises plus petites.

TABLEAU 3.1 – Dimensions des moules en laiton pour le pressage à chaud.

Moules	Moule 1		Moule 2			Moule 3		
Consignes de largeur [µm]	105	200	250	500	1000	250	500	1000
Largeurs [µm]	123 ± 6	219 ± 4	270 ± 3	521 ± 3	1016 ± 2	256 ± 3	505 ± 4	1003 ± 1
Consignes de hauteur [µm]	100	100	100	100	100	200	200	200
Hauteurs [µm]	88 ± 1	88 ± 2	88 ± 1	88 ± 1	88,5 ± 0,1	179,2 ± 0,2	179 ± 1	171 ± 7
Rapport de forme	0,72	0,40	0,33	0,17	0,09	0,70	0,35	0,18

Plusieurs paramètres peuvent influencer la résolution des motifs obtenus par pressage à chaud. La température et la pression utilisées lors du pressage sont discutées dans les prochaines sections. Pour cette étude, le temps de pressage a été fixé à 1h.

II.A.1.b. Température

Dans le cas du pressage à chaud d'un thermoplastique, il faut chauffer le substrat au-dessus de sa température de transition vitreuse afin de le ramollir pour y transférer des motifs. Même si le chitosane n'est pas un thermoplastique, la température peut jouer un rôle important avec cette méthode de micro-structuration. Des motifs obtenus par pressage à chaud du Moule 1 à T_{amb} et à 65°C , en appliquant une même pression de 4,5 MPa et pendant 1h, sur un échantillon sont comparés sur la FIG 3.6. Les motifs associés au passage de la fraise à la surface du moule sont répliqués partiellement sur le chitosane lors d'un pressage à T_{amb} .

Les largeurs et hauteurs des empreintes des canaux de 123 et 219 µm de large et 88 µm de haut ont été mesurées respectivement par microscope optique et profilomètre (TAB 3.2). Pour une impression à 65°C , nous obtenons des canaux de largeurs 120 ± 5 µm et 211 ± 5 µm et de profondeur 83 ± 8 µm et 79 ± 5 µm. Pour une impression à T_{amb} , les largeurs des canaux sont de 117 ± 5 µm et 210 ± 5 µm. La justesse des largeurs est similaire pour les deux températures testées. Par contre, les profondeurs des canaux obtenus à T_{amb} sont seulement de 2 ± 1 µm et 3 ± 2 µm.

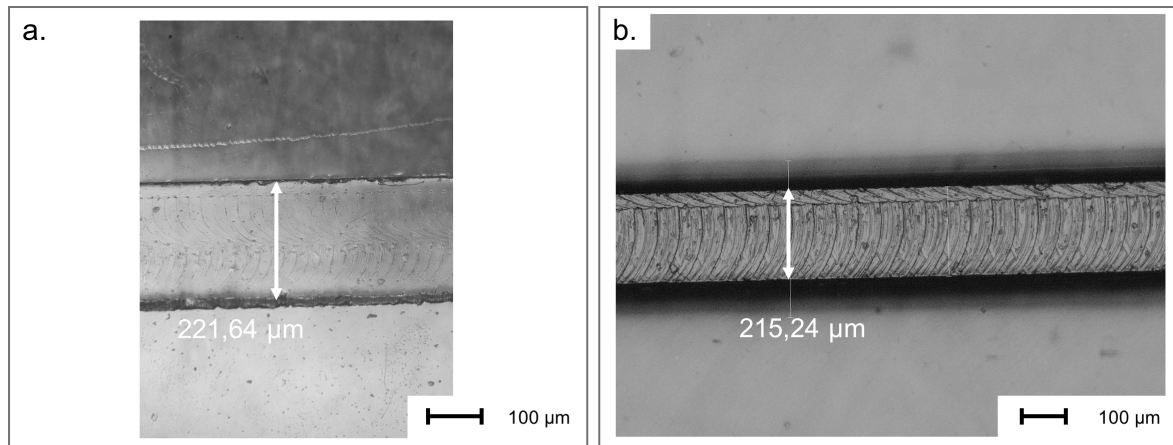


FIGURE 3.6 – Photos prises au microscope optique de films de chitosane après pressage à chaud à T_{amb} (a) et à 65°C (b) et à $4,5\text{ MPa}$ pendant 1h avec le Moule 1.

Bien que le chitosane ne soit pas un thermoplastique, la profondeur d’impression du motif dépend fortement de la température. Cependant, ce matériau est sensible à la température et peut se dégrader à des températures supérieures à 65°C maintenues sur des temps longs, c’est pourquoi nous nous sommes limités à cette température. Pour une impression d’une heure à 65° , les films de chitosane ne présentaient pas d’altération de couleur suggérant l’absence de dégradation.

TABLEAU 3.2 – Dimensions des canaux obtenus sur des films de chitosane par pressage à 65°C ou T_{amb} pendant 1h avec une pression de $4,5\text{ MPa}$ en utilisant le Moule 1.

Température	T_{amb}		65°C	
Largeur du Moule 1 [μm]	123 ± 6		219 ± 4	
Largeur des échantillons en bas du canal [μm]	117 ± 5	120 ± 5	210 ± 5	211 ± 5
Hauteur du Moule 1 [μm]	88 ± 1		88 ± 2	
Profondeur [μm]	2 ± 1	83 ± 8	3 ± 2	79 ± 5

II.A.1.c. Pression

Un deuxième paramètre à étudier pour le pressage à chaud est la pression appliquée pour presser le moule contre le film de chitosane. Il faut la sélectionner pour qu’elle soit assez forte pour transférer les motifs sans déformer les films. Des pressages à $4,5\text{ MPa}$ et à $6,8\text{ MPa}$ ont été comparées pour le Moule 3 (FIG 3.7).

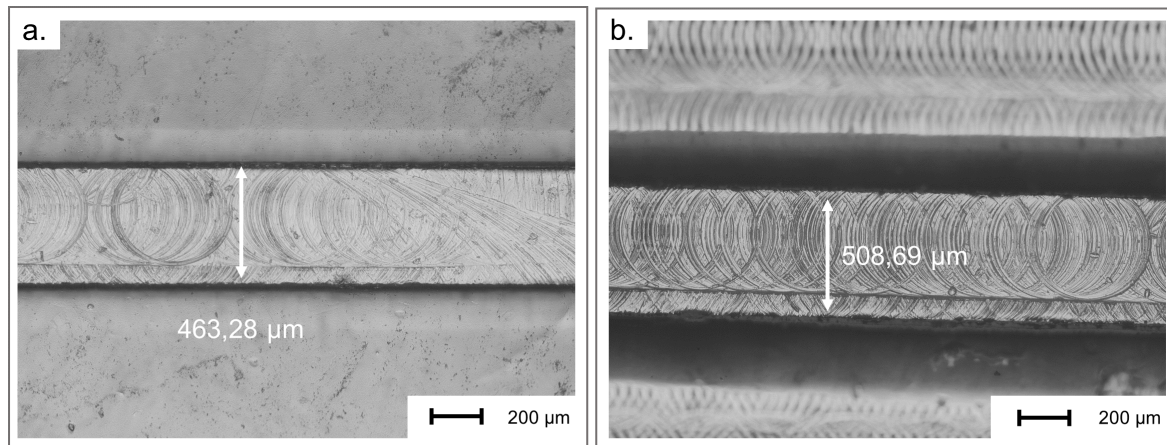


FIGURE 3.7 – Photos prises au microscope optique de films de chitosane après pressage à chaud à 65°C pendant 1h avec une pression de 4,5 MPa (a) ou 6,8 MPa (b) avec le Moule 3.

Les largeurs et profondeurs des canaux obtenus sont comparées dans le TAB 3.3. En appliquant des pression de 4,5 MPa ou de 6,8 MPa, les profondeurs obtenues sont similaires pour chaque canal, mesurées à $125 \pm 30 \mu\text{m}$ pour 4,5 MPa et à $121 \pm 38 \mu\text{m}$ pour 6,8 MPa pour le canal de 505 μm de large. Mais ces valeurs mesurées sont assez éloignées de la hauteur du moule de 179 μm . Nous pouvons remarquer que les canaux sont plus évasés en haut du canal qu'en bas. Nous avons ainsi mesuré la largeur au fond des canaux et en haut des canaux. Cette différence est d'autant plus marquée que la pression appliquée est importante. En effet, pour des canaux de 505 μm de large et une pression de 4,5 MPa, les largeurs sont de $490 \pm 13 \mu\text{m}$ en bas du canal et de $831 \pm 79 \mu\text{m}$ en haut du canal tandis que, pour 6,8 MPa, elles sont de $494 \pm 11 \mu\text{m}$ en bas et de $1353 \pm 180 \mu\text{m}$ en haut.

TABLEAU 3.3 – Dimensions des canaux obtenus sur des films de chitosane après pressage à chaud à 65°C pendant 1h avec une pression de 4,5 MPa ou 6,8 MPa en utilisant le Moule 3.

Pression [MPa]	4,5	6,8	4,5	6,8	4,5	6,8
Largeur du Moule 3 [μm]	256 \pm 3		505 \pm 4		1003 \pm 1	
Largeur des échantillons en bas du canal [μm]	251 \pm 4	268 \pm 9	490 \pm 13	494 \pm 11	912 \pm 10	982 \pm 16
Largeur des échantillons en haut du canal [μm]	290 \pm 17	712 \pm 20	831 \pm 79	1353 \pm 180	1094 \pm 4	1315 \pm 191
Hauteur du Moule 3 [μm]	179,2 \pm 0,2		179 \pm 1		171 \pm 7	
Profondeur [μm]	45 \pm 23	42 \pm 11	125 \pm 30	121 \pm 38	133 \pm 9	153 \pm 15

Par conséquent, ces résultats illustrent l'influence de la pression appliquée pendant le

pressage sur la résolution des motifs obtenus. Pour les deux pressions testées, il n'y a pas de différences marquées sur la profondeur des motifs. Mais pour limiter l'évasement des canaux, une pression de 4,5 MPa a été choisie pour étudier plus finement les résolutions des canaux obtenus.

II.A.2. Précision et régularité des canaux produits par pressage à chaud

D'après les études préliminaires effectués dans §II.A.1 (Chap. 3), les Moules 1 et 2 ont été pressés à 65°C et 4,5 MPa pendant 1h sur les films de chitosane neutralisé à 1M NaOH. La hauteur de 88 µm a été choisie pour limiter l'évasement des canaux. Les canaux produits ont été utilisés pour étudier la précision et régularité du pressage à chaud sur les films de chitosane.

L'image et le profil d'un canal obtenu à partir du motif de 521 µm de large (Moule 2) sont présentés respectivement à la FIG 3.8-a et -b. Comme observé précédemment, le canal s'évase et sa largeur varie de 505 µm en bas à 868 µm en haut. Ce phénomène se retrouve sur l'ensemble des canaux réalisés dont les dimensions sont répertoriées dans le TAB 3.4. Par exemple, pour un moule de 219 ± 4 µm de large, la largeur d'un canal imprimé varie entre 210 ± 5 µm en bas et 457 ± 62 µm en haut. La section évasée des canaux peut modifier le flux d'un échantillon circulant dans le canal en générant une vitesse hétérogène sur la section et une recirculation des flux dans les zones confinées.

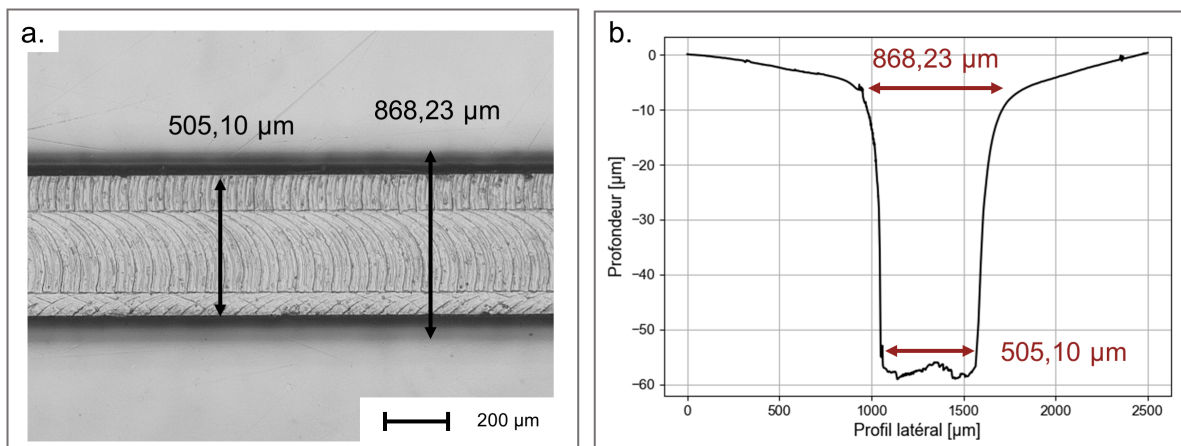


FIGURE 3.8 – Photo prise au microscope optique (a) et profil en profondeur (b) d'un film de chitosane après pressage à chaud à 65°C et à 4,5 MPa pendant 1h du canal de 521 µm de large (Moule 2).

De manière générale, nous constatons qu'en bas des canaux, les largeurs des motifs sont imprimées avec des justesses allant de 90% pour le canal le plus étroit (123 ± 6 µm de large) à 99,6% pour le plus large (1016 ± 2 µm). Les faibles écarts-types obtenus au fond des canaux attestent de la régularité de l'empreinte le long des canaux de 1 cm de long. Par contre, en haut des canaux, il y a d'énormes variations de la largeur, non seulement le long de chaque canal avec des écarts-types compris entre 20 et 208 µm, mais aussi entre les 3 canaux imprimés par le même moule. Pour le canal de 123 ± 6 µm

de large, les largeurs en haut de chaque canal sont mesurées à 183 ± 30 , 233 ± 51 et 443 ± 31 μm . De plus, nous observons une variabilité de la justesse des profondeurs obtenues (entre 99% et 33%). Les variations de largeur et de profondeur indiquent une mauvaise reproductibilité des canaux et donc des phénomènes générés par la forme évasée des canaux.

D'après ces résultats, les motifs du moule ne se transfère pas aussi fidèlement sur des films de chitosane que sur des thermoplastiques comme le COC ou le PMMA. Par conséquent, le pressage à chaud du chitosane ne permet pas de reproduire finement des motifs épais ayant des facteurs de forme supérieurs à 0,9, comme ceux utilisés pour produire des canaux microfluidiques. Cela limite l'utilisation du pressage à chaud pour la fabrication de microsystèmes fluidiques en chitosane.

Néanmoins, il convient de noter qu'il semble possible d'imprimer des motifs peu profonds tels que les défauts du moule sur les films de chitosane. En effet, les marques d'usinage du moule sont transférées au fond du canal, comme le montre la FIG 3.8-a pour le canal de 521 μm de large. La rugosité de la surface est estimée par AFM, au fond d'un canal de 1016 μm de large, à 142 nm, ce qui est semblable à celle de 137 ± 70 nm, mesurée sur le moule correspondant.

TABLEAU 3.4 – Caractérisation du pressage à chaud : Mesures de la largeur par microscopie optique et mesures de la hauteur par profilomètre, toutes deux moyennées sur la longueur des canaux. Pour chacune des 5 tailles, le moule et 3 canaux pressés à chaud à 65°C et 4,5 MPa pendant 1 h ont été examinés. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque ensemble de canaux pressés à chaud. Si aucune valeur n'est donnée, la valeur p est négligeable.

	Moule 1			Moule 2	
Largeur des moules [μm]	123 \pm 6	219 \pm 4	270 \pm 3	521 \pm 3	1016 \pm 2
Largeur des échantillons en bas du canal [μm]	120 \pm 5	211 \pm 5	262 \pm 3	508 \pm 4	1009 \pm 13
	122 \pm 4	210 \pm 5	273 \pm 10	506 \pm 1	1013 \pm 12
	110 \pm 7	215 \pm 5	262 \pm 5	512 \pm 6	1009 \pm 5
	<i>p = 0,014</i>	<i>p = 0,29</i>	<i>p = 0,044</i>	<i>p = 0,13</i>	<i>p = 0,73</i>
Largeur des échantillons en haut du canal [μm]	183 \pm 30	609 \pm 92	611 \pm 208	883 \pm 156	1240 \pm 33
	443 \pm 31	457 \pm 62	602 \pm 97	883 \pm 32	1230 \pm 54
	233 \pm 51	391 \pm 34	473 \pm 30	712 \pm 20	1278 \pm 48
Hauteur des moules [μm]	88 \pm 1	88 \pm 2	88 \pm 1	88 \pm 1	88,5 \pm 0,1
Profondeur des échantillons [μm]	83 \pm 8	79 \pm 5	41 \pm 42	83 \pm 8	87 \pm 2
	89 \pm 4	44 \pm 9	77 \pm 5	61 \pm 1	54 \pm 9
	29 \pm 5	53 \pm 5	68 \pm 21	68 \pm 21	67 \pm 14

Un autre inconvénient du pressage à chaud est la préparation d'un moule unique à chaque design. Cette étape supplémentaire convient moins bien aux besoins du prototypage, comparée à une approche directe de micro-structuration.

II.B. Micro-structuration de films de chitosane avec micro-gravure

La micro-gravure étant un outil adapté pour graver des matériaux durs, nous l'avons utilisé pour usiner directement des canaux dans des films de chitosane neutralisé. Cette technique est limitée en résolution par le diamètre de la fraise, le plus petit disponible dans le commerce mesurant 10 μm de diamètre, mais elle offre une grande polyvalence puisqu'il est possible, par exemple, de faire varier facilement la hauteur des canaux d'un microsystème.

II.B.1. Etude préliminaire des paramètres de gravure

Plusieurs canaux ont été produits par micro-gravure sur des films de chitosane neutralisés. Chaque échantillon a été ensuite nettoyé dans un bain d'éthanol ou avec un chiffon imbibé d'éthanol pour éliminer les fragments de chitosane laissés après la gravure. Dans un premier temps, certains paramètres de gravure tels que la vitesse de broche, l'avance de coupe et le recouvrement ont été discutés.

La vitesse de rotation de la fraise (ou vitesse de broche) ne doit pas être trop élevée car cela peut conduire à un échauffement et une dégradation du matériau à cause des forces de friction [6]. Nous avons gravé des canaux dans le chitosane avec des vitesses de rotation variant de 1200 rpm à 10000 rpm et n'avons pas observé de dégradation du chitosane.

L'avance de coupe ou la vitesse de déplacement de la fraise modifie le temps qu'il faut pour réaliser un motif, mais ne modifie pas l'aspect des canaux de façon notable. Cependant, si la fraise a une vitesse trop importante lorsqu'elle rencontre un obstacle (ici, la surface à graver), la fraise a plus de chances de se briser sous l'impact. Dans le cas du chitosane, des avances de coupe entre 100 et 200 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ ont été choisies.

Pour des raisons similaires, la profondeur gravée par la fraise en un passage est limitée. Plus la fraise est fine, plus elle est fragile. Ainsi, par précaution, la profondeur de chaque passe est limitée à 10% du diamètre de la fraise. Par exemple, pour une fraise de 300 μm de diamètre, la profondeur finale des motifs est atteinte en réalisant plusieurs passes de 30 μm .

Finalement, la rugosité de la surface des canaux a été estimée en fonction du recouvrement des déplacements de la fraise. Les mesures de rugosité ont été effectuées avec un profilomètre. Un recouvrement de 475 μm pour une fraise de 500 μm de diamètre conduit à une rugosité de 844 nm (FIG 3.9-a), alors qu'un recouvrement de 100 μm conduit à une rugosité de 613 nm (FIG 3.9-b). Ainsi, il semblerait qu'augmenter le recouvrement permettent de réduire la rugosité.

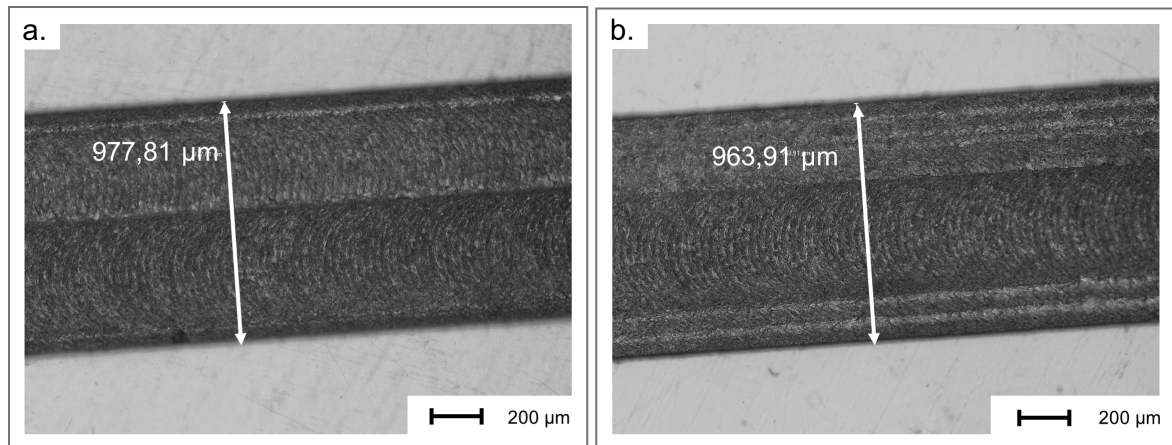


FIGURE 3.9 – Photos prises au microscope optique de canaux gravés avec une fraise de 500 μm de diamètre sur des films de chitosane avec un recouvrement de 475 μm (a) et de 100 μm (b).

Un autre paramètre impactant l'état de surface des canaux produits est l'usure de la fraise utilisée pour la gravure. Plus la fraise est usée, plus les bords des motifs sont irréguliers, notamment, il y a plus de débris et de défauts.

Ces tests préliminaires ont permis d'identifier des paramètres de gravure applicables pour la micro-structuration de films de chitosane.

II.B.2. Précision et régularité des canaux produits par micro-gravure

A partir de l'étude préliminaire des paramètres de gravure (§II.B.1 (Chap. 3)), des canaux ont été produits par micro-gravure pour étudier sa précision et régularité sur les films de chitosane neutralisés. Pour l'analyse de la résolution en largeur, une fraise de 200 μm de diamètre a été utilisée pour graver des canaux de 250, 500 et 1000 μm de large, tandis que des canaux de 105 et 200 μm ont été obtenus à partir d'une fraise de 100 μm de diamètre. Ces canaux avaient une profondeur de l'ordre de 200 μm , comme l'illustre le profil mesuré au profilomètre de la FIG 3.10-a.

Les pentes des parois des canaux et leur asymétrie sont des artefacts dus à la rigidité de la pointe de profilage lors d'un changement abrupte de hauteur et de l'angle de la pointe. Contrairement aux canaux obtenus par pressage à chaud, la micro-gravure permet d'obtenir des micro-canaux aux bords droits, comme le montrent les FIG 3.10-a et -b. D'après les mesures de largeur indiquées dans le TAB 3.5-a, à l'exception des canaux de 105 μm de large, qui ont une justesse de 87% par rapport à la consigne, les autres canaux micro-gravés présentent une justesse de plus de 97%. De plus, nous pouvons remarquer, d'après les écarts-types des mesures, que les largeurs des canaux sont homogènes sur la longueur de 1 cm des canaux. En effet, les largeurs des canaux micro-gravés présentent un écart-type de 2 μm en moyenne, à l'exception du canal de 1000 μm de large. Concernant la reproductibilité des canaux, il y a peu d'écarts entre les valeurs obtenues pour une même

consigne. Les variations entre les canaux sont en partie dues à la variation de diamètre d'une micro-fraise à l'autre, le diamètre indiqué par le fournisseur étant précis à 10% près.

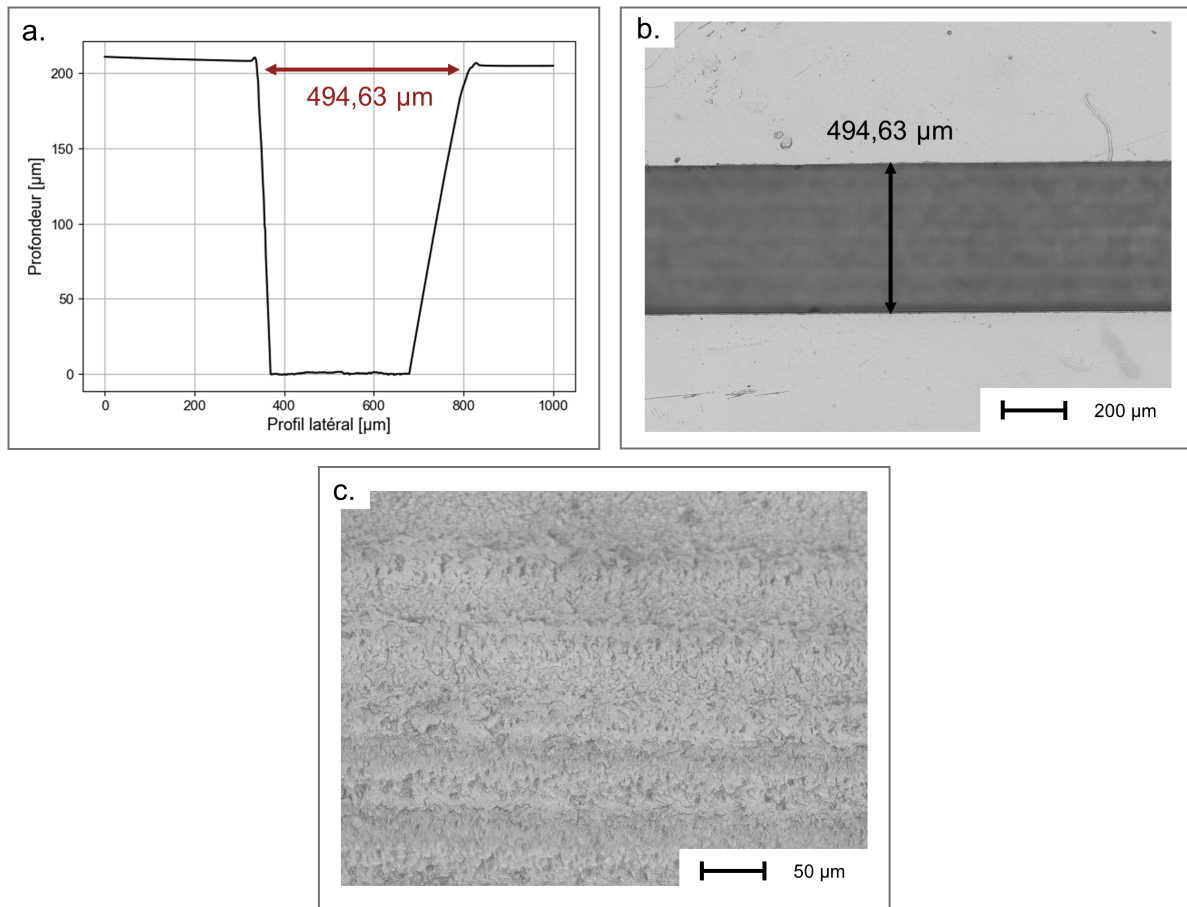


FIGURE 3.10 – (a) Profil de la profondeur d'un canal mesurée au proffidomètre ; (b) Photo prise au microscope optique d'un canal micro-gravé sur un film de chitosane ; (c) Photo prise au microscope optique du fond d'un canal de 1000 µm de large gravé avec une fraise de 200 µm.

Les traces d'usinage sont visibles sur la surface du chitosane gravé, comme le montre la FIG 3.10-c. Comme indiqué précédemment, l'état de la surface micro-gravée dépend des dimensions de la fraise ainsi que des paramètres du programme, tels que la vitesse de rotation ou la distance de recouvrement. Sur un canal de 1000 µm de large, la rugosité a été estimée par AFM à 375 nm pour une vitesse de rotation de 10000 rpm et un recouvrement de 0,02 mm. Cette valeur pourrait être améliorée en effectuant une optimisation plus avancée car la littérature fait état d'une rugosité comprise entre 100 et 200 nm pour une micro-gravure optimisée sur PMMA ou COC [7].

TABLEAU 3.5 – Caractérisation de la micro-gravure : Mesures de largeur (a) par microscopie optique en moyenne sur la longueur du canal (5 mesures par canal) et mesures de profondeur (b) par profilomètre au point d'étalonnage. Pour chaque essai, les canaux sont réalisés en trois exemplaires. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque série de canaux gravés. Si aucune valeur n'est donnée, la valeur p est négligeable.

a.

Largeur de consigne [µm]	105	200	250	500	1000
Largeur mesurée [µm]	114 ± 1	203 ± 2	245 ± 2	499 ± 2	988 ± 7
	119 ± 2	206 ± 2	245 ± 2	500 ± 5	1003 ± 4
	117 ± 2	205,5 ± 0,8	249 ± 2	497 ± 4	985 ± 13
	<i>p = 0,0056</i>	<i>p = 0,028</i>	<i>p = 0,0055</i>	<i>p = 0,54</i>	<i>p = 0,018</i>

b.

Profondeur de consigne [µm]	50	100	150	200
Profondeur mesurée [µm]	45,7 ± 0,3	105,8 ± 0,2	138,0 ± 1	174,6 ± 0,2
	44,6 ± 0,4	96,7 ± 0,3	136,3 ± 0,5	175,5 ± 0,2
	47,9 ± 0,4	92,9 ± 0,2	138,9 ± 0,6	173,3 ± 0,2

Pour analyser la résolution en profondeur de la micro-gravure, des micro-canaux de 350 µm de large, avec une profondeur variant de 50 µm à 200 µm, ont été produits avec une fraise de 300 µm de diamètre. Pour chaque micro-canal, une zone de 300 µm de diamètre a été calibrée pour correspondre à 0 µm de hauteur, au µm près, sur la surface du film de chitosane. Cela permet de ne pas tenir compte de la variation de l'épaisseur du film dans les mesures de profondeur. Les résultats sont présentés dans le TAB 3.5-b. La justesse par rapport à la consigne pour toutes les profondeurs testées est de 91%. Or, cela représente des différences par rapport aux instructions allant de 5 µm pour le canal de 50 µm à 25 µm pour celui de 200 µm de profondeur. Comme les canaux sont gravés avec plusieurs passes, une erreur constante à chaque passe a pu s'accumuler. Les différentes mesures réalisées pour une même profondeur, avec une même fraise, sont reproductibles. Donc, l'écart de hauteur peut donc être corrigé dans les consignes de fabrication.

Finalement, nous avons produit des micro-canaux de différentes dimensions en utilisant deux méthodes de fabrication distinctes. A la lumière des résultats obtenus avec le pressage à chaud et la micro-gravure pour la micro-structuration de canaux dans des films de chitosane neutralisés, la micro-gravure offre des performances supérieures. Cette technique de micro-fabrication permet d'obtenir des canaux aux bords verticaux, et donc des sections rectangulaires, dont la largeur est homogène sur la longueur des canaux, de manière reproductible. En outre, la micro-gravure permet des conceptions plus souples, en termes de hauteurs et de rapidité de prototypage. L'approche de la micro-gravure a donc été privilégiée pour la production de prototypes microfluidiques dans la suite de ce chapitre.

II.C. Assemblage des microsystèmes fluidiques à base de chitosane et évaluation des performances

II.C.1. Collage

Afin de sceller les canaux micro-gravés sur des films de chitosane, il a fallu développer une étape de collage de ces films sur un autre substrat. Ce collage doit résister au passage de solutions aqueuses pendant différentes durées et sous différents débits, être biocompatible et ne pas déformer les canaux.

Dans un premier temps, plusieurs méthodes de collage direct et indirect entre 2 films de chitosane ont été testées. Des gouttes de plusieurs solutions ont été déposées entre deux films de chitosane neutralisés et le contact a été maintenu entre les films par deux plaques les enserrant. La tenue des films a été ensuite évaluée de manière qualitative. Les gouttes de solution aqueuse d'acide acétique, d'eau déionisée et de solution basique à 0,64 M NaOH n'ont pas permis leur collage. L'utilisation d'une goutte de chitosane liquide entre deux films de chitosane permet de les coller après le séchage de la solution. Cependant, la pression doit être maintenue entre les films pour éviter leur déformation à cause de l'acidité de la solution. Toutefois, ce collage n'est pas résistant à l'eau car le chitosane servant de colle n'a pas été neutralisé. En conclusion, ces premières tentatives de collage n'ont pas permis de coller deux films de chitosane. Nous avons donc développé une méthode de collage indirect.

Une des méthodes de collage indirect consiste à utiliser une couche intermédiaire, une résine par exemple, pour assembler les deux parties du microsystème. Dans cet objectif, un protocole de collage a été développé à partir de la résine sèche biocompatible Ordyl SY 310 de 10 μm d'épaisseur. Des systèmes microfluidiques ont été obtenus en collant les films de chitosane sur un autre substrat selon les étapes décrites à la FIG 3.11-a.

Les étapes successives de collage ont été soigneusement contrôlées par microscopie optique comme illustré à la FIG 3.11-b. Des canaux et des trous pour la connexion des tubes ont été micro-gravés sur des films de chitosane neutralisés. La résine est recouverte de 2 couches plastiques de protection. La première a été retirée avant la lamination de la résine sur le film de chitosane gravé. Après lamination et transfert d'une partie de la résine sur le film de chitosane, la seconde couche plastique de protection a été retirée. La résine photosensible au-dessus des motifs micro-gravés, et donc qui n'était pas au contact du chitosane, a été retirée avec la seconde couche plastique de protection. Il est à noter, comme le montre la FIG 3.11-b.ii, qu'une petite partie de la résine, près des bords des motifs n'est pas enlevée pendant cette étape. La largeur et l'épaisseur de ce résidu de résine sont négligeables devant les dimensions des canaux.

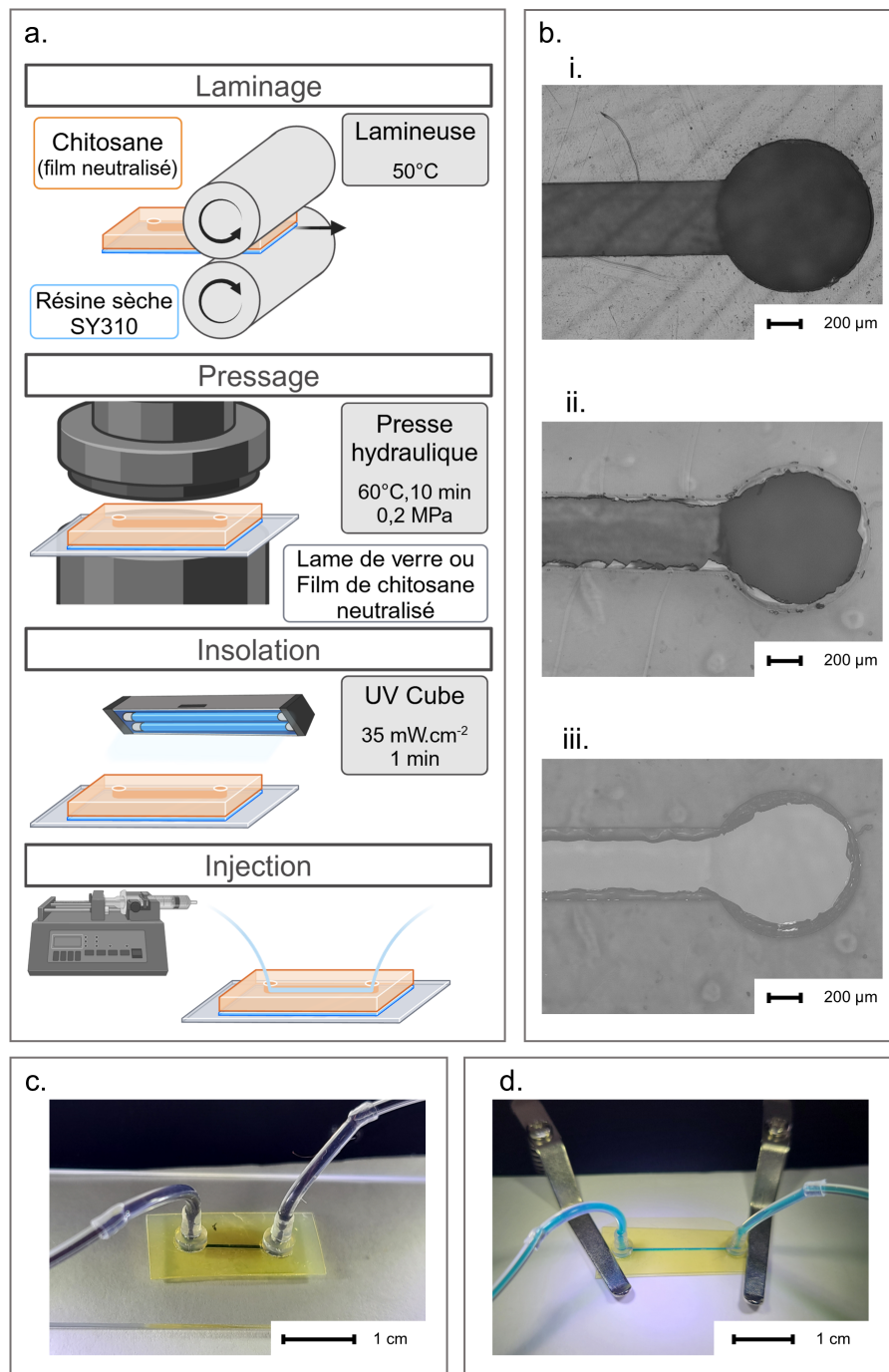


FIGURE 3.11 – (a) Protocole de collage de films de chitosane; (b) Photos prises au microscope optique d'un film de chitosane gravé (i), après dépôt de la résine sèche (ii) et après collage sur une lame de verre (iii); Photos de systèmes microfluidiques collés sur une lame de verre (c) et sur un autre film de chitosane (d) avec canaux de $350\ \mu\text{m}$ de largeur et $150\ \mu\text{m}$ de hauteur sous injection à $1\ \text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

Pour assurer le collage sans boucher les canaux, il est primordial que la résine ne soit pas déposée sur les motifs gravés. Nous avons étudié le collage pour des canaux de dimensions et de facteurs de forme différents : les largeurs variant de $550\ \mu\text{m}$ à $2000\ \mu\text{m}$ et les profondeurs de $50\ \mu\text{m}$ à $200\ \mu\text{m}$. Les largeurs et les profondeurs des canaux fabriqués ont été mesurées et sont reportées dans la FIG 3.12. A partir de ces dimensions,

les facteurs de forme sont calculés pour chaque canal. Au-dessus d'un facteur de forme de 0,12, les canaux n'ont pas de dépôt de résine au fond du canal, tandis que, pour un facteur de forme inférieur, la résine se dépose partiellement au fond du canal, principalement à proximité des entrées et sorties des canaux. Dans le cas d'un facteur de forme de l'ordre de 0,12, le résultat est variable considérant qu'un canal a eu de la résine déposée alors qu'un autre n'en a pas. Ainsi, le facteur de forme limite semble être 0,12. Par la suite, pour les systèmes microfluidiques en chitosane, les canaux seront dimensionnés avec un facteur de forme supérieur à cette limite. Il faut noter qu'à cette étape, la résine est encore soluble dans l'éthanol, contrairement au chitosane, ce qui permet de nettoyer la résine déposée sur le motif si besoin.

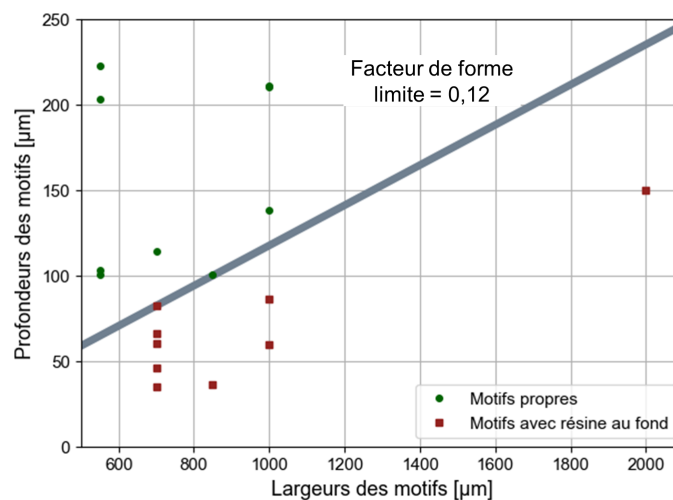


FIGURE 3.12 – Dimensions de canaux (profondeurs et largeurs) répartis selon la présence ou l'absence de résine au fond du canal après lamination de la résine Ordyl SY 310 à 50°C.

La deuxième partie du système, une lame de verre ou un film de chitosane neutralisé, a ensuite été placée sur le film de chitosane gravé et sur lequel la résine est déposée. L'ensemble a été pressé à 60°C, 0,2 MPa pendant 10 min. La réduction de la pression au minimum des capacités de la machine a permis de minimiser le débordement de la résine photosensible dans les canaux. De plus, un bloc de PDMS est ajouté entre la presse et le système en chitosane pour assurer le contact de toute la résine avec l'autre substrat sans augmenter la pression. Après l'étape de pressage, la résine photosensible qui avait débordé légèrement dans le canal est toujours présente comme le montre la FIG 3.11-b.iii. Cela ne devrait pas entraver les fonctions microfluidiques, car l'épaisseur de la résine photosensible (10 µm) est bien inférieure à la hauteur du canal (100 à 200 µm).

Après l'insolation aux UV de la résine (365 ± 5 nm pendant 1 min), une fois le système scellé, cette dernière devient insoluble dans l'eau et l'éthanol permettant l'injection de solutions dans les systèmes microfluidiques. Ainsi, les films de chitosane peuvent être collés à une lame de verre ou à un autre film de chitosane neutralisé pour sceller les dispositifs microfluidiques.

Des tubes ont été connectés à la sortie et aux entrées des dispositifs à l'aide de connecteurs. Ces connecteurs, avec ou sans réservoir, ont été fixés aux systèmes en chitosane avec de

la colle en silicone étanche ou avec des anneaux adhésifs. Puis, des solutions aqueuses colorées ont été injectées dans les systèmes microfluidiques chitosane/verre (FIG 3.11-c) et chitosane/chitosane (FIG 3.11-d). D'autres géométries ont été fabriquées comme un canal en forme de serpent, utilisé pour favoriser un mélange par diffusion de différents composants tout en réduisant l'encombrement total du système. Comme le montre la FIG 3.13, un co-flux de solutions aqueuses colorées en bleu et en rouge, observé au début des canaux de 500 μm de large, tend à se mélanger le long du serpent.

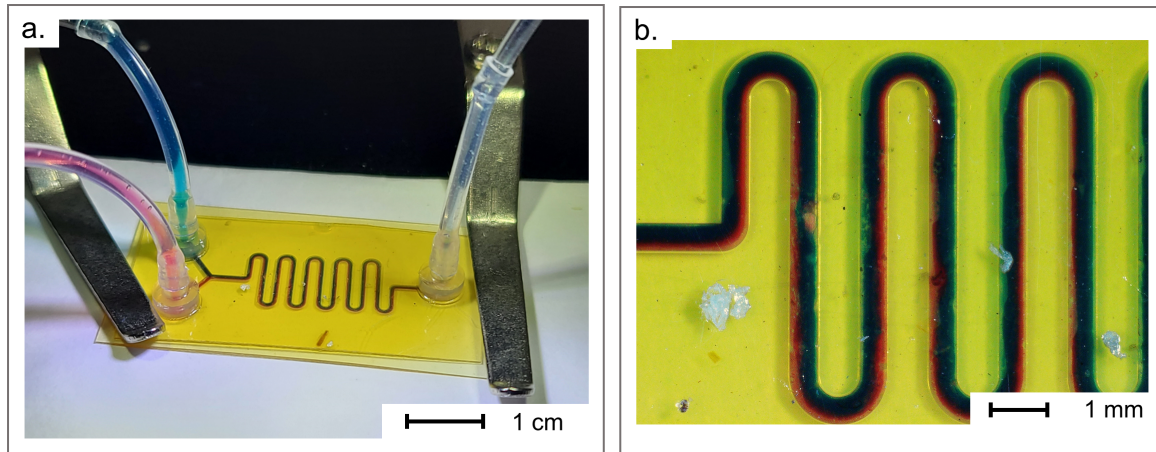


FIGURE 3.13 – Système microfluidique avec des solutions aqueuses rouge et bleue injectée à 1 mL.h^{-1} dans des canaux de 500 μm de largeur et 150 μm de hauteur dans une puce entièrement en chitosane.

II.C.2. Tenue du collage

Les systèmes en chitosane doivent pouvoir adresser différents types d'application et donc être opérationnels sur une large gamme de débits et de durées d'utilisation. Ces tests et caractérisations ont été effectués sur des films de chitosane neutralisés avec 1M NaOH/EtOH. Le collage des systèmes comporte deux étapes : (i) le collage des deux faces du système, toutes les 2 en chitosane ou en chitosane et verre, avec la résine Ordyl SY 310 et (ii) le collage des connectiques avec la colle en silicone.

La résistance du collage de la résine photosensible a été testée sur des dispositifs microfluidiques possédant des canaux droits de 300 μm de large et 200 μm de haut. Tout d'abord, nous avons évalué la résistance du collage en fonction du débit appliqué pour des systèmes chitosane/verre. Une solution d'eau déionisée a été injectée avec des débits augmentant progressivement à partir de 100 $\mu\text{L.h}^{-1}$. A 400 mL.h^{-1} , sur trois dispositifs différents, le collage au niveau des connectiques à l'entrée s'est rompu (FIG 3.14-a) mais le collage entre le film de chitosane et la lame de verre était intact (FIG 3.14-b et -c). Ainsi le point limitant pour les dispositifs testés est le collage des connectiques. Selon la méthode de collage de ces derniers, le débit maximal atteignable peut ainsi varier. En mettant une quantité plus faible de colle comme pour le connectique de gauche sur la FIG 3.14-d, la rupture a eu lieu pour un débit de 50 mL.h^{-1} . Les anneaux adhésifs sont peu résistants et se détachent vers 10 mL.h^{-1} . Ces résultats sont aussi valables pour un dispositif chitosane/chitosane.

Le collage des deux parties constituant le microsystème avec une résine sèche photosensible est donc capable de résister à des débits au moins égaux à 400 mL.h^{-1} , ce qui correspond à une différence de pression appliquée de 115 mbar. Ces résultats sont donc prometteurs pour les applications microfluidiques nécessitant un débit élevé comme le tri cellulaire [8, 9]. Par la suite, il s'agira d'améliorer la tenue en pression des connectiques pour élargir encore la gamme de pressions applicables.

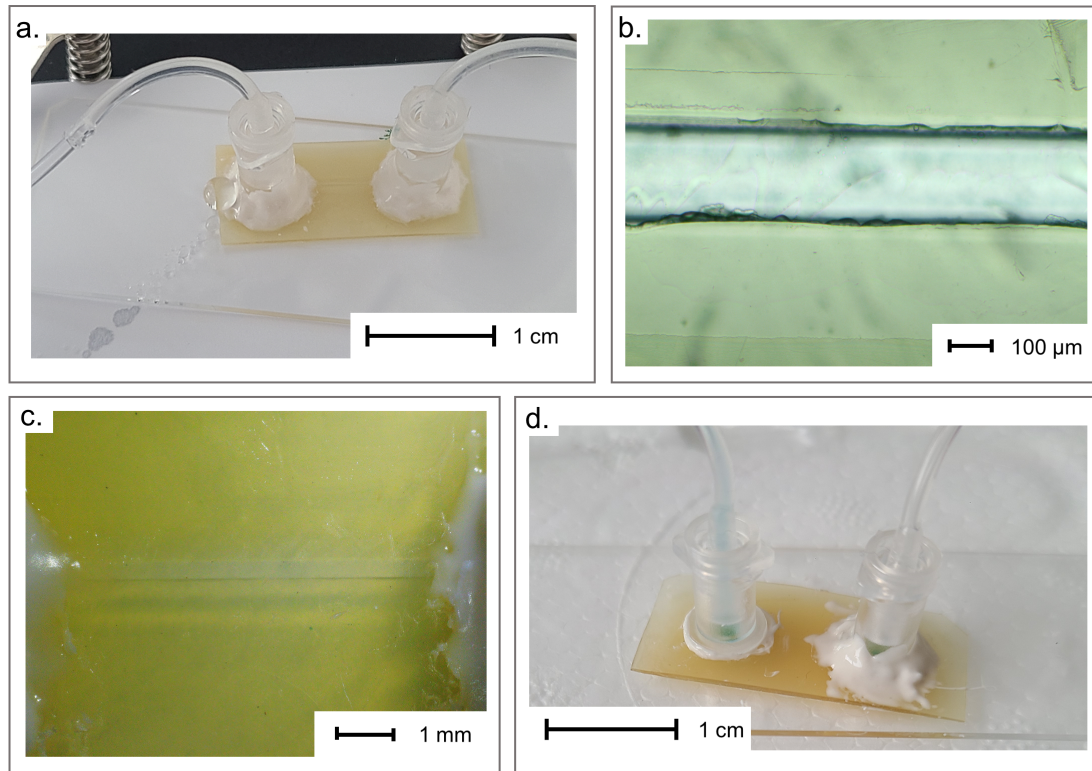


FIGURE 3.14 – Photo de systèmes chitosane/verre après la rupture du collage du connectique pendant l'injection d'eau déionisée à 400 mL.h^{-1} dans un canal de $300 \mu\text{m}$ de large et $200 \mu\text{m}$ de haut (a); Photos prises par un microscope optique de ce canal montrant le maintien du collage chitosane/verre (b) et l'intégrité du canal (c); Photo de collages de connectiques avec différentes quantités de colle (d).

Nous avons également testé la tenue du collage en soumettant des dispositifs chitosane/verre et chitosane/chitosane à des débits relativement lents sur de longues périodes (FIG 3.15-a et -c). De l'eau déionisée a été injectée dans les canaux microfluidiques à un débit de $100 \mu\text{L.h}^{-1}$ en continu pendant plusieurs heures. Après 24 heures d'écoulement (FIG 3.15-b et -d), les systèmes microfluidiques ne présentent aucune fuite et le flux continue à circuler dans les canaux.

Le fonctionnement des systèmes microfluidiques sur des temps longs est un avantage pour des applications de cultures cellulaires qui requièrent des perfusions lentes des cellules sur plusieurs jours.

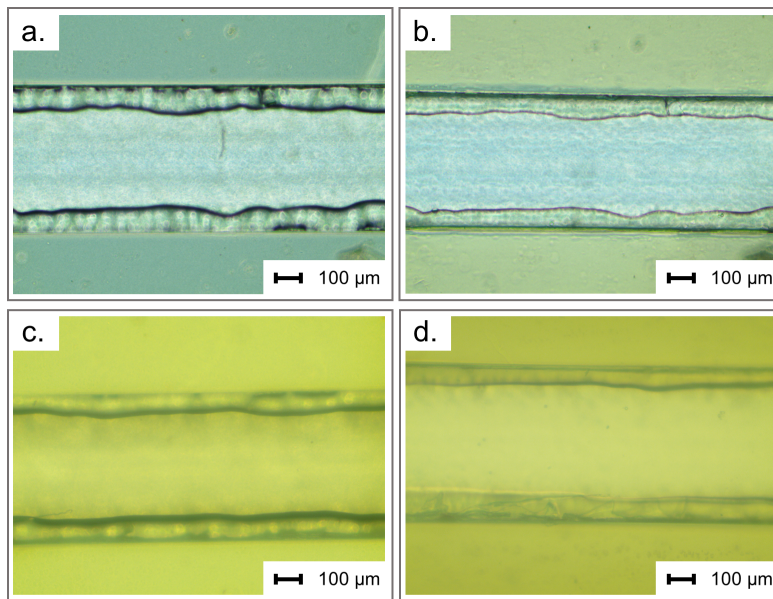


FIGURE 3.15 – Photos prises au microscope optique de canaux de 500 μm de large et 150 μm de haut dans des systèmes microfluidiques chitosane/verre (a, b) et chitosane (c, d) respectivement à $t=0\text{h}$ et à $t=24\text{h}$ de l'injection d'eau déionisée à $100 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$.





II.C.3. Stabilité des systèmes microfluidiques en fonctionnement

Le gonflement des films de chitosane a été étudié et discuté dans le CHAPITRE 2. Même si la méthode de neutralisation des films de chitosane privilégie un gonflement le plus faible possible, il demeure que ces films de chitosane neutralisé à 1 M NaOH/EtOH gonflent de $56,6\% \pm 0,8\%$ en 24h. La section des systèmes microfluidiques risque de diminuer lors de l'injection de solutions aqueuses et la vitesse de circulation des échantillons dans le canal ne sera pas constante pour un débit donné. Pour étudier cela, une solution aqueuse a été injectée à $1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ pendant 1h dans des systèmes chitosane/verre. Nous avons utilisé des dispositifs chitosane/verre pour avoir une paroi de la section du canal qui ne gonfle pas au contact de la solution aqueuse et peut ainsi faire office de mesure de référence. Des scans 3D, obtenus en lumière blanche, des canaux vides avant et après l'injection ont permis de déterminer les largeurs et profondeurs des canaux. Les dimensions des canaux avant et après l'injection sont comparées dans le TAB 3.6 et sur la FIG 3.16.

Deux canaux avec des dimensions différentes ont été étudiés. Le Canal 1 mesure initialement $509,60 \pm 2,89 \mu\text{m}$ de large et $165 \pm 7 \mu\text{m}$ de profondeur tandis que le Canal 2 mesure $316,33 \pm 0,53 \mu\text{m}$ de large pour $208 \pm 4 \mu\text{m}$ de profondeur. Les déformations semblent dépendre des dimensions originales des canaux. Dans les 2 cas, les canaux perdent en largeur avec une perte de 11% pour le Canal 1 et de 35% pour le Canal 2. La profondeur reste constante pendant l'expérience pour le Canal 1, mais le Canal 2 voit sa profondeur augmentée de 13%. Il semble difficile de prévoir les déformations des canaux mais d'après les mesures de gonflement réalisés sur des films de chitosane (§II.B (Chap. 2)) la déformation des canaux devrait aussi se stabiliser après 1h de contact avec une solution aqueuse. Il serait intéressant d'effectuer des mesures sur des durées plus longues

pour vérifier.

TABLEAU 3.6 – Dimensions des canaux microfluidiques avant et après 1h d’injection d’une solution aqueuse à 1 mL.h^{-1} , mesurées par microscope optique en lumière blanche.

	Canal 1		Canal 2	
	t = 0	t = 1h	t = 0	t = 1h
Largeur du canal [μm]	$509,60 \pm 2,89$	$453,01 \pm 3,54$	$316,33 \pm 0,53$	$205,61 \pm 1,98$
Profondeur du canal [μm]	165 ± 7	165 ± 7	208 ± 4	235 ± 7
Section du canal [μm^2]	84083	74747	65638	48318
Schéma de la section du canal				

Les systèmes ont été également caractérisés avec un suivi au microscope optique en fluorescence pendant toute l’injection. La solution aqueuse injectée contenait en effet des molécules fluorescentes : la fluorescéine et la BSA marquée. Comme le gonflement des films de chitosane est dû à l’absorption de la solution aqueuse par le film, l’injection de molécules fluorescentes permet de suivre la diffusion de la solution à travers l’épaisseur du chitosane. Les deux molécules choisies ont des tailles différentes, la fluorescéine émettant dans le vert possède un rayon de Stokes de $0,5 \text{ nm}$ [10] tandis que le rayon de Stokes de la BSA mesure entre $3,5 \text{ nm}$ et $3,9 \text{ nm}$ [11, 12] avec un marquage basé sur des fluorophores qui émettent dans le jaune. D’après les FIG 3.16-b.ii et la FIG 3.16-d.ii, au bout d’une heure d’injection, nous pouvons observer une différence entre les zones occupées par chacune des molécules fluorescentes. Les largeurs du canal et de chaque zone occupée par les molécules fluorescentes ont été mesurées au cours du temps et sont reportées en FIG 3.17-a pour le Canal 1 et en FIG 3.17-c pour le Canal 2.

Dans le cas des deux molécules, leur présence est visible sur des zones plus étendues que la largeur mesurée des canaux. Cependant, la mesure de la largeur des canaux en lumière blanche est difficile à interpréter puisque le verre ne se déformant pas, le gonflement des parois en chitosane n’est pas homogène sur toute la profondeur du canal. En effet, en observant les FIG 3.16-b.i et FIG 3.16-d.i, on remarque que, même si la largeur du canal a diminué, les bords semblent légèrement évasés et ne pas toucher la lame de verre, comme représenter en FIG 3.16-e. Ainsi des molécules fluorescentes pourraient être piégées entre le verre et la portion du chitosane qui a gonflé. Cette zone comprenant les bords évasés correspond à la zone occupée par la BSA marquée (FIG 3.16-b.ii et FIG 3.16-d.ii), et demeure inférieure à la largeur initiale de chaque canal. Donc, la diffusion de BSA marquée reste incertaine car elle pourrait être confinée dans le canal. En revanche, la fluorescéine est présente sur une zone plus large que le canal, indiquant sa présence à l’intérieur du film du chitosane. Cette différence de comportement est sûrement due à la différence de taille des molécules. Avec un rayon de Stokes plus faible, la fluorescéine peut

diffuser plus facilement à travers le chitosane.

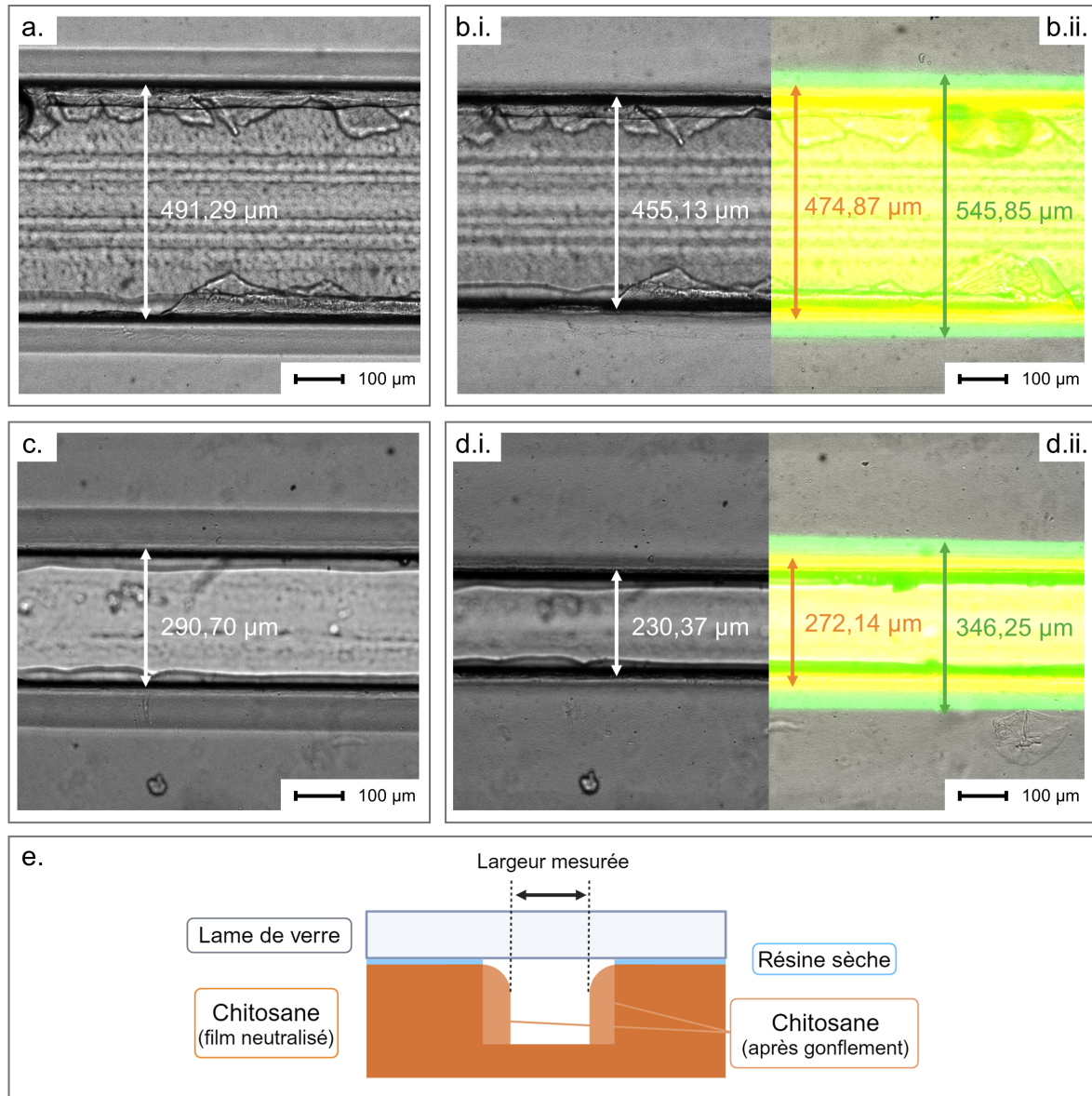


FIGURE 3.16 – Photos prises au microscope optique du Canal 1 (a-b) et du Canal 2 (c-d) : (a, c) après 5 min en lumière blanche ; (b, d) après 60 min d'injection de la solution fluorescente à 1 mL.h^{-1} en lumière blanche seule (b.i, d.i) et avec superposition des signaux fluorescents (b.ii, d.ii.) ; (e) Schéma de la section d'un canal après gonflement.

A partir d'images prises au microscope en fluorescence, sa diffusion est calculée au cours du temps (FIG 3.17-b, FIG 3.17-d), en comparant la largeur du canal en lumière blanche avec la largeur de la zone occupée par la fluorescéine. Pour le Canal 1, la fluorescéine a diffusé sur $46 \pm 3 \mu\text{m}$ en 1h tandis que la diffusion était de $60 \pm 4 \mu\text{m}$ en 1h pour le Canal 2. Les vitesses de diffusion ont été estimées à partir de régressions linéaires. La diffusion s'est déroulée à une vitesse de $0,872 \pm 0,035 \mu\text{m.min}^{-1}$ pour le Canal 1 et à $0,919 \pm 0,085 \mu\text{m.min}^{-1}$ pour le Canal 2. Contrairement à la déformation des canaux, la diffusion de la fluorescéine ne semble pas se stabiliser au cours du temps. Cela est problématique pour des applications nécessitant une stabilité de la composition du milieu ou d'avoir des

canaux en parallèle sans contamination croisée. Cependant, cela peut être utilisé pour des co-cultures impliquant un transfert de certaines molécules d'une espèce à l'autre, sans les cultiver dans le même canal.

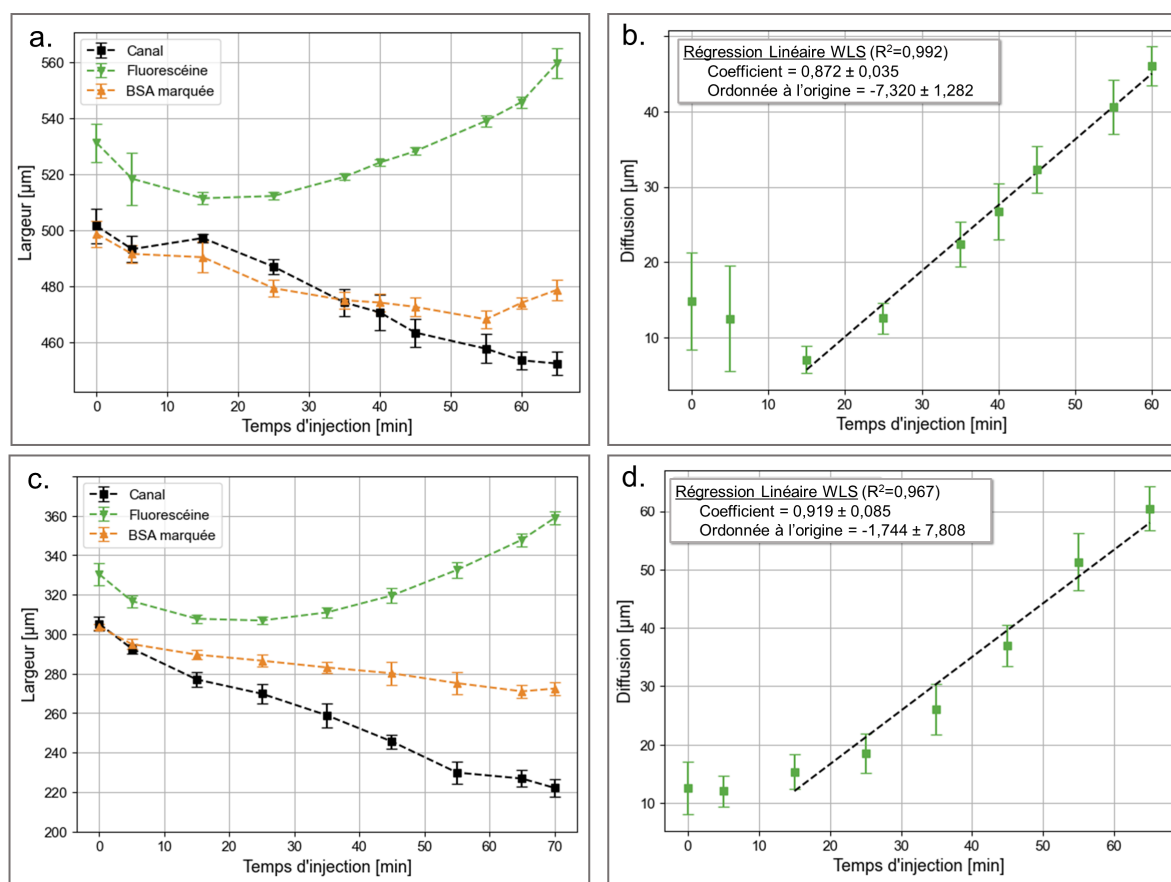


FIGURE 3.17 – Mesures sur le Canal 1 (a,b) et sur le Canal 2 (c-d) : (a, c) Largeurs du canal au cours du temps, de la zone occupée par la fluorescéine et la BSA marquée ; (b, d) Diffusion à travers le film de chitosane de fluorescéine en fonction du temps avec les résultats d'une régression linéaire pondérée par les écarts-types.

En plus de l'étude du gonflement, les canaux en chitosane ont été caractérisés par leur solubilité dans l'eau déionisée après neutralisation. Nous avons vu au CHAPITRE 2 que les films de chitosane neutralisés avec 1M NaOH/EtOH pendant 15h30 présentent une solubilisation de $4,6\% \pm 0,4\%$ de leur masse après 24h d'immersion dans l'eau. Pour mesurer l'impact de cette solubilité sur des systèmes microfluidiques, de l'eau déionisée a été injectée à $1,25 \text{ mL.h}^{-1}$ puis collectée après son passage dans un système chitosane/chitosane. Après 24h, environ 30 mL ont été récupérés et analysés pour déterminer la quantité de chitosane dissout. Suite à la lyophilisation de l'échantillon récupéré d'un système chitosane/chitosane avec un canal droit de $500 \mu\text{m}$ de large et $150 \mu\text{m}$ de hauteur, un précipité blanc de masse inférieure à 1 mg (limite de précision de la balance utilisée) a été récupéré. La limite de détection de la SEC, n'a pas permis de confirmer la composition de ce précipité. S'il s'agit de chitosane, cela peut poser problème pour des applications nécessitant une maîtrise précise de la composition de l'échantillon. Cependant, d'après l'étude de la solubilité du chitosane dans le CHAPITRE 2, la solubilisation partielle du chitosane se passe en 30 min et la quantité de

chitosane solubilisée n'augmente pas pendant 48h. Par conséquent, il serait possible d'ajouter un cycle de nettoyage des systèmes avant de réaliser des analyses quantitatives dans un système microfluidique en chitosane. Par comparaison, des chaînes non réticulées ont aussi été détectées dans des canaux microfluidiques en PDMS remplis d'eau déionisée pendant 24h [13]. La quantité de chaînes non réticulées est estimée à 5% (m/m) en conditions standards de préparation de PDMS (§II.A (Chap. 1)). Cette quantité peut être réduite par extraction de ces dernières avant l'utilisation des microsystèmes fluidiques, mais les chaînes non réticulées de PDMS restent détectables dans les canaux [13]. De plus, ces chaînes non réticulées présentent des signes d'interférence avec les cellules [14, 15] tandis que le chitosane est biocompatible [16, 17, 18].

Pour récapituler, le gonflement des films de chitosane conduit à une modification de la section des canaux microfluidiques pendant l'injection de solutions aqueuses et à une légère solubilisation du chitosane. Par ailleurs, les molécules de petites M_w , comme l'eau et la fluorescéine diffusent à travers le chitosane. Cela peut poser des problèmes pour des applications nécessitant un contrôle précis des concentrations des analytes. D'après les études effectuées sur des films de chitosane et présentées dans le CHAPITRE 2, le gonflement du chitosane et sa solubilisation devraient se stabiliser au cours du temps même si cela n'a pas été observé au cours des expériences réalisées ici.

D'autres matériaux avec de fortes absorptions d'eau ont déjà été utilisés pour faire des systèmes microfluidiques, comme le bois, avec des traitements de surface permettant de les rendre imperméable [19]. Même si ces traitements sont principalement basés sur des polymères d'origine pétrochimique comme le téflon, il existe des alternatives bio-sourcées, comme de la cire, qui restent à tester [20].

III. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié le développement de systèmes microfluidiques à partir de films de chitosane sélectionnés dans le chapitre précédent.

Dans un premier temps, les films ont été micro-structurés à l'aide de deux méthodes, à savoir le pressage à chaud et la micro-gravure. Ces méthodes ont été comparées à partir de leurs résolutions respectives en termes de hauteur et de largeur des canaux. Les canaux obtenus avec le pressage à chaud présentaient une section évasée et une profondeur non reproductible. La micro-gravure, quant à elle, a offert une meilleure précision et reproductibilité pour la micro-structuration de canaux allant de 105 à 1000 μm de large. La justesse des largeurs obtenues par rapport aux consignes est de plus de 97% et de 91% pour les profondeurs. La résolution est uniquement limitée par le diamètre de la fraise utilisée.

Les canaux microfluidiques ont ensuite été scellés en collant les films de chitosane micro-structurés à une lame de verre ou à un autre film de chitosane neutralisé, à l'aide d'une résine photosensible biocompatible de 10 μm d'épaisseur. Cette résine se dépose sur la surface des films du chitosane et non dans les motifs tant que leur facteur de forme dépasse 0,12. Grâce à la micro-gravure, des dispositifs microfluidiques fonctionnels avec différents designs ont été préparés. À notre connaissance, il s'agit des premiers dispositifs microfluidiques fabriqués à partir de chitosane [21].

Nous avons étudié les conditions d'utilisation des dispositifs en termes de débit et de durée d'injection. Les systèmes microfluidiques en chitosane avec le collage par résine photosensible peuvent résister à des débits allant jusqu'à 400 mL.h^{-1} et pour 24h de perfusion à 120 $\mu\text{L.h}^{-1}$ ou 1,25 mL.h^{-1} . Cette étude a aussi permis de caractériser les changements de dimensions des systèmes au cours de l'injection. A cause de la propension des films de chitosane au gonflement, nous avons observé que la section des canaux microfluidiques diminue au cours du temps avec une perte dépendant de la section initiale. Ainsi, des molécules de petites tailles peuvent diffuser à travers le polymère avec une vitesse de $0,872 \pm 0,035 \mu\text{m.min}^{-1}$.

Bien que le procédé d'élaboration des films de chitosane ait été étudié dans le CHAPITRE 2 afin de limiter le gonflement, ce dernier reste problématique pour des applications microfluidiques. D'autres méthodes de neutralisation ou de traitement surfacique devraient être étudiées afin de réduire ou même empêcher l'absorption d'eau. Par exemple, une étape supplémentaire de neutralisation pourrait être ajoutée après la gravure des canaux car la neutralisation effectuée pourrait être moins efficace dans l'épaisseur des films. De plus, des alternatives éco-responsables devraient être envisagées pour le collage du chitosane, le collage des connectiques sur le chitosane ainsi que les connectiques en eux-mêmes.

Ces résultats préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives pour la fabrication durable de LoC. Grâce à la biocompatibilité du chitosane, entre autres propriétés, des fonctions plus complexes peuvent être étudiées, y compris la manipulation et la culture des cellules.

Bibliographie

- [1] H. Becker and L. E. Locascio, "Polymer microfluidic devices," *Talanta*, vol. 56, pp. 267–287, 2002.
- [2] S. M. Scott and Z. Ali, "Fabrication methods for microfluidic devices : An overview," *Micromachines*, vol. 12, 2021.
- [3] S. I. Djomehri, "Diffusive and mechanical properties of biodegradable alginate stents," Ph.D. dissertation, San Jose State University, 2012. [Online]. Available : <https://www.researchgate.net/publication/258177971>
- [4] M. A. Bennet, "Multi-parameter quantitative mapping of macrofluidic devices," Ph.D. dissertation, University of Edinburgh, 2011.
- [5] S. S. Deshmukh and A. Goswami, "Hot embossing of polymers - a review," in *Materials Today : Proceedings*, vol. 26. Elsevier Ltd, 2019, pp. 405–414.
- [6] M. Hasan, J. Zhao, and Z. Jiang, "A review of modern advancements in micro drilling techniques," *Journal of Manufacturing Processes*, vol. 29, pp. 343–375, 2017.
- [7] I. R. Ogilvie, V. J. Sieben, C. F. Floquet, R. Zmijan, M. C. Mowlem, and H. Morgan, "Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, 2010.
- [8] C. W. S. Iv, C. D. Reyes, and G. P. López, "Microfluidic cell sorting : A review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation," *Lab on a Chip*, vol. 15, pp. 1230–1249, 2015.
- [9] Y. Shen, Y. Yalikun, and Y. Tanaka, "Recent advances in microfluidic cell sorting systems," *Sensors and Actuators, B : Chemical*, vol. 282, pp. 268–281, 2019.
- [10] E. Fernandez-Carro, R. Salomon-Camero, L. Armero, H. A. Castro-Abril, J. Ayensa-Jiménez, M. A. Martínez, I. Ochoa, C. Alcaine, I. García, and J. Ciriza, "Nanoparticles stokes radius assessment through permeability coefficient determination within a new stratified epithelium on-chip model," *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 51, pp. 466–475, 2023.
- [11] I. Axelsson, "Characterization of proteins and other macromolecules by agarose gel chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 152, no. 1, pp. 21–32, 1978.
- [12] B. Jachimska and A. Pajor, "Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces," *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 138–146, 2012.
- [13] K. J. Regehr, M. Domenech, J. T. Koepsel, K. C. Carver, S. J. Ellison-Zelski, W. L. Murphy, L. A. Schuler, E. T. Alarid, and D. J. Beebe, "Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 2132–2139, 2009.
- [14] E. Berthier, E. W. Young, and D. Beebe, "Engineers are from pdms-land, biologists are from polystyrenia," *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 1224–1237, 2012.
- [15] Y. Wang and T. P. Burghardt, "Uncured PDMS inhibits myosin in vitro motility in a microfluidic flow cell," *Analytical Biochemistry*, vol. 563, pp. 56–60, 2018.
- [16] M. Mattotti, Z. Alvarez, L. Delgado, M. A. Mateos-Timoneda, C. Aparicio, J. A. Planell, S. Alcántara, and E. Engel, "Differential neuronal and glial behavior on flat and micro patterned chitosan films," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 158, pp. 569–577, 2017.
- [17] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, J. Blumling, C. F. Wang, D. S. Kohane, and R. Langer, "Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5259–5267, 2006.

- [18] J. Oh, K. Kim, S. W. Won, C. Cha, A. K. Gaharwar, Šeila Selimović, H. Bae, K. H. Lee, D. H. Lee, S. H. Lee, and A. Khademhosseini, “Microfluidic fabrication of cell adhesive chitosan microtubes,” *Biomedical Microdevices*, vol. 15, pp. 465–472, 2013.
- [19] A. Andar, M. S. Hasan, V. Srinivasan, M. Al-Adhami, E. Gutierrez, D. Burgenson, X. Ge, L. Tolosa, Y. Kostov, and G. Rao, “Wood microfluidics,” *Analytical Chemistry*, vol. 91, pp. 11 004–11 012, 2019.
- [20] S. Thakur, M. Misra, and A. K. Mohanty, “Sustainable hydrophobic and moisture-resistant coating derived from downstream corn oil,” *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, vol. 7, pp. 8766–8774, 2019.
- [21] M. Zimmer, S. Trombotto, E. Laurenceau, and A. L. Deman, “Chitosan as an alternative to oil-based materials for the fabrication of lab-on-a-chip,” *Micromachines*, vol. 15, 2024.

CHAPITRE 4

Application des laboratoires sur puce en chitosane pour la culture cellulaire

Grâce à leur capacité à manipuler les fluides et les micro-objets à l'échelle microscopique, les systèmes microfluidiques ont été utilisés pour manipuler des cellules. En particulier, des microsystèmes conçus pour cultiver des cellules sont décrits dans la littérature [1, 2]. En offrant un contrôle précis des conditions expérimentales, ces systèmes permettent d'étudier le comportement de petites populations de cellules. Ils sont notamment utiles pour développer des traitements et par exemple déterminer la réponse spécifique de chaque patient à ces traitements, tout en optimisant l'utilisation des ressources et en réduisant les coûts expérimentaux.

Dans le CHAPITRE 3, nous avons développé un protocole de fabrication de systèmes microfluidiques à partir de films de chitosane neutralisés avec des solutions aqueuses ou hydroalcooliques de soude. Sachant que des films de chitosane ont déjà été étudiés comme substrat de culture cellulaire dans plusieurs études [3, 4, 5], il nous a semblé intéressant de réaliser des systèmes microfluidiques en chitosane pour la culture cellulaire.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord discuter de certaines méthodes de stérilisation de films de chitosane. Puis, ces films ont été utilisés comme substrats pour de la culture de deux types de lignées cellulaires : les ML-2, cellules humaines de leucémies aigües myéloïdes, qui sont des cellules non adhérentes, et les MDA-MB-231, cellules humaines de cancer mammaire métastatique, qui sont des cellules adhérentes. Cela nous a permis de confirmer la compatibilité des films de chitosane produits à partir du protocole décrit dans le CHAPITRE 2 avec la culture cellulaire. En tenant compte de ces résultats, un système microfluidique en chitosane a été développé pour mener les premiers essais de culture de cellules.

I. Matériels & Méthodes

I.A. Matériels

Les films de chitosane ont été préparés selon le protocole décrits dans le CHAPITRE 2, à partir d'une solution à 4% (m/v) de chitosane 244LG à $192 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ et 2,4% (v/v) d'acide acétique. Ils ont été neutralisés pendant 15h30 avec des solutions basiques à 1M NaOH dans de l'eau déionisée ou 1M NaOH dans une solution à 70% (v/v) d'éthanol, qui sera notée dans la suite du manuscrit comme 1M NaOH/EtOH.

La solution tampon phosphate (PBS 1X) a été préparée à partir d'une solution PBS 10X fournie par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Le DMEM avec supplément de GlutaMAX (GibcoCat# 61965026), le RPMI (GibcoCat# 12633012), le sérum bovin fœtal (SVF; GibcoCat# 10270106), la pénicilline-streptomycine (P-S; Gibco Cat# 15140122), la trypsine (TrypLE Express (1X); Gibco 12605-010) et les marqueurs CellMask™ rouge profond (Invitrogen #C10046 (1X)) ont été obtenus auprès de ThermoFisher Scientific (Dardilly, France).

I.B. Protocoles de stérilisation de films de chitosane

Les tests de stérilisation ont été réalisés sur des films de chitosane découpés, aux dimensions de $2 \times 1,5 \text{ cm}^2$. Trois méthodes de stérilisation ont été comparées : par immersion dans l'éthanol, par un passage dans l'autoclave ou par une exposition aux UV.

Pour la stérilisation avec l'éthanol, les films ont été immergés dans 5 mL d'éthanol pendant 15 min. Avant utilisation, les films ont été séchés à l'air libre pendant 10 min dans un Poste de Sécurité Microbiologique (hotte PSM) pour assurer l'évaporation de l'éthanol.

Dans le cas de la stérilisation par autoclave, les films de chitosane ont été placés dans un récipient en verre dans un autoclave (DB-45, Systec, Linden, Allemagne). Le cycle d'autoclave solide est effectué avec une pression de 15 psi et une température de $121,1^\circ\text{C}$ maintenues pendant 1h pour stériliser. L'enceinte a ensuite été ramenée à pression ambiante. Les films ont été refroidis jusqu'à atteindre la T_{amb} , avant d'être manipulés.

Pour la stérilisation par UV, les films de chitosane ont été placés sous une lampe G15T8 (Sankyo Denki, Hiratsuka, Japon) à 253,7 nm pour 4,9 W pendant 15 min dans une hotte PSM (SafeFAST Classic, Faster, Milan, Italie).

Pour chaque méthode de stérilisation, quatre films de chitosane ont été caractérisés. La masse a été mesurée avant et après stérilisation respectivement avec une balance de haute précision.

Les spectres FTIR ont été obtenus avec le spectromètre IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, USA) équipé d'un accessoire en diamant pour ATR. 64 balayages ont été effectués dans la gamme de $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ avec une résolution de 2 cm^{-1} .

I.C. Culture de cellules sur des films de chitosane stérilisés

I.C.1. Préparation des films de chitosane pour la culture

Comme illustré sur la FIG 4.1, les films de chitosane sont tout d'abord stérilisés par immersion dans une solution d'éthanol. Ils ont ensuite été immergés dans le milieu de culture, DMEM ou RPMI supplémenté avec 10% SVF et 1% P-S selon les cellules cultivées, pendant 3h dans une hotte PSM.

Après avoir laissé les films gonflés, ils ont été découpés au format d'une boîte de Petri de 35 mm de diamètre (Référence 353001, Falcon Corning, Glendale, USA), de 60 mm de diamètre (Référence 353004, Falcon Corning, Glendale, USA) ou d'un puits de 22 mm de diamètre dans une boîte de 12 puits (Nunclon Delta Surface, ThermoFisher Scientific, Roskilde, Danemark).

Les films de chitosane sont maintenus au fond de la boîte par un joint circulaire en silicone autoclavé (RS PRO, Beauvais, France), ou par un adhésif double face. La boîte est ensuite remplie de milieu de culture jusqu'à l'ajout des cellules.

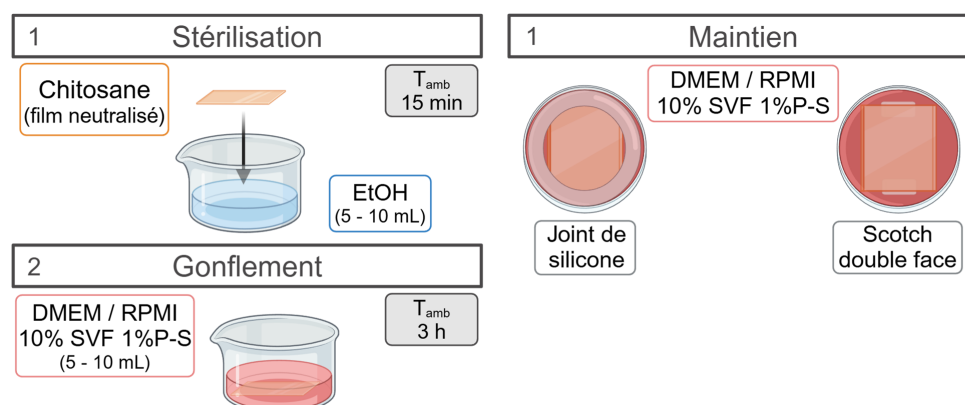


FIGURE 4.1 – Protocole de préparation des films de chitosane pour la culture cellulaire.

I.C.2. Culture des cellules ML-2

Les cellules humaines de leucémies aigües myéloïdes (ML-2) ont été cultivées dans du RPMI complété par 10% de SVF et 1% de P-S, à 37 °C, 95% d'humidité, et 5% de CO₂. Les cellules ont été passées tous les 3-4 jours en renouvelant le milieu de culture, comme illustré en FIG 4.2.

Les cellules et le milieu ont été récupérés de leur boîte de culture pour être centrifugés à 1000 × g pendant 5 min. Les cellules vivantes, formant un culot, ont été resuspendues dans 1 mL de milieu. La concentration des cellules a été estimée avec des cellules de Malassez (Globe Scientific Inc., Mahwah, USA) à l'aide d'un microscope optique. A partir de ce chiffre, le volume à prélever a été calculé pour obtenir une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules.mL⁻¹ dans 5 mL de milieu de culture, qui a été placé dans une nouvelle boîte de

Petri, avec ou sans film de chitosane. Ces boîtes ont été ensuite placées dans un incubateur à 37°C. Des expériences ont été réalisées dans des boîtes de Petri de 3,5 cm et 6 cm de diamètre. Pour chaque expérience, une boîte témoin, sans film de chitosane, a été préparée.

Après 3-4 jours de culture, les cellules sont récupérées et comptées avec des cellules de Malassez.

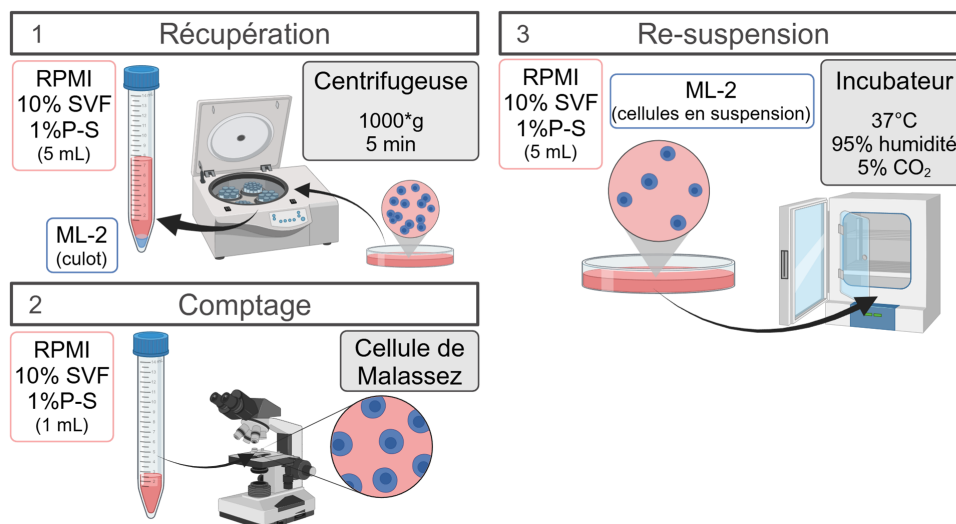


FIGURE 4.2 – Protocole de culture des cellules ML-2 dans une boîte de Petri de diamètre 60 mm.

I.C.3. Culture des cellules MDA-MB-231

Les cellules humaines de cancer mammaire métastatique (MDA-MB-231) ont été cultivées dans du DMEM + Glutamax complété par 10% de SVF et 1% de P-S à 37 °C, 95% d'humidité, et 5% de CO₂. Les cellules ont été passées chaque fois qu'elles avaient atteint 80-90% de confluence, c'est-à-dire tous les 3-4 jours, suivant le protocole en FIG 4.3. Après deux rinçages au PBS, les cellules ont été remises dans l'incubateur pour 3 min dans 1 mL de trypsine (volumes indiqués pour une boîte de Petri de 60 mm de diamètre). Ensuite, les cellules ont été récupérées et diluées dans 4 mL supplémentaires de milieu de culture. Après une centrifugation à 1000 × g pendant 5 min, les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de milieu. Dans une nouvelle boîte de Petri, avec ou sans film de chitosane, 100 ou 150 µL de la solution avec cellules ont été ajoutés au milieu de culture. Cette boîte a ensuite été placée dans l'incubateur.

Pour observer le comportement des MDA-MB-231 pendant leur culture, une boîte de 12 puits (Nunclon Delta Surface, ThermoFisher Scientific, Roskilde, Danemark) a été préparée et mise en culture initialement dans l'incubateur. Les puits contenaient en trois exemplaires, des puits témoins, des puits avec un film de chitosane et des puits avec un film de chitosane dont la surface avait été micro-gravée avec un cercle de 1,5 cm de diamètre. A partir du jour 2 (J2) de culture, la boîte à puits a été placée dans l'enceinte d'incubation i8 du microscope DMI8 inversé (Leica Thunder Imager 3D Cell culture, Leica) à 37°C et 5% de CO₂. L'humidité atmosphérique d'environ 95% a été assurée par la présence d'eau autoclavée dans l'enceinte. Des images de chaque puits ont été prises toutes les heures

pendant 24h. Les résolutions et dimensions de chaque image et vidéos sont détaillées en Annexe D.

Pour compter les cellules, ces dernières ont été récupérées après 3 ou 4 jours de culture. Après re-suspension, les cellules sont comptées dans des cellules de Malassez au microscope optique. Comme il existe trois exemplaires de chaque type de puits, des analyses ANOVA ont été réalisées entre le nombre de cellules estimé pour chaque catégorie de puits. Les valeurs p sont indiquées dans la section §II (Chap. 4).

Les rugosités de surface des films de chitosane avec et sans mirco-gravure ont été calculées à partir de l'écart quadratique moyen mesuré sur 2 zones de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ cartographiées avec un AFM équipé d'une sonde Arrow NCR de 40 N.m^{-1} (Mode sans contact / de tapotement - Revêtement reflex). Marie-Charlotte Audry de l'INL a effectué ces mesures.

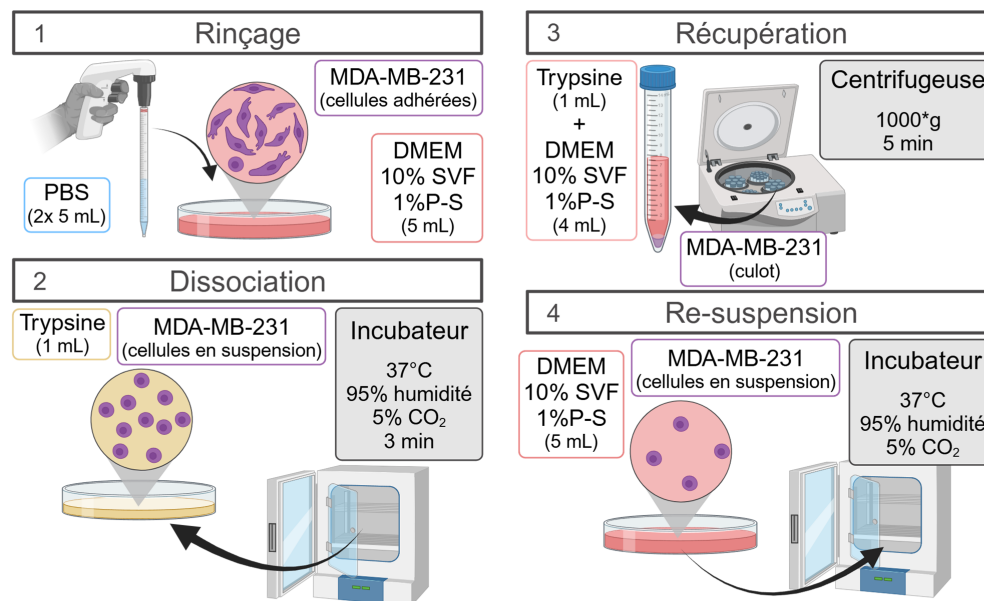


FIGURE 4.3 – Protocole de culture de cellules MDA-MB-231 dans une boîte de Petri de 60 mm de diamètre.

I.D. Culture cellulaire en microsystème

I.D.1. Fabrication des systèmes microfluidiques

Les systèmes microfluidiques chitosane/chitosane ont été fabriqués en utilisant des films de chitosane neutralisés avec 1M NaOH/EtOH à partir du protocole développé et détaillé dans le CHAPITRE 3. Des films de chitosane neutralisés ont été micro-gravés avec une micro-fraiseuse Desktop à 3 axes (Minitch Machinery Corp., Norcross, USA) contrôlée par un contrôleur Naknishi E3000. Sur un des films, les motifs des canaux ont été gravés tandis que des trous ont été percés sur le second. Le système consiste en 2 chambres de culture de 200 μm de profondeur et 3 mm de diamètre, alimentées par des canaux de 100 μm de profondeur et 500 μm de large. L'ouverture des canaux sur les chambres de culture se fait progressivement pour faciliter l'évacuation de petites bulles d'air dans le système.

La résine Ordyl SY 310 a été laminée sur le film micro-gravé de canaux avant qu'il ne soit aligné sur l'autre film. Après le collage du microsystème, le système a été connecté à des tubes en PTFE par des olives (Fluidic 630, ChipShop, Jena, Allemagne) et de la colle CAF 4 (Rhodia, Roussillon, France), comme illustré sur la FIG 4.4-a. Le système a été maintenu sous l'objectif des microscopes sur une lame de verre à l'aide d'adhésifs double face. Les chambres de cultures sont présentées en FIG 4.4-b.

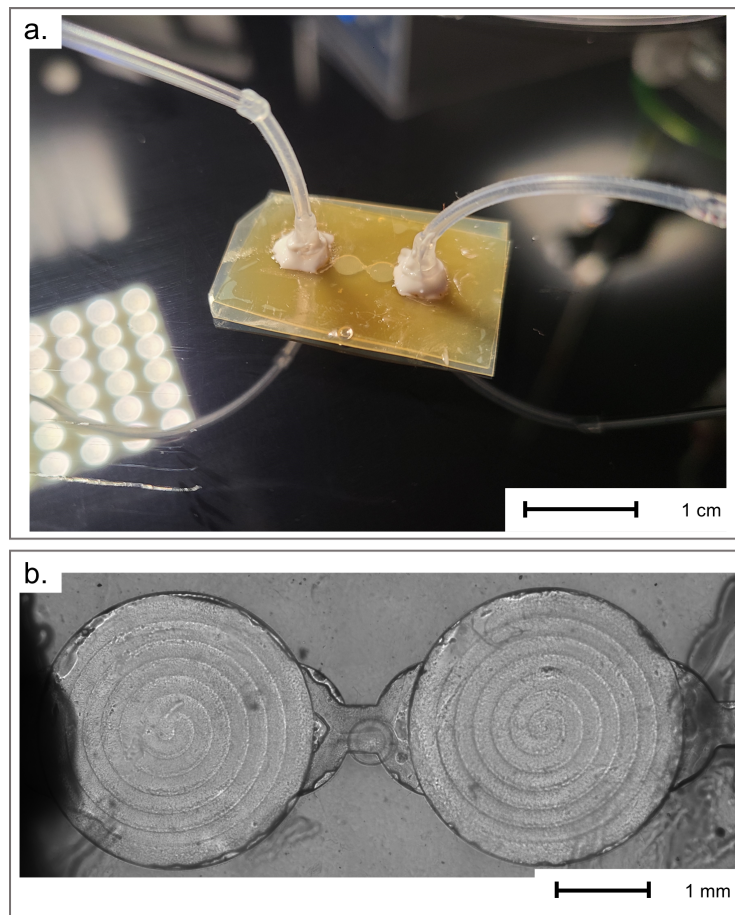


FIGURE 4.4 – (a) Photo du système microfluidique; (b) Photo prise par microscope optique du système microfluidique avec 2 chambres de culture (200 μm de profondeur et 3 mm de diamètre) reliées par des canaux (100 μm de profondeur et 500 μm de large).

I.D.2. Injection et incubation des cellules

L'injection des différents liquides a été contrôlée par le pousse-seringue LSPone (Advanced Microfluidics, Lausanne, Suisse) et le logiciel associé LSPone Quick. Ce pousse-seringue est muni d'une valve de sélection sans volume mort permettant de manipuler plusieurs liquides avec une unique seringue sans formation de bulles d'air. Le système microfluidique a été installé sur une lame de verre dans l'enceinte d'incubation i8 du microscope DMI8 inversé à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture, DMEM + GlutaMax avec 10% SVF et 1% P-S, a été aussi conservé dans l'enceinte. L'installation expérimentale est décrite sur la FIG 4.5.

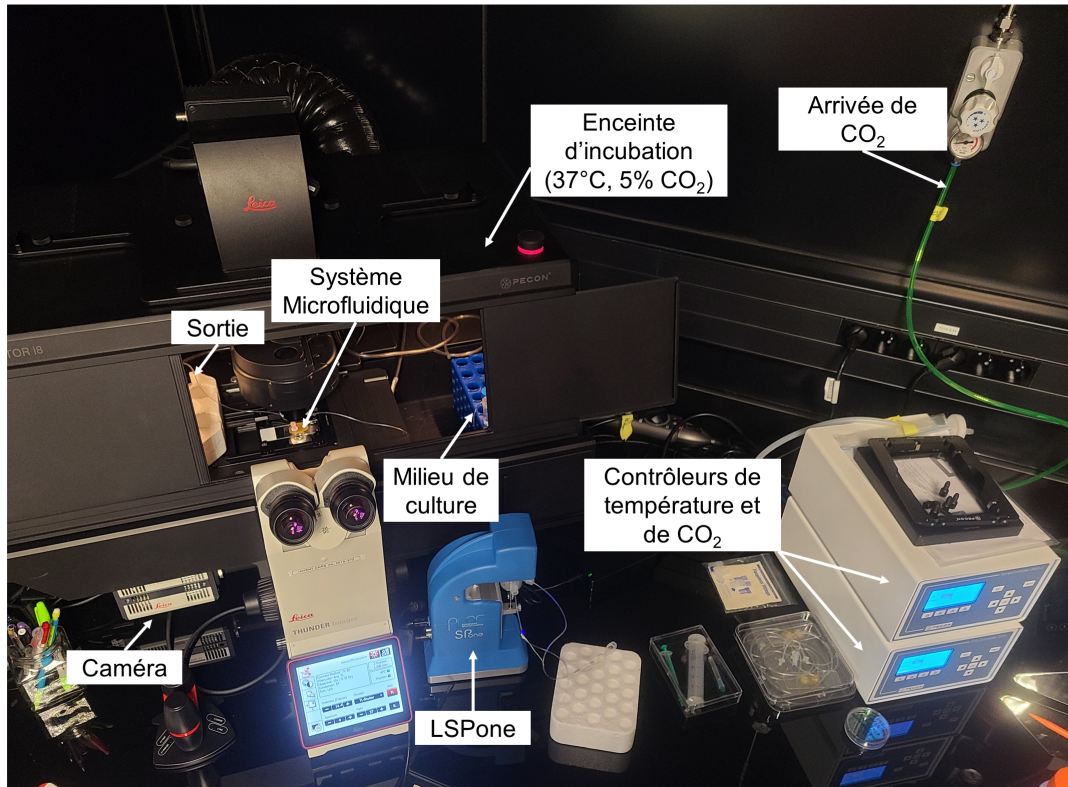


FIGURE 4.5 – Photo de l'installation expérimentale.

Le suivi de la culture a été effectué au microscope DMI8. Des images en lumière blanche et en fluorescence ont été prises chaque jour. Les résolutions et dimensions des images sont décrites en Annexe E. Sur les images en fluorescence, l'intensité (entre 0 et 255) de tous les pixels constituant les chambres de culture (cercle de 3mm de diamètre) est calculée pour une gamme dynamique fixée et identique d'une image à l'autre. La moyenne et l'intensité maximale apparaissant sur chaque image sont calculées pour suivre l'évolution de la population des cellules.

I.D.3. Calcul de contraintes de cisaillement

Les contraintes de cisaillement τ sur les parois cellulaires sont estimées à partir de la formule suivante [6] :

$$\tau = \frac{3\eta \times V}{2R} \quad (4.1)$$

avec η la viscosité dynamique (en mPa.s) du milieu de culture reportée valant $0,930 \pm 0,034$ mPa.s [7], V la vitesse du fluide et R le rayon moyen (en μm) des cellules MDA-MB-231 estimé à $7,5 \mu\text{m}$ [8].

II. Résultats & Discussions

II.A. Stérilisation des films de chitosane

La stérilisation est un processus crucial qui permet de garantir la propreté et l'absence de contamination des échantillons par des micro-organismes tels que des bactéries, des virus, des champignons ou des spores. Elle consiste à éliminer ou détruire tous ces micro-organismes des produits, instruments ou environnements avant leur utilisation. Il est nécessaire de pouvoir stériliser les systèmes microfluidiques en chitosane dédiés à la culture cellulaire, et à la manipulation de cellules en général pour éviter les contaminations. En effet, le système étant placé dans des conditions favorables pour la culture cellulaire, celles-ci favoriseront aussi la prolifération d'autres micro-organismes s'ils sont présents.

Il existe plusieurs méthodes de stérilisation, chacune ayant ses propres avantages et inconvénients en fonction des matériaux et contextes d'utilisation. Une première possibilité pour obtenir des films de chitosane stériles est de maintenir toutes les étapes de filmification et neutralisation dans des conditions stériles. Ce fut le cas de l'étude de Mattoti *et al.* [4]. Or, cette solution n'est pas compatible avec les installations disponibles dans nos laboratoires, particulièrement s'il faut pouvoir assembler des systèmes microfluidiques. Ainsi, nous avons étudié trois méthodes de stérilisation classiques : l'autoclave, l'éthanol et l'irradiation aux UV.

La stérilisation par autoclave utilise la vapeur d'eau pour stériliser. En effet, la vapeur d'eau saturée sous pression provoque la destruction des germes en dénaturant les protéines par hydrolyse. Cette technique est très utilisée pour stériliser des instruments chirurgicaux ou des équipements de laboratoire résistants à la chaleur et à l'humidité [9].

L'éthanol est souvent utilisé pour désinfecter des surfaces et de petits équipements non critiques. Il dénature les protéines et tue les micro-organismes en dissolvant les lipides de leurs membranes cellulaires. Cette méthode est plus rapide et pratique mais elle est moins efficace contre les spores [9].

La lumière ultraviolette, particulièrement les UV-C entre 100 et 280 nm, provoquent des dommages au niveau de l'ADN des bactéries, virus et autres pathogènes, inhibant leur reproduction. Elle est principalement utilisée pour la désinfection de l'air, des surfaces ou de l'eau. Ses applications sont limitées car les UV ne pénètrent pas les surfaces opaques ou les liquides troubles [9].

Nous avons comparé les impacts de ces trois méthodes sur des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH/EtOH. Pour chaque méthode, quatre films ont été stérilisés et caractérisés selon des critères physiques (aspect visuel, masse) et des critères chimiques (structure chimique).

II.A.1. Caractérisations physiques des films après stérilisation

Visuellement, les films de chitosane neutralisés qui ont été stérilisés par UV ou par éthanol ne présentent pas de changement de forme ou de coloration. Par contre, la stérilisation à l'autoclave a déformé les films de chitosane en générant des ondulations des films. En effet, la vapeur chauffée utilisée pour endommager les micro-organismes a probablement fait gonfler les films de chitosane qui se sont ensuite déformés lors du séchage.

De même, l'évolution de la masse des films après leur stérilisation indique clairement que la stérilisation à l'éthanol et par irradiation aux UV n'a pas d'influence sur la masse des films de chitosane (TAB 4.1). En revanche, les films de chitosane autoclavés présentent un gain de masse de $12,9\% \pm 0,7\%$ après stérilisation, probablement dû à l'absorption de la vapeur d'eau. Cette absorption a déjà été observée par Rao *et al.* [10] et liée à une augmentation de l'épaisseur de films de chitosane après la stérilisation à l'autoclave.

TABLEAU 4.1 – Evolution de la masses des film de chitosane avant et après stérilisation en fonction de la technique de stérilisation.

	Autoclave	Rinçage à l'éthanol	Irradiation aux UV
Gain de masse [%]	$12,9 \pm 0,7$	$0 \pm 0,41$	$0 \pm 0,38$

II.A.2. Caractérisations chimiques des films après stérilisation

Les films de chitosane ont également été caractérisés avant et après stérilisation par spectroscopie FTIR afin d'évaluer l'effet de la stérilisation sur la structure chimique du chitosane. Les spectres obtenus sont présentés sur la FIG 4.6.

Les films stérilisés par autoclave et par éthanol (FIG 4.6-a) présentent des spectres FTIR similaires à celui d'un film de chitosane neutralisé non-stérilisé. Nous retrouvons les pics correspondant aux liaisons et groupements caractéristiques du chitosane tels que la bande de vibrations N-H et O-H à 3312 cm^{-1} , le groupe N-H de l'amide II à 1582 cm^{-1} , le groupe $-\text{CH}_2$ à 1418 cm^{-1} et la liaison glycosidique C-O-C à 894 cm^{-1} . Leur position et amplitude relative restent comparables à celles des pics d'un film avant stérilisation. Ainsi, le chitosane n'a pas été dégradé par ces deux méthodes de stérilisation.

En revanche, le film stérilisé par irradiations aux UV présente un spectre FTIR avec des différences très nettes par rapport à celui d'un film de chitosane non-stérilisé (FIG 4.6-b). La bande de vibrations N-H et O-H à 3312 cm^{-1} a diminué en intensité relativement aux autres pics. Cette diminution peut indiquer une scission de liaisons O-H et/ou N-H [11, 12]. Les pics compris entre 1650 et 1400 cm^{-1} , notamment celui du groupe N-H de l'amide II à 1582 cm^{-1} et celui du groupe $-\text{CH}_2$ à 1418 cm^{-1} ont augmenté en intensité relative pour former un pic unique très intense à 1460 cm^{-1} . Cela peut correspondre à la création de liaisons C=O [11, 12]. De plus, à côté du pic C-O-C à 894 cm^{-1} , un pic apparaît à 876 cm^{-1} avec une intensité forte que nous n'avons pas réussi à attribuer.

En ne considérant que leur énergie de dissociation, une irradiation à 258 nm possède une énergie suffisante pour rompre des liaisons typiques de polymères (C-C, C-O, C-H, O-H

ou O-O) [13]. Suite à ces scissions de liaison, des radicaux libres sont créés, qui peuvent se recombinaison avec d'autres radicaux. Dans le cas du chitosane, il a été reporté que ces radicaux peuvent conduire à la scission des liaisons glycosidiques reliant les unités de chitosane, à l'ouverture des cycles ainsi qu'à la formation de nouveaux radicaux [14]. Ces réactions en chaîne provoquent la dégradation du chitosane. A l'échelle macroscopique, ces changements structuraux peuvent se traduire par la modification des propriétés physiques et chimiques du polymère. En effet, il a été observé dans la littérature que les films de chitosane après une irradiation par UV présentent une diminution de leur angle de contact [15] et une augmentation de leur dureté [16].

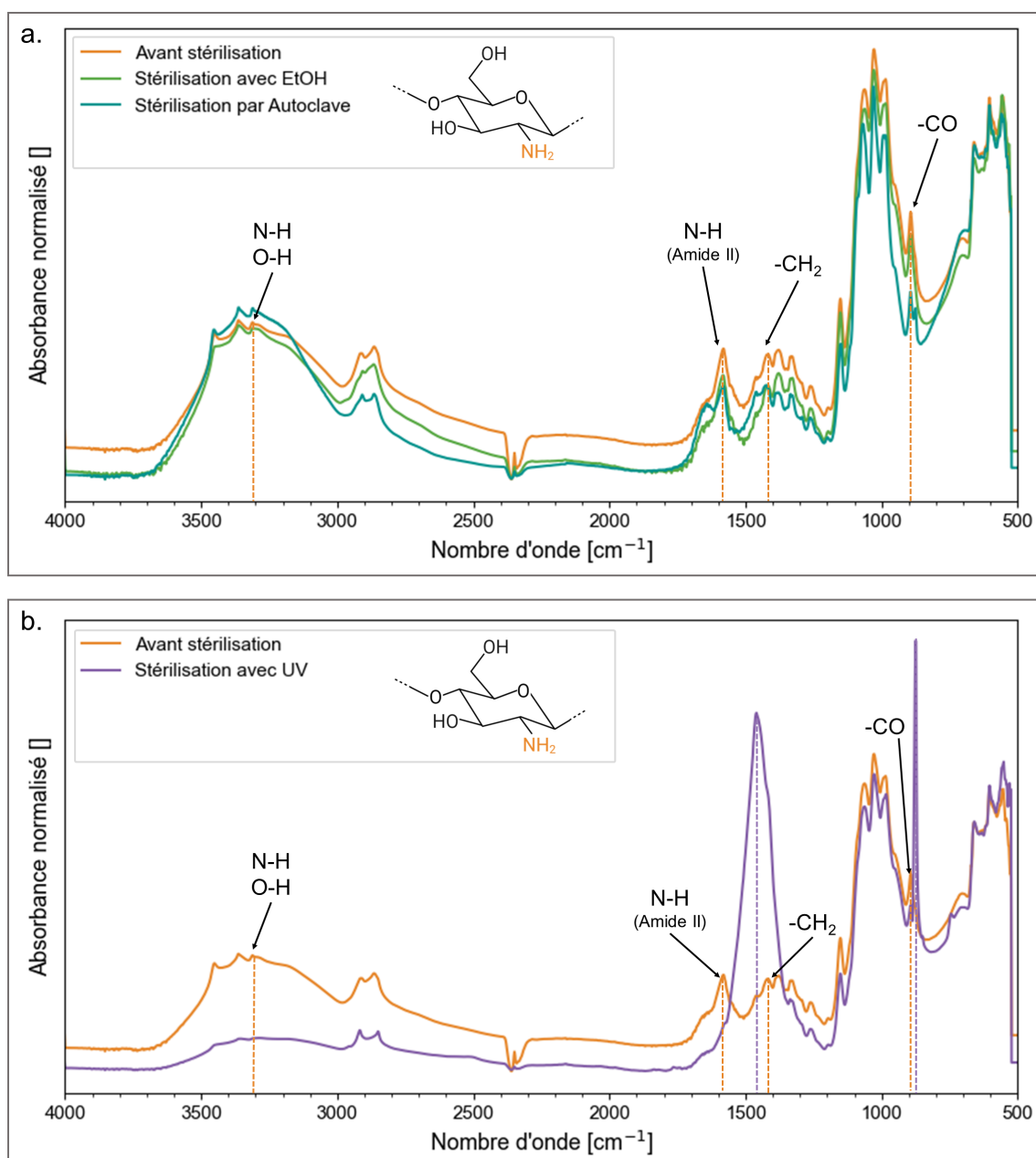


FIGURE 4.6 – Spectres FTIR des films de chitosane avant et après stérilisation : (a) Stérilisation par Ethanol (EtOH) et par autoclave ; (b) Stérilisation par irradiation aux UV.

II.A.3. Conclusion sur les méthodes de stérilisation des films de chitosane pour la culture cellulaire

Afin d'utiliser les films de chitosane pour la culture cellulaire, ces derniers doivent être stériles pour éviter la contamination des échantillons étudiés. La méthode de stérilisation choisie ne doit pas modifier les films macroscopiquement et microscopiquement. La discussion concerne les films de chitosane dédiés à la culture de cellules et les films de chitosane qui seront assemblés en système microfluidique.

L'irradiation aux rayons UV permet de stériliser une large gamme de produits, y compris à travers les emballages transparents. Cependant, nous avons observé que le chitosane absorbe fortement ces longueurs d'onde, ce qui conduit à une dégradation de sa structure chimique. Fukuda *et al.* [5] ont pu stériliser leurs films de chitosane par exposition aux UV d'une hotte PSM car le chitosane utilisé avait été préalablement modifié chimiquement lors d'une réaction avec du N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine, de l'1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide et de l'acide 4-azidobenzoïque pour le rendre photo-réticulable. Mais cette méthode ne semble pas adaptée pour la stérilisation de nos films de chitosane.

La stérilisation par autoclave est reconnue comme très efficace pour tuer tous types de micro-organismes. Cependant, même si la structure chimique du chitosane n'est pas altérée, les films de chitosane ont été déformés par la vapeur d'eau. Dans le cas de films de chitosane utilisés comme substrats de culture cellulaire, cela n'est pas problématique, puisque l'ensemble du film sera immergé dans le milieu de culture, déformant de nouveau le film. En maintenant le film à plat une fois humide, il sera possible de lui redonner une forme plane. Cependant, ces déformations peuvent modifier les dimensions des micro-gravures sur les films de chitosane. Par conséquent, il n'est pas recommandable d'utiliser l'autoclave pour des systèmes microfluidiques en chitosane.

Finalement, la stérilisation par l'éthanol n'a pas montré de modification de la structure chimique, de la masse ou de la forme des films de chitosane. Elle a déjà été utilisée pour conserver de microtubes de chitosane avant leurs implantations *in vivo* sur les nerfs sciatiques de rats blessés pour promouvoir leur régénération [17]. Ainsi, il s'agit de la méthode sélectionnée pour stériliser les films de chitosane servant de substrats pour la culture cellulaire dans la suite de ce chapitre. Dans le cas de systèmes microfluidiques en chitosane, comme il faut pouvoir les stériliser après toutes les étapes de fabrication, la stérilisation à l'éthanol se fera en injectant une solution d'éthanol dans le système avant l'injection du milieu de culture puis des cellules.

II.B. Culture cellulaire sur films de chitosane

Le chitosane est un polymère considéré biocompatible. Un matériau biocompatible a la capacité d'interagir avec les cellules ou tissus vivants sans provoquer de réponse immunitaire ou toxique lors d'un contact prolongé. Ainsi le chitosane a été utilisé dans de nombreuses applications biomédicales telles que la cicatrisation de plaies [18], les

systèmes de libération de médicaments [19] et les dispositifs de réparation des tissus [4, 20].

Dans cette section, nous allons vérifier que les films de chitosane demeurent biocompatibles, après le protocole de fabrication et de neutralisation développé dans le CHAPITRE 2. Pour contrôler que les films de chitosane neutralisés à 1M NaOH/EtOH et stérilisés avec de l'éthanol ne sont pas toxiques et qu'ils sont compatibles avec la culture cellulaire, des cellules ont été cultivées en leur présence. L'évaluation de la croissance de leur population après 4 jours de culture (J4) rend compte de leur prolifération et a été comparée à la croissance d'une population témoin cultivée dans une boîte de Petri sans film de chitosane. Deux types de cellules ont été étudiés : les cellules ML-2 non adhérentes et les cellules MDA-MB-231 adhérentes.

II.B.1. Culture de cellules non adhérentes (ML-2)

Les cellules ML-2 sont une lignée cellulaire dérivée de leucémies aigües myéloïdes humaines, un cancer affectant la différenciation et la prolifération des cellules dans la moëlle osseuse. Ces cellules sont couramment utilisées dans la recherche en hématologie et en oncologie pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de ce type de cancer. Leur culture permet de tester de nouveaux agents thérapeutiques et d'étudier les interactions entre les cellules leucémiques et leur micro-environnement [21, 22]. Ces cellules sont non-adhérentes et se cultivent en suspension dans le milieu de culture. En ajoutant un film de chitosane dans la boîte de Petri, cela testera à la fois la toxicité de ces films et celles des molécules relarguées par ces derniers.

Suite à la culture de ML-2 en présence de joints en silicone autoclavés, la bio-inertie de ces joints utilisés pour maintenir les films de chitosane au fond des boîtes de Petri a été confirmée. Ces joints ont été aussi ajoutés aux témoins utilisés dans les expériences avec les ML-2 pour obtenir des ratios volume/surface identiques à ceux des boîtes contenant des films de chitosane.

Avant l'ensemencement des cellules ML-2, les films de chitosane ont été stérilisés puis immergés pendant 3h dans le milieu de culture afin de stabiliser le gonflement du film, conformément aux résultats présentés dans le CHAPITRE 2 et la diffusion des nutriments présents dans le milieu. En effet, dans le CHAPITRE 3, nous avons vu que les molécules de faibles masses molaires peuvent diffuser dans le chitosane. Ainsi il est préférable de stabiliser le gonflement des films de chitosane dans le milieu de culture plutôt que dans de l'eau déionisée, pour éviter les fluctuations des concentrations des nutriments lors de la culture des cellules. La croissance des cellules est alors évaluée à J4. Les résultats sont reportés dans le TAB 4.2. Des films avec deux neutralisations différentes, 1M NaOH et 1M NaOH/EtOH, ont été comparés. Ils ont été placés dans des boîtes de Petri de différents diamètres selon la taille des films disponibles.

Quatre boîtes de 3,5 mm de diamètre ont été utilisées : une pour le témoin, une contenant un film de chitosane neutralisé avec 1M NaOH et 2 boîtes contenant chacune 1 film neutralisé avec 1M NaOH/EtOH. Pour ces boîtes, la population de cellules du témoin a quasiment doublé. Une croissance similaire a été observé pour la boîte contenant le film de chitosane à 1M NaOH et la boîte (1) avec 1M NaOH/EtOH. En revanche, la population de la boîte (2) contenant un film à 1M NaOH/EtOH a été quasiment triplé.

Cela montre une variabilité des concentrations de cellules, même pour des conditions identiques. Cela peut être aussi dû à la méthode de comptage de cellules car nous avons estimé la concentration de cellules à partir d'un prélèvement de 10 μL par boîte. Dans le cas des boîtes de 6 cm de diamètre, nous avons étudié trois boîtes de Petri contenant respectivement le témoin, un film de chitosane neutralisé avec 1M NaOH et un film de chitosane neutralisé avec 1M NaOH/EtOH. La population de cellules du témoin a presque été multiplié par 6 en 4 jours. Dans les mêmes conditions, les populations de cellules en contact avec des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH et à 1M NaOH/EtOH ont été multipliées, respectivement, par 4 et 3.

TABLEAU 4.2 – Concentration des cellules ML-2 après 4 jours de culture dans des boîtes témoin (sans film de chitosane) et des boîtes contenant des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH ou 1M NaOH/EtOH ((1) et (2) représentant des boîtes différentes).

		Conditions initiales J0	Témoin J4	Films de chitosane 1M NaOH J4	Films de chitosane 1M NaOH/EtOH J4
Boîte Ø 3,5 cm	Nombre de cellules [$\times 10^5$]	3,75	6,70	6,70	(1) 6,20 (2) 10,20
	Concentration [$\times 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$]	1,5	2,68	2,68	(1) 2,48 (2) 4,08
Boîte Ø 6 cm	Nombre de cellules [$\times 10^5$]	7,5	44,80	29,40	20,80
	Concentration [$\times 10^5 \text{ c.mL}^{-1}$]	1,5	8,96	5,88	4,16

Les cellules se sont multipliées pour toutes les expériences et les concentrations de cellules mesurées à J4 en présence de films de chitosane neutralisés sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les boîtes de Petri. Les différences avec les boîtes témoin ne sont pas significatives. Les variations observées pourraient être dues à des variations biologiques entre expériences, indépendamment de la présence de film de chitosane et à la méthode de comptage. Les cellules ML-2 étant en suspension dans le milieu, elles n'étaient pas en contact direct avec les films de chitosane, et cette étude confirme que les films de chitosane ne relarguent aucune molécule toxique. Ainsi, les films de chitosane fabriqués à partir du protocole développé lors du CHAPITRE 2 sont compatibles avec la culture de cellules non adhérentes, que leur neutralisation ait été réalisée avec 1M NaOH ou 1M NaOH/EtOH.

Contrairement à d'autres études [3, 23], nous n'avons pas observé pas de différences notables selon la méthode de neutralisation des films sur nos deux expériences. En effet, He *et al.* ont noté que des cellules endothéliales adhèreraient et se multiplieraient plus sur des films de chitosane neutralisés avec des solutions hydroalcooliques que des solutions aqueuses [3]. A l'opposé, Korniienko *et al.* ont observé que la neutralisation avec des solutions hydroalcooliques pouvaient réduire ou ne pas affecter la prolifération de cellules épithéliales sur des nano-tubes en chitosane [23]. Puisque leur biocompatibilité semble similaire, nous avons choisi de continuer uniquement avec les films neutralisés à 1M NaOH/EtOH qui génèrent un gonflement plus faible.

II.B.2. Culture de cellules adhérentes (MDA-MB-231)

D'autres cellules nécessitent d'être cultivées sur des substrats spécifiques car elles doivent pouvoir y adhérer. Dans le cas des boîtes de Petri en PS, la surface est spécifiquement traitée pour favoriser l'adhésion des cellules. Les cellules MDA-MB-231 sont une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome mammaire humain métastatique. Ces cellules sont couramment utilisées comme modèle pour le développement de thérapies ciblées et pour la recherche fondamentale sur le cancer du sein, en raison de leur agressivité et de leur capacité à se propager rapidement [24, 25]. Nous avons alors étudié la culture de ces cellules adhérentes sur la surface de films de chitosane neutralisés à 1M NaOH/EtOH, afin d'évaluer leur compatibilité avec la culture cellulaire en tant que support de culture.

Des films de chitosane neutralisés ont été préparés, et pour une partie d'entre eux un cercle de 1,5 cm de diamètre et 100 μm de profondeur a été gravé sur leur surface à l'aide d'une fraise de 300 μm de diamètre. Comme les cellules MDA-MB-231 se cultivent en adhérant sur une surface, l'influence de l'état de surface des films (micro-gravés ou non) a pu ainsi être évalué. Après leur stérilisation et la stabilisation de leur gonflement, les films sont ensuite maintenus au fond d'un puits de la boîte de Petri avec des adhésifs double face. Le comportement des cellules MDA-MB-231 a été enregistré pendant 24h avec des images prises toutes les heures, ainsi qu'à 4 jours de culture (J4) dans un incubateur (FIG 4.7).

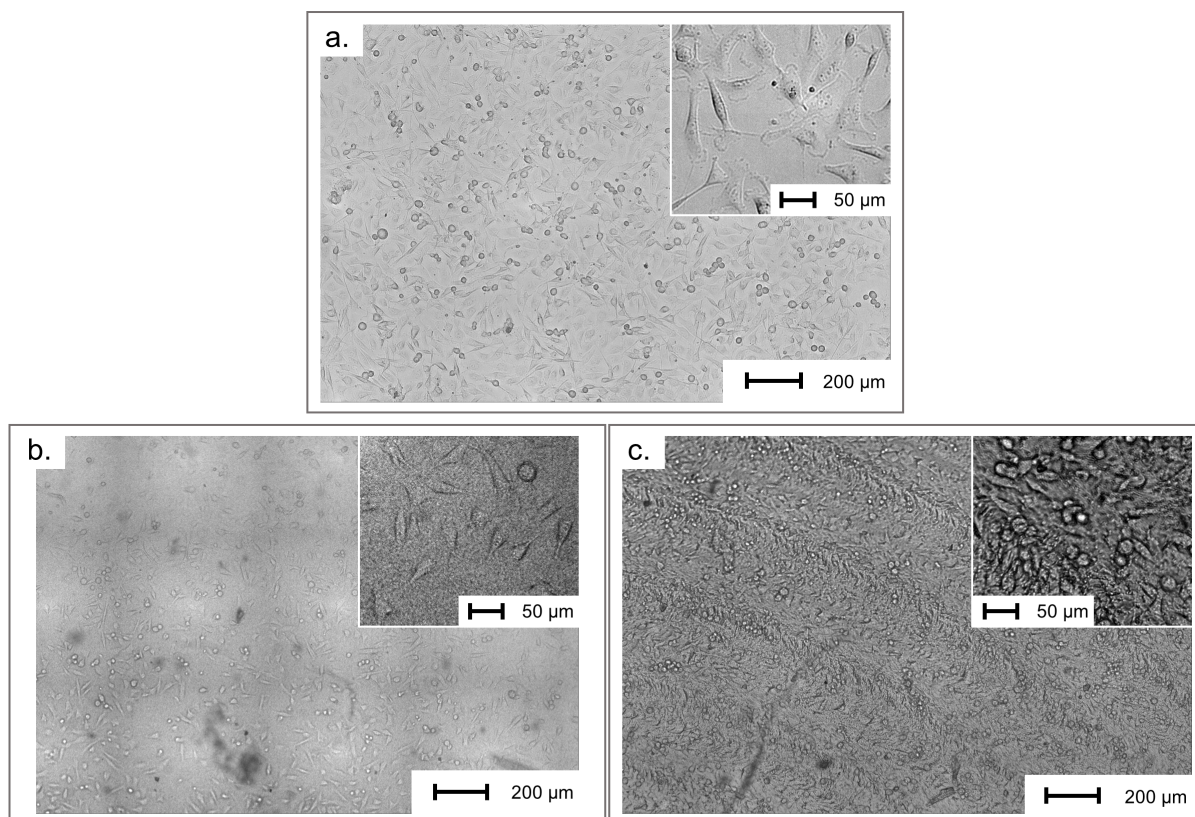


FIGURE 4.7 – Images prises au microscope (x20) à J4 de cellules MDA-MB-231 cultivées sur : (a) sur une boîte de Petri témoin, (b) sur un film de chitosane et (c) sur un film de chitosane micro-gravé.

Nous avons d'abord comparé la multiplication des cellules cultivées sur la surface témoin en PS traité pour la culture cellulaire à celles cultivées sur des films de chitosane neutralisés (sans gravure). D'après les observations réalisées au microscope au cours de la culture et au bout de 4 jours de culture, les cellules MDA-MB-231 présentent un comportement similaire sur les deux types de surface. Les cellules adhèrent aux substrats en adoptant des formes allongées (FIG 4.7-a et -b). Leur migration, suivi par vidéo (FIG 4.8), semble suivre des modes similaires entre les échantillons témoin et ceux contenant des films de chitosane. Nous retrouvons les deux modes principaux de déplacement décrits dans la littérature [26] : (1) le mode «*élongation-rupture*» où les cellules s'allongent sur plusieurs centaines de micromètres avant de rompre leurs attaches avec leur lieu d'adhésion initiale, provoquant un changement brutal de leur longueur et (2) le mode «*élongation-rétraction*» où les cellules se déplacent selon un axe sans changement de leur longueur. De plus, certaines cellules peuvent rester rondes.

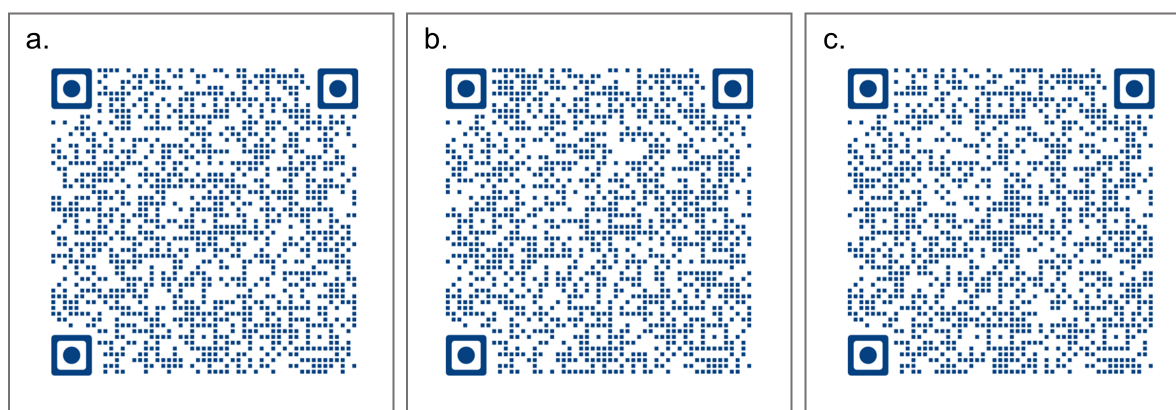


FIGURE 4.8 – Vidéos prises au microscope (x10) entre J2 et J3 de cellules MDA-MB-231 cultivées sur : (a) sur une boîte de Petri témoin ([lien](#)), (b) sur un film de chitosane ([lien](#)) et (c) sur un film de chitosane micro-gravé ([lien](#)). A télécharger pour un meilleur visionnage.

Sachant que les films de chitosane seront utilisés dans des systèmes microfluidiques, les surfaces des canaux seront micro-gravés. Ainsi, la culture de cellules MDA-MB-231 a aussi été testée sur des films de chitosane micro-gravés (FIG 4.7-c). La rugosité de ces surfaces micro-gravées a été mesurée à 66 ± 9 nm contrairement aux films de chitosane de 10 ± 2 nm de rugosité. A cause de l'aspect de la surface, l'identification des cellules adhérentes est plus difficile que sur des surfaces non-gravées. Grâce aux vidéos (FIG 4.8), il est possible de vérifier que les cellules semblent présenter un comportement similaire aux témoins pour leur adhésion et migration. Il a été reporté dans la littérature [27, 28] qu'une rugosité de surface plus importante peut réduire l'allongement des cellules, même si cela reste difficile à confirmer sur nos échantillons.

Finalement, les cellules ont été récoltées et comptées. Les résultats sont présentés dans le TAB 4.3. En comparant la quantité initiale de cellules et celle après 4 jours de culture, les cellules MDA-MB-231 ont proliféré sur tous les échantillons. Pour les trois répétitions de culture de cellules sur des films de chitosane non gravés, la population cellulaire a été multipliée par 2,5, ce qui reste inférieur à celle des substrats témoins pour lesquels la population a été multipliée par 7 en moyenne. Il faut tenir compte du fait que la surface des boîtes de Petri est spécifiquement traitée pour favoriser l'adhésion et la prolifération de ce type de cellules, contrairement à celles des films de chitosane. Quant aux films

de chitosane gravés, les cellules se sont aussi multipliées par 2,5. Ainsi la rugosité des canaux micro-gravés ne sera pas pénalisante pour la culture de cellules dans un système microfluidique.

TABLEAU 4.3 – Concentration des cellules MDA-MB-231 après 4 jours de culture dans des puits (\varnothing 22 mm) témoin (sans film de chitosane), contenant des films de chitosane ou des films de chitosane micro-gravés. Des tests ANOVA ont été effectués pour chaque catégorie.

	Conditions initiales J0	Témoin J4	Films de chitosane J4	Films de chitosane micro-gravés J4
Nombre de cellules [$\times 10^5$]	1,4 \pm 0,2	9,1 \pm 1,9	2,3 \pm 0,3	3,5 \pm 0,8
		10,0 \pm 3,3	4,2 \pm 0,4	4,3 \pm 0,7
		10,0 \pm 0,8 <i>p</i> = 0,803	4,0 \pm 0,9 <i>p</i> = 0,002	2,9 \pm 0,5 <i>p</i> = 0,049
Concentration [$\times 10^5$ c.cm ⁻²]	0,37 \pm 0,05	2,39 \pm 0,49	0,61 \pm 0,07	0,93 \pm 0,21
		2,63 \pm 0,88	1,11 \pm 0,12	1,13 \pm 0,19
		2,63 \pm 0,21	1,05 \pm 0,23	0,76 \pm 0,13

En conclusion, les films de chitosane neutralisés produits suite à notre protocole ne présentent pas de signe de toxicité à J4 et sont compatibles avec la culture de cellules adhérentes sans nécessité de fonctionnalisation ou traitement supplémentaire. A l’opposé, les matériaux classiquement utilisés pour la fabrication de systèmes microfluidiques comme le PDMS [29] ou les thermoplastiques [30] exigent une étape supplémentaire pour favoriser l’adhésion cellulaire. En effet, il est nécessaire de modifier leur surface par traitement plasma oxygène [31], greffage de molécules possédant notamment des groupes amine tel que le chitosane [32] ou le triméthoxysilylpropyl(polyéthyl- enimine) [33], ou de protéines comme du collagène [30].

II.C. Evaluation de système microfluidique en chitosane pour la culture cellulaire

Les systèmes microfluidiques pour la culture cellulaire offrent un contrôle précis sur les micro-environnements des cellules et une surveillance en temps réel de leurs comportements. Ils fournissent des modèles pour améliorer la compréhension de la biologie humaine, faire des tests de toxicologie ou des diagnostics et suivis de maladies [34]. D’après les études réalisées lors du CHAPITRE 3, nous avons montré que les systèmes microfluidiques obtenus à partir de films de chitosane neutralisés restent fonctionnels après une injection d’eau déionisée de 24h à 120 $\mu\text{L.h}^{-1}$ et à 1,25 mL.h^{-1} . De plus, dans la section précédente, nous avons mis en évidence que des cellules adhérentes, telles que les cellules MDA-MB-231, pouvaient être cultivées sur des films de chitosane dont la surface a été micro-gravée. Ainsi, à partir du protocole de fabrication

de microsystème fluide mis au point au CHAPITRE 3, nous avons voulu développer une application de culture cellulaire dans un système microfluidique en chitosane.

Le système microfluidique utilisé est constitué de deux chambres de culture de 3 mm de diamètre et 200 μm de profondeur, alimentées par un canal de 500 μm de large et 100 μm de profondeur (FIG 4.5). Cette différence de profondeur va permettre de piéger des cellules dans les chambres de culture tout en injectant des solutions à bas débit. Après son assemblage, le système microfluidique chitosane/chitosane a été placé dans l'enceinte d'incubation sur le microscope optique. De l'éthanol a été initialement injecté entre 9,6 et 36 mL.h^{-1} pendant 15 min pour stériliser le système microfluidique. Afin de renforcer la neutralisation des parois des canaux, une solution à 1M NaOH/EtOH a été injectée à 0,72 mL.h^{-1} pendant 30 min, puis les parois ont été lavées pendant 1h30 avec de l'eau déionisée injectée à 7,2 mL.h^{-1} . Finalement, le milieu de culture a été ensuite injecté à 9,6 mL.h^{-1} pendant 30 min pour stabiliser le gonflement.

Les chambres de culture ont ensuite étéensemencées de cellules MDA-MB-231 à une concentration de $3,91 \pm 0,71 \times 10^6$ cellules. mL^{-1} avec un débit de 9,6 mL.h^{-1} . A l'arrivée des cellules dans les chambres de culture, l'injection est stoppée pendant 20 min pour les laisser sédimenter (FIG 4.10-a et -b). Une fois une partie des cellules piégées dans les chambres de culture, qui est plus profonde que le canal, le reste de la suspension est rincé par un flux de 1,2 mL.h^{-1} de milieu de culture. Des études sur la culture cellulaire en microsystème ont montré que le ratio surface/volume plus élevé par rapport à une culture dans des boîtes standards (0,5 mm^2 pour 1 μL de milieu) a un impact sur le métabolisme et la prolifération des cellules [6]. Il y a notamment une consommation plus rapide des nutriments et une accumulation accélérée de déchets dans le milieu de culture. Ainsi, il est nécessaire de changer le milieu plus régulièrement, souvent avec une perfusion constante, que dans le cas d'une culture en boîte de Petri. Pour les systèmes réalisés, le ratio surface/volume est de 5 mm^2 pour 1 μL . L'injection de milieu de culture, DMEM + GlutaMax avec 10% SVF et 1% P-S, a été effectuée à 120 $\mu\text{L.h}^{-1}$ pendant 2,5 jours, pour permettre la perfusion des cellules en culture.

L'évolution de la population des cellules MDA-MB-231 a été suivie par microscopie en lumière blanche et fluorescente par marquage temporaire des membranes plasmiques des cellules par CellMaskTM avec une émission à 666 nm, représenté en magenta sur la FIG 4.10. Avant d'imager le système, une solution de 50 μL de CellMaskTM rouge profond a été injectée à 0,6 mL.h^{-1} dans le système. L'injection a été stoppée pendant 10 min pour laisser le temps de marquer les cellules, avant de rincer avec du milieu de culture à 1,2 mL.h^{-1} pendant 10 min.

Les cellules MDA-MB-231 semblent présenter principalement un aspect rond plutôt qu'allongé (FIG 4.9), contrairement aux cellules cultivées dans des boîtes de Petri sans flux dans la section précédente. Cela pourrait être dû aux contraintes de cisaillement auxquelles elles sont soumises avec la perfusion comprise entre 0,112 et 0,614 dyn.cm^{-2} . Néanmoins, pour des injections de faibles durées (de 1 à 15 min), Landwehr *et al.* [35] ont montré qu'il fallait atteindre des contraintes de cisaillement de 5 ou 10 dyn.cm^{-2} pour observer des déformations des cellules. Mais, pour des perfusions de longues durées, il est possible que ces contraintes de cisaillement aient un impact sur le comportement des cellules, sachant par exemple que des contraintes allant de 1 à 10 dyn.cm^{-2} modifient l'expression de leur gène [36].

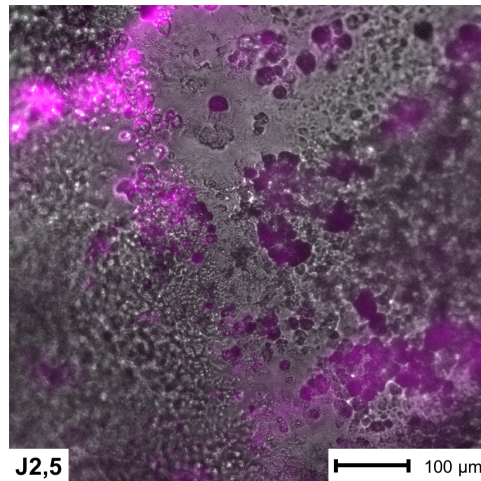


FIGURE 4.9 – Photo prise au microscope optique (20x) en lumière blanche et fluorescence (CellMask™ rouge profond en magenta sur les images) à J2,5.

D'après les images sur la FIG 4.10, les cellules initialement au centre de la chambre de culture ont migré sur toute la surface de la chambre de culture. Afin d'observer l'évolution de la population des cellules, les pixels de l'image de la chambre de culture sont répartis par intensité dans des histogrammes sur les FIG 4.10-b, d, f et h. Au cours des 2,5 jours de culture, les images possèdent de plus en plus de pixels brillants car les histogrammes s'étalent vers la droite. Ainsi, l'intensité maximale augmente au cours du temps mesurant 45 à J0, 35 à J1, 121 à J2 et 170 à J2,5. La moyenne des intensités, quant à elle, ne permet pas de quantifier précisément l'évolution de la population des cellules car la chambre de culture est majoritairement sombre (intensités comprises entre 0 et 20). Ainsi, il est difficile de comparer les images entre elles en terme d'intensité moyenne et donc de quantifier la multiplication des cellules. Une observation des images et l'étalement des histogrammes semblent indiquer une multiplication des cellules, confirmant leur viabilité. De plus, à J2,5, un rinçage avec du milieu de culture à $9,6 \text{ mL.h}^{-1}$ pendant 5 min n'a pas déplacé les cellules. Cela montre que ces cellules adhèrent à la surface du chitosane et par conséquent qu'elles sont encore vivantes.

Un élément perturbateur de la culture des cellules est l'apparition de bulles dans le système microfluidique. D'après les FIG 4.10-a, -c, -e et -g, des bulles de taille moyenne arrivent progressivement dans la chambre de culture puis fusionnent pour former de plus grandes bulles. Ces bulles perturbent la culture cellulaire. Dans un premier temps, elles sont collées à la paroi supérieure de la chambre de culture, ce qui limite le volume du milieu présent dans la chambre et modifie les flux. Dans un second temps, après avoir grandi les bulles atteignent la paroi inférieure et limitent ainsi la surface disponible pour la culture de cellules. Cela se voit, par exemple, par l'absence de cellules sous le centre de la plus grande bulle sur les FIG 4.10-g et -h. De plus, la présence de bulles peut altérer leur comportement et morphologie car les conditions de culture appliquées aux cellules, notamment le ratio surface/volume et les contraintes de cisaillement, sont modifiées.

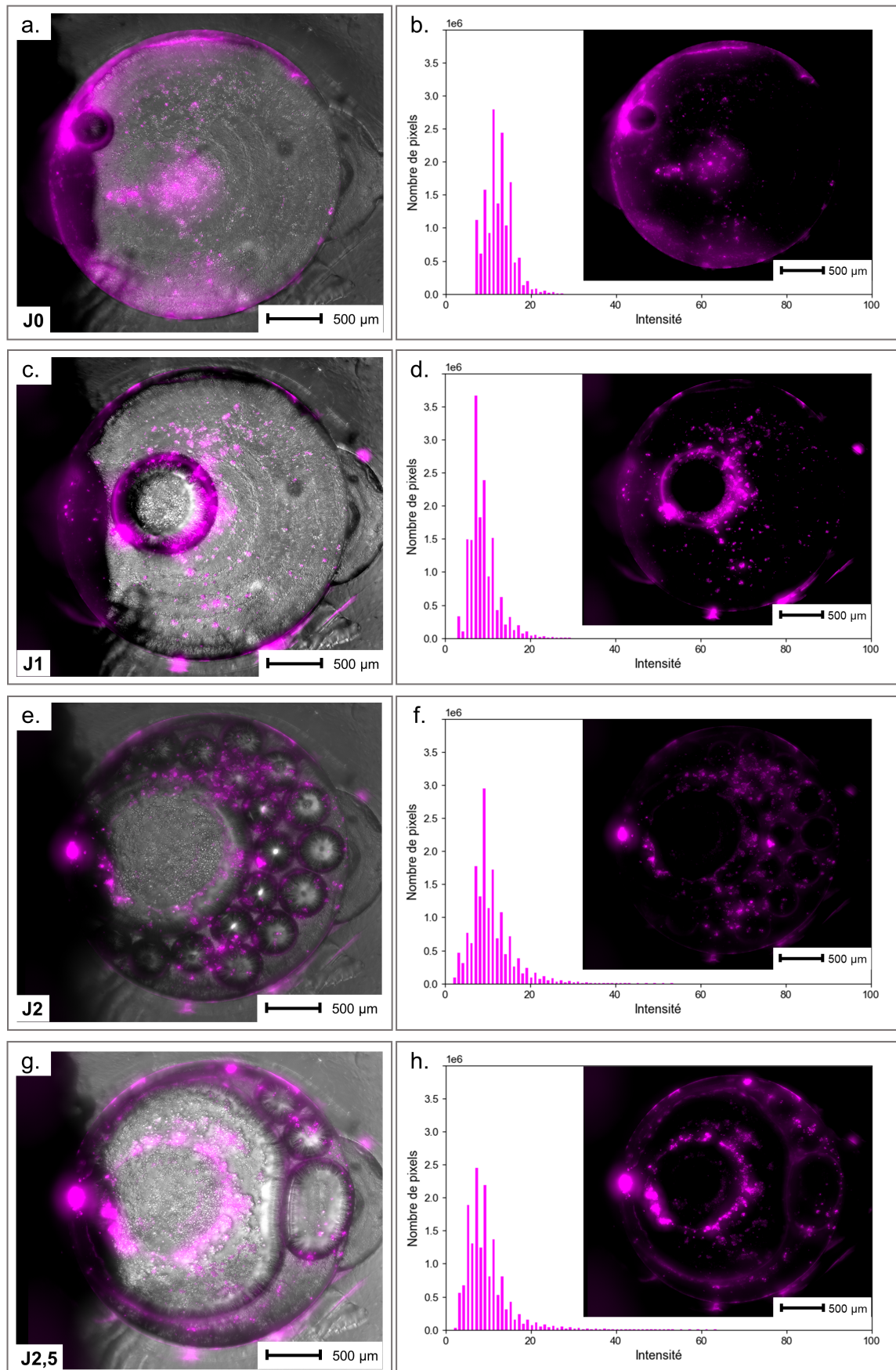


FIGURE 4.10 – Photos prises au microscope optique (20x) de la seconde chambre de culture en lumière blanche et fluorescence (CellMask™ rouge profond en magenta sur les images) avec les histogrammes de la répartition des pixels de la chambre selon leur intensité : (a-b) après sédimentation des cellules MDA-MB-231 (J0); (c-d) à J1; (e-f) à J2; (g-h) à J2,5.

Afin d'injecter le milieu de culture dans les conditions nécessaires pour la survie des cellules, ce dernier est conservé dans un tube ouvert dans l'enceinte climatique à 37°C et 5% de CO₂. Ces conditions sont néanmoins à l'origine de la formation de bulles dans le milieu à cause des échanges gazeux. Ces dernières sont ensuite injectées dans le système microfluidique. Les bas débits utilisés lors de la perfusion ne permettent pas de les évacuer, car nous avons observé que cela requière des débits compris entre 36 et 90 mL.h⁻¹ pour les sortir de la chambre de ce système. Ne pouvant pas retirer le milieu de l'enceinte climatique, une solution serait d'ajouter un piège à bulles en amont du système microfluidique comme Air Bubbles Remover (CTQ-006BT , Fluigent, Le Kremlin-Bicêtre , France) ou de modifier le système pour l'inclure dans les canaux avant les chambres de culture [37, 38].

Au cours des multiples injections (eau déionisée et milieu de culture) avant l'injection des cellules, le système microfluidique s'est déformé à cause du gonflement des films de chitosane (FIG 4.11). Cette déformation est restée stable jusqu'à J2,5 de perfusion (FIG 4.10-g) mais cela a rendu difficile l'analyse d'images, les cellules n'étant pas toutes dans le même plan. Pour obtenir les images de la FIG 4.10 contenant l'ensemble des cellules, des images ont été enregistrées à profondeurs régulières puis une projection de la luminosité maximale a été effectuée. Ces déformations ne semblent pas avoir affecté la culture des cellules, mais il faudra envisager de pouvoir maintenir les systèmes à plat. Une solution pourrait être de réduire la surface ou modifier l'agencement des chambres et canaux pour limiter la déformation globale du système.

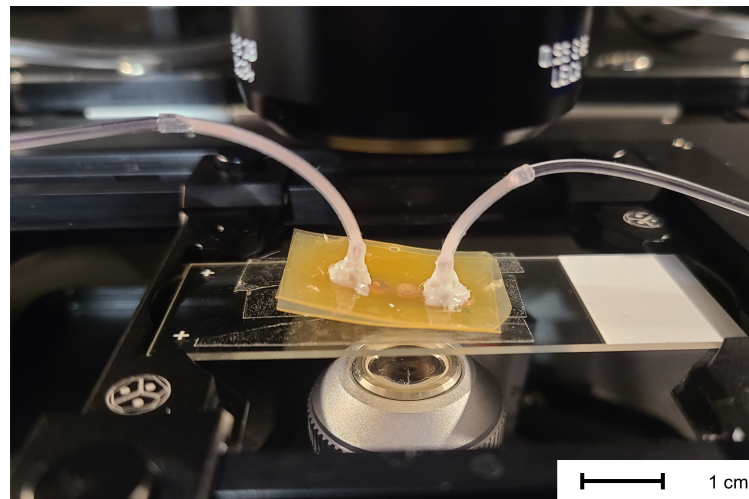


FIGURE 4.11 – Photo du système microfluidique sous l'objectif du microscope maintenu sur une lame de verre par des adhésifs double face à J2,5.

III. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié le développement d'une application de culture cellulaire à partir de systèmes microfluidiques en chitosane dont nous avons caractérisé le protocole de fabrication dans les chapitres précédents.

Dans un premier temps, nous avons effectué une étude de trois méthodes de stérilisation sur des films de chitosane neutralisés à 1M NaOH/EtOH pendant 15h30. Après une évaluation des effets de chaque méthode de stérilisation sur ces films, nous avons décidé que rincer les films à l'éthanol pendant 15 min est la méthode la plus adaptée pour des films de chitosane. Cette méthode peut par ailleurs être utilisée pour des microsystèmes fluidiques en injectant de l'éthanol dans les canaux pour les désinfecter.

Dans un second temps, deux lignées cellulaires différentes ont été cultivées en présence des films de chitosane neutralisés puis stérilisés afin de vérifier leur biocompatibilité avec la culture cellulaire. Les cellules se cultivant en suspension, les cellules ML-2, avaient une prolifération similaire en présence et absence de films de chitosane. Les cellules adhérentes MDA-MB-231 adhéraient sur les films de chitosane, même lorsque leur surface a été micro-gravée. Cette adhésion se fait sans avoir besoin de traitements supplémentaires, contrairement aux polymères usuellement utilisés pour la culture cellulaire. Cependant, la prolifération des cellules est moins importante qu'avec des boîtes de Petri traitées spécifiquement pour la culture cellulaire. Ces expériences ont montré que les films de chitosane neutralisés sont compatibles avec la culture cellulaire.

Finalement, un système microfluidique incluant des chambres de culture de 3 mm de diamètre a été préparé à partir de 2 films de chitosane neutralisés. Même si le système s'est initialement déformé pendant les injections de préparation, à cause du gonflement caractérisé au CHAPITRE 2, cette déformation s'est stabilisée avant l'injection de cellules. Ce prototype de LoC pour la culture cellulaire a permis la survie des cellules pendant 2,5 jours. Après ces 2,5 jours de culture dans les chambres du système microfluidique en chitosane, les cellules ont migré et restent adhérentes à la surface micro-gravée du chitosane. Cependant, des bulles ont été injectées lors de cette expérience, perturbant la culture des cellules MDA-MB-231. Pour les retenir, un piège à bulles devrait être installé en amont dans le circuit microfluidique. De plus, le gonflement des films de chitosane reste un problème à traiter, mentionné dans les chapitres précédents.

Une fois un système fonctionnel obtenu, il serait possible d'étudier une population de cellules MDA-MB-231 au cours de leur culture dans des conditions qui pourraient s'apparenter à celles de cellules *in vivo* localisées à proximité de la vascularisation sanguine. Ce type de microsystème pourrait permettre de tester l'efficacité d'un médicament ou d'étudier les réponses biologiques des cellules à un stimulus précis. De plus, il est possible de micro-structurer la surface de culture pour étudier l'impact de la rugosité ou des motifs sur les cellules ou de fonctionnaliser le chitosane avec des biomolécules [39].

Bibliographie

- [1] M. Mehling and S. Tay, "Microfluidic cell culture," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 25, pp. 95–102, 2014.
- [2] B. D. Cardoso, E. M. Castanheira, S. Lanceros-Méndez, and V. F. Cardoso, "Recent advances on cell culture platforms for in vitro drug screening and cell therapies : From conventional to microfluidic strategies," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 12, 2023.
- [3] Q. He, Q. Ao, Y. Gong, and X. Zhang, "Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 22, pp. 2791–2802, 2011.
- [4] M. Mattotti, Z. Alvarez, L. Delgado, M. A. Mateos-Timoneda, C. Aparicio, J. A. Planell, S. Alcántara, and E. Engel, "Differential neuronal and glial behavior on flat and micro patterned chitosan films," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 158, pp. 569–577, 2017.
- [5] J. Fukuda, A. Khademhosseini, Y. Yeo, X. Yang, J. Yeh, G. Eng, J. Blumling, C. F. Wang, D. S. Kohane, and R. Langer, "Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5259–5267, 2006.
- [6] S. Torino, B. Corrado, M. Iodice, and G. Coppola, "PDMS-based microfluidic devices for cell culture," *Inventions*, vol. 3, 2018.
- [7] C. Poon, "Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 126, p. 105024, 2022.
- [8] F. A. W. Coumans, G. van Dalum, M. Beck, and L. W. M. M. Terstappen, "Filtration parameters influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood," *PLoS ONE*, vol. 8, p. e61774, 2013.
- [9] A. Neville, *CICR Guide de Stérilisation - Troisième Édition 2020*. CICR, 2021.
- [10] S. B. Rao and C. P. Sharma, "Use of chitosan as a biomaterial : Studies on its safety and hemostatic potential," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 34, pp. 21–28, 1997.
- [11] P. Durin, "Développement d'une résine verte écoresponsable à base de biopolymères pour la lithographie : étude des interactions de films de chitosane avec les plasmas de gravure fluorés," Ph.D. dissertation, Ecole Centrale de Lyon, 2023.
- [12] M. Caillau, "Nanotechnologie verte : des polymères de la biomasse comme résines éco-efficentes pour la lithographie," Ph.D. dissertation, Université de Lyon, 2017. [Online]. Available : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01661444>
- [13] J. F. Rabek, *Absorption of Radiation*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1996, pp. 1–8.
- [14] F. Weilmboeck, R. Bruce, S. Engelmann, G. Oehrlein, D. Nest, T. Chung, D. Graves, M. Li, D. Wang, C. Andes, and E. Hudson, "Photoresist modifications by plasma vacuum ultraviolet radiation : The role of polymer structure and plasma chemistry," *Journal of Vacuum Science and Technology B : Nanotechnology and Microelectronics*, vol. 28, no. 5, pp. 993–1004, 2010.
- [15] A. Sionkowska, H. Kaczmarek, M. Wisniewski, J. Skopinska, S. Lazare, and V. Tokarev, "The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films," *Surface Science*, vol. 600, pp. 3775–3779, 2006.
- [16] P. O. Bussiere, J. L. Gardette, G. Rapp, C. Masson, and S. Therias, "New insights into the mechanism of photodegradation of chitosan," *Carbohydrate Polymers*, vol. 259, 2021.

- [17] W. Wang, S. Itoh, A. Matsuda, S. Ichinose, K. Shinomiya, Y. Hata, and J. Tanaka, "Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration," *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 84, no. 2, pp. 557–566, 2008.
- [18] M. Fujita, M. Ishihara, M. Simizu, K. Obara, T. Ishizuka, Y. Saito, H. Yura, Y. Morimoto, B. Takase, T. Matsui *et al.*, "Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel," *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 699–706, 2004.
- [19] M. K. Lima-Tenório, E. T. Tenório-Neto, M. R. Guilherme, F. P. Garcia, C. V. Nakamura, E. A. Pineda, and A. F. Rubira, "Water transport properties through starch-based hydrogel nanocomposites responding to both pH and a remote magnetic field," *Chemical Engineering Journal*, vol. 259, pp. 620–629, 2015.
- [20] T. Jiang, M. Deng, R. James, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 1632–1645, 2014.
- [21] H. Zhou, Y. Ning, G. Zeng, C. Zhou, and X. Ding, "Curcumin promotes cell cycle arrest and apoptosis of acute myeloid leukemia cells by inactivating AKT," *Oncology Reports*, vol. 45, 2021.
- [22] Z. Liu, C. Wang, Y. Wang, L. Wang, Y. Zhang, and G. Yan, "4'-O-Methylbrousochalcone B as a novel tubulin polymerization inhibitor suppressed the proliferation and migration of acute myeloid leukaemia cells," *BMC Cancer*, vol. 21, 2021.
- [23] V. Korniienko, Y. Husak, A. Yanovska, Şahin Altundal, K. Diedkova, Y. Samokhin, Y. Varava, V. Holubnycha, R. Viter, and M. Pogorielov, "Biological behaviour of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralisation methods," *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, vol. 27, pp. 135–153, 2022.
- [24] R. M. Gol and S. Kheirouri, "The effects of quercetin on the apoptosis of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 : A systematic review," *Nutrition and Cancer*, vol. 74, pp. 405–422, 2022.
- [25] F. M. AlGhalban, A. A. Khan, and M. N. K. Khattak, "Comparative anticancer activities of ficus carica and ficus salicifolia latex in MDA-MB-231 cells," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, pp. 3225–3234, 2021.
- [26] C. Antoine, "Optimisation des conditions de migration et de détachement de lignées cancéreuses du cancer du sein en vue de leur tri fonctionnel," Ph.D. dissertation, Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. [Online]. Available : <https://theses.hal.science/tel-01119715>
- [27] B. Majhy, P. Priyadarshini, and A. K. Sen, "Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth-facile surface modification for enhanced cell culture," *RSC Advances*, vol. 11, pp. 15 467–15 476, 2021.
- [28] M. Nikkhah, J. S. Strobl, E. M. Schmelz, P. C. Roberts, H. Zhou, and M. A. s, "MCF10A and MDA-MB-231 human breast basal epithelial cell co-culture in silicon micro-arrays," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 7625–7632, 2011.
- [29] F. Akther, S. B. Yakob, N. T. Nguyen, and H. T. Ta, "Surface modification techniques for endothelial cell seeding in PDMS microfluidic devices," *Biosensors*, vol. 10, 2020.
- [30] S. Schneider, E. J. Brás, O. Schneider, K. Schlünder, and P. Loskill, "Facile patterning of thermoplastic elastomers and robust bonding to glass and thermoplastics for microfluidic cell culture and organ-on-chip," *Micromachines*, vol. 12, 2021.
- [31] I. Beaulieu, M. Geissler, and J. Mauzeroll, "Oxygen plasma treatment of polystyrene and zeonor : Substrates for adhesion of patterned cells," *Langmuir*, vol. 25, pp. 7169–7176, 2009.

- [32] K. T. L. Trinh, D. A. Thai, D. H. Yang, and N. Y. Lee, "Chitosan : a green adhesive for surface functionalization and fabrication of thermoplastic biomedical microdevices," *Lab Chip*, vol. 23, pp. 4245–4254, 2023.
- [33] F. Sarvi, Z. Yue, K. Hourigan, M. C. Thompson, and P. P. Chan, "Surface-functionalization of PDMS for potential micro-bioreactor and embryonic stem cell culture applications," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, pp. 987–996, 2013.
- [34] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, "Microfluidic organs-on-chips," *Nature Biotechnology*, vol. 32, pp. 760–772, 2014.
- [35] G. M. Landwehr, A. J. Kristof, S. M. Rahman, J. H. Pettigrew, R. Coates, J. B. Balhoff, U. L. Triantafyllu, Y. Kim, and A. T. Melvin, "Biophysical analysis of fluid shear stress induced cellular deformation in a microfluidic device," *Biomicrofluidics*, vol. 12, 2018.
- [36] C. F. Buchanan, S. S. Verbridge, P. P. Vlachos, and M. N. Rylander, "Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model," *Cell Adhesion and Migration*, vol. 8, pp. 517–524, 2014.
- [37] Y. Gao, M. Wu, Y. Lin, and J. Xu, "Trapping and control of bubbles in various microfluidic applications," *Lab on a Chip*, vol. 20, pp. 4512–4527, 2020.
- [38] C. Lochovsky, S. Yasotharan, and A. Günther, "Bubbles no more : In-plane trapping and removal of bubbles in microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 12, pp. 595–601, 2012.
- [39] S. T. Koev, M. A. Powers, H. Yi, L. Q. Wu, W. E. Bentley, G. W. Rubloff, G. F. Payne, and R. Ghodssi, "Mechano-transduction of DNA hybridization and dopamine oxidation through electrodeposited chitosan network," *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 103–111, 2007.

Conclusion générale

Compte tenu des progrès de la recherche dans le développement des LoC, il est attendu à ce que des millions de ces dispositifs à usage unique soient utilisés quotidiennement dans les hôpitaux et les foyers dans les années à venir. Or, les matériaux couramment utilisés pour la fabrication de LoC destinés aux applications biomédicales sont des polymères synthétiques (PDMS, thermoplastiques), tous dérivés d'hydrocarbures. Pour réduire l'impact environnemental de leur fabrication et leur élimination, des polymères biosourcés tels que le PLA, la soie, la zéine ou les alginates ont été progressivement introduits dans le processus de fabrication. Malgré leur biocompatibilité inhérente, aucun de ces biopolymères ne permet d'obtenir des LoC présentant des caractéristiques satisfaisantes et durables par rapport aux matériaux conventionnels.

L'objectif de cette thèse était de développer une méthode alternative de fabrication de LoC à partir du chitosane, un polysaccharide abondant et provenant majoritairement de la valorisation de déchets produits par l'industrie agroalimentaire. En plus d'être biosourcé, le chitosane est biodégradable, répondant aux critères d'éco-responsabilité de notre projet. Parmi les autres propriétés de ce biopolymère, le chitosane est non toxique et biocompatible, favorisant son utilisation dans des applications biomédicales.

Des films de chitosane ont été obtenus par évaporation de la solution d'eau acidifiée utilisée pour dissoudre la poudre de chitosane. Une étude a été menée pour déterminer les paramètres permettant d'obtenir des films transparents et épais, en variant notamment la masse molaire et la concentration du chitosane. Sachant que la transparence est inversement corrélée avec l'épaisseur des films, un compromis sur les propriétés des films a été nécessaire. Ainsi les paramètres sélectionnés ont permis d'obtenir une épaisseur de $470 \pm 60 \mu\text{m}$ et une transparence de 62%. Cependant, un inconvénient majeur des films de chitosane pour la microfluidique est leur dissolution et gonflement au contact de solutions aqueuses. Ainsi, une seconde étude a été consacrée à la comparaison de plusieurs stratégies pour résoudre ce problème. Nous avons montré que leur réticulation avec le glutaraldéhyde et la génipine diminue le gonflement (jusqu'à 411% pour un ratio molaire de 1 : 20 de glutaraldéhyde par rapport aux groupes amine du chitosane et 566% pour un ratio molaire de 1 : 93 de génipine) au détriment de leur transparence (respectivement 29% et opaque). D'autre part, la neutralisation des films de chitosane a montré une diminution du taux de gonflement pour des temps de neutralisation et des concentrations d'hydroxyde de sodium croissants, jusqu'à atteindre un taux de gonflement minimal ($65\% \pm 4\%$ pour une neutralisation de 3h ou plus dans 1M d'hydroxyde de sodium). Ce taux de gonflement reste stable pendant 48h. En comparant des neutralisations avec des solutions aqueuses et hydroalcooliques, nous avons pu observer une diminution du taux de gonflement ($56,6\% \pm 0,8\%$) pour une neutralisation avec 1M d'hydroxyde de sodium dans une solution de 70% (v/v) d'éthanol. Par conséquent, les deux procédés de neutralisation sélectionnés pour les

études suivantes ont été les neutralisations de 15h30 (une nuit) par 1M d'hydroxyde de sodium dans une solution aqueuse ou hydroalcoolique. Les caractérisations des propriétés mécaniques des films neutralisés telles que le module d'Young ($5,96 \pm 0,11$ GPa), la dureté ($0,23 \pm 0,01$ GPa), la rugosité (10 ± 2 nm), l'angle de contact ($92,7^\circ \pm 1,8^\circ$) et leur épaisseur (412 ± 48 μm) ont permis de sélectionner des méthodes de micro-fabrication adaptées.

Ces résultats nous ont amené à étudier deux méthodes de micro-structuration mises en œuvre pour les thermoplastiques, le pressage à chaud et la micro-gravure, ces matériaux ayant des propriétés mécaniques (par exemple des modules d'Young compris entre 3 et 5 GPa) comparables à celles du chitosane. A partir des mesures de profondeurs et largeurs de différents canaux obtenus sur des films de chitosane neutralisés, les résolutions de ces deux méthodes ont été comparées. Tandis que le pressage à chaud a produit des canaux avec une section évasée et une profondeur non reproductible, la micro-gravure a offert une excellente précision et une très bonne reproductibilité. Des canaux de 105 et 1000 μm de large ont été gravés avec des justesses supérieures à 97% et pour des consignes de profondeur de 50 à 200 μm , les justesses obtenues étaient de 91%. Le collage des films de chitosane avec une résine photosensible de 10 μm d'épaisseur a permis la fabrication des premiers dispositifs microfluidiques à partir de films de chitosane. Nous avons alors étudié les conditions d'utilisation en termes de débit des LoC en chitosane pour vérifier la tenue du collage jusqu'à 400 mL.h^{-1} . De plus, des perfusions de 24h à des débits de 120 $\mu\text{L.h}^{-1}$ et 1,25 mL.h^{-1} ont été effectuées pour confirmer la tenue du collage sur la durée. Il a été observé qu'aux débits élevés, le collage des connectiques reliant les LoC en chitosane au système d'injection était le point de rupture de chaque système. Par ailleurs, nous avons caractérisé la diminution de la section des canaux microfluidique, liée au gonflement des films de chitosane suite à l'injection de solutions aqueuses. En testant deux géométries différentes (300×200 μm et 500×150 μm), nous avons pu constater que cette diminution dépend des dimensions initiales des canaux. Ce gonflement a aussi eu pour conséquence la diffusion de molécules de petites tailles (~ 1 nm de diamètre) à travers les parois des films de chitosane avec une vitesse de $0,872 \pm 0,035$ $\mu\text{m.min}^{-1}$.

Les travaux réalisés ont montré la possibilité de réaliser des dispositifs microfluidiques à partir de chitosane, ce qui nous a conduit à envisager d'élaborer une application de culture cellulaire. Dans un premier temps, nous avons discuté trois méthodes de stérilisation pour déterminer leurs impacts macro et microscopique sur les films de chitosane. La stérilisation par l'éthanol a été déterminée comme celle utilisable à la fois pour des films de chitosane et des systèmes microfluidiques en chitosane. A l'opposé, nous avons montré que la stérilisation par irradiation UV modifie chimiquement le chitosane tandis que la stérilisation par autoclave conduit à la déformation des films de chitosane. Par la suite, la non-toxicité des films de chitosane après neutralisation a été confirmée par la culture de deux types de cellules humaines cancéreuses sur des films de chitosane, des cellules non adhérentes (ML-2), et des cellules adhérentes (MDA-MB-231). Ces dernières ont adhéré et se sont multipliées à la surface des films de chitosane, qu'ils soient micro-gravés ou non, et sans traitement surfacique, contrairement à des systèmes en plastique. Finalement, un système microfluidique en chitosane a été développé pour la culture cellulaire. Après stérilisation par injection d'éthanol, des cellules MDA-MB-231 ont été cultivées pendant 2,5 jours dans deux chambres de cultures préparées à cet effet. Pendant cette expérience, nous avons pu observer l'adhésion et la migration de ces cellules dans les chambres de culture.

En conclusion, l'utilisation du chitosane pour la fabrication de système microfluidique n'avait pas encore été explorée, et plusieurs défis techniques devaient être relevés. Dans un premier temps, les méthodes pour obtenir des films de chitosane ont été adaptées pour garantir une épaisseur suffisante afin d'intégrer des canaux microfluidiques, une transparence permettant l'observation au microscope et un gonflement minimal en présence de solutions aqueuses. Dans un second temps, un protocole de micro-structuration et une technique de collage appropriée ont également été développés. Ainsi, ces différentes études ont permis le développement du premier protocole de fabrication de système microfluidique en chitosane, offrant une nouvelle alternative bio-sourcée, biodégradable et biocompatible aux matériaux standards.

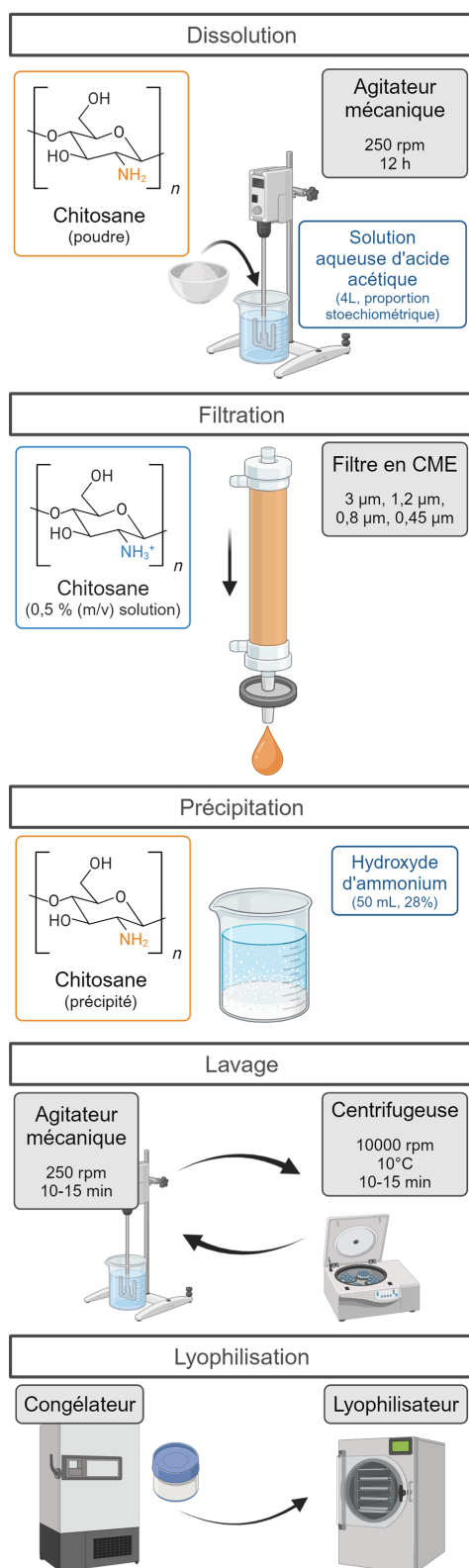
En perspective de ces travaux, il serait intéressant à court terme de poursuivre certaines études. Tout d'abord, les méthodes de neutralisation et de réticulation n'ont pas été exhaustives. Ainsi, d'autres méthodes peuvent être envisagées comme la neutralisation par voie gazeuse à l'ammoniaque. De plus, des combinaisons de plusieurs stratégies, comme la neutralisation et la ré-acétylation ou la neutralisation et la réticulation, peuvent permettre de réduire davantage, voire d'éliminer le gonflement des films de chitosane. Une autre approche serait de considérer des traitements de surface pour rendre les parois des canaux imperméables. Ce traitement devra être bio-sourcé, biodégradable et biocompatible pour ne pas dégrader les propriétés des films de chitosane.

Afin de fabriquer des LoC entièrement éco-responsables, la méthode actuelle de collage des films de chitosane devrait être remise en question et une alternative durable devrait être étudiée. En effet, même si la résine photosensible utilisée lors de cette thèse est biocompatible, elle demeure issue de la pétrochimie. De même, les connectiques en PC et la colle en silicone utilisée pour les fixer sur des systèmes microfluidiques en chitosane devraient être remplacés par des alternatives plus éco-responsables.

Enfin, il serait intéressant d'envisager d'autres méthodes de micro-structuration. Cela permettrait de descendre en dessous de la résolution de la micro-gravure, limitée à cause du diamètre des fraises disponibles. De plus, ces nouvelles méthodes pourraient offrir la possibilité de structurer les surfaces des films de chitosane à l'échelle nanométrique, comme la lithographie par nano-impression. Ainsi, cela ouvrirait d'autres opportunités d'applications microfluidiques.

À long terme, le chitosane, associé à d'autres biopolymères, pourrait offrir une alternative durable aux matériaux plastiques utilisés dans la fabrication des systèmes microfluidiques. Grâce à ses propriétés biodégradables et biocompatibles, il représente une solution écologique face aux enjeux actuels, offrant la possibilité de développer des dispositifs plus respectueux de l'environnement.

A. Purification du chitosane



Le protocole pour purifier 20g de chitosane 244LG est décrit sur la FIG A.1.

Le chitosane à purifier est dissous par agitation mécanique en 12h pour obtenir une solution de concentration 0,5% (m/v) dans 4L d'eau déionisée avec 7,09 mL d'acide acétique (proportion stoechiométrique). La solution est ensuite filtrée sous air comprimé en utilisant des filtres en CME (Millipore) de porosités décroissantes : 3 µm, 1,2 µm, 0,8 µm et 0,45 µm.

Une solution de 50 mL de d'hydroxyde d'ammonium à 28% est ajoutée dans la solution de chitosane pour précipiter le chitosane.

Le chitosane est ensuite lavé à l'eau déionisée en laissant le mélange sous agitation mécanique pendant 10-15 min avant d'être centrifugé à 10 000 tpm à 10°C pendant 10 min. Le chitosane est ensuite séparé de l'eau de centrifugation. Plusieurs cycles de lavage (<10 cycles) sont répétés jusqu'à ce que l'eau de centrifugation atteigne un pH neutre.

Finalement, le chitosane est congelé pendant une nuit avant d'être lyophilisé pour être conservé sous forme de poudre.

FIGURE A.1 – Protocole de purification du chitosane.

B. Caractérisation de la BSA marquée avec Alexa Fluo[®] 555

Afin de caractériser le marquage de la BSA réalisée préalablement au sein de notre laboratoire en suivant le protocole défini par Life Technologies (Carlsbad, USA), nous avons appliqué la méthode recommandée par cette compagnie. La solution initiale de BSA marquée avec Alexa Fluo[®] 555 est diluée à 10% dans du PBS 1X. Une première mesure a été réalisée avec du PBS seul dont l'absorbance a été soustraite automatiquement aux mesures suivantes (blanc), puis l'absorbance de la solution diluée a été mesurée dans une cuve de 1 cm par un spectrophotomètre UVmc (Safas, Monaco, Monaco). Les valeurs mesurées sont reportées dans le Tableau S1 à 280 et 555 nm pour séparer les absorptions de la BSA de celles du marqueur fluorescent.

TABLEAU B.1 – Absorbance de la solution diluée à 10% de BSA fonctionnalisée avec Alexa Fluo[®] 555.

Longueur d'onde [nm]	280	555
Absorbance []	0,1705	0,4865

La concentration C_{BSA} de BSA est calculée à partir de la formule suivante :

$$C_{BSA} = \frac{(A_{280} - A_{555} \times CF_{280}) \times dilution}{\epsilon_{BSA}^{280}} = 30 \mu\text{M}$$

avec $CF_{280} = 0,08$ le facteur de correction pour la contribution du marqueur à 280 nm et $\epsilon_{BSA}^{280} = 43824 \text{ mL.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ le coefficient d'extinction molaire à 280 nm pour la BSA.

Le degré de marquage d_{fluo} , défini comme le ratio de moles de fluorophore et de moles de BSA, est déduit du résultat précédent à partir du calcul suivant :

$$d_{fluo} = \frac{A_{555} \times dilution}{\epsilon_{fluo}^{555} \times C_{BSA}} = 1,08$$

avec $\epsilon_{fluo}^{555} = 150000 \text{ mL.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ le coefficient d'extinction molaire du fluorophore à 555 nm.

C. Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur les canaux microfluidiques

C.a. Scans 3D

Des scans 3D sont effectués dans des canaux à vide avant et après injection d'une solution aqueuse. Ces scans ont été utilisés afin de mesurer les largeurs et profondeurs des canaux. Le microscope est réglé avec un objectif 20x (HC PL FLUOTAR 20x/0.40 DRY, Leica 11506243) pour couvrir les régions d'intérêt avec l'assemblage de 3 images.

TABLEAU C.2 – Résolution et dimensions des scans 3D.

Dimensions	Taille des pixels	Résolution	Taille totale
X	0,653 μm	0,839 μm	667,74 μm
Y	0,653 μm	0,839 μm	667,74 μm
Z	5 μm	3,437 μm	509,98 μm

TABLEAU C.3 – Caractéristiques des lumières utilisées pour les scans 3D.

Canal	Couleur sur image	Temps d'exposition	Illumination
BF	Nuance de gris	10 ms	Lumière blanche
GFB	Vert	10 ms	470 nm
Y3	Jaune	30 ms	555 nm

C.b. Vidéos

Des vidéos 2D, prises à une profondeur correspondant à la surface du chitosane collée à la lame de verre, ont été enregistrées pendant l'injection d'une solution aqueuse fluorescente sur 1h. Ces images sont ensuite utilisées pour mesurer l'évolution de la largeur du canal et celles des zones occupées par les molécules fluorescentes. Le microscope est réglé avec un objectif 10x (HC PL FLUOTAR 10x/0.32 DRY, Leica 11506522), pour couvrir toute la largeur du canal en image.

TABLEAU C.4 – Résolution et dimensions des vidéos (N/D pour données non disponibles ou non applicables).

Dimensions	Taille des pixels	Résolution	Taille totale
X	1,313 μm	1,048 μm	1343,1 μm
Y	1,313 μm	1,048 μm	1343,1 μm
T	5 min	N/D	1 h

TABLEAU C.5 – Caractéristiques des lumières utilisées pour les vidéos.

Canal	Couleur sur image	Temps d'exposition	Illumination
BF	Nuance de gris	10 ms	Lumière blanche
GFB	Vert	10 ms	470 nm
Y3	Jaune	30 s	555 nm

D. Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur la culture cellulaire des MDA-MB-231 dans des puits

D.a. Vidéos

Des vidéos 2D ont été prises des MDA-MB-231 entre J2 et J3 de culture dans des puits dans une boîte à 12 puits. Dans certains puits, la culture s'effectue sur des films de chitosane, micro-gravés ou non. Le microscope est réglé avec un objectif 10x (HC PL FLUOTAR 10x/0.32 DRY, Leica 11506522) pour couvrir les régions d'intérêt avec l'assemblage de plusieurs images.

TABLEAU D.6 – Résolution et dimensions des vidéos (N/D pour données non disponibles ou non applicables).

Dimensions	Taille des pixels	Résolution	Taille totale
X	1,969 μm	1,048 μm	15,83 mm
Y	1,969 μm	1,048 μm	15,83 mm
T	1h	N/D	24h

TABLEAU D.7 – Caractéristiques des lumières utilisées pour les vidéos.

Canal	Couleur sur image	Temps d'exposition	Illumination
BF	Nuance de gris	10 ms	Lumière blanche

D.b. Photos

Des photos ont été prises des MDA-MB-231 à J4 de culture dans des puits dans une boîte à 12 puits. Dans certains puits, la culture s'effectue sur des films de chitosane, micro-gravés ou non. Dans le cas de la culture sur films de chitosane, des scans 3D ont été effectués à cause des déformations des films. Le microscope est réglé avec un objectif 10x (HC PL FLUOTAR 20x/0.40 DRY, Leica 11506243), pour couvrir les régions d'intérêt avec l'assemblage de plusieurs images.

TABLEAU D.8 – Résolution et dimensions des photos.

Dimensions	Taille des pixels	Résolution	Taille totale
X	0,979 μm	0,839 μm	6,67 - 16,27 mm
Y	0,979 μm	0,839 μm	6,67 - 16,27 mm
Z	5 μm	3,437 μm	0,23 - 0,42 mm

TABLEAU D.9 – Caractéristiques des lumières utilisées pour les photos.

Canal	Couleur sur image	Temps d'exposition	Illumination
BF	Nuance de gris	20 ms	Lumière blanche

E. Résolution des images prises au microscope DMI8 inversé sur la culture dans un système microfluidique

Des photos ont été prises des MDA-MB-231 entre J0 et J2,5 de leur culture dans un système microfluidique chitosane/chitosane. A cause des déformations des chambres de culture, des scans 3D ont été effectués puis assemblés en une image par projection de luminosité maximale. Le microscope est réglé avec un objectif 20x (HC PL FLUOTAR 20x/0.40 DRY, Leica 11506243) pour couvrir les chambres de culture avec l'assemblage de plusieurs images.

TABLEAU E.10 – Résolution et dimensions des scans 3D.

Dimensions	Taille des pixels	Résolution	Taille totale
X	0,656 μm	1,048 μm	3911,80 μm
Y	0,656 μm	1,048 μm	3911,14 μm
Z	19,634 μm	1,371 μm	373,04 - 719,97 μm

TABLEAU E.11 – Caractéristiques des lumières utilisées pour les scans 3D.

Canal	Couleur sur image	Temps d'exposition	Illumination
BF	Nuance de gris	5 ms	Lumière blanche
Y5	Magenta	20 ms	635 nm

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 mai 2016 modifié par l'arrêté du 26 août 2022,

Vu la demande des directrices de thèse

Mesdames E. LAURENCEAU et A-L. DEMAN-HIM

et les rapports de

M. F. CHOLLET

Professeur - Université de Franche-Comté - 16 route de Gray - 25030 Besançon

et de

M. C. VIEU

Directeur de recherche - INSA Toulouse - 7 avenue du Colonel Roche - 31031 Toulouse

Madame ZIMMER Morgane

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 13 novembre 2024

Pour le directeur de l'École Centrale de Lyon
Le directeur de la recherche



Christophe CORRE