

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Origines de l'étude . . . . .	1
1.2 Sonder un environnement par suivi de particules uniques . . . . .	2
1.2.1 Origines et prétentions du suivi de particules . . . . .	2
1.2.2 Caractérisation de microenvironnement à l'aide de particules . . . . .	4
1.2.3 Caractérisation d'écoulements . . . . .	6
1.3 Dynamique de particules proche d'une paroi : forces transverses . . . . .	10
1.3.1 Forces de volume et forces de surface . . . . .	11
1.3.2 Migration sous cisaillement . . . . .	12
1.4 Séparation par taille de molécules d'ADN . . . . .	21
1.4.1 Taille d'un polymère . . . . .	21
1.4.2 Électrophorèse, séparation sur gel et analogues technologiques . . . . .	25
1.4.3 Séparation sans matrice . . . . .	32
1.5 Bilan et introduction des travaux expérimentaux . . . . .	36
<b>2 Matériels et méthodes</b>	<b>37</b>
2.1 Fabrication et intégration des puces microfluidiques . . . . .	37
2.1.1 Photolithographie optique . . . . .	37
2.1.2 Gravure du silicium . . . . .	38
2.1.3 Perçage et oxydation des puces . . . . .	39
2.1.4 Capotage des dispositifs et connexions fluidiques . . . . .	40
2.2 Banc expérimental . . . . .	41
2.2.1 Optique . . . . .	43
2.2.2 Imagerie . . . . .	43
2.3 Fluides et particules . . . . .	46
2.3.1 Solutions tampon . . . . .	46
2.3.2 Marquage de l'ADN . . . . .	46
2.3.3 Contrôle en taille des colloïdes . . . . .	47
<b>3 Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques</b>	<b>49</b>
3.1 Introduction . . . . .	49
3.2 Hydrodynamique et dynamique de particule à bas nombre de Reynolds : quelques fondements nécessaires à notre étude . . . . .	52
3.2.1 Hydrodynamique à bas nombre de Reynolds : équation de Stokes . . . . .	52
3.2.2 Écoulement fluide au sein de fente fine . . . . .	53

## Table des matières

---

3.3	Dynamique d'une bille entre deux parois . . . . .	55
3.3.1	Impact des interactions hydrodynamiques sur la dynamique d'une bille confinée .	57
3.3.2	Vitesse de translation d'une sphère confinée entre deux murs dans un écoulement de Poiseuille . . . . .	60
3.4	Construction d'un modèle d'ajustement des données expérimentales . . . . .	63
3.4.1	Densité de probabilité de vitesse du traceur . . . . .	63
3.4.2	Ajustement des données expérimentales . . . . .	69
3.5	Validation du modèle par dynamique brownienne . . . . .	73
3.5.1	Équation de Langevin et non-homogénéité du coefficient de diffusion . . . . .	73
3.5.2	Résultats des simulations . . . . .	74
3.6	Confrontation à l'expérience pour des fluides Newtoniens . . . . .	83
3.6.1	Conditions expérimentales . . . . .	83
3.6.2	Application de notre méthode de caractérisation pour différentes fentes micro-fluïques . . . . .	83
3.6.3	Migration transverse . . . . .	89
3.6.4	Conclusion partielle . . . . .	97
3.7	Application au suivi de la déformation d'une canalisation . . . . .	99
3.7.1	Le Poly-diméthylsiloxane : matériau déformable . . . . .	99
3.7.2	Conditions expérimentales . . . . .	100
3.7.3	Résultat . . . . .	102
3.8	Conclusion du chapitre . . . . .	104
<b>4</b>	<b>Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme</b>	<b>109</b>
4.1	Introduction . . . . .	109
4.2	Conditions expérimentales . . . . .	111
4.3	Résultats de la séparation . . . . .	115
4.3.1	Séparation du kb ladder . . . . .	115
4.3.2	Séparation du 100 bp ladder . . . . .	118
4.3.3	Analyse des performances : vitesse de migration et nombre de plateau théoriques	119
4.3.4	Conclusions sur les expériences de séparation . . . . .	123
4.4	Migration transverse en microfluidique : pistes bibliographiques pour l'interprétation de la séparation . . . . .	125
4.4.1	Migration transverse d'objets sous l'action de champs hydrodynamique et électrophorétique : cas du fluide Newtonien . . . . .	125
4.4.2	Migration transverse en fluide viscoélastique . . . . .	130
4.5	Comprendre la séparation : expériences en molécules uniques . . . . .	135
4.5.1	Effet de la concentration en PVP sur l'efficacité de la séparation . . . . .	135
4.5.2	Une preuve directe de la migration vers les bords . . . . .	140
4.5.3	Étude en mouvement . . . . .	145
4.5.4	Quelles limites de hauteur pour le phénomène de migration transverse ? . . . . .	151
4.6	Conclusion du chapitre . . . . .	155
<b>5</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>157</b>
5.1	Conclusions . . . . .	157
5.2	Perspectives . . . . .	161
	<b>Bibliographie</b>	<b>162</b>

<b>Annexes</b>	<b>179</b>
.1 Programme de dynamique Brownienne . . . . .	179
.2 Calcul du coefficient de diffusion . . . . .	185
.3 Vitesse de traceurs confinés . . . . .	189
.4 Programme d'ajustement des données . . . . .	191





# Introduction

Dans cette introduction, nous reviendrons d'abord sur les origines et les motivations de notre travail. Ce travail consiste en l'étude de micro-environnements par suivi de particules ainsi que leur migration dans un écoulement sous l'effet de forces perpendiculaires aux lignes de champ. Ces effets portent en germes des stratégies pour la séparation par taille d'objets dissous, ce qui nous amènera à discuter les méthodes de séparation de biomolécules.

## 1.1 Origines de l'étude

Ce travail constitue une suite aux travaux menés dans le groupe microfluidique du LAAS-CNRS. À l'origine, le début de cette thèse s'est fait au contact des étudiants Houssam Hajjoul, Mathon Julien, Yannick Viero et surtout Qihao He. Le présent travail s'est beaucoup inspiré de leurs travaux.

Le projet de Houssam Hajjoul et Julien Mathon concernait la dynamique de chromosomes *in-vivo* [Hajjoul et al., 2009] [Hajjoul et al., 2011] [Hajjoul et al., 2013]. Celui de Yannick Viero concernait la dynamique de molécules d'ADN dans des matrices de nanoplots et son application à la séparation par taille [Viero et al., 2011a] [Viero et al., 2012] [Viero et al., 2013]. Celui de Qihao He, concernait l'auto-organisation de colloïdes et la dynamique de molécules d'ADN dans des nanocanaux [He et al., 2013].

Il est un point commun à chacun d'entre eux, il se retrouve dans chaque intitulé : *la dynamique*. Dynamique et transport sont intimement liés. Le premier terme est plus naturellement associé à l'objet individuel. Le second fait quant à lui référence à la masse, à une dynamique globale, une dynamique d'ensemble d'objets. Il n'existe *a priori* aucune frontière entre les deux, tout juste une différence d'échelle, et la physique moderne se joue de cette dualité. Le transport d'un ensemble de particules est aujourd'hui compris à partir de l'objet unique, plus précisément, le comportement global est appréhendé via des mécanismes décrits à l'échelle moléculaires. Ce constat est la base des succès de la physique des grands nombres, physique statistique, physique de la matière molle et condensée : à partir des modèles de Rouse et Zimm, on remonte par exemple aux propriétés viscoélastiques d'un liquide ou le passage d'un électron unique à travers une jonction entre deux semiconducteurs permet de prédire la réponse en courant de l'ensemble.

Ce manuscrit abordera la thématique du transport d'objets individuels dilués sous deux formes. La

première concerne la dynamique d'objets *parfaits* pour la caractérisation d'un micro-environnement. La seconde concerne la dynamique d'objets uniques dans un environnement maîtrisé.

Par objets *parfaits* nous entendons des objets tels que l'on connaît leur réponse à un environnement particulier. Ceux-ci perdent de fait la dénomination d'objet, pour devenir des *sondes*. Ils ne constituent alors plus l'intérêt premier de l'étude mais font office de relais dans un but de caractérisation de leur environnement. Cette visée se retrouve dans les techniques de vélocimétrie de particule ou encore de micro-rhéologie, où les colloïdes utilisés ne sont pas étudiés pour eux-mêmes, mais se font messagers des interactions auxquelles ils sont soumis.

Nous nous intéresserons par la suite aux méthodes de séparation par taille de molécules d'ADN, en tâchant de mettre en avant les différents mécanismes physiques impliqués. Nous commencerons cette partie par une introduction des paramètres essentiels à la description de la molécule (sa taille), puis nous décrirons les méthodes de séparation, en commençant par les techniques classiques de séparation sur gel, et en décrivant brièvement ses analogues technologiques

Il est une autre constante dans les projets des étudiants sus-cités et le travail actuel, il s'agit du suivi de particules individuelles par microscopie de fluorescence. Aussi commencerons-nous par l'introduction de cette technique particulière et montrerons quelques une de ces applications pour la caractérisation de micro-environnements. Nous nous attacherons par la suite à décrire le comportement de particules dans des écoulements, avec une attention particulière pour la migration perpendiculaire aux lignes de fluide, induite par interaction avec les parois ou par cisaillement.

## 1.2 Sonder un environnement par suivi de particules uniques

### 1.2.1 Origines et prétentions du suivi de particules

La microscopie optique constitue un outil majeur pour la caractérisation de la matière jusqu'à une limite fixée par la diffraction et caractéristique des rayons utilisés pour conduire l'imagerie. En effet, selon le critère de Rayleigh [Rayleigh, 1896], la diffraction des rayons lumineux dans un système d'imagerie conduit à une limite de la résolution de l'ordre de  $\lambda / (2NA)$ , où  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement et  $NA$  l'ouverture numérique du système utilisé pour l'imagerie. Ce critère est basé sur la simple étude de la diffraction par une ouverture et constitue une limite basse, à laquelle doivent s'ajouter l'effet de la pixelisation ou encore du bruit [Stelzer, 1998]. Pour l'imagerie de fluorescence à  $\lambda \sim 500nm$  via un objectif à immersion d'ouverture numérique  $NA = 1.4$ , l'application de ce critère conduit à une limite de la résolution dans le plan focal de l'ordre de 200 nm, trop haute pour l'investigation de processus moléculaires dans le domaine de la biophysique pour ne citer que cet exemple. Différentes approches ont été suivies dans le but de dépasser cette limite. Revenant sur la définition de la résolution, on s'aperçoit que ce critère n'est consistant que pour distinguer deux objets proches. S'intéressant à une particule unique et de taille sub-longueur d'onde, il est possible de repérer son centre de masse plus précisément par déconvolution de la figure de diffraction (ou fonction d'étalement du point ou PSF en anglais) qu'elle produit au plan image du système d'imagerie (voir par exemple [Friskén Gibson and Lanni, 1992], [Kirshner et al., 2013]). Pour des molécules uniques, la PSF est particulièrement bien reproduite par une gaussienne, et des résolutions de l'ordre du nm ont été atteintes [Yildiz et al., 2003]. Cette idée est à la base de nouvelles techniques de microscopie

## 1.2. Sonder un environnement par suivi de particules uniques

dites de super-résolution, et notamment celle basée sur la photo-activation séquentielle de fluorophores individuels (PALM) [Betzig et al., 2006] [Hess et al., 2006]. Ces outils contribuent au domaine de la nanoscopie optique en champ large [Hell, 2007] [Schermele et al., 2010].

Une autre méthode de pointé de résolution sub-longueur d'onde consiste à suivre la position du centre de masse de la particule dans le plan focal  $(x_{CM}, y_{CM})$  selon le calcul [Carter et al., 2005]

$$x_{CM} = \frac{\sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h i \times I(i, j)}{\sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h I(i, j)} \quad (1.1)$$

$$y_{CM} = \frac{\sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h j \times I(i, j)}{\sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h I(i, j)}$$

où  $I(i, j)$  est l'intensité associée au pixel localisé en  $(i, j)$  d'une image de dimension  $w \times h$  pixels<sup>2</sup>.

Le suivi de particules est aujourd'hui largement utilisé, pour, à titre d'exemple, l'étude de la diffusion de protéines membranaires [Ghosh and Webb, 1994], ou encore de fibres d'actine [Work and Warshaw, 1992] et se trouve revu dans des articles de Saxton et Jacobson [Saxton and Jacobson, 1997] (avec une application particulière à l'étude de membranes) ou encore par Levi et Gratton [Levi and Gratton, 2007] [Levi and Gratton, 2009]. Compte tenu de leur taille, la caractérisation de la dynamique de particules sub-micrométriques requiert un formalisme particulier, incluant à la fois les mouvements d'origine diffusive mais aussi dus à l'advection. La manière la plus commune d'analyser les trajectoires issues de la localisation en fonction du temps du centre de masse de particules consiste en la construction du déplacement quadratique moyen (MSD : mean square displacement en anglais) tel que suit :

$$MSD = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 + (y(t + \tau) - y(t))^2 + (z(t + \tau) - z(t))^2 \rangle \quad (1.2)$$

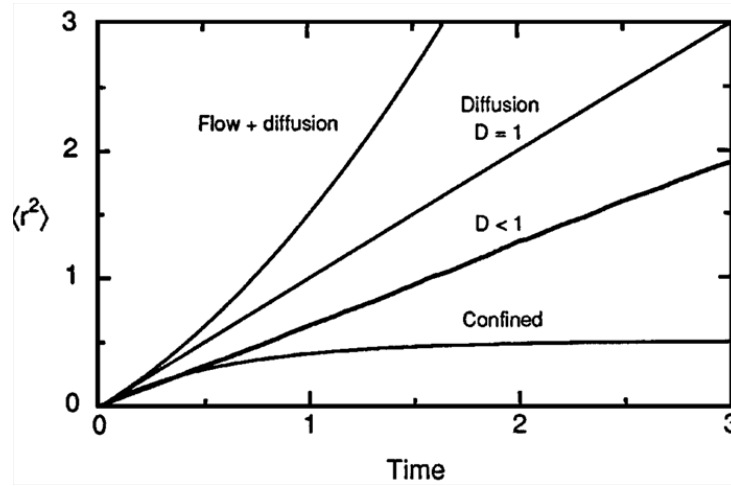
où  $x(t), y(t), z(t)$  sont les coordonnées spatiale du centre de masse de la particule au cours du temps. Les MSD ainsi construites suivent des lois bien particulières telles que présenté dans la table qui suit et illustré dans la figure 1.1 tirée de [Saxton and Jacobson, 1997] :

Diffusion simple	$MSD(\tau) = 2dD\tau$
Diffusion anormale	$MSD(\tau) = 2dD\tau^\alpha$
Diffusion et advection	$MSD(\tau) = 2dD\tau + (V\tau)^2$

Où  $d$  correspond à la dimension ( $d=1,2,3$ ),  $D$  est le coefficient de diffusion de la particule,  $V$  correspond à une vitesse d'advection et  $\alpha$  est un coefficient tel que  $\alpha < 1$ . La diffusion normale caractérise essentiellement la dynamique de particules libres dans un milieu non borné et homogène. La diffusion anormale est notamment observée pour des particules diffusant dans un potentiel extérieur, comme c'est le cas par exemple d'un segment d'une chaîne de polymère de Rouse au temps courts ( $\alpha = 1/2$ ) ou dans le cadre du régime de la reptation dans un fondu de polymère ( $\alpha = 1/4$ ) [Doi, 1988] [De Gennes, 1979].

Cette dernière équation donnée en 1.2.1 renferme toute la potentialité de la méthode. Étant donnée l'expression du coefficient de diffusion selon la loi de Stokes-Einstein pour une particule sphérique de rayon  $a$  dans un milieu à température  $T$  et de viscosité  $\mu$ ,  $k_B$  étant la constante de Boltzmann :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu a} \quad (1.3)$$



**FIGURE 1.1** – Évolution temporelle de MSD pour des objets suivant une diffusion confinée, une sous-diffusion, une diffusion normale ou encore une diffusion et un entraînement dirigé. Image tirée de [Saxton and Jacobson, 1997]

l'analyse des parties de diffusion et d'advection de cette dernière équation conduit à une caractérisation des valeurs intensives que sont la température et la viscosité du milieu, mais aussi le champ de fluide externe dans laquelle la particule se meut.

Nous donnerons dans la partie qui suit quelques exemples où des particules sont employées à la caractérisation du milieu dans lequel elles se trouvent.

### 1.2.2 Caractérisation de microenvironnement à l'aide de particules

Nous reverrons ici quelques méthodes expérimentales, où les particules employées font office de sondes et servent à déterminer un micro-environnement. Cette liste n'est pas exhaustive, elle n'en a pas la vocation, nous nous restreindrons ici à la dynamique de colloïdes sphériques et solides pour la caractérisation d'une viscosité, d'une température, mais surtout d'un écoulement de fluide, afin de rester au plus proche des éléments de cœur de ce rapport.

#### Mesure des propriétés rhéologiques et température

Une propriété fondamentale de tout matériau est donnée par sa réponse à une contrainte. Par exemple, un solide stocke l'énergie transmise sous forme élastique, alors qu'un fluide s'écoule et dissipe l'énergie transmise sous forme de cisaillement via des forces visqueuses. Dans le cadre d'un fluide purement visqueux, considérant l'expression du coefficient de diffusion donné par la formule de Stokes-Einstein et celle de la MSD à deux dimensions ( $MSD = 4Dt$ ) on obtient :

$$\mu = \frac{2k_B T t}{3\pi a MSD(t)} \quad (1.4)$$

Ainsi, caractériser les fluctuations de particules uniques diffusant dans un fluide purement visqueux, permet de remonter à la viscosité du fluide moyennant la connaissance de la température et de la taille de la particule sonde. Utilisant un système de pinces optiques, des cartes de viscosité peuvent ainsi être construites [Nemet et al., 2002]. Cette potentialité peut paraître anecdotique, mais cette mesure

est d'importance dans deux cas particuliers : celui des systèmes où la viscosité n'est pas homogène et dans le cas où il n'est pas possible de travailler avec des quantité macroscopique de fluide, comme par exemple au sein de cellules.

**Non homogénéité de la viscosité** La mesure de la viscosité est d'importance dans la compréhension des matériaux non-homogène comme les émulsions [Moschakis et al., 2006], ou en présence d'un gradient de température [Ługowski et al., 2002]. Plus proche des considérations qui seront les nôtres dans ce manuscrit sont l'influence des interactions hydrodynamiques sur la viscosité apparente d'une particule en mouvement proche d'une paroi. Comme nous aurons par la suite l'occasion de le développer, la condition de non glissement imposée par la présence d'une paroi amène à redéfinir la viscosité *apparente* du milieu dans lequel une particule se meut [Happel and Brenner, 1983]. La mise en évidence de cet effet pour des particules sub-microniques a suscité de nombreux travaux [Fauchaux and Libchaber, 1994] [Lin et al., 2000] [Lançon et al., 2001] [Banerjee and Kihm, 2005] [Huang and Breuer, 2007] [Carbajal-Tinoco et al., 2007] tous basés sur le suivi de particules uniques.

**Micro-rhéologie** Les matériaux sont rarement purement visqueux. Les cellules du corps humain sont constamment soumises à des contraintes venant d'actions mécaniques extérieures ou même à des changements physiologiques internes. Pléiade de techniques se sont donc développées afin de sonder les propriétés mécaniques des matériaux vivants à l'échelle de la cellule unique [Lim et al., 2006]. Souvent, ces mesures se font en appliquant des contraintes externes et maîtrisées, en utilisant une micropipette, la pointe d'un microscope à force atomique ou encore des billes maintenues par des pinces optiques. Avec la promesse de pouvoir mesurer les propriétés rhéologiques internes de matériaux, s'est développée la technique de micro-rhéologie par suivi de particules [Mason and Weitz, 1995]. À l'aide d'un formalisme basé sur une équation de Langevin généralisée, introduisant une dépendance temporelle de l'amortissement visqueux<sup>1</sup>, le module complexe viscoélastique du fluide  $G^*(\omega)$  peut être retrouvé grâce à la formule [Mason et al., 1997] :

$$G^*(\omega) = \frac{dk_B T}{3\pi a i \omega \mathcal{F}(MSD(t))} \quad (1.5)$$

où  $\mathcal{F}(MSD(t))$  est la transformée de Fourier du déplacement quadratique moyen. Cette technique a été mise en œuvre afin de sonder les propriétés viscoélastiques de cellules sous diverses conditions et fait l'objet d'une revue récente d'un des principaux instigateurs du domaine D. Wirtz [Wirtz, 2009].

**Mesure de température** De manière identique à la mesure de viscosité, l'expression du déplacement quadratique moyen à deux dimensions et de la relation de Stokes-Einstein peuvent être remaniées pour donner une expression à la température du milieu :

$$T = \frac{3\pi\mu a MSD(t)}{2k_B T t} \quad (1.6)$$

La température apparaît alors proportionnelle à  $MSD$ , de manière cohérente avec sa définition de mesure de l'agitation moléculaire. Comme nous le verrons dans le paragraphe qui suit, la micro-vélocimétrie par image de particule (d'acronyme anglais  $\mu$ -PIV) est une méthode pour la caractérisation d'écoulements de fluide basée sur la corrélation d'images de particules ensemencées dans ce dernier. La

<sup>1</sup>La dérivation de ce modèle est donnée de manière extensive dans [Mason, 2000] et [Squires and Mason, 2010]

corrélation croisée de deux images consécutives conduit à un pic dont la position est caractéristique du mouvement par advection des particules. Toutefois, cette mesure peut être entachée par le mouvement brownien des particules, effet se retrouvant directement dans la largeur du pic de corrélation. Hohreiter *et al.* [Hohreiter et al., 2002] ont été les premiers à mettre en avant qu’une mesure de température était possible si l’on s’attachait à la largeur du pic de corrélation. Toutefois cette technique reste essentiellement ratiométrique, non-absolue. Cette méthode a été développée par la même équipe dans [Chamarthy et al., 2009] et adaptée pour s’affranchir de cette procédure de calibration. Park *et al.* [Park et al., 2005] ont proposé une méthode de suivi tridimensionnel de particules, basée sur la reconnaissance de la figure de diffraction produite par les particules au plan focal image. Une particule hors du plan focal produit une figure (tâche d’Airy) typique tel qu’il est possible, après une procédure de calibration, de déduire la position selon l’axe optique de cette dernière en repérant le rayon du cercle le plus extérieur de la tâche de diffraction. Ceux-ci ont alors construit des déplacements quadratiques moyens de particules et déduit la température du système via cette méthode non invasive. Notons qu’à cette fin, les auteurs ont utilisé une expression de la viscosité donnée par  $\mu = A10^{B/(T-C)}$  avec  $T$  la température absolue, et  $A$ ,  $B$ ,  $C$  des constantes, afin de considérer la variation de viscosité inhérente à l’augmentation de température<sup>2</sup>. Ceux-ci ont de cette manière démontré la possibilité de mesurer une température avec des incertitudes de 5.54 %, 4.26 % et 3.19 % dans les cas où le positionnement a été conduit à 1, 2 ou 3 dimensions. Un même type de méthode, s’affranchissant de l’algorithme de localisation par étude de la figure de diffraction a été conduite pour cartographier la température au sein d’un canal microfluidique en contact avec des dispositifs de chauffage [Chung et al., 2009]. Les auteurs ont pu ainsi revendiquer des déviation mesure/modèle de l’ordre de 1% sur la température.

### 1.2.3 Caractérisation d’écoulements

#### Micro-Vélocimétrie par image de particules

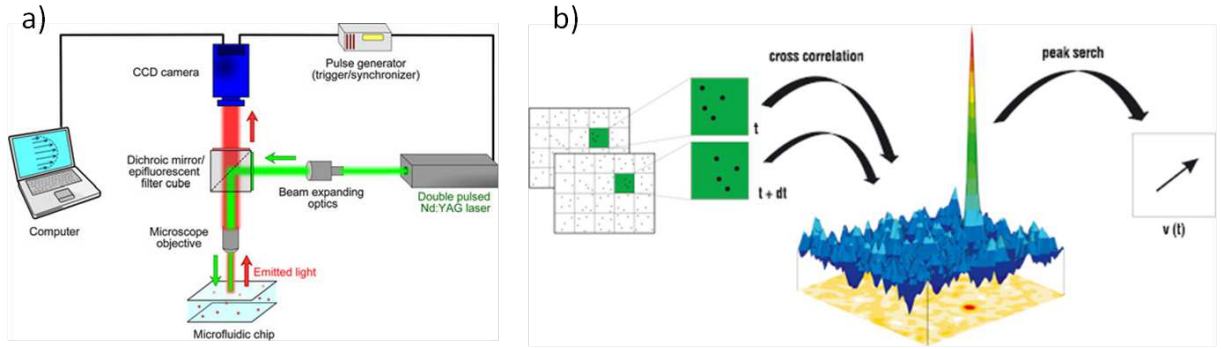
On dénomme par l’acronyme  $\mu$ PIV la vélocimétrie par image de particule résolue à l’échelle du micromètre. Celle-ci se réfère à la mesure du mouvement des fluides aux micro-échelles de l’ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-7}$  m et apparaît comme la technique reine pour la mesure d’écoulements microfluidiques. Nous avons jusqu’ici introduit la technique de suivi de particule unique, qui possède son application à la mesure de vitesse de fluide sous l’appellation de PTV (particle tracking velocimetry). Toutes deux consistent à ensemençer un fluide avec des particules et à les imager pour en extraire leur vitesse, et donc la vitesse du fluide qui les transporte. Même si basées sur le même principe, celles-ci diffèrent par la densité de traceurs utilisée et par l’algorithme de suivi mis en place. La technique de PTV requiert de faibles concentration de traceurs dans le fluide, de manière à ce que les trajectoires individuelles puissent être construites par recherche du plus proche voisin sans erreur.

La PIV fait appel à la corrélation de l’intensité observée sur deux images successives, elle n’est donc pas limitée à de très faibles fractions volumiques de traceurs. La  $\mu$ PIV est l’adaptation de la méthode macroscopique (PIV) utilisant une illumination par nappe de lumière de la zone d’intérêt. Dans la PIV macroscopique, c’est l’épaisseur de cette nappe de lumière qui définit la résolution de la technique. Avec les travaux de Santiago [Santiago et al., 1998] est née la  $\mu$ PIV en champ large, où l’éclairage est volumique. C’est alors l’optique de collection qui définit la résolution. Il existe de nombreuses revues sur cette technique, concernant la PIV macroscopique [Adrian, 1991], et la  $\mu$ PIV [Sinton, 2004] [Lindken et al., 2009] [Williams et al., 2010] [Wereley and Meinhart, 2010], dans lesquelles on préférera [Sinton, 2004] pour

---

<sup>2</sup>Dans le cas de l’eau, ces derniers ont utilisé  $A = 2.414.10^{-5} Pa.s$   $B = 247.8$  et  $C = 140$ .

## 1.2. Sonder un environnement par suivi de particules uniques



**FIGURE 1.2** – Principe de la méthode de  $\mu$ PIV. a) Schéma d'un banc expérimental typique adapté à la  $\mu$ PIV tiré de [Williams et al., 2010]. b) Illustration du procédé de corrélation croisée, tirée du site de LA VISION <http://www.piv.de/>.

une revue générale des techniques de visualisation d'écoulements, [Lindken et al., 2009] pour ses conseils pratiques aux nouveaux utilisateurs, et [Williams et al., 2010] [Wereley and Meinhart, 2010] pour des revues approfondies des derniers développements.

Cette méthode a jusqu'ici été utilisées dans de multiples applications, comme la mesure de vitesse de glissement à une paroi [Joseph and Tabeling, 2005], l'investigation du transport électrocinétique de particules [Devasenathipathy et al., 2002], d'écoulements sanguins [Sugii et al., 2002], ou encore de l'écoulement autour de cellules adhérentes [Rossi et al., 2009]. Le principe de la mesure repose sur l'acquisition d'images espacées d'un temps  $\tau$  et de conduire une corrélation spatiale croisée de ces deux images, ayant préalablement défini des *sous-zones* d'intérêt. Pour chaque sous zone (repérée par les indices  $(x_1, y_1)$ ) peut alors être définie une fonction de corrélation sur laquelle l'apparition d'un pic témoigne du transport préférentiel des particules vers une zone  $(x_2, y_2)$ . Un vecteur vitesse ayant pour origine  $(x_1, y_1)$  et composantes  $(\frac{x_2 - x_1}{\tau}, \frac{y_2 - y_1}{\tau})$  est alors extrait des données. Une schéma type du montage expérimental tiré de [Williams et al., 2010] pour la PIV de particules fluorescentes est donné en figure 1.2.

Un banc expérimental standard pour la  $\mu$ PIV comprend une source lumineuse, un microscope (préférentiellement inversé), une caméra, une électronique de synchronisation source-caméra. Un laser pulsé est préférentiellement utilisé pour palier à une faible cadence d'acquisition de la caméra. *A priori* rien n'impose que le traceur soit fluorescent. Celui-ci doit toutefois satisfaire à des critères essentiels, comme le fait d'avoir une taille suffisante à l'obtention d'un bon contraste en imagerie, une taille suffisamment faible pour suivre les lignes de fluide, mais pas trop faible pour ne pas être trop *Brownien*. Usuellement les traceurs utilisés sont des sphères fluorescentes de 200 nm à 1  $\mu$ m de rayon ou des quantum dots de 5 à 25 nm [Pouya et al., 2005]. L'erreur relative  $\epsilon$  liée à l'agitation thermique des sondes peut être appréhendée via la formule [Santiago et al., 1998] :

$$\epsilon = \frac{1}{u} \sqrt{\frac{2D}{\tau}} \quad (1.7)$$

qui correspond au ratio du déplacement par mouvement Brownien en un temps  $\tau$  sur le déplacement lié à l'advection sur une ligne de fluide de vitesse  $u$ . Cette erreur diverge rapidement pour des faibles tailles de traceur. Toutefois, la majorité des applications concernant des écoulements stationnaires et laminaires, des stratégies de moyenne des fonctions de corrélations peuvent être employées de manière à faire décroître l'influence du bruit thermique [Meinhart et al., 2000] [Devasenathipathy et al., 2003].

C'est l'impact de ce bruit thermique, ajouté au grandissement et à l'ouverture numérique de l'optique de collection ainsi que la taille des pixels de la caméra qui définissent la limite de résolution de la technique dans le plan focal. Théoriquement, les algorithmes de moyenne permettraient d'atteindre une résolution de 60 nm [Wereley and Meinhart, 2010]. Toutefois, les précisions annoncées sont plus souvent au moins 10 fois supérieures. Comme précisé plus tôt, la précision de pointé axiale se définit, dans le cas d'un éclairage en champ large, par la profondeur de champ de l'objectif. Selon Bourdon *et al.* [Bourdon et al., 2005] la longueur de corrélation (définie comme la distance au delà de laquelle une particule ne contribue plus au calcul des fonctions de corrélation spatiale) est donnée par :

$$\delta_{corr} = 2 \left[ \frac{1 - \sqrt{\epsilon}}{\sqrt{\epsilon}} \left( \frac{n_0^2 d_p^2}{4NA^2} + \frac{5.95(M+1)^2 \lambda^2 n_0^4}{16M^2 NA^4} \right) \right]^{1/2} \quad (1.8)$$

où  $d_p$  est le diamètre des particules,  $\lambda$  la longueur d'onde du signal observé,  $M$  est le grandissement,  $n_0$  l'indice de réfraction de liquide d'immersion de l'objectif (huile  $n_0 = 1.518$ ), et  $NA$  est son ouverture numérique. Le paramètre  $\epsilon$  définit la valeur seuil relative en deçà de laquelle on considère que la particule ne contribue plus au calcul de la corrélation et est traditionnellement pris égal à 0.01. Considérant l'objectif à immersion à huile de grandissement 100X et des particules de 200 nm (configuration admise dans la suite du manuscrit) cette longueur de corrélation vaut  $\sim 2.2 \mu\text{m}$ . Gagner en résolution axiale suppose l'utilisation d'une configuration confocale ou en réflexion totale interne sur laquelle nous reviendrons dans quelques lignes. L'adaptabilité d'un microscope confocal à du suivi dynamique peut apparaître *de prime abord* ardue pour l'investigation d'un phénomène dynamique. Toutefois, de très hautes cadences d'acquisition sont permises par l'insertion d'un disque de Nipkow comprenant un réseau de microlentilles [Park et al., 2004]. Des cadences d'acquisition de 2000 images par secondes et une profondeur confocale de  $1.88 \mu\text{m}$  ont ainsi pu être démontrées pour l'analyse d'un écoulement au sein d'une gouttelette [Kinoshita et al., 2007].

### Nano-vélocimétrie

En 2003, Zettner et Yoda [Zettner and Yoda, 2003] ont adapté la technique de microscopie par réflexion totale interne (TIRM) afin de caractériser des écoulements au voisinage d'un mur. Quand la lumière se réfléchit à une interface entre deux milieux d'indices optiques  $n_{1,2}$  ( $n_1 < n_2$ ) différents avec une incidence supérieure à un angle critique donné par l'application de la loi de Snell-Decartes ( $\theta_c > \sin^{-1}(\frac{n_1}{n_2})$ ), une onde évanescente est créée dans le milieu d'indice le plus faible. L'intensité  $I(z)$  de cette onde est exponentiellement décroissante selon

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{z}{z_p}\right) \quad (1.9)$$

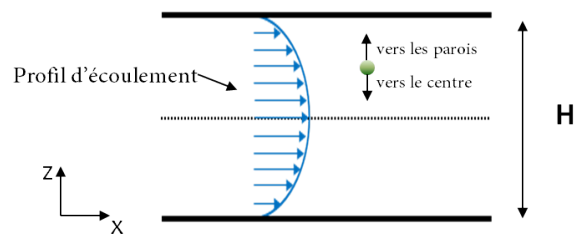
avec  $I_0$  constante et  $z_p$  la profondeur de pénétration de l'onde donnée par :

$$\frac{\lambda_0}{4\pi n_2} \left[ \sin^2 \theta - \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2 \right]^{-1/2} \quad (1.10)$$

Avec  $\lambda_0$  la longueur d'onde associée à l'onde incidente. Considérant les valeurs typiques caractérisant cette dernière, les indices de réfraction du verre et de l'eau (système couramment rencontré lorsque l'on s'attache à l'étude d'écoulements microfluidiques), et un angle d'incidence de l'ordre de  $70^\circ$ ,  $z_p$  prend



des valeurs caractéristiques d'une centaine de nanomètres. Ainsi la microscopie TIR est-elle tout à fait adaptée à l'étude d'écoulements très proches de parois. Cette technique, qui a pris pour dénomination nano-PIV, a été mise en application dans de nombreux travaux, tels que l'étude d'un écoulement de type Couette entre deux plaques [Zettner and Yoda, 2003], l'investigation de l'effet de glissement aux parois [Huang et al., 2006b], des mesures en utilisant des quantum dots [Pouya et al., 2005], l'effet de diffusion ralentie aux parois [Choi et al., 2007] [Kihm et al., 2004], à la mesure de vitesse dans un écoulement d'origine électroosmotique [Sadr et al., 2004] [Sadr et al., 2006], et même la mesure simultanée de la température et de la vitesse dans un écoulement [Guasto and Breuer, 2008]. Cette méthode a récemment évolué pour revendiquer une mesure multi-plans, par opposition à une mesure moyenne sur toute la profondeur de pénétration de l'onde. Cette adaptation repose sur la classification des particules selon l'intensité qu'elles rayonnent, d'autant plus faible que ces dernières sont éloignées de la paroi [Li et al., 2006] [Li and Yoda, 2008]. Plus que l'effet de la mesure de vitesse en elle-même c'est la fiabilité de la méthode qui est le plus souvent discutée dans la littérature et comment se manifeste l'effet de la diffusion ralentie, [Sadr et al., 2005] [Sadr et al., 2007], ou les effets combinés de cette diffusion ralentie avec l'advection du fluide [Huang et al., 2009] sur la fiabilité des mesures. Tout récemment, il a été évoqué que les forces de surfaces pouvaient avoir un rôle majeur dans la surestimation de la vitesse du fluide. Nous reviendrons sur ces effets dans le prochain paragraphe.



**FIGURE 1.3** – Description du système considéré. Une particule sphérique solide est entraînée dans un écoulement de fluide laminaire entre deux parois créé par une différence de pression entre l’entrée et la sortie d’une canalisation. Une migration *transverse* se manifeste par un mouvement soit en direction des parois ou du centre de la canalisation.

### 1.3 Dynamique de particules proche d’une paroi : forces transverses

Avec la partie précédente, nous avons pu mettre en avant les différentes méthodes de caractérisation d’un milieu par l’utilisation de particules *parfaites*, telle que leurs réponses à un actionnement donné sont connues. Ainsi, mesures de température, viscosité et vitesse d’écoulement sont rendues possibles par l’utilisation et le suivi de particules sphériques. Aussi avons-nous introduit, comme développement de la technique de la  $\mu$ PIV, la nano-vélocimétrie, permettant la caractérisation d’écoulement sur des distances inférieures à 400 nm à une paroi. Toutefois, la promesse de mesure très fine de vitesse que donnait à l’origine cette technique est aujourd’hui modérée par l’apparition de phénomènes liés à la nature très *brownienne* des particules utilisées, mais aussi à l’augmentation des effets des forces de surfaces qui tendent à biaiser les valeurs de vitesses extraites des mesures.

Nous reviendrons plus directement sur ce qu’impose la nature brownienne des particules et notamment en terme d’intervalle entre deux images acquises par la caméra. Cette discussion sera directement insérée dans le chapitre sur la caractérisation de micro et nano-écoulements. Nous souhaitons toutefois ici mettre en avant différents types de forces d’interaction s’appliquant sur des objets au sein d’un écoulement. Nous introduirons brièvement l’effet de forces électrostatiques entre la particule et la paroi. Nous reviendrons ensuite sur les forces de lift d’origine inertielle et électro-visqueuse. Notons que ce bilan sera mené pour des objets sphériques non déformables et dans des conditions d’actionnement par hydrostatique ou par électrophorèse. Aussi ne considérerons-nous pas les migration bulles, capsules, cellules ( Cf. par exemple [Danker et al., 2009]), et nous restreindrons à des fractions volumiques d’objets n’augurant aucun effet de migration dû aux interactions hydrodynamiques particule à particule. Le comportement de polymère sous ce même type d’actionnement sera directement discuté dans la partie concernant la séparation de molécule d’ADN et ce pour ne pas trop disperser cette introduction.

Le lecteur sera sans doute surpris de voir dans la partie qui suit que chacune des interactions présentée peut être, aux vues de nos applications, négligée. Nous souhaitons ici argumenter que cette discussion n’en est pas pour autant stérile. Sans vouloir trop digresser, notre projet nous a amené à observer des migrations transverses en écoulement et donc à faire un tour d’horizon bibliographique à ce sujet. Nous souhaitons ici rappeler les différentes forces d’interaction particule/paroi dans un écoulement qui peuvent amener les traceurs à ne pas suivre les lignes de fluide, et à tantôt se rapprocher des parois, tantôt du centre de la canalisation (la figure 1.3 rappelle la géométrie du système étudié par la suite).

#### 1.3.1 Forces de volume et forces de surface

Nous débutons notre état des lieux par l'expression d'interactions indépendantes de l'écoulement fluide.

##### Pesanteur et poussée d'Archimède

Un objet de densité inégale à celle du fluide dans lequel il est immergé subit une force résultant de la composition de la poussée d'Archimède et de son poids. Pour un objet sphérique de rayon  $a$  et de masse volumique  $\rho_b$  immergé dans un fluide de masse volumique  $\rho_f$ , la résultante de cette combinaison est égale à

$$\mathbf{F}_g = \frac{4\pi}{3} a^3 \Delta\rho \mathbf{g} \quad (1.11)$$

Avec  $\Delta\rho = \rho_b - \rho_f$  et  $\mathbf{g}$  l'accélération de la pesanteur. Considérant la taille et la masse volumique typiques des traceurs utilisés dans cette étude  $a \sim 100 \text{ nm}$   $\rho_b = 1.0510^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , dans un liquide de densité proche de l'eau, cette force est de l'ordre de 2 aN. Considérant que l'amplitude des forces liées aux fluctuations thermiques sont de l'ordre de  $\sim k_B T / a \sim 40 \text{ fN}$ , nous négligerons dans toute cette étude la contribution de cette force.

##### Forces de surface

La force de répulsion électrostatique entre une sphère et une paroi (Cf. figure 1.4), ainsi que l'interaction dipolaire peuvent être caractérisées selon la théorie DVLO (Derjaguin and Landau, Verwey and Overbeek). Considérant la longueur de Debye<sup>3</sup> caractéristique du système  $\lambda_D$ , le potentiel de surface de la paroi et d'une bille  $\zeta_{s,p}$ , la permittivité diélectrique du vide  $\epsilon_0$  et celle relative du liquide dans lequel la bille se trouve  $\epsilon$ , l'interaction électrostatique est donnée par [Israelachvili, 2011] [Oberholzer et al., 1997] :

$$F_{el} = 4\pi\epsilon_0\epsilon a \left( \frac{k_B T}{e} \right)^2 \left( \frac{\hat{\zeta}_p + 4\gamma_p \Omega a \kappa}{1 + \Omega a \kappa} \right) (4\gamma_s) \kappa e^{-\kappa(z-a)} \quad (1.12)$$

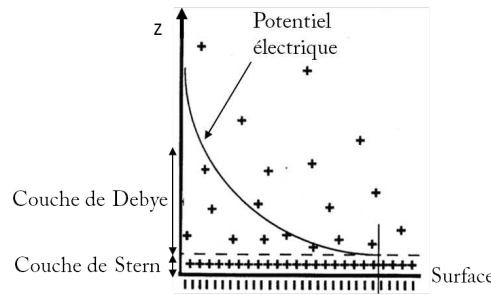
Avec  $\kappa = 1/\lambda_D$  l'inverse de la longueur de Debye,  $\hat{\zeta}_{p,s} = e\zeta_{p,s}/k_B T$ ,  $\gamma_{p,s} = \tanh(\hat{\zeta}_{p,s}/4)$  et  $\Omega = (\hat{\zeta}_p - 4\gamma_p)/2\gamma_p^3$ .

Considérant la définition de la longueur de Debye :

$$\lambda_d = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T}{\sum_{j=0}^N n_j^0 q_j^2}} \quad (1.13)$$

Avec  $n_j^0$  la concentration en volume de l'espèce ionique  $j$  de charge  $q_j = e z_i$  et de valence  $z_i$ . Considérant la force ionique des solutions tampon utilisées pour la biologie, la longueur de Debye n'excède pas quelques nm. Plus particulièrement, nous utiliserons une solution TBE 2X (Tris-HCl 160 mM, acide borique 160 mM, acide éthylène diamine tétraacétique -EDTA- 5mM) qui définit une longueur de Debye inférieure à 1 nm. La force de répulsion électrostatique peut donc être considérée comme

<sup>3</sup>Nous faisons le choix de ne pas donner la résolution de la solution de l'équation de Poisson-Boltzmann au dessus d'une surface chargée et immergée dans une solution d'électrolytes dans cette introduction. La figure 1.4 rappelle la forme du potentiel déduit et le modèle en bicouche, fixe : Stern, mobile : Gouy-Chapman.



**FIGURE 1.4** – Schéma descriptif de la géométrie considérée. Sont représentés le potentiel électrique et schématisés les ions en solution. Figurent sur la figure la couche immobile d'ions adsorbés à la surface (Stern) et la couche dite de Gouy-Chapman, où les ions de charge opposée à celle de la surface sont majoritaires. Au delà de la longueur de Debye, l'influence de la charge de surface est considérée comme écrantée.

totalemt écrantée au delà de 10 nm et négligeable dans nos expériences.

En plus de la force répulsion électrostatique, la théorie DVLO fait état d'une force d'interaction dipolaire de Van der Waals, qui s'exprime comme :

$$F_{vdw} = \frac{A_{ps}}{6} \left[ \frac{1}{z-a} - \frac{a}{(z-a)^2} - \frac{1}{(z+a)^2} - \frac{a}{(z+a)^2} \right] \quad (1.14)$$

Avec  $A$  la constante de Hamaker pour le système particule-surface-dans un liquide. Celle-ci est de l'ordre de  $-1.10^{-20}$  J pour un système représentatif du notre, dans de l'eau.

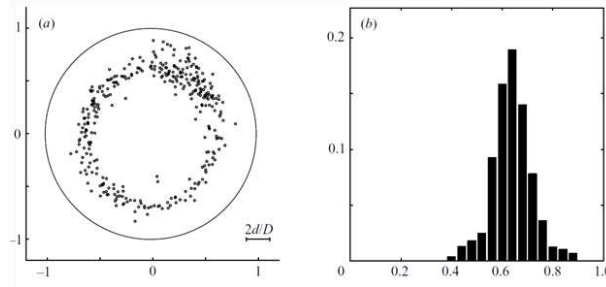
Nous discuterons l'impact de ces interactions dans le chapitre concernant la caractérisation de micro et nano-écoulements.

### 1.3.2 Migration sous cisaillement

Les forces étudiées au paragraphe précédent existent indépendamment d'un écoulement (voir la discussion sur la force électrovisqueuse en fin de cette partie). L'actionnement d'une particule dans un écoulement de cisaillement peut potentiellement faire émerger des forces supplémentaires sur une particule en translation. Nous nous proposons d'en dresser une liste dans le paragraphe qui suit, pour des objets sphériques et solides.

#### Force de lift d'origine inertielle

Si le domaine de la microfluidique s'est originellement porté sur le transport de fluides monophasiques, la complexification et l'intensification des procédés l'a peu à peu amené à englober le transport de matière « multi-phasique », au sens où une phase dispersée (chez nous solide) est transportée par une phase fluide. Considérant des tailles d'objets non négligeables devant l'extension du canal fluide, ces derniers ne suivent pas nécessairement les lignes de fluides et une migration latérale peut être observée. On peut situer l'origine de l'observation d'un tel phénomène avec la publication des travaux de Poiseuille en 1836. Ce dernier a en effet observé, travaillant sur les écoulements de sang à l'intérieur de capillaire, que les cellules sanguines migrent préférentiellement loin des parois de la canalisation et se concentrent vers le centre de celle-ci. Cet effet, revu par Fåhræus et Lindqvist

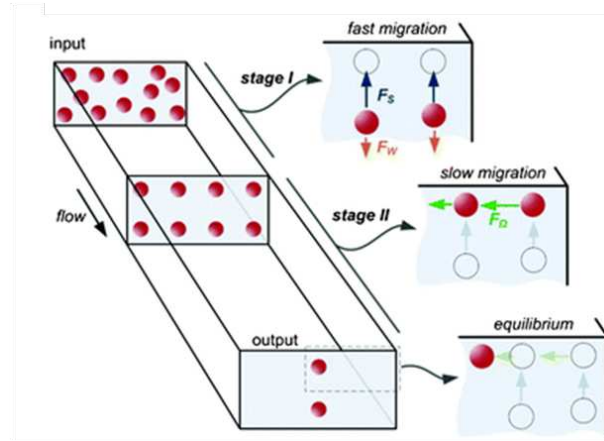


**FIGURE 1.5** – Figure extraite de [Matas et al., 2004b] illustrant l’accumulation de particules à une distance égale à  $0.6 D$  du centre d’un capillaire de diamètre  $D=8$  mm, et  $D/d=9$ , avec  $d$  le diamètre des particules utilisées. Le panneau a) représente les positions imagées de billes à l’intérieur du capillaire. Le panneau b) donne un histogramme expérimental des positions observée à la sortie du capillaire de longueur  $2.6$  m.

[Fåhræus and Lindqvist, 1931], implique la diminution de la résistance fluidique d’un écoulement sanguin dans un capillaire. On peut dater la première étude systématique et intensive de ce phénomène avec les travaux de Segré et Silberberg [Segre and Silberberg, 1962]. Travaillant sur les écoulements de billes (de diamètre peu inférieur à  $2$  mm dans un tube d’environ  $11$  mm de diamètre) de densité égale à celle du fluide porteur, ceux-ci ont démontré un schéma de migration complexe de la phase diluée, tendant à la fois à la déplétion des bords et du centre de la canalisation vers une position d’équilibre située à  $0,6$  fois le rayon du tube du centre de la canalisation. La figure 1.5 présente le résultat d’une expérience de Matas *et al.* dans des conditions illustrant cet effet.

Dès lors de nombreux travaux, tant théoriques qu’expérimentaux, ont eu pour objet la caractérisation de ce phénomène. L’analyse théorique de cet effet est rendue difficile par le fait qu’elle nécessite la résolution de l’équation de Navier-Stokes sans en négliger les termes inertiels. En effet, à la limite  $Re=0$ , les écoulements sont décrits par l’équation de Stokes, et aucune force de lift n’est possible, de par les propriétés de réversibilité qui la caractérisent [Bretherton, 1962] (voir par exemple l’expérience de pensée de [Guyon et al., 2001]). Les développements théoriques de Ho et Leal [Ho and Leal, 1974], Vasseur et Cox [Vasseur and Cox, 1976], Schonberg et Hinch [Schonberg and Hinch, 1989] ont permis de mieux appréhender la force de lift  $F_L$  à l’origine de la migration latérale de particules et mis en avant que celle-ci est de l’ordre de  $F_L \approx \rho U^2 d^4 / H^2$ , avec  $d=2a$  le diamètre de la particule,  $\rho$  la masse volumique du fluide et  $H$  la hauteur de la canalisation (ou diamètre du capillaire).

En plus de donner un ordre de grandeur, ces travaux ont mis en avant la dépendance spatiale de la force suivant l’axe perpendiculaire à l’écoulement jusqu’à  $Re=150$  [Asmolov, 1999]. Celle-ci est dépendante du nombre de Reynolds  $Re$  et la position préférentielle à  $\sim 0.6H/2$  du centre de la canalisation se déplace plus vers les bords pour de haut nombre de Reynolds [Matas et al., 2004a] [Matas et al., 2004b]. Cette position préférentielle semble être la combinaison de deux effets, le premier induit par le cisaillement amène la particule à migrer vers les parois. Proche de la paroi, l’écoulement autour de la particule induit une augmentation de pression qui tend à s’opposer à la migration de cisaillement. Concernant les écoulements microfluidiques, la migration inertielle est d’un grand intérêt puisqu’elle augure, entre autres, des applications telles que la filtration de particules sans membrane [Choi and Lee, 2010]. Récemment, les travaux de DiCarlo ont mis en avant deux lois d’échelles caractérisant la force de lift dans un microcanal [Di Carlo et al., 2009] [Di Carlo, 2009]. Proche de l’axe central du canal  $F_L \approx \rho U^2 d^3 / H$  alors que proche du mur  $F_L \approx \rho U^2 d^6 / H^4$ . Encore très récemment, cette ubiquité a été mise en avant [Bhattacharya et al., 2013] pour un capillaire de rayon  $R_0$  mais avec des lois quelques peu différentes, avec  $F_L \approx \frac{\rho U^2 a^3 r}{R_0(R_0-a)}$  alors que proche du mur  $F_L \approx \rho U^2 a^5 / R_0^3$ . Dans les deux cas, l’occurrence

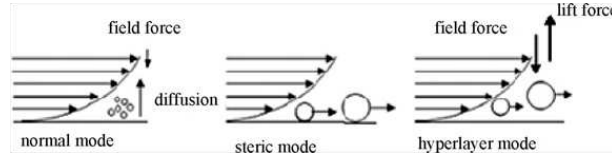


**FIGURE 1.6** – Illustration du phénomène de migration inertielle dans des canalisations rectangulaires tirée de [Zhou and Papautsky, 2013]. Pour des nombres de Reynolds modérés, les particules migrent dans un premier temps vers les parois sous l’influence des forces  $F_s$  et  $F_w$  (resp. force de cisaillement et de pression à la paroi). Puis, pour des temps plus longs, une force de moindre amplitude  $F_\Omega$  tend à éloigner les particules des murs latéraux. Il ne persiste alors plus que deux fines bandes de particules au milieu des faces haute et basse de la canalisation.

de deux lois d’échelle différentes reflète la combinaison de deux mécanismes physiques en opposition.

Dans une contribution récente, Zhou et Papautsky [Zhou and Papautsky, 2013] ont mené une étude expérimentale visant à la détermination de l’amplitude des forces de lift. Pour ce faire, ceux-ci ont ré-exprimé la force de lift comme  $F_L = \frac{4\rho C_L U_f^2 a^4}{H^2}$ . Une transformation simple leur permet alors de relier la longueur nécessaire à l’équilibrage des particules à l’intensité de la force et donc la valeur du coefficient  $C_L$  contenant à la fois le phénomène de migration dû au gradient de cisaillement mais aussi l’influence de la paroi. Ces derniers ont mis en évidence un mécanisme plus complexe et en deux temps à la migration de particules dans des canalisations rectangulaires (figure 1.6). Premièrement, la focalisation décrite plus tôt prend part suivant la plus petite dimension de la canalisation et conduit à la formation de deux zones d’accumulation proches des parois. Puis, les particules tendent à migrer parallèlement aux parois pour ne former au final que deux fines zones d’accumulation dans toute la canalisation. Cette effet est à mettre selon les auteurs sur le compte de la géométrie rectangulaire de la section de la canalisation, alors que les travaux théoriques se sont essentiellement intéressés aux géométries plane et cylindrique. Selon l’interprétation des auteurs, cet effet serait dû à l’entrée en compte d’une force d’un ordre de grandeur inférieur à la force de lift décrite plus tôt, et dont l’origine réside dans la rotation de la bille du type de celle décrite initialement par Rubinow et Keller [Rubinow and Keller, 1961].

Comme nous avons pu le décrire plus tôt, l’amplitude des forces de lift d’origine inertielle est donnée, selon les études par : de  $F_L \approx \rho U^2 a^4 / H^2$  ou encore  $F_L \approx \rho U^2 a^6 / H^4$  proche des parois selon DiCarlo. Un simple calcul d’ordre de grandeur nous conduit à une amplitude de l’ordre de  $10^{-20} N$  pour la première et  $10^{-27} N$  pour la seconde. Nous avons pris pour ce calcul l’exemple d’une particule de 100 nm de rayon dans un fluide de densité 1. Les traceurs utilisés dans nos expériences sont browniens, et l’amplitude de cette force de lift doit être comparée à la quantité  $\frac{k_B T}{a} \approx 10^{-14} N$ . Ainsi peut-on décemment négliger l’impact de cette force dans nos expériences.



**FIGURE 1.7** – Illustration des trois modes principaux de la FFF tirée de [Messaud et al., 2009]. De gauche à droite sont illustrés le mode normal, stérique et en "sur-couches" (hyperlayer). Dans les trois cas la migration globale dans le flux se fait de gauche à droite. Une force tend à plaquer les particules sur le mur du bas (basse vitesse de fluide). Dans le mode normal, pour des particules colloïdales browniennes, la diffusion s'oppose à la force de plaquage. Les petites particules sondent des plus hautes altitudes et sont éluées en premier. Dans le mode stérique, les objets à séparer sont de plus grande taille et la diffusion négligeable. Les particules de plus grands rayons ont leur centre plus haut dans la canalisation et moyennent des vitesses de fluide plus hautes. Elles sont éluées en premier. Dans le mode "hyperlayer" une force de lift tend à d'opposer à la force externe.

#### Force de lift d'origine « visqueuse »

La technique de Fractionnement par Couplage Flux-Force (FFE, en anglais "Field-Flow Fractionation") a été pensée il y a maintenant plus de 40 ans par C. Giddings de l'université d'Utah [Giddings, 1966]. Cette technique consiste en l'injection en tête d'un séparateur d'un petit volume de fluide contenant des espèces solides à séparer et/ou caractériser. Ces dernières sont ensuite entraînées par un flux laminaire vers la sortie du séparateur où elles sont détectées. Afin de conduire à une séparation, une force externe est appliquée suivant l'épaisseur du canal et tendant à accumuler les particules sur une des parois le composant (ainsi dénommée paroi d'accumulation). La migration étant fonction des propriétés des différentes espèces en solution, de même en est l'altitude d'équilibre au dessus de la paroi d'accumulation. Compte tenu de l'anisotropie de la vitesse du fluide entraînant les espèces, différentes altitudes entraînent différents temps d'élution à la sortie du séparateur et donc séparation des espèces (Cf. figure 1.7).

L'histoire du mode "hyperlayer" est pour nous de premier intérêt. Alors que la tendance dans la communauté était à l'augmentation de la vitesse du fluide pour diminuer les temps de rétention, il a été observé que les particules étaient éluées bien plus rapidement que prédit par la théorie décrivant les modes normaux et stériques. Il est alors apparu comme évident que les particules devaient avoir leur centre de masse situé bien plus haut au-dessus du mur d'accumulation et moyennaient donc des vitesses de fluide plus élevées. Ainsi, en 1979, Caldwell *et al.* ont-ils mis en avant qu'un mode anormal de rétention devait opérer<sup>4</sup> [Caldwell et al., 1979]. Alors est née le terme de fractionnement "hyperlayer" [Giddings, 1983]. Ces forces de lift étant mal comprises, l'utilisation de ce mode devenait relative et imposait une calibration avant toute séparation. C'est dans ce contexte, que P.S Williams, alors post-doctorant chez C. Giddings, s'est attaché à donner une expression empirique cette force de lift tendant à éloigner les particules de la paroi d'accumulation [Williams et al., 1992] [Williams et al., 1994] [Williams et al., 1996]. Aussi, ayant démontré l'impossibilité d'interpréter cette force comme résultant de la migration d'origine inertielle décrite plus tôt, ces derniers ont-ils proposé un modèle de force empirique telle que l'amplitude de la force tendant à éloigner la particule de la paroi est donnée par :

$$F_W = C \frac{a^3 \mu \dot{\gamma}_W}{z - a} = 4C \frac{a^3 \mu v_0}{H(z - a)} \quad (1.15)$$

Où C est une constante,  $a$  le rayon de la particule,  $\dot{\gamma}_W$  le taux de cisaillement à la paroi,  $z$  l'altitude de la

<sup>4</sup>Pour ne citer que le titre de leur publication : *Observations on anomalous retention in steric field-flow fractionation.*

particule,  $v_0$  la vitesse au centre de la canalisation et  $H$  sa hauteur. Ainsi cette force diffère fortement de celle d'origine inertielle. Comme discuté par les auteurs, la dépendance au premier ordre de  $F_W$  en  $\dot{\gamma}_W$  suggère que cette force est d'origine visqueuse et peut être liée à un phénomène de lubrification. Toutefois ceux-ci font aussi remarquer des arguments très généraux d'hydrodynamiques interdisent de telles forces en direction perpendiculaire à la paroi. Malgré le caractère *non physique* de cette force, depuis sa découverte au début des années 90, les auteurs ne l'ont jamais remise en cause, et n'ont cessé d'en prouver l'existence et de donner la variation du coefficient empirique  $C$  en fonction de conditions telles que la force ionique du milieu ou encore sa viscosité ainsi que son pH. Aussi ont-ils mis en avant que cet effet était majoritaire devant les forces de lift électrocinétique<sup>5</sup> ou encore les forces d'interactions électrostatiques avec la surface [Williams et al., 1996]. Toutefois, la formule empirique 1.15 a été montrée comme adéquate pour une gamme limitée de viscosité, inférieures à  $2 \cdot 10^{-3}$  Pa.s. Pour des viscosités supérieures, les dépendances en terme de taille de particules, cisaillement et distance au bord semblent moins bien établies. Initialement dérivée pour des particules soumises à un champ de gravitation, l'opposition de la force de lift à la paroi de Williams et de la force de sédimentation donne lieu à l'apparition d'une position d'équilibre donnée par :

$$z_{eq} = \frac{3C\mu v_0}{\pi\Delta\rho gH} + a \quad (1.16)$$

Où  $\Delta\rho$  caractérise la différence de masse volumique entre particule et solvant et  $g$  et l'accélération de pesanteur (ou alternativement est égale à l'accélération centrifuge pour un système en rotation). Janca *et al.* [Janca and Stejskal, 2009] ont ainsi montré que cette expression n'est pas physiquement acceptable puisqu'elle conduit à la divergence linéaire en  $v_0$  de la position d'équilibre. Aussi ont-ils proposé de remplacer  $\dot{\gamma}_W$  dans 1.15 par l'expression  $z$  dépendante du taux de cisaillement dans un écoulement de Poiseuille, soit :

$$\dot{\gamma}(z) = \frac{4v_0}{H^2} (H - 2z) \quad (1.17)$$

Toutefois, ces derniers ont aussi montré que l'introduction d'une telle expression avait pour effet de rendre  $C$  dépendant de  $v_0$  ce qui renforce encore l'aspect approximatif de l'expression empirique de cette force.

Ainsi Williams *et al.* ont-ils proposé une force empirique d'origine très discutable mais dont l'existence peut-être considérée comme expérimentalement avérée. Des approximations résident encore dans l'expression de cette dernière compte tenu de la dépendance relativement forte du coefficient  $C$  aux conditions telles que la viscosité ou encore la vitesse du fluide. Toutefois, de par sa divergence au bord, cette force ne peut-être négligée quelle-que-soit la taille de la particule en migration.

### Force de lift électrocinétique

La plupart des surfaces solides mises en contact d'un liquide polaire deviennent spontanément chargée. L'interaction électrostatique amène un excès de contre-ions à cet interface, formalisé par le modèle de la double couche de Stern-Gouy-Chapman introduite plus tôt. Ainsi, deux particules solides, immergées dans un liquide peuvent interagir via plusieurs types d'interactions 1) une interaction répulsive de très courte portée (ou répulsion de Born), 2) l'interaction de Van der Waals due aux interactions dipolaires des charges des deux surfaces ou encore 3) une interaction électrique due au recouvrement des couches de Debye des deux entités. Ces deux dernières interactions sont insérées dans la théorie DVLO décrite

---

<sup>5</sup>Nous reviendrons au paragraphe suivant sur cet effet



plus tôt. Toutefois, en présence d'un écoulement, ces forces doivent être quelque peu revues. Dans une telle situation s'opère un couplage entre les équations décrivant les interactions électriques et celles décrivant l'hydrodynamique du problème, qui conduit notamment à l'augmentation de la force de friction tangentielle, mais aussi et surtout, l'apparition d'une force de lift tendant à éloigner les deux surfaces solides. Ce phénomène est baptisé interaction électrovisqueuse.

La partie qui suit a pour but d'introduire quelque peu le phénomène. Toutefois, notons dès à présent que ce phénomène et son amplitude est sujet à controverse scientifique depuis sa révélation expérimentale à la fin des années 1980. Le haut degré de raffinement théorique que nécessite sa description ajouté au fait que cet effet n'a été que récemment porté à notre connaissance, nous confine ici à ne porter qu'un œil observateur sur le phénomène et en aucun cas un œil critique. Nous tâcherons ici de donner une description, qui apparaîtra peut être minimaliste, mais nous servira par la suite pour l'interprétation des résultats.

L'origine de l'interaction électrovisqueuse entre deux surfaces chargées remonte à une expérience de B. Alexander et D.C Prieve [Alexander and Prieve, 1987]. Celle-ci consistait en l'observation de particules de  $9\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre migrant dans un écoulement au dessus d'une surface chargée et a donné lieu à la construction d'une première théorie basée sur l'expression de fonction de courant<sup>6</sup>. L'idée sous-jacente initiale tendait à la mise en évidence d'interactions entre surfaces en s'affranchissant du protocole expérimental d'Israelachvili [Israelachvili and Adams, 1978] pour mesurer l'interaction entre deux cylindres de mica, en réduisant la taille des particules étudiées à quelques microns. Cette expérience a été reprise par Bike Lazarro et Prieve quelques années plus tard et la théorie initialement donnée raffinée [Bike et al., 1995] [Bike and Prieve, 1995]. Afin de mesurer une interaction particule-surface, l'idée ingénieuse mise en place par les auteurs consiste à mesurer la distribution d'équilibre  $p(h)$  donnant la probabilité pour que la distance séparant les deux surfaces soit égale à  $h$ . Cette probabilité étant connue, il est alors possible d'invoquer le fait qu'elle répond à la distribution d'équilibre de Boltzmann telle que

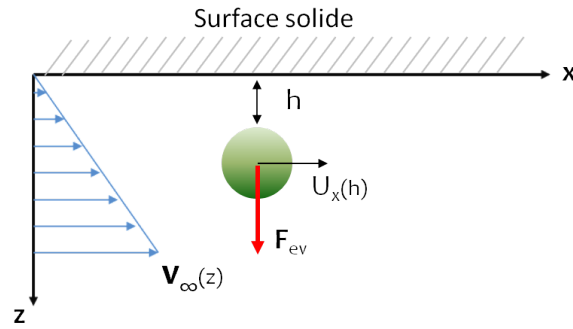
$$p(h) = A \exp(-\Phi(h)/k_B T) \quad (1.18)$$

Avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température, et  $\Phi(h)$  le potentiel d'interaction particule-surface. Et il est alors possible de mesurer  $\Phi(h)$  par simple inversion. Considérant que les potentiels d'interaction sont de portée inférieure au micron, cette mesure est inaccessible par simple observation au microscope optique. Le subterfuge trouvé par les auteurs consiste alors à faire migrer la particule dans un écoulement et d'observer sa vitesse. Cette dernière étant monotone avec  $h$ <sup>7</sup>, il est alors possible de connaître la distance particule-paroi. La géométrie de l'expérience est rappelée dans la figure 1.8.

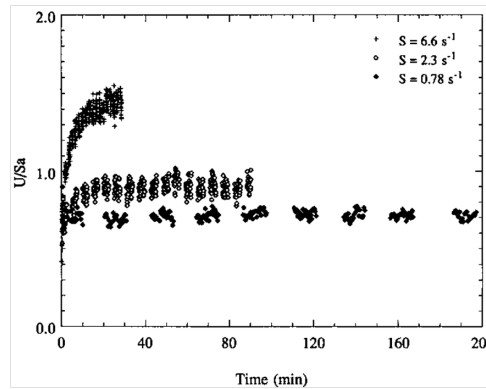
La figure 1.9 présente un des résultats donnés dans la publication [Bike et al., 1995] représentant la vitesse de migration de sphère de  $10\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre dans une solution de glycérol pur en fonction du temps après mise en actionnement du fluide et selon la direction de l'écoulement. Selon leurs notations, la vitesse de la bille  $U$  est normalisée sur le produit du taux de cisaillement  $S$  multiplié le rayon des billes  $a$ . Si l'on ne suppose pas de migration induite par la force électrovisqueuse, l'équilibre en place entre la force de flottaison et l'interaction électrostatique (DVLO) à la paroi conduit à une distance d'équilibre d'environ  $h \sim 300\text{ nm}$  et une vitesse de migration normée  $U/Sa$  sensiblement égale à 0.7

<sup>6</sup>Notons que les prémices de cet effet avait été donnés dans une note antérieure à Science [Prieve and Alexander, 1986]

<sup>7</sup>Et ce même après prise en compte des facteurs correctifs liés à l'interaction hydrodynamique bille paroi. Nous reviendrons en détail sur ce point.



**FIGURE 1.8** – Illustration du schéma expérimental mis en place par Bike *et al.* [Bike et al., 1995] afin de révéler l'amplitude de la force électrovisqueuse. Des billes de polystyrène (de diamètre 5 et 10  $\mu\text{m}$ ) sont mises au contact d'une paroi de verre en utilisant un fluide plus dense que les billes qui sont alors soumises, sans écoulement, à la combinaison poussée d'Archimède et poids ainsi qu'à l'interaction électrostatique avec la paroi. La distance  $h$  de séparation peut être déduite de la vitesse des billes actionnées selon la direction  $x$  par un écoulement laminaire généré par une chute de pression entre l'entrée et la sortie de la canalisation.



**FIGURE 1.9** – Résultats expérimentaux obtenus par Bike *et al.* tirés de [Bike et al., 1995]. La courbe représentée donne la vitesse en fonction du temps de billes ( $a = 10 \mu\text{m}$ ) migrant proche d'une surface de verre dans du glycérol pur pour plusieurs taux de cisaillement. Le fait que les points apparaissent sous forme de nuages groupés provient de limitations expérimentales et du temps nécessaire pour changer la plaque photographique sur laquelle les billes sont imagées.

<sup>8</sup>. Cette valeur est observée pour la plus basse valeur du taux de cisaillement imposée ( $S = 0.78 \text{ s}^{-1}$ ). Toutefois pour les valeurs supérieures de  $S$ , la vitesse des billes croît en fonction du temps jusqu'à atteindre une valeur plateau, d'autant plus grande que l'est  $S$ . Cet effet permet de mettre en évidence la présence d'une force, générée pour des valeurs de vitesse d'écoulement suffisante, et qui tend à éloigner les particules de la paroi.

L'utilisation de différentes solutions permet aux auteurs d'affirmer que cette force dépend à la fois de la viscosité du fluide porteur mais aussi de sa force ionique. Cet effet est d'autant plus important que le sont la viscosité et la vitesse du fluide, et diminue avec sa conductivité et donc avec la présence d'ions.

Depuis l'expérience originelle de 1987, nombreuses ont été les théories avancées pour expliquer cette migration loin de la surface. La première tentative remonte à 1990 [Bike and Prieve, 1990]. Ceux-ci ont

<sup>8</sup>Et non pas 1 du fait des interactions hydrodynamiques bille-paroi.

### 1.3. Dynamique de particules proche d'une paroi : forces transverses

ainsi avancé que la force de lift électrovisqueuse était d'amplitude donnée par :

$$F_{ev} = 0.3840\pi\epsilon^3 \left( \frac{U\zeta}{K} \right)^2 \frac{a}{h^3} \quad (1.19)$$

où  $\epsilon$  est la permittivité du milieu,  $U$  la vitesse de la particule,  $\zeta$  le potentiel de surface de la particule et de la paroi (supposés égaux), et  $K$  est la conductivité du milieu. Cette théorie, valable dans la région  $\lambda_D \ll h \ll a$  ayant été démontrée d'amplitude insuffisante pour expliquer les données expérimentales, la même équipe l'a revue pour parvenir à l'expression suivante, valide dans le domaine  $h \geq a$  :

$$F_{ev} = \frac{27}{16}\pi\epsilon^2 \left( \frac{U}{K} \right)^2 (\zeta_b + 2\zeta_p) \zeta_b \frac{a^2}{h^4} \quad (1.20)$$

$p$  et  $b$  indiquant respectivement la paroi et la bille. Ces deux lois reposent sur des pré-requis forts qui sont que la particule est en translation simple, mais surtout, celles-ci ne sont valides que pour un nombre de Péclet  $Pe = Ua/D$  faible, avec  $D$  le coefficient de diffusion des ions en solution. Aussi leur solution impose que la description en double couche des ions autour des surfaces de la particule et de la paroi sont toujours valides, soit qu'elles répondent toujours à la description d'équilibre (Cf. figure 1.4). La force résultante provient de l'utilisation d'un terme supplémentaire dans le tenseur des contraintes du fluide, qui en plus de contenir les termes décrivant un fluide newtonien non chargé, contient aussi le tenseur des contraintes de Maxwell pour la description du caractère ionique du fluide, soit :

$$\sigma = -p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{v} + (\nabla\mathbf{v})^t) + \frac{\epsilon}{4\pi} \left( \mathbf{E}\mathbf{E} - \frac{E^2}{2}\mathbf{I} \right) \quad (1.21)$$

Avec  $\mathbf{I}$  la matrice identité,  $\mu$  la viscosité du fluide,  $\mathbf{v}$  sa vitesse et  $\mathbf{E}$  le champ électrique.

Pour expliquer cette relation constitutive, où la contrainte est liée au déplacement du fluide par la viscosité mais aussi au champ électrique qui confine le mouvement des charges du liquide, il faut revenir aux équations Navier-Stokes combinées aux lois de l'électrostatique. Formellement, la résolution *complète* du problème requiert de lever la limitation d'équilibre des distributions de charges dans les couches de Debye des surfaces solides du problème [Cox, 1997] [Warszyński et al., 1998]. Soit l'équation de convection-diffusion pour chacun des ions (indités  $i$ ) :

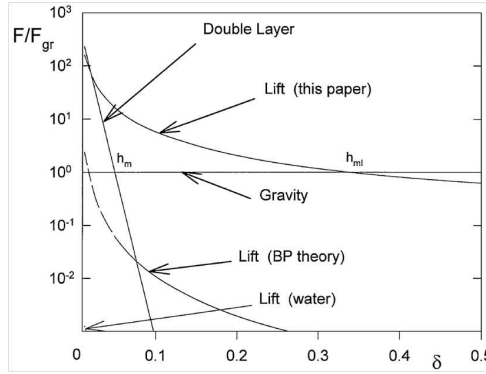
$$\nabla \left( D_i \nabla n_i + n_i \frac{z_i e}{k_B T} D_i \nabla \Psi - n_i \mathbf{v} \right) = \frac{\partial n_i}{\partial t} \quad (1.22)$$

Où  $n_i$  le nombre d'ions  $i$  par unité de volume,  $D_i$  correspond au coefficient de diffusion de l'ion  $i$ ,  $z_i e$  est sa charge,  $\mathbf{v}$  est la vitesse du fluide,  $\Psi$  est le potentiel électrique. Ce dernier doit satisfaire à l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\nabla^2 \Psi = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (1.23)$$

Avec  $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$  la permittivité du milieu,  $\epsilon_0$  celle du vide, et  $\epsilon_r$  la permittivité relative du milieu.  $\rho = \sum_i n_i z_i e$  correspond à la densité de charge dans le liquide. La vitesse du fluide (et des ions) est quant à elle donnée par l'équation de Stokes (l'inertie est négligée) avec un terme de force externe qu'impose le champ électrique créé par la non homogénéité des distributions de charge :

$$\mu \nabla^2 \mathbf{v} - \nabla p = \rho \nabla \Psi \quad (1.24)$$



**FIGURE 1.10** – Figure représentant le ratio des forces électrovisqueuses et de répulsion électrostatique sur la force de gravité en fonction de la distance normée  $\delta = h/a$  à la paroi et tirée de [Warszyński and van de Ven, 2000]. Les paramètres utilisés sont donnés dans le texte. Les forces de lift électrovisqueuses sont données pour deux modèles et deux liquides. Les positions  $h_{ml}$  et  $h_m$  sont les positions les plus probables correspondant à une somme des forces nulles sur la particule, en présence ou non d'un écoulement.

Sous la condition de continuité pour un fluide incompressible donnée par  $\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$ . Après résolution de 1.22, 1.23 et 1.24 tout en respectant les conditions aux bords des surfaces et à l'infini, la force peut être retrouvée en intégrant les forces de contraintes normales au bord de la particule via l'utilisation de l'expression de tenseur donnée en 1.21. Si l'on fait le décompte, les équations couplées précédentes régissent trois variables scalaires pour la description de la vitesse, une pour la pression, une pour le potentiel, une pour la densité de charge, et  $i$  pour les concentration ioniques. Soit un minimum de 8 variables dans le cas où deux ions de charge opposée sont en présence... Dans sa publication [Cox, 1997] R.G Cox a donné un résultat reproduisant l'amplitude des forces expérimentalement observées sous la condition de petit nombre de Péclet pour un cylindre. Cette démonstration fait depuis référence dans le domaine. Dans notre cas précis, concernant une sphère libre dans un écoulement, la contribution de Warsinski [Warszyński and van de Ven, 2000] semble parmi les plus adaptées. Celle-ci peut s'exprimer sous la forme :

$$F_{ev} = A \frac{\epsilon_0 \epsilon \pi \lambda_D^2}{D^2} \left( \frac{k_B T}{q} \right)^2 \frac{V^2 a^2}{h^2} + B \frac{\epsilon_0 \epsilon \pi \lambda_D^4}{D^2} \left( \frac{k_B T}{q} \right)^2 \frac{V^2 a}{h^3} \quad (1.25)$$

où l'on a considéré que deux ions de charge opposée  $q$  égale et de même coefficient de diffusion  $D$ .  $A$  et  $B$  sont des fonctions des coefficients de diffusion des espèces ioniques et des potentiels de surfaces, qui dans nos mains et considérant des potentiels de surface de 50 mV sont de l'ordre de l'unité. La figure 1.10 illustre le ratio de cette force sur la force de gravité en fonction de  $\delta = h/a$ , la distance au bord normée. Cette application vaut pour des sphères de 5  $\mu\text{m}$  de rayon, dans du glycérol pur (de conductivité 0.7  $\mu\text{S/m}$ ), des potentiels zêta de la bille et des parois égaux à 50 mV, des ions monovalents et de coefficient de diffusion  $D = 2.5 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $a/\lambda_D = 145$ ,  $\epsilon = 42.6\epsilon_0$ , et un taux de cisaillement de  $6.6 \text{ s}^{-1}$ . Cette figure, extraite de [Warszyński and van de Ven, 2000], présente également la force issue de la théorie de Bike et Prieve [Bike and Prieve, 1995] (courbe BP) ainsi que la force de répulsion électrostatique due au recouvrement des couches de Debye des surfaces solides (courbe Double layer). Afin de montrer l'effet drastique de la conductivité et de la viscosité, les auteurs ont aussi représenté l'évaluation de leur force dans de l'eau (de conductivité 0.5 mS/m). Des ces courbes transparaît clairement le fait que la force électrovisqueuse domine dans les conditions de haute viscosité et de basse conductivité. Dans un milieu de plus haute conductivité, cette force apparaît comme négligeable devant les deux autres. Aussi les auteurs mettent-ils en avant que la force issue du calcul de Bike et Prieve semble sous-évaluée (l'argument le plus fort en ce sens provenant toutefois de l'expérience).

Cette figure présente un cas assez éloigné de celui qui nous concernera par la suite. En effet, si l'on mène une application numérique à l'aide de la formule 1.25, pour une bille de rayon  $a=100$  nm distante de  $a$  d'une paroi et s'écoulant à une vitesse de  $100 \mu\text{m.s}^{-1}$ , avec une couche de Debye de l'ordre de 1 nm, nous obtenons une force de l'ordre de  $10^{-19}$  N et le deuxième terme de 1.25 est négligeable dû à sa dépendance en  $\lambda_D^4$ . Soit encore une fois une force qui semble négligeable devant l'agitation thermique considérant la taille des particules que ainsi que l'épaisseur de la couche de Debye caractéristiques dans nos applications. On note plusieurs contributions plus récentes sur la force électrovisqueuse [Chun and Ladd, 2004] [Tabatabaei et al., 2006]. Toutefois, la première concerne l'interaction entre deux sphères, et les deux suivantes ont pour objet le mouvement d'un cylindre et d'une sphère en translation au dessus d'une paroi sans écoulement externe du fluide, et ne correspondent pas à notre situation expérimentale. Les contributions plus récentes de Schnitzer et Yariv [Yariv et al., 2011] [Schnitzer et al., 2012] vont dans le sens d'une sous évaluation chronique de la force par les théories passées, toutefois celles-ci nous sont restées obscures.

Au demeurant, la force l'effet de la force de lift électrovisqueuse s'exerçant sur une particule chargée au dessus d'une paroi dans un liquide ionique est un fait expérimentalement avéré. Toutefois, la forte décroissance de l'amplitude cette dernière avec la force ionique du liquide, sa dépendance à la taille des traceurs, n'augure pas un fort effet de celle-ci dans notre étude. Nous discuterons cette affirmation au regard des résultats expérimentaux.

## 1.4 Séparation par taille de molécules d'ADN

Les parties qui précèdent nous ont permis d'introduire quelques techniques permettant la caractérisation d'écoulements microfluidiques. Aussi avons-nous passé en revue différentes forces transverses s'exerçant sur des objets sphériques solides dans un écoulement de cisaillement et/ou au voisinage d'une surface chargée. Bien sûr, le transport d'ADN dans des écoulements n'est pas libre de forces transverses. C'est d'ailleurs un sujet intense de recherche (notamment de modélisation) récemment revu par Graham [Graham, 2011]. Toutefois, il nous a semblé plus judicieux de discuter ces effets au cœur du chapitre expérimental afin d'enrichir les résultats. Nous souhaitons toutefois ici introduire quelques paramètres physiques nécessaires à la description de la molécule d'ADN, et notamment le concept de *taille* pour des molécules polymériques. Nous commencerons ainsi cette partie en introduisant les paramètres de longueur de persistance et de rayon de giration. Nous tâcherons par la suite de brièvement introduire le transport par électrophorèse de cette molécule, et décrirons qualitativement le phénomène de séparation sur gel. Nous terminerons ensuite cette partie par la donnée de quelques méthodes de séparation alternatives, notamment celles permettant une séparation sans matrice.

### 1.4.1 Taille d'un polymère

L'ADN, acronyme d'Acide DésoxyriboNucléique, est une chaîne d'acide nucléiques support de l'information du vivant. Elle consiste en quatre blocs de base que sont l'Adénine (A), la Guanine (G), la Thymine (T) et la Cytosine (C). Elle existe essentiellement sous sa forme de double hélice, découverte il y a soixante ans par Watson et Crick, [Watson and Crick, 1953], et consiste en l'appariement de deux brins par des interactions spécifiques A-T et G-C. L'enchaînement de ces monomères constitue un *code* source pour la synthèse des protéines, selon le dogme central de la biologie, bien que des résultats récents laissent à penser qu'il existe une certaine marge dans l'interprétation des plans contenus

dans le codage des gènes [Pal et al., 2011]. L'aspect pluridisciplinaire de la biologie tient pour partie de l'intérêt qu'a suscité cette molécule dans la communauté des chercheurs [Schrodinger, 1992]. À titre d'exemple, on pourra citer que la découverte de la structure par Watson et Crick a été permise par l'interprétation de clichés de cristallographie par rayons X de la molécule. Les biologistes ont très tôt réalisé que la lecture des gènes serait une étape clef dans la compréhension des mécanismes du vivant, et la poursuite de ce paradigme a abouti à l'émergence de la biologie moléculaire. Mais alors, comment procéder à la lecture du matériel génétique ? Utilisant des outils aujourd'hui conventionnels de la biologie moléculaire, à savoir la modification de l'ADN, son amplification, et la séparation par taille, deux méthodes historiques de séquençage génomique ont été développées, l'une par Maxam et Gilbert à Harvard [Maxam and Gilbert, 1977], l'autre par Sanger à Cambridge [Sanger et al., 1977]. Bien que les deux équipes aient partagé le prix Nobel de chimie de 1980, c'est le procédé Sanger qui a été préféré et s'impose aujourd'hui comme méthode standard pour le séquençage, notamment pour son industrialisation.

Comme plus tôt mentionné, les procédés de séquençage reposent sur une étape de séparation par taille. Nous discuterons dans le passage suivant de la définition physique de ce paramètre pour l'ADN. On remarquera que les expressions qui seront données sont valables pour les polymères libres, non confinés, si bien que les la *forme* des molécules n'est dictée que par la maximisation de leur entropie conformationnelle. La lecture du code contenu sur une molécule sous forme de pelote est difficilement réalisable. Notons que le paragraphe suivant est librement inspiré de la revue de Reisner 2012 [Reisner et al., 2012], qui traite plus spécialement de la manipulation conformationnelle d'ADN avec les outils micro- et nano-fluidiques modernes.

### Longueur de contour et longueur de persistance

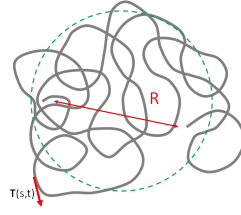
Sous sa forme en double brin, l'ADN peut être vu comme un polymère issu de l'enchaînement de blocs constitutifs que sont les paires appariées de bases nucléotidiques. Dans son état hydraté double brin (hélice B), l'espacement entre deux bases consécutives est de 0.34 nm. La longueur de contour  $L_c$ , correspond à l'idée de *taille* la plus simple d'une molécule d'ADN. Elle correspond à la longueur bout à bout de la molécule soit  $L_c = N_{bp} * 0.34$  nm. Considérant que le génome humain est constitué de  $N_p = 3.10^9$  paires de bases (3 Gbp), qu'il existe deux copies de ce génome dans chaque cellules (6 Gbp) implique qu'environ 2 m linéaire d'ADN sont condensés au sein de chacune d'entre elles.

Sachant que 2 m linéaire d'ADN sont présents dans chaque cellule humaine, il convient d'introduire de la flexibilité pour permettre sa compaction dans des volumes de  $\sim 10 \mu m^3$ <sup>9</sup>. Cette notion de flexibilité est liée à la grandeur caractéristique dite de longueur de persistance. Cette dernière définit la longueur au bout de laquelle la corrélation sur le vecteur tangent au squelette de la molécule est perdu. En d'autres termes, cette longueur correspond à celle au delà de laquelle l'énergie d'agitation thermique suffit à *tordre* l'ADN. Si l'on définit un vecteur tangent  $\mathbf{T}(s, t)$  et une coordonnée  $s$  le long de la molécule, tel qu'illustré avec la figure 1.11, une définition plus formelle de la longueur de persistance ( $P$ ) est donnée par la fonction de corrélation sur  $\mathbf{T}(s, t)$  comme [Doi, 1988] :

$$\langle \mathbf{T}(s, t) \mathbf{T}(s', t) \rangle = \exp \left( - \frac{|s - s'|}{P} \right) \quad (1.26)$$

---

<sup>9</sup> Remarquons ici que cette vision reste naïve lorsque la condensation sous forme de chromatine via les histones est mise dans la balance.



**FIGURE 1.11** – Schéma illustrant la longueur bout à bout et le vecteur tangent  $\mathbf{T}(s, t)$  d'une chaîne de polymère.

Pour une molécule d'ADN dans une solution de force ionique supérieure à 10 mM,  $P \sim 50 \text{ nm}$ . Cette valeur cache toutefois certaines disparités. La première provenant du fait que les propriétés mécaniques locales de la molécules sont séquence-dépendantes. Aussi cette valeur ne doit-elle être vue que comme une valeur moyenne. Cette quantité est également dépendante de la concentration en ions du milieu. En effet, un abaissement de la force ionique conduit à un plus faible écrantage des interactions électrostatiques intra-chaîne et à une augmentation subséquente de la longueur de persistance. Ce paramètre est accessible expérimentalement et décrit par la théorie de Odijk, Skolnick et Fixman [Odijk, 1977] [Skolnick and Fixman, 1977]. Une formulation utile de ces théories a été donnée par [Baumann et al., 1997] :

$$P = P' + \frac{0.0324M}{I} nm \quad (1.27)$$

Avec  $I = \sum_i z_i^2 n_i$  la force ionique du milieu et  $P' \approx 50 \text{ nm}$ . Cette théorie a été récemment rediscutée, ce qui a amené à une nouvelle expression pour  $P$  [Dobrynin, 2006] :

$$P = 46.1 + \frac{1.9195M}{\sqrt{I}} nm \quad (1.28)$$

Dans les deux cas, l'écrantage des interactions électrostatiques conduit à une valeur seuil proche de 50 nm ce qui correspond à environ 150 paires de bases. Cette définition nous permet de classer l'ADN dans la classe des polymères semi-flexibles, pourvu que celui-ci soit de taille supérieure à  $\sim 1000 \text{ bp}$ , puisqu'alors la longueur de persistance est grande devant la taille du monomère, mais reste faible devant la longueur de contour.

### Longueur bout à bout

Ainsi la longueur de contour est-elle la caractéristique de taille la plus facilement accessible, puisqu'elle est la résultante du produit de la longueur d'un monomère par le degré de polymérisation du polymère. Toutefois, celle-ci ne correspond pas totalement à la taille *physique* d'un polymère en solution, qui tend à maximiser son entropie conformationnelle. La taille typique d'une chaîne linéaire peut ainsi être appréhendé par la notion de longueur bout à bout (formellement la distance moyenne entre les deux extrémités de la chaîne tel qu'illustré à l'aide de la figure 1.11). Une modélisation naïve mais puissante consiste à voir la chaîne d'ADN comme une marche aléatoire de  $N$  pas de longueur  $b$  dite longueur de Kuhn. Chaque pas est alors décrit par un vecteur  $\mathbf{r}_i$  tel que  $\langle \mathbf{r}_i \mathbf{r}_j \rangle = b^2 \delta_{ij}$  et la longueur bout à bout vaut  $\mathbf{R} = \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i$ . Cette vue amène au résultat :

$$\langle R^2 \rangle = \left\langle \left( \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i \right) \left( \sum_{j=1}^N \mathbf{r}_j \right) \right\rangle = b^2 N \quad (1.29)$$

Ce résultat est associé à une chaîne dite *idéale*. Considérant la décroissance sur la corrélation décrite plus tôt pour une chaîne semi-flexible, la moyenne du carré de la longueur bout à bout peut être exprimée de manière alternative :

$$\langle R^2 \rangle = \int_0^{L_c} ds \int_0^{L_c} ds' \langle \mathbf{T}(s, t) \mathbf{T}(s', t) \rangle = 2L_c P \left[ 1 - \frac{P}{L_c} \left( 1 - \exp\left(-\frac{L_c}{P}\right) \right) \right] \quad (1.30)$$

Cette équation admet deux limites données par  $L_c \gg P$  et  $L_c \ll P$ . Dans le premier cas,  $\langle R^2 \rangle \approx 2PL_c$  et correspond à une marche aléatoire de pas  $b = 2P$  par identification  $L_c = bN$  dans 1.29. Dans le cas  $L_c \ll P$  il vient  $\langle R^2 \rangle \approx L_c^2$ . La molécule consiste alors en un cylindre rigide.

Ces définitions comportent pour limitation de ne pas prendre en compte l'existence de répulsion entre monomères qui confère au polymère la caractéristique de chaîne auto-évitante. En d'autres termes, pour de longues chaînes, la probabilité d'interaction entre deux segments constitutifs augmente, et les modèles se doivent alors de prendre en compte un paramètre d'exclusion volumique. Ces considérations ont été entreprises par Flory ( Voir [Flory, 1953] ou alternativement [De Gennes, 1979] p 43). Considérant une chaîne constituée de  $N$  segments et d'extension caractéristique  $R$ , l'astuce de Flory consiste en l'ajout d'une contribution énergétique d'interaction de paire entre segments en plus d'une interaction élastique (liaison entre monomères), par l'intermédiaire de l'introduction d'un paramètre donnant le volume exclu associé à chaque monomère. La minimisation de l'énergie totale aboutit alors à une extension de la molécule donnée par le rayon de Flory  $R_F$

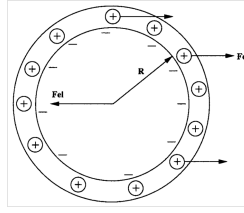
$$R_F \sim N^\nu \quad (1.31)$$

Avec  $\nu = 3/5$  à trois dimensions. Ainsi la prise en compte du volume exclu conduit à faire *gonfler* la taille caractéristique du polymère, puisque l'exposant  $\nu = 0.6 > 0.5$  caractérisant une chaîne idéale décrite par une marche aléatoire. Compte tenu de la facilité de repérer et de suivre des molécules d'ADN marquées à l'aide de sondes fluorescentes [Smith et al., 1996], il est intéressant de donner les relations liant coefficient de diffusion du centre de masse d'une molécule à son rayon. Il existe deux modèles théoriques majeurs de la physique des polymères, représentant les molécules comme des chaînes fantômes (pas de volume exclu) constituées de billes et de ressorts harmoniques [Doi, 1988]. Le premier d'entre eux est dû à Rouse [Rouse, 1953]. Pour ce dernier modèle, le coefficient de diffusion évolue suivant la loi  $D \sim L_c^{-1}$ . Ce modèle ne prend toutefois pas en compte les interactions hydrodynamiques entre segments, qui sont alors vus comme se mouvant sans entraîner le fluide environnant. Celui-ci est donc surtout adapté à la description de milieux denses, où l'écrantage hydrodynamique est important, comme dans un gel par exemple. Aussi préférera-t-on la description de Zimm [Zimm, 1956] pour un polymère en solution libre et non confiné. Dans le cadre de ce dernier, le coefficient de diffusion varie comme  $D \sim R_g^{-1}$ , avec  $R_g$  le rayon de giration de la molécule. Cette dernière quantité est donnée par la distance rms entre les segments de la molécule et son centre de masse. Soit pour une polymère composé de  $N$  segments localisés par  $\mathbf{r}_i$  :

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_G)^2 \rangle \quad (1.32)$$

avec  $\mathbf{R}_G = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i$  repérant le centre de masse de la molécule. Tout comme pour la longueur bout à bout,  $R_g \sim L_c^{3/5}$  selon le modèle de Flory.





**FIGURE 1.12** – Schéma représentant une sphère négativement chargée de rayon  $R > \lambda_D$  sous un actionnement par champ électrique.  $F_{el}$  représente la force exercée sur le nuage de contre-ions et sur la particule.

### 1.4.2 Électrophorèse, séparation sur gel et analogues technologiques

L'électrophorèse sur gel est la méthode historique pour la séparation de biomolécules. Notre but n'est pas ici d'en donner une description profonde, mais nous souhaitons toutefois donner des concepts clefs en commençant par l'impossibilité de séparer des molécules chargées selon leur taille en solution libre, mais surtout de décrire qualitativement les mécanismes de tamisage d'Ogston, de tri entropique, et surtout de reptation biaisée sans orientation. La description de ces mécanismes nous permettra alors d'introduire quelques analogues technologiques récents, permettant la séparation sur puce microfluidique.

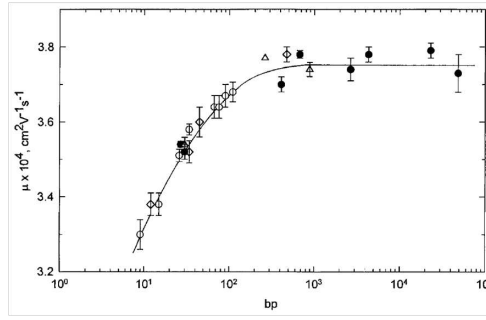
L'actionnement par électrophorèse est historiquement apparu comme l'unique moyen d'actionnement de biomolécules. Cette stratégie a donc naturellement été poursuivie dans le domaine des laboratoires sur puce. Il faut ajouter que, des arguments très généraux institutionnalisant l'analogie des modes d'actionnement par électrophorèse et hydrodynamique (nous reviendrons sur ce point) [Long et al., 1996] [Viovy, 2000], les puces actuelles sont opérantes suivant ces deux stratégies sans différence notable [Teclamarium et al., 2007] [Kenward and Slater, 2006]. Ainsi décidons-nous de revoir en premier lieu ce mode d'actionnement.

#### Électrophorèse en solution libre

Considérons ici une particule solide de rayon  $R$  telle qu'illustrée par figure 1.12 tirée de [Sartori et al., 2003] dans une solution ionique. Comme nous avons pu le décrire plus tôt, la charge de surface amène une inhomogénéité spatiale de la distribution ionique sur une dimension commensurable avec la longueur de Debye. Lorsqu'un champ électrique  $E$  est appliqué, celui-ci exerce une force à la fois sur la particule mais aussi le nuage de contre-ions l'entourant, les deux entités étant amenées à se mouvoir dans des directions opposées. Des solutions utiles à la description de ce problème peuvent être dérivées dans deux cas limites, selon les valeurs relatives caractérisant la taille de la particule et la longueur de Debye [Viovy, 2000].

Dans la limite  $\lambda_D \gg R$ , les contre-ions peuvent être considérés comme loin de la sphère et les deux entités comme en interaction faible. La mobilité électrophorétique peut être alors exprimée par la balance entre la force électrique appliquée sur la sphère de charge  $Q$ ,  $F_{el} = QE$  et la force de friction visqueuse de Stokes sur la sphère translatant à une vitesse  $v$  dans un fluide de viscosité  $\eta$ <sup>10</sup> :  $F_s = 6\pi\eta Rv$ . La particule a une vitesse limite alors donnée par  $v = \frac{QE}{6\pi\eta R}$ , correspondant à une mobilité  $\mu = v/E = Q/(6\pi\eta R)$  dépendante de la taille de la particule. La limite  $\lambda_D \ll R$  impose la résolution de l'équation de Navier Stokes pour l'écoulement avec le forçage externe imposé par le champ. Cette

<sup>10</sup>Nous modifions pour un temps nos notations pour ne pas avoir à réinventer une autre quantité que  $\mu$  pour indiquer la mobilité.



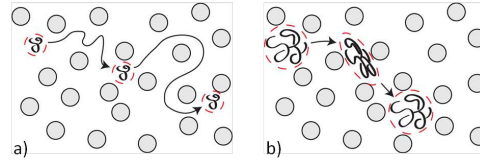
**FIGURE 1.13** – Évolution de la mobilité électrophorétique de brins d'ADN en fonction de leur taille, en solution de TAE (en échelle semi-logarithmique). Figure tirée de [Stellwagen et al., 1997]

approche conduit à une mobilité donnée par  $\mu = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta}$ ,  $\zeta$  étant le potentiel de surface de la particule. Cette mobilité est donc indépendante de la forme et de la taille de la particule. La description de molécules semi-flexibles sous actionnement électrophorétique nécessite l'ajout dans la description du paramètre longueur de persistance et de procéder à l'identification de trois régimes respectivement décrits par 1)  $P \gg \lambda \gg R_g$ , 2)  $R_g \gg P \gg \lambda_D$  et 3)  $P \gg R_g \gg \lambda$  [Desruisseaux et al., 2001]. Toutefois, et comme pour une particule sphérique, la mobilité n'est dépendante de la taille de la molécule que dans le cas 1)  $P \gg \lambda \gg R_g$  et varie alors comme  $\mu \sim \ln L_c$ . Pour les deux autres, aucune séparation en solution libre n'est possible. Ce constat est bien illustré par la figure 1.13 qui donne la mobilité de molécules d'ADN expérimentalement relevée dans un buffer TAE extraite de [Stellwagen et al., 1997]. Deux régimes sont clairement observables. De 0 à 400 paires de bases, la mobilité des brins croît de manière cohérente avec la loi d'échelle  $\mu \sim \ln L_c$  puis atteint un plateau pour les tailles supérieures.

Il est un modèle utile, bien que critiquable en certains cas, permettant de comprendre l'indépendance de la mobilité électrophorétique en fonction de la taille des chaînes : il s'agit du modèle de la force locale. Considérons une chaîne fantôme constituée de  $N$  segments de Kuhn de longueur  $l$  telle que la longueur de contour vaut alors  $L_c = Nl$ . Quand l'un d'entre eux subit une force électrique, le champ de vitesse induit est essentiellement dissipé par le mouvement des contre-ions dans la couche de Debye. En effet, contrairement aux interactions hydrodynamiques induites par une force *non électrique* qui décroissent en  $1/r$  où  $r$  définit la distance au point d'application de la force ponctuelle, le mouvement des contre-ions conduit à une décroissance bien plus rapide des interactions hydrodynamiques en électrophorèse, suivant  $(\lambda_D/r)^3$  [Long et al., 1996], si bien que les segments peuvent être traités indépendamment les uns des autres. La force électrophorétique totale suit alors  $F_{el} = NqE$  et la force de friction est alors donnée par  $F_s = N\xi$  avec  $q$  et  $\xi$  la charge et le coefficient de friction de chaque segment. Il s'en suit que la vitesse est alors donnée par  $v = qE/\xi$  et est indépendante de la taille  $N$  de la molécule.

### Séparation sur gel et analogues technologiques

Afin de parvenir à une séparation par taille de molécules d'ADN supérieures à  $\sim 400 \text{ bp}$  il est nécessaire d'utiliser une matrice comme support à la migration. Gels et matrices polymères enchevêtrés (électrophorèse en capillaire) sont communément utilisés pour la séparation de biomolécules. Les gels peuvent être des gels physiques (*e.g.* agarose) ou issus de la polymérisation chimique de monomères (*e.g.* polyacrylamide). Les matrices sont caractérisées par une taille de pore  $b$ , correspondant à l'espace libre entre les chaînes composant le gel. Les mécanismes de migration sont dictés par cette dimension caractéristique. Trois régimes (conduisant à une séparation en taille) sont communément



**FIGURE 1.14** – Schéma illustrant le transport de molécules dans des matrices désordonnées selon les régimes de tamisage d'Ogston a) et de rétention entropique b). Figure adaptée de [Dorfman et al., 2013]. Les disques simulent la présence d'obstacles dans les matrices de gel désordonnées. Les interstices (pores) entre ces obstacles sont d'extension typique  $b$ .

identifiés [Salieb-Beugelaar et al., 2009] [Viovy, 2000] selon 1)  $R_g < b$ , 2)  $R_g \sim b$  et 3)  $R_g > b$ . Ceux-ci sont respectivement qualifiés de tamisage d'Ogston, rétention entropique, et reptation biaisée sans orientation. Nous souhaitons ici qualitativement décrire chacun d'entre eux en leur associant quelques analogues microfluidiques. En effet, bien que ces théories aient été initialement démontrées pour décrire la migration de polyélectrolytes en matrices désordonnées, les développements technologiques récents peuvent souvent être vus comme leur adaptation à des matrices micro-fabriquées. En ce qui concerne la séparation sur puce, le lecteur trouvera une revue plus qu'exhaustive de K. Dorfman [Dorfman et al., 2013].

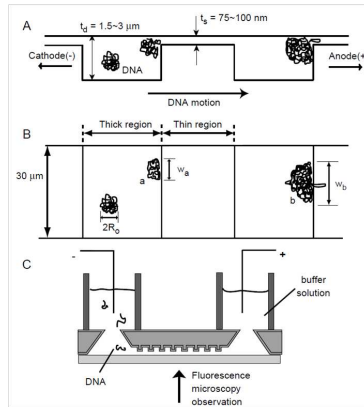
**Tamisage d'Ogston et rétention entropique** Le régime d'Ogston est observé lors de la migration de molécules caractérisées par des tailles bien inférieures à la taille des pores constitutifs de la matrice de séparation (resp.  $\sim 100$  et  $\sim 10$  nm pour les gels d'agarose et de polyacrylamide) comme le présente la figure 1.14 a) adaptée de [Dorfman et al., 2013]. Au cours de leur migration, les particules ne sont pas ou peu déformées et ont une mobilité dépendante de leur taille  $R$  et de la concentration  $c$  du gel support de la migration<sup>11</sup>. Ce mécanisme correspond alors tout à fait à l'idée commune d'une *filtration* et la mobilité d'une molécule est d'autant plus importante qu'elle laisse de *volume libre*  $f$  dans le pore où elle se trouve. Sa mobilité varie alors comme  $\frac{\mu}{\mu_0} = f$  où  $\mu_0$  est la mobilité de la particule en solution libre. Il existe autant d'expression du volume libre que de géométrie de pores. Dans le cas particulier d'une particule ponctuelle dans un réseau aléatoire de fibres Ogston a donné [Ogston, 1958] :

$$\frac{\mu(R, c)}{\mu(R, 0)} = \exp(-K(R)c) \quad (1.33)$$

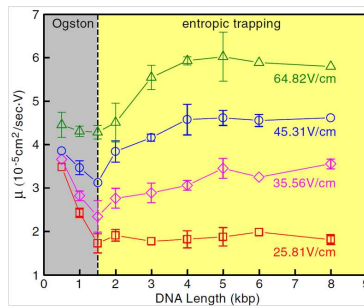
avec  $K(R) = R + R_{fiber}$  et  $R_{fiber}$  est une correction pour la taille des fibres.

Dans la limite  $R_g \sim b$ , le mécanisme de séparation est dit de *rétention entropique*. Celui-ci peut être vu comme un cas limite du tamisage d'Ogston. Comme illustré par la figure 1.14 b), l'hétérogénéité de la taille des pores conduit la molécule à parfois se déformer, et son passage se fait alors au prix d'une pénalité entropique. Dans les faits, une explication complète du mécanisme serait hors de propos. Toutefois nous souhaitons ici l'introduire qualitativement en regard d'une expérience. L'exemple emblématique de séparation par piégeage entropique correspond aux travaux de Han et Craighead publiés en 2000 [Han and Craighead, 2000] et apparaît sous la dénomination de matrice de pièges entropiques pour la séparation de longues molécules. Le système utilisé est schématisé dans la figure 1.15 tirée de leur publication. La théorie décrivant le fonctionnement du système a été donnée dans [Han et al., 1999]. Contrairement à l'idée commune de filtration, les molécules, actionnées à l'aide d'un champ électrique, sont d'autant plus rapides que leur rayon de gyration est important. En effet,

<sup>11</sup>La concentration du gel influe en effet sur la taille de ces pores constitutifs  $b$ . En règle générale,  $b$  diminue avec  $c$



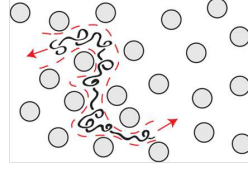
**FIGURE 1.15** – Schématisation d'un canal microfluidique pour la séparation de molécule selon le schéma de rétention entropique. Figure tirée de [Han and Craighead, 2000]. A) Coupe du système où l'on peut repérer les zones de haut et de bas confinement. B) Vue en projection du système. Selon les notations des auteurs  $R_0$  représente le rayon de gyration d'une molécule. Le panneau C) représente le système intégré en coupe, constitué de la matrice de pièges scellée sur une lame de silice fondue. Entrée et sortie sont connectées à des réservoirs possédant des électrodes permettant l'application d'un champ électrique.



**FIGURE 1.16** – Évolution de la mobilité de brins d'ADN dans un piège entropique pour plusieurs valeurs de l'amplitude du champ électrique tiré de [Fu et al., 2006]. Deux régimes sont observables. Pour  $N < 1.5$  kbp la mobilité décroît avec la taille (régime d'Ogston) alors qu'elle augmente pour des valeurs supérieures de  $N$ .

dans les régions profondes de la matrice, les brins d'ADN, faiblement confinés, sont sous forme de pelote statistique comme décrit plus tôt. Lors de leur passage dans la région de faible hauteur, les molécules sont amenées à se déformer et ce coût est d'autant plus important que la molécule est grande. Toutefois, le passage de la constriction est essentiellement déterminé par le nombre de brins à la frontière. Lorsque ceux-ci sont en nombre suffisant, la molécule est amenée à dépasser l'obstacle. La fréquence avec laquelle les monomères constitutifs sont au contact de cette frontière est d'autant plus grande que la molécule occupe un espace important dans la région profonde du piège. Les molécules de plus haut poids moléculaire sont alors amenées à migrer plus rapidement dans la canalisation.

Comme décrit plus tôt, la rétention entropique est un cas limite du tamisage d'Ogston. Aussi, pour un obstacle entropique de hauteur  $h$ , c'est le rapport  $R_g/h$  qui détermine la limite entre les deux mécanismes. Aussi a-t-il été démontré qu'une inversion de bandes était possible dans de tels systèmes. La figure 1.16 présente la mobilité électrophorétique de molécules dans une matrice de pièges entropique en fonction de la taille des molécules d'ADN selon [Fu et al., 2006] pour différentes amplitudes du champ électrique. Le piège est constitué de régions profondes de 325 nm de hauteur, et de régions fines de 73 nm. Comme démontré ici, la mobilité des molécules n'est pas monotone avec leur taille. Celle-ci est décroissante pour les entités de tailles inférieures à 1.5 kbp, et correspond donc à un phénomène de filtration d'Ogston, mais croît pour les molécules de tailles supérieures, qui migrent alors selon le



**FIGURE 1.17** – Schéma illustrant le régime de reptation biaisée tiré de [Dorfman et al., 2013]. La matrice du gel confine la chaîne d'ADN dans un *tube* de diamètre  $b$  (en rouge). L'avancée de la molécule se traduit par la création d'un bulbe en tête et la destruction d'un autre en bout de chaîne, et le tube est ainsi renouvelé.

schéma de la rétention entropique. Considérant le rayon de gyration d'un ADN double brin de 1500 bp, la transition entre les deux régimes intervient autour de  $R_g/h \sim 1$ .

**Reptation biaisée** Comme indiqué plus tôt, la procédure standard de séparation de molécules réside dans l'emploi d'un gel constitué de pores de taille  $b$ . On doit le concept de reptation à de Gennes [De Gennes, 1979] pour la description d'une chaîne confinée. Comme illustré par la figure 1.17 tirée de [Dorfman et al., 2013] la chaîne est vue comme serpentant dans les interstices avec un direction préférentielle colinéaire à celle du champ électrique appliqué. Toute la force de la physique de Gennes consiste entre autre en la décomposition en bulbes de la chaîne de polymères. Un bulbe se définit alors comme une entité renfermant  $N_K$  segments de Khun de longueur  $l$  à l'équilibre. Ceux-ci sont alors décrits par une statistique de la chaîne gaussienne à l'équilibre thermique et chacun d'entre eux peut être traité indépendamment des autres. La taille typique des bulbes est ainsi dictée par la taille des pores du gel  $b$ . On doit la théorie de la reptation biaisée à deux articles fondateurs [Lumpkin and Zimm, 1982] [Lerman and Frisch, 1982] complétés par Slater en 1985 [Slater and Noolandi, 1985]. La chaîne étant définie en  $N$  sous-bulbes de taille  $b$  contenant  $N_K = \left(\frac{b}{l}\right)^2$  segments de Khun, et repérés par des vecteurs  $\mathbf{r}_i$ , il vient que la force électrique appliquée sur la chaîne est donnée par la somme :

$$\mathbf{F}_{el} = \sum_{i=1}^{N_K} \frac{qE\mathbf{r}_i}{b} = \frac{QE}{L_c} \sum_{i=1}^{N_K} \mathbf{r}_i = \frac{QER}{L_c} \quad (1.34)$$

Avec  $\sum_{i=1}^{N_K} \mathbf{r}_i = \mathbf{R}$  le vecteur bout à bout de la chaîne, et  $Q$  sa charge globale. Si l'on choisi d'orienter le champ selon la direction arbitraire  $\mathbf{e}_x$  et l'on dénomme par  $R_x$  la projection du vecteur bout à bout il vient  $F_{el} = \frac{QE}{L_c} R_x$ . Cette force est balancée par la friction visqueuse proportionnelle à une vitesse curvilinéaire du tube donnée par  $F_f = v_{tube}\eta L_c$  et conduit ainsi à une vitesse donnée par :

$$v_{tube} = \mu_0 ER_x / L_c \quad (1.35)$$

où  $\mu_0 = Q/\eta L_c$  est la mobilité de la chaîne en solution. Le temps  $\tau_r = L_c / v_{tube} = L_c^2 / (\mu_0 ER_x)$  correspond ainsi au temps de renouvellement du tube, au bout duquel la chaîne s'est déplacée d'une distance  $R_x$ . Il vient alors que la vitesse de la molécule  $v_x$  dans la direction du champ peut être exprimée par

$$v_x = \frac{R_x}{\tau_r} = \mu_0 E \left( \frac{R_x}{L_c} \right)^2 \quad (1.36)$$

Soit encore que le ratio entre mobilité dans le gel sur la mobilité en solution est donnée par

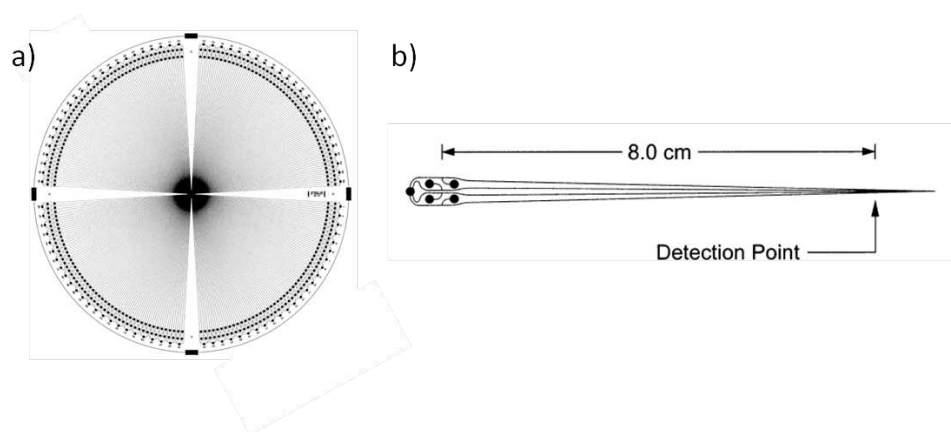
$$\frac{\mu}{\mu_0} = \left( \frac{R_x}{L} \right)^2 \quad (1.37)$$

Tout le résultat réside alors dans la donnée d'une expression pour  $R_x$ . Pour un champ électrique faible, on peut considérer que la distribution des bulbes est elle aussi donnée par une marche aléatoire, il vient alors que  $R_x \sim N^{1/2}$  et que la mobilité décroît avec la longueur de la chaîne comme  $N^{-1}$ . Cette valeur est valable pour des chaînes faiblement orientées. En effet, lorsque l'amplitude du champ croît, l'extension selon  $\mathbf{e}_x$  de la molécule devient comparable à  $L_c$  et conduit à une mobilité indépendante de la taille de la molécule que l'on peut exprimer comme  $\mu \sim N^0 E^1$ . ce régime correspond à la reptation biaisée avec orientation. Comparant les deux expressions pour la mobilité électrophorétique dans un gel, il vient qu'il existe, pour un champ donné, une taille critique pour les molécules, au-delà de laquelle celles-ci ne sont plus séparables :  $N^* \sim E^{-1}$ . Dans des conditions typiques de migration sur gel d'agarose, cette taille critique s'établit autour de 50 kbp. Compte-tenu de la croissance de  $N^*$  avec  $E$  il semble *a priori* possible de séparer de plus longues molécules en abaissant l'amplitude du champ. Toutefois, cette stratégie conduit à une augmentation de la durée de migration, et le bénéfice de l'augmentation de  $N^*$  se perd alors en diffusion des bandes, d'autant plus importante que la longue application du champ conduit à un échauffement du gel et peut modifier les propriétés de la solution tampon. Malgré la relative *simplicité* du modèle de la reptation biaisée, il est remarquable que celui-ci permet la description correcte des observations expérimentales.

Afin de dépasser la limitation de la taille maximale séparable, des stratégies d'électrophorèse par champ pulsé ont été développées. Nous ne souhaitons pas longuement développer ce sujet (Voir par exemple [Gardiner, 1991] [Viovy, 2000]) mais notons toutefois que la clef de cette technique réside en l'application séquentielle de champs de différentes orientations. Le mécanisme permettant la séparation repose alors sur la dynamique de réorientation des molécules dans le gel. Ces techniques permettent alors de rehausser la taille limite séparable par un facteur 100. Toutefois, celles-ci nécessitent un temps de migration de l'ordre de la journée. Remarquons aussi, que l'introduction de l'électrophorèse en capillaire a permis de considérablement améliorer les performances de l'électrophorèse sur gel [Carrilho, 2000]. Le large rapport surface sur volume de la géométrie en capillaire permet une meilleure dissipation de la chaleur et donc l'application de champ électrique plus important. Il est à noter qu'il est impossible d'insérer un gel dans un capillaire sans piéger des bulles, si bien que les solutions de polymère doivent être utilisées en tant que matrices. Il est à noter qu'il est difficile d'insérer un gel dans un capillaire sans piéger des bulles, aussi des matrices de polymères enchevêtrés ont-elles été introduites. La puissance de ce dernier outil et sa parallélisation a été d'un apport certain pour la réussite du séquençage du premier génome humain.

On remarquera que la miniaturisation des techniques de séparation sur gel a suscité un fort intérêt. Cette thématique a fait l'objet de nombreux travaux à l'émergence du concept de laboratoire sur puce. Aussi trouve-t-on dans la littérature des géométries permettant l'intensification des procédés sur des canaux microfabriqués comme montré dans la figure 1.18 tirée de [Emrich et al., 2002]. Ces systèmes intégrés sont aujourd'hui commercialisés. Toutefois, consistant en la seule miniaturisation des systèmes classiques, il ne répond pas à notre définition d'*analogues technologiques*.

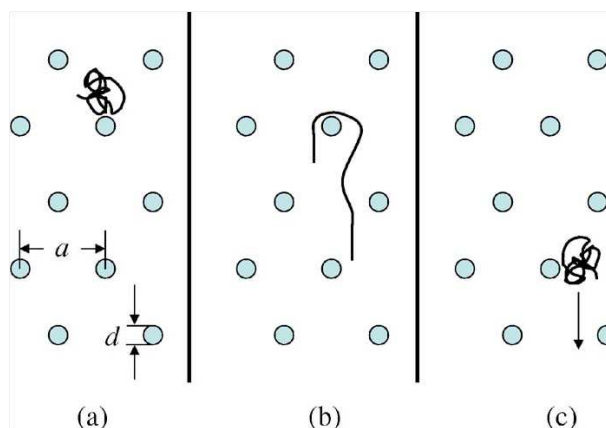
Les analogues technologiques de séparateurs sur gel, comme les nanop pièges entropiques présentés plus haut, sont apparus au début des années 1990 et sont aujourd'hui rassemblés sous le nom générique de gels artificiels. On peut lister trois motivations principales à l'origine de leur développement [Dorfman, 2010]. Comme nous l'avons décrit plus tôt, la taille relative entre les molécules à séparer et la taille des pores du gel détermine le régime de migration. Dans le cas de la reptation biaisée, il apparaît ainsi une taille limite au-delà de laquelle les molécules ne sont plus séparables. Cette limite est atteinte pour  $R_g \gg b$ . Considérant que les méthodes de structuration de la matière permettent de fabriquer,



**FIGURE 1.18** – Exemple d'intégration massive de 384 canaux de séparation sur plaquette de verre de 20 cm de diamètre. Figure tirée de [Emrich et al., 2002]. a) Géométrie globale des canaux. b) Géométrie d'un canal unique avec ses entrées auxiliaires pour l'introduction de l'échantillon

par des technologies standard de la photolithographie, des réseaux de pas commensurable ou supérieur à quelques centaines de nanomètres, il apparaît alors possible d'adapter à souhait la matrice de séparation pour la résolution d'une zone particulière du spectre de taille des molécules. En effet, alors que la taille des pores des gels d'agarose et de polyacrylamide sont difficilement ajustables et atteignent de valeurs plafonds au-delà desquelles le gel n'est plus stable, il est tout à fait envisageable de fabriquer des réseaux peu denses pour la séparation de molécules de grande taille. La deuxième motivation provient du fait que le désordre caractérisant les matrices chimiques ont pour effet d'augmenter la dispersion des vitesses moléculaires. Le contrôle des motifs composant les matrices artificielles peut potentiellement remédier à cette limitation. Enfin, l'organisation et le contrôle des réseaux facilitent la modélisation des processus physiques ayant trait à la séparation. Ces systèmes constituent alors des objets modèles pour le test des théories de la séparation sur gel, qui bien que donnant des lois d'échelle très satisfaisantes, restent peu quantitatives.

Les systèmes les plus représentatifs pour la séparation sur puce consistent en des matrices de plots, de diamètre allant quelques centaine de nanomètres à quelques microns. Les travaux fondateurs peuvent être assignés à Volkmuth et Austin en 1992 [Volkmuth and Austin, 1992]. Ceux-ci ont ouvert la voie à de nombreuses études dans le but de mettre en avant les conditions optimales de séparation et d'élaborer des modèles propres au transport dans ces milieux. Le développement d'un tel système composé de nanoplots a été au cœur du travail de thèse de Yannick Viero, ancien doctorant du LAAS [Viero et al., 2011b]. Le mécanisme à l'origine de la séparation est basé sur la collision des molécules contre les obstacles qui bloquent temporairement leur avancée. Comme illustré à l'aide de la figure 1.19. L'espace des phases correspondant aux conformations est vaste, et le mécanisme d'étirement et de désengagement se fait suivant plusieurs voies. Il existe toutefois deux collisions modèles, telles que la molécule est étirée non loin de la longueur de contour, suivant deux bras de chaque côté du plot sur lequel elles sont arrêtés ( Cf. b) de la figure 1.19 ). Par analogie avec les conformations adoptées, ces collisions ont été nommées collisions U et J. Afin d'expliquer ce mécanisme, le modèle de corde autour d'une poulie a été proposé [Randall and Doyle, 2006]. Suivant ce dernier, dans le cas de ces collisions, le temps durant lequel les molécules restent *piégées* sur les obstacles est alors d'autant plus important que la molécule est longue : ces systèmes modèles permettent alors bel et bien la séparation de biomolécules.



**FIGURE 1.19** – Schéma décrivant l’interaction d’une molécule d’ADN avec un obstacle fixe dans un réseau de nanoplots [Dorfman, 2006]. a) Molécule en mouvement libre (du haut vers le bas) dans le réseau de pas  $a$  de plots de diamètres  $d$ . b) Illustration de la collision de la molécule avec un plot. c) Après désengagement, le polymère se retrouve sous forme de pelote et continue sa course d’obstacles.

Toutefois, et malgré les efforts fournis par la communauté, les systèmes de nanoplots peinent à atteindre la résolution d’échantillons composés de nombreuses tailles de molécules. Le développement de l’électrophorèse sur puce passe alors aujourd’hui par des travaux sur l’optimisation de matrice à issu de l’agrégation de nanoparticules auto-assemblées [Kaji et al., 2010].

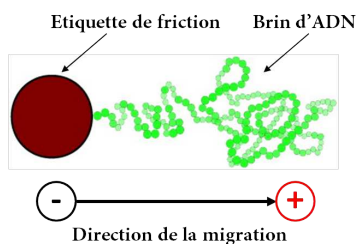
### 1.4.3 Séparation sans matrice

L’impossibilité de séparer des molécules d’ADN en solution libre a amené à l’utilisation de matrices comme supports à la migration. Par matrice nous entendons à la fois matrices de gel (ou de polymères enchevêtrés) ou matrices micro-fabriquées. L’utilisation de ces matrices est suivie de certains désagréments. Aussi, pour la technique d’électrophorèse capillaire, les supports solides sont-ils amenés à s’encrasser au cours des migrations ou peuvent parfois présenter des ruptures dues aux bulles d’air créées à l’injection de la matrice. Pour la même technique, l’utilisation de solution de polymères enchevêtrés permet de résoudre ce dernier aléa, mais l’injection de tels support à l’intérieur de capillaires d’une centaine de micromètres de diamètre et de  $\sim 50$  cm de long nécessite l’application de pressions importantes. Cette question est d’autant plus cruciale qu’il est observé que l’utilisation de polymère de très haut poids moléculaire (et donc l’injection de solution de forte viscosité) améliore la séparation. Enfin, nous avons pu voir que, dans un gel, la taille typique des pores impose une limite de taille séparable, et que la séparation d’espèces de tailles supérieures à 50 kbp imposait l’utilisation de champs pulsés et des durées de migration allant de 4 à 72h [Dorfman et al., 2013].

Une question se pose alors : comment séparer des molécules d’ADN sans matrice (en solution aqueuse) et dépasser le caractère *free-draining* de cette molécule ? Deux techniques récemment décrites permettent de répondre à cette question. La première impose la modification même des molécules à séparer, la seconde impose une variation du champ d’actionnement à l’échelle de la molécule.

**End-labelled free solution electrophoresis (ELFSE)** Nous avons pu voir que l’indépendance du rapport charge sur friction des molécules d’ADN interdisait leur séparation en électrophorèse en solution libre. En 1992, Noolandi [Noolandi, 1992] suggère que cette limitation peut être dépassée pourvu que l’on attache à la molécule d’ADN une *étiquette de friction* ou *drag-tag* (Cf. figure 1.20).





**FIGURE 1.20** – Illustration de l'actionnement par électrophorèse d'un brin d'ADN attaché à une étiquette de friction. Figure adaptée de [Shendruk et al., 2012].

Cette théorie a été assise par les travaux de Long et Mayer [Mayer et al., 1994] [Long and Ajdari, 1996]. Celle-ci repose sur le fait que l'étiquette possède une mobilité électrophorétique égale à  $\beta$  fois celle du brin d'ADN (qui elle vaut  $\mu_0$  et est composée de  $N$  bases) et a un coefficient de friction visqueuse équivalent à  $\alpha$  paires de base. Alors, la mobilité globale de l'ensemble ADN+étiquette est donnée par :

$$\mu = \mu_0 \frac{N - \beta}{N + \alpha} \quad (1.38)$$

Pour une étiquette neutre ( $\beta = 0$ ) cette relation s'exprime alors comme :

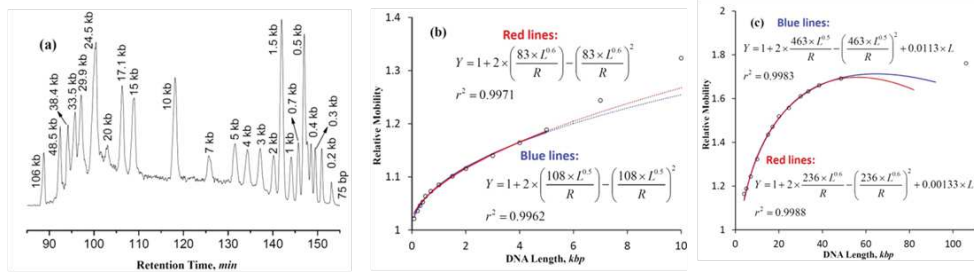
$$\mu = \mu_0 \frac{1}{1 + \alpha/N} \quad (1.39)$$

Ainsi ces relations introduisent-elle une dépendance au poids moléculaire de la molécule. Les conditions que doivent satisfaire cette étiquette sont nombreuses mais les principales imposent qu'elle puisse être greffée en bout de chaîne et qu'elle présente un coefficient de friction bien supérieur à celui de la molécule seule. La première mise en application de cette technique remonte à 1998 pour la séparation d'une échelle moléculaire 100 bp (taille maximale 1000 bp) [Heller et al., 1998] par électrophorèse capillaire en solution libre. Les auteurs avaient alors utilisé des molécules de streptavidine comme étiquette de friction. Une année plus tard, cette idée a été reprise par Ren *et al.* [Ren et al., 1999]. Le greffage de la streptavidine sur les brins d'ADN avait alors été rendu possible par l'ajout d'une modification biotine des amorces utilisées durant les cycles d'amplification d'un brin modèle selon la méthode Sanger. Une longueur de lecture de 100 bp avait alors été démontrée. L'optimisation de cette méthode passa dès lors dans le domaine de l'ingénierie chimique des étiquettes. Un des résultats récents obtenus par cette méthode est présenté en figure 1.21 et montre une longueur de lecture de 180 bp en une vingtaine de minutes. On remarquera que la mobilité croît avec la longueur des molécules, si bien que l'on doit lire depuis le panneau du bas à droite pour retrouver la séquence du brin modèle.

On trouvera avec les articles de Won [Won, 2006] et Meagher [Meagher et al., 2005] des revues du domaine.

**Chromatographie hydrodynamique et méthodes dérivées** La méthode ELSFE présente la possibilité de séparer des molécules d'ADN sans matrice, par la modification chimique des brins à séparer. La chromatographie hydrodynamique et ses méthodes dérivées possèdent le même avantage, au prix d'imposer que le champ fluide d'actionnement varie sur une longueur commensurable avec la taille des espèces à séparer. Nous avons introduit plus tôt la méthode de fractionnement en flux (FFF) qui nécessite l'application d'une force transverse à l'écoulement. La méthode décrite ici s'inspire de son mode stérique en s'affranchissant de l'application d'une force.





**FIGURE 1.23** – Résultats obtenus lors de la séparation hydrodynamique d'un mélange de brins d'ADN de taille allant de 0,75 à 106 kbp. a) Chromatogramme. b) Mobilité des brins de taille inférieure à 10 kbp. c) Mobilité des brins de taille supérieure à 10 kbp. La migration a été menée dans un capillaire de 2,5  $\mu$ m de rayon et sur longueur effective de 445 cm sous une différence de pression proche de 25 bar.

suivant pour la vitesse moyenne  $u_p$  :

$$u_p = \bar{U} \left( 1 + 2\lambda_p - \lambda_p^2 \right) \quad (1.41)$$

Ainsi qu'au temps de rétention  $\tau_p$  donné par :

$$\tau_p = \frac{L}{\bar{U} (1 + 2\lambda_p - \lambda_p^2)} \quad (1.42)$$

avec  $L$  la longueur totale de migration. Le temps de rétention est ainsi dépendant de la taille des particules.

Cette technique a été récemment (re) démontrée comme adaptée pour la séparation par taille de molécules d'ADN [Wang et al., 2010] [Liu et al., 2011] [Wang et al., 2012a] [Zhu et al., 2013]. La figure 1.23 présente un des chromatogrammes obtenus via cette technique pour des brins d'ADN allant de 0.75 à 106 kbp tiré de [Wang et al., 2012c]. Les formules d'ajustement des mobilités sont données suivant l'équation 1.41, en prenant pour rayon hydrodynamique des molécules les lois d'échelle décrites plus tôt soit  $R_g = kL_c^{0.5}$  pour une chaîne idéale, ou  $R_g = kL_c^{0.6}$  pour une chaîne en prenant en compte le volume exclu.

### 1.5 Bilan et introduction des travaux expérimentaux

Suivant le découpage de l'introduction, ce manuscrit sera organisé en deux axes principaux. Nous décrirons dans un premier temps notre approche expérimentale, basée sur le suivi de traceurs fluorescents, pour la caractérisation d'écoulements micro et nano-fluidiques *in situ*. Nous développerons par la suite une méthode innovante pour la séparation de biomolécules. Le dénominateur commun entre ces deux parties réside dans l'étude du transport d'objets dispersés en milieu confiné.

**Vers une métrologie micro- et nano-fluidique in situ** Nous avons mis en avant des méthodes à l'état de l'art pour la caractérisation d'écoulements. La micro-vélocimétrie par image de particules ( $\mu$ PIV) est une méthode puissante et éprouvée, tant et si bien qu'elle est aujourd'hui commercialisée et ne constitue plus (ou peu) un sujet de recherche à part entière, mais plutôt un outil. Nous avons également introduit la méthode de vélocimétrie par réflexion totale interne nano-PIV. Bien que seulement de 5 ans la cadette de la  $\mu$ PIV, cette méthode connaît un engouement plus mitigé. Ce constat est à mettre sur le compte de sa complexité accrue, qui fait d'elle une méthode aujourd'hui moins mature. De plus, son domaine de pertinence est limité aux études proches d'une et une seule paroi, ce qui tend à la confiner aux études spécifiques aux effets physico-chimiques de surfaces, et non pas à se démocratiser dans les vastes applications qu'offrent le domaine de la microfluidique. Cette étude bibliographique met en avant un déficit de techniques permettant la caractérisation de d'écoulements confinés dans des structures de hauteur inférieure à la profondeur de champ des meilleurs objectifs en champ large, et supérieure à la longueur de pénétration de l'onde évanescente utilisée pour l'imagerie nPIV. Nous présenterons dans le chapitre *Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques* notre approche du problème, basée sur les propriétés statistiques extraites du suivi de traceurs individuels et de taille sub-longueur d'onde. Nous détaillerons les grandeurs accessibles et décrirons un modèle d'ajustement adapté. Celui-ci sera confronté aux résultats de simulations et d'expériences.

**Vers de nouvelles technologies de séparation sans matrice** Les quatre dernières décennies ont vu se développer diverses méthodes de séparation par taille de molécules d'ADN. Dans notre introduction, nous avons brièvement introduit les méthodes *classiques* de séparation sur gel, qui ont atteint aujourd'hui des degrés de maturité extrêmes, permettant des résolutions à la paire de base près dans leur configuration la plus efficiente, l'électrophorèse capillaire. Les analogues technologiques fondés sur les matrices artificielles, développés ces vingt dernières années, ont émergé avec la promesse d'à la fois élargir la gamme des tailles séparables, mais aussi d'intensifier les procédés de séparation. Force est d'admettre que leur démocratisation n'est pas arrivée. Ceux-ci constituent toutefois de formidables outils de laboratoire pour l'étude de la physique des polymères confinés. Bien sûr, les études avec ces nouvelles technologies continuent tant et si bien que les performances progressent, mais, bien souvent, ceci se fait au prix d'une complexification, qui tend à éloigner la phase de transfert technologique. Nous présenterons dans le chapitre *Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme* notre approche pour la séparation sur puce. Cette étude a été motivée par le récent regain d'intérêt autour des méthodes de séparation sans matrice. Une des originalités de notre approche tient à son mode d'actionnement *hybride* molécules dans des champs hydrodynamique et électrophorétique croisés. Nous débuterons ce manuscrit par des considérations expérimentales. Nous présenterons la fabrication des puces microfluidiques et le banc expérimental autour desquels nos études se sont construites.

# Matériels et méthodes

Cette partie a pour but d'introduire la fabrication des puces microfluidiques, le banc expérimental, ainsi que les réactifs utilisés dans nos expériences. Dans ce travail, nous n'avons mené qu'un travail de développement technologique limité, et nous sommes appuyés sur l'expertise acquise au laboratoire. Nous présenterons donc ces parties de manière factuelle et tâcherons de ne développer que les parties spécifiques au projet. Pour plus d'amples informations sur la microfabrication, nous renvoyons les lecteurs aux revues récentes [Abgrall and Gué, 2007] [Iliescu et al., 2012] [Nge et al., 2013].

## 2.1 Fabrication et intégration des puces microfluidiques

Le domaine de la microfluidique repose sur l'utilisation de réseaux de canaux de taille caractéristique comprise entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  pour le transport de liquide [Whitesides, 2006]. Il impose donc la structuration de la matière aux échelles microniques et des systèmes de contrôle des écoulements adaptés. Nous avons opté pour une stratégie de fabrication par gravure sur silicium et capotage via une couche d'accroche sur lamelle de verre. Cette partie a pour but d'introduire les différentes étapes de fabrication.

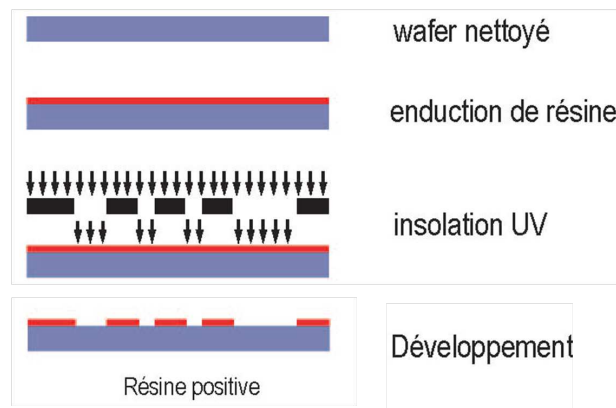
### 2.1.1 Photolithographie optique

La photolithographie optique est une technique de structuration standard issue de la microélectronique. Comme son nom le laisse paraître elle est basée sur l'utilisation de rayon lumineux et comporte donc une limite de résolution inhérente à la diffraction. Considérant que les tailles critiques dans le plan pour ce projet sont de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ , cette technologie est tout à fait adaptée. Nos dispositifs ont été fabriqués sur plaquette silicium (dopée p) 4 pouces. Un procédé complet de lithographie comprend la préparation de la plaquette, l'enduction de la résine, un recuit, l'insolation sélective à travers un masque, un recuit post-insolation et enfin la révélation de la résine. La préparation du substrat a été menée à l'aide d'un bain de mélange acide sulfurique-eau oxygénée (50/50 v/v). Un promoteur d'adhérence a ensuite été déposé (HDMS - Hexamethyldisilazane). Puis une résine positive<sup>1</sup> (ECI 3027, épaisseur 2,6  $\mu\text{m}$ ) a été enduite à la tournette. Insolée à l'aide d'un masque chrome verre, elle permet donc la structuration de la plaquette comme décrit dans la figure 2.1.

Une fois l'étape d'insolation menée, on procède à un recuit sur plaque chauffante puis au développe-

---

<sup>1</sup>La dénomination positive réfère aux résine rendue soluble au révélateur une fois soumise à un rayonnement UV.



**FIGURE 2.1** – Illustration du procédé de photolithographie optique. Cas d’une résine positive. Après nettoyage du substrat, la résine est enduite. Durant l’étape d’insolation, seules les zones libres de chrome du masque laissent passer le rayonnement UV qui vient insoler la résine en des zones définies. Le développement, conduit à l’aide d’un révélateur adapté, permet de laisser à nu les zones insolées pour gravure ultérieure du substrat. Schéma adapté de la thèse de V. Picot (LAAS) [Picot, 2012]

ment des zones insolées à l’aide d’un révélateur adapté.

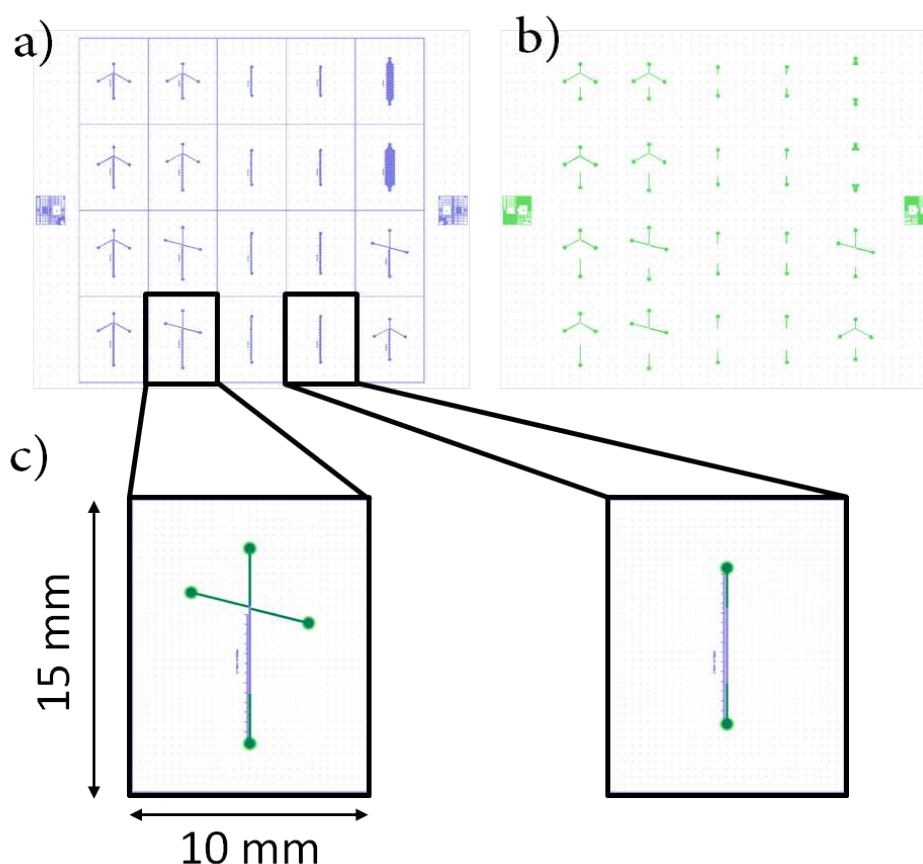
### 2.1.2 Gravure du silicium

La gravure correspond à l’étape de transfert des structures dans le matériau. Les zones définies à l’aide de l’étape de photolithographie correspondent à des zones où le matériau brut est non protégé et peut être usiné. Cette étape peut être conduite par gravure chimique ou sèche (plasma) du silicium. Afin d’obtenir un bon respect du rapport de forme lors du transfert des structures dans le silicium, la gravure chimique correspondant essentiellement isotrope<sup>2</sup> ou suivant les plans cristallins du substrat<sup>3</sup>, nous avons opté pour une gravure directive RIE du matériau. Ce procédé de gravure (Reactive Ion Etching) consiste en un bombardement de gaz ionisés sur la surface. Celle-ci possède un effet à la fois chimique et physique permettant d’enlever de la matière dans les zones prédéfinies. La partie chimique provient de l’utilisation de gaz ionisés tels que  $SF_6$  ou  $CF_4$ , qui augmente l’effet physique de la gravure par bombardement par des gaz nobles tels que  $Ar$  ou  $Ne$ . Elle combine donc à la fois la sélectivité de la gravure sèche mais une vitesse augmentée par l’utilisation des espèces réactives. C’est à cette étape que la résine joue tout son rôle, et protège les zones souhaitées (on parle de gravure sélective).

Nous avons dans ce projet produit des puces microfluidiques sur silicium par gravure sur des profondeurs s’échelonnant de 350 à 2000 nm. La figure 2.2 présente le masque utilisé pour la lithographie. Ce projet étant à son commencement exploratoire, nous avons opté pour la multiplication des géométries des puces, qui sont, pour les études fondamentales d’écoulements, constituées d’un seul canal, ou pour les puces pour la séparation d’ADN, constituées de deux canaux croisés. Nous reviendrons en détail sur la justification du choix de ces motifs dans les chapitres expérimentaux de ce rapport. La largeur des canaux a été fixée à 50 et 100  $\mu m$  suivant les puces. Le choix d’un rapport d’aspect plus favorable a été conduit par anticipation du possible flambage des structures pour les plus basses hauteurs de canalisation ( $H = 350$  nm). Notons que pour ces dernières, nous avons réalisé un deuxième masque (Cf. figure 2.2 b)). En effet, les faibles hauteurs ont pour effet de considérablement augmenter la résistance hydraulique des canalisations. Afin de pouvoir créer des vitesses de fluide suffisante dans les canaux,

<sup>2</sup>(e.g. à l’aide d’un mélange acide fluorhydrique, acide nitrique, et éthanol)

<sup>3</sup>(e.g. à l’aide d’une solution de d’hydroxyde de potassium, ou TMAH<sup>4</sup>)



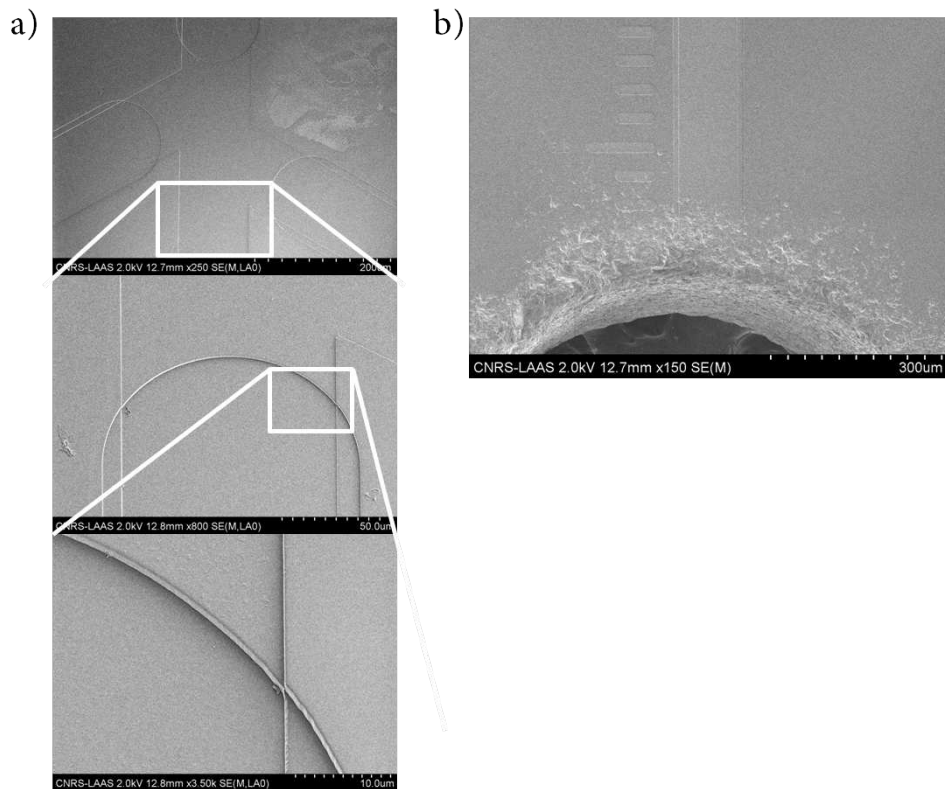
**FIGURE 2.2** – Schéma descriptif de la géométrie des puces microfluidiques. a) Masque du premier niveau de photolithographie. b) Masque du second niveau de photolithographie. c) Agrandissement pour les deux types de puce microfluidique majoritairement utilisés dans ce projet.

et compte tenu de la pression maximale supportée par les connexions au système microfluidiques, nous avons choisi de réduire la zone d'intérêt et de graver plus profondément les entrées et sorties des canalisations, afin d'en diminuer la résistance hydraulique totale.

Les hauteurs des canalisations ont été mesurées à l'aide d'un profilomètre mécanique après gravure.

### 2.1.3 Perçage et oxydation des puces

Afin de rendre les puces fonctionnelles, il est nécessaire de créer des entrées et sorties aux canalisations. Nous avons réalisé cette étape par sablage. Après avoir laminé un film sec de protection sur l'entière surface des plaquettes, le perçage a été réalisé par projection de grains d'oxyde d'aluminium. Propulsés par air comprimé, ceux-ci permettent l'abrasion des plaquettes sur leur entière épaisseur ( $\sim 0.5 \text{ mm}$ ), produisant des trous d'accès d'environ 1 mm de diamètre, et ce pour chaque extrémité des canaux. Ces puces étant destinées à fonctionner par application de champs électriques, nous avons procédé à l'isolation électrique des substrats après perçage. À cette fin, nous avons conduit une croissance thermique d'une couche d'environ  $\sim 200 \text{ nm}$  d'oxyde ( $\text{SiO}_2$ ) sur le substrat. L'épaisseur de cette couche a été contrôlée à l'aide d'un ellipsomètre. Compte tenu de l'isotropie de cette croissance, la hauteur des canaux n'est pas modifiée par le procédé. Seule leur largeur, non critique dans nos systèmes, est



**FIGURE 2.3** – Cliché acquis au microscope électronique à balayage d’une puce dédiée à la séparation. a) Grossissement progressif d’une zone montrant les deux niveaux de gravure. b) Cliché en champ large d’un trou d’accès percé à la sableuse. La rugosité parasite est restreinte et ne s’étend que sur une distance de  $\sim 300\ \mu\text{m}$  dans la canalisation. Je remercie Qiaho He pour m’avoir aidé à acquérir ces clichés.

impactée.

La figure 2.3 a) présente des clichés de microscopie électronique d’une puce dédiée à la séparation, composée de deux canaux. La largeur externe des canalisations principales est de  $120\ \mu\text{m}$ . La gravure du premier niveau a conduit à une épaisseur du canal de  $950\ \text{nm}$ . La gravure du second niveau conduit à une hauteur (aux extrémités) des canaux de  $1.9\ \mu\text{m}$ . Notons que ces données ont été acquises au profilomètre mécanique. Les barres d’échelles ne sont que peu représentatives car pour la plupart des clichés le substrat a été incliné pour une meilleure observation des flans des canaux. Le panneau b) de la figure présente un cliché des trous d’accès. Celui-ci démontre la faible extension de la zone abrasée par l’oxyde d’aluminium. Les expériences seront toujours conduites au delà d’un millimètre de l’entrée des canalisations. Pour indication, les graduations présentes sur le côté gauche du canal sont espacées de  $50\ \mu\text{m}$  entre elles et sont de  $20\ \mu\text{m}$  d’épaisseur.

### 2.1.4 Capotage des dispositifs et connexions fluidiques

Nous avons opté pour un scellement des puces sur des lamelles de microscopie ( $24 \times 32\ \text{mm}^2$ , épaisseur  $170\ \mu\text{m}$ ) via une couche d’accroche polymérique. Aussi avons-nous choisi pour adhésif un dérivé du poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Ce matériau comporte des groupements  $-O-Si(CH_3)_2-$  ce qui en fait un matériau naturellement hydrophobe. Toutefois, son exposition à un plasma d’oxygène conduit à la formation de groupe silanols qui ont pour effet de le rendre hydrophile. L’exposition d’une surface



de PDMS et de silicium conduit à la formation de radicaux -OH. La mise en contact conforme des deux surfaces conduit à la création d'un collage irréversible des matériaux, via la formation de liaisons  $Si - O - Si$  [McDonald et al., 2000]. Comme nous avons pu l'évoquer précédemment, le fort rapport d'aspect qui caractérise les canaux de 350 nm hauteur et de 50  $\mu m$  de largeur peut potentiellement conduire à l'effondrement des structures lors du scellement. Aussi avons-nous opté pour une formulation du PDMS qui permet de multiplier par  $\sim 4,5$  son module élastique [Schmid and Michel, 2000] [Odom et al., 2002] [Choi and Rogers, 2003]. Ce mélange a été enduit à l'aide d'une tournette<sup>5</sup> afin de créer une couche d'épaisseur  $\sim 6 \mu m$  sur les lamelles de microscopie. Cette association a ensuite été disposée dans une étuve pour 30 min. La surface de PDMS a ensuite été activée par plasma oxygène<sup>6</sup>, ainsi que la surface de silicium<sup>7</sup> au préalable traitée dans un mélange acide sulfurique-eau oxygénée et déshydratée dans une étuve<sup>8</sup>. Ces deux surfaces ont ensuite été mises en contact pour le scellement et disposées dans une étuve durant 20 min (80°C).

Les géométries des dispositifs différant d'une puce à l'autre, nous avons opté pour une connexion flexible via un timbre de PDMS. Aussi avons-nous créé sur une plaquette de silicium traitée à l'aide d'un anti-adhésif<sup>9</sup> une couche épaisse de PDMS<sup>10</sup> d'environ 8 mm d'épaisseur. Des timbres de même épaisseur ont ainsi pu être découpés aux dimensions correspondantes à la surfaces des puces microfluidiques. Des trous d'accès traversant ont été créés de manière conforme à la puce utilisée, à l'aide d'un emporte pièce de section circulaire et de diamètre 1,2 mm. Ce timbre a ensuite été enduit d'une colle photosensible, disposé sur le dos des puces de silicium, et exposé à un rayonnement UV pour permettre la réticulation de la colle. Ce dispositif, bien qu'artisanal, s'est démontré suffisant pour supporter des pressions allant jusqu'à 3,5 bar.

Nous avons choisi des réservoirs directement connectés sur la puce microfluidique. Ceux-ci ont pour avantage de ne pas introduire de volume mort et minimisent les volumes d'échantillon nécessaires aux expériences. Des tubes à vis de micro-centrifugeuse (1,5 ml) ont été percés à l'aide d'un flux d'air chaud afin d'y disposer des cylindres métalliques de diamètre externe 1.5 mm (légèrement supérieur au diamètre des trous percés dans le timbre de PDMS). Ceux-ci ont alors été scellés à l'aide d'une colle thermo-réticulante. Remarquons que ce procédé a été mené à la fois sur le culot des tubes, sur leurs bouchons, mais aussi sur les flanc des tubes. Cet accès nous a permis d'insérer un filament de platine pour le contrôle en tension, nécessaire à l'application de champ électrique au sein de la canalisation. La figure 2.4 présente une puce microfluidique intégrée sur le microscope. On repère sur cette dernière le timbre épais de PDMS sur lesquels sont plantés les réservoirs.

## 2.2 Banc expérimental

Nous souhaitons décrire ici le banc expérimental utilisé pour nos expériences. Le schéma présenté en figure 2.5 le présente dans sa configuration complète. Les expériences constituant ce projet ont été essentiellement conduites à l'aide d'un microscope de fluorescence (configuration *épi*). Nous souhaitons dans les paragraphes qui suivent brièvement introduire les éléments de ce montage et leurs adaptations spécifiques.

<sup>5</sup> Paramètres de l'enduction : vitesse de rotation = 3000 tr/min, accélération = 3000 tr/min<sup>2</sup>, temps = 30 s.

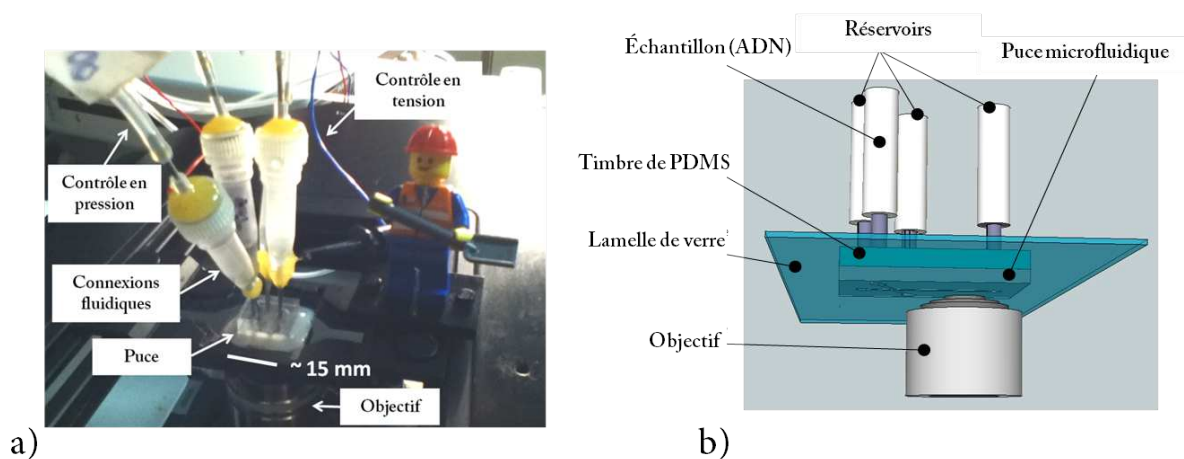
<sup>6</sup> Puissance 200 W, temps 30 s, débit d'O<sub>2</sub> 1000 ml/min. Avec cage de Faraday.

<sup>7</sup> Puissance 800 W, temps 2 min, débit d'O<sub>2</sub> 1000 ml/min

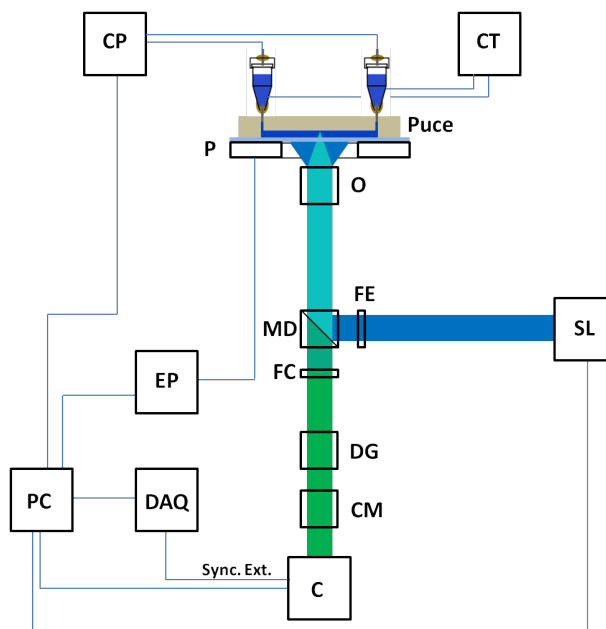
<sup>8</sup> Température : 80 °C. Temps : 5 min.

<sup>9</sup> OTS : OctadecylTrichloroSilane

<sup>10</sup> Sylgard 184. Ratio massique agent réticulant/base 1 : 10.



**FIGURE 2.4** – Intégration de la puce microfluidique. a) Photographie de la puce disposée sur la platine d'un microscope inversé. On repère sur cette dernière les tubes de contrôle en pression, les réservoirs contenant les échantillons, Les fils pour le contrôle en tension. b) Vue d'artiste de la puce intégrée.



**FIGURE 2.5** – Banc expérimental construit autour d'un microscope de fluorescence. SL : source lumineuse. FE,FC : filtres d'émission et de collection. O : objectif. P : platine de positionnement. EP : électronique de contrôle de la platine. CP,CT : contrôleurs de pression et de tension. CM : Photo-masque *Crop Mode*. DG : Dispositif de grandissement 1,6 X. C : Caméra EMCCD. DAQ : Électronique de synchronisation. *Sync. Ext* : Synchronisation externe.

### 2.2.1 Optique

Notre étude étant essentiellement centrée autour de la dynamique de particules, deux paramètres fondamentaux doivent être optimisés, soit la précision de localisation et la cadence d'acquisition. Concernant le pointé, en considérant le bruit de comptage, la taille finie  $p$  des pixels de la caméra, et le niveau du bruit de fond  $b$ , il a été montré que la précision de localisation  $\langle(\Delta x)^2\rangle$  pouvait s'écrire comme [Thompson et al., 2002] :

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s + p^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2} \quad (2.1)$$

où  $s$  est la largeur de la gaussienne décrivant la fonction d'étalement du point, et  $N$  correspond au nombre de photons collectés. Il apparaît donc deux éléments cruciaux pour optimiser la localisation, abaisser la taille du pixel (au sens de l'image, à savoir la taille physique du pixel du capteur divisée par le grandissement), abaisser le niveau de bruit, mais surtout, maximiser le nombre de photons collectés. Cette dernière observation impose un éclaircissement suffisant, mais aussi limitant le photoblanchiment des sondes, et enfin une bonne efficacité de collection. Cette dernière quantité se définit comme [Frigault et al., 2009] :

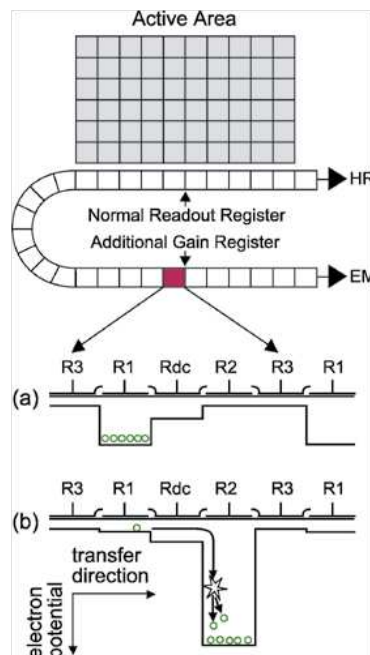
$$E \propto \frac{NA^4}{M^2} \quad (2.2)$$

Considérant la croissance à la puissance 4 de l'efficacité avec l'ouverture numérique, celle-ci apparaît comme un des paramètres primordiaux pour améliorer la précision sur la localisation des sondes. Pour nos expériences, une source lumineuse à diode laser a été utilisée, couplée au microscope via une fibre optique et un condenseur. Considérant les caractéristiques des sondes fluorescentes utilisées dans de projet (YOYO-1 491/510 nm, Dragon Green 480/520 nm) nous avons essentiellement utilisé le canal cyan de cette source ( $480 \pm 15$  nm), délivrant une intensité de  $\sim 2 \text{ mW.cm}^{-2}$  (donnée constructeur pour une fibre de 2 mm de diamètre). Les filtres d'émission et de collection ainsi que le dichroïque (Zeiss 38 HE) ont de même été optimisés pour correspondre aux caractéristiques des sondes et minimiser le niveau de bruit. Nous avons pu voir que taille du pixel et ouverture numérique étaient déterminants. Aussi avons-nous choisi de travailler avec un objectif à immersion à huile, d'ouverture numérique NA = 1.4 et de grandissement M=100 X (Zeiss Plan Apochromat).

### 2.2.2 Imagerie

#### Caméra

Une caméra EMCCD (Electron Muliplied Charge Coupled Device) a été utilisée pour ce projet (Andor iXon 885). Son mode de fonctionnement est donné dans la figure 2.6 tiré du site web du constructeur. La caméra consiste en trois organes principaux (en réalité quatre, nous discuterons cela sous peu), la matrice de capteurs, un registre de lecture et un registre de gain. Exposés à un rayonnement lumineux, les capteurs CCD (taille physique 8  $\mu\text{m}$ ) se chargent d'électrons (effet photo-electrique) durant un temps dit d'exposition. Puis, via l'application d'une tension, ces charges sont transférées ligne à ligne vers le registre de lecture. Sans gain, ces charges sont déplacées latéralement vers l'électronique de conversion (charge vers tension) pour aboutir en fin de chaîne à un niveau de gris sur une image. Le temps entre chaque image est alors composé du temps d'exposition, ainsi que du temps nécessaire au transfert des charges, négligeable devant le temps de conversion. Le transport des charges dans le registre se fait linéairement par l'application d'une tension (on remarque les puits de potentiel

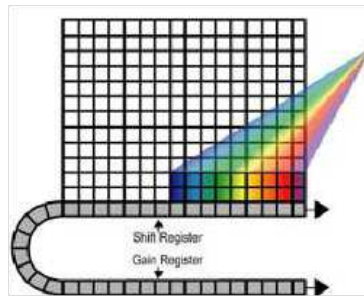


**FIGURE 2.6** – Schéma décrivant le fonctionnement d'un capteur EMCCD. Illustration du transfert des charges dans le registre a) sans gain, b) avec gain.

successifs sur le panneau a) ). Le mode amplifié correspond au même schéma global, toutefois, un registre de lecture est suivi d'un registre de gain. Celui-ci conduit au transfert latéral des charges par l'application de tensions plus élevées que le registre classique (voir l'évolution de la hauteur des puits de potentiels sur b) ). L'augmentation de la différence de tension a pour effet d'augmenter la probabilité du phénomène d'ionisation d'impact dans le matériau. Ainsi les électrons sont-ils multipliés de manière statistique, ce qui a pour effet d'augmenter le rapport signal sur bruit. Remarquons ici que la caméra est refroidie à  $-80^{\circ}\text{C}$ , ce qui a pour effet de limiter la création de charges parasites (bruit thermique).

### Stratégie pour l'augmentation de la cadence d'acquisition

En réalité, 4 organes principaux composent la caméra, en plus de la matrice de capteurs, et des registres de lecture et de gain, la caméra possède une matrice *image* du capteur, disposée juste après ce dernier mais avant le registre de lecture dans l'organigramme présenté plus tôt. Cette matrice, protégée du rayonnement lumineux, est dite de stockage, et agit comme un tampon avant les registres. Cet organe a pour intérêt de pouvoir permettre une plus grande cadence d'acquisition. Dans un premier temps, le capteur principal est exposé à la lumière et stocke des charges. Puis ces charges sont décalées vers la matrice tampon. Toutefois, alors que ce transfert se produit, le capteur principal est toujours exposé au rayonnement et le procédé est ainsi continu. On remarquera que ce mode de fonctionnement impose une limite basse au temps d'exposition, qui doit alors être suffisant pour les procédés simultanés de transfert puisse être complétés avant l'acquisition de l'image suivante. Poursuivant des objectifs de suivi dynamique de particules, nous nous placerons dans ce mode de fonctionnement. Le temps de transfert, comporte, comme nous venons de le voir, deux aspects. Le premier consiste au décalage des charges ligne à ligne vers le registre, le second à les convertir en tension. Dans la plupart des conditions d'imagerie, c'est ce temps de conversion qui est limitant. La caméra utilisée pour ce projet comporte un mode *binning*, qui permet de moyenner la charge portée par des pixels adjacents. Cette étape est conduite au niveau du registre lors du décalage des charges. Au lieu de transférer les pixels en



**FIGURE 2.7** – Schéma décrivant le fonctionnement de la caméra en mode *cropped*. Tiré du site web du constructeur.

direction de l'électronique de conversion, ceux-ci restent le temps du transfert de 1,2,4 ou 8 lignes. Ce mode a deux implications contradictoires au regard de la formule énoncée plus tôt concernant la précision de pointé. Moyenner la valeurs de plusieurs pixels a pour effet d'augmenter le rapport signal sur bruit. Toutefois, cette méthode implique aussi l'augmentation de la taille du pixel (au sens image)  $p$ . L'utilisation de ce mode est encore une fois sujette à compromis. Lors de sa thèse au LAAS, Julien Mathon [Mathon, 2013] a mené des études de la résolution de pointé. Celui-ci a expérimentalement remarqué que la précision de pointé était maximale pour un binning 2x2 pourvu que l'on intercale une lentille de grandissement supplémentaire sur le trajet optique, de manière à palier l'augmentation de la taille du pixel. Nous nous sommes alors placés dans ces conditions<sup>11</sup>.

### Imagerie à travers un photo-masque : *Crop mode*

Le capteur de la caméra est composé de 1024x1024 pixel<sup>2</sup>, et le temps nécessaire à l'acquisition d'une image croît bien sûr avec le nombre de pixels la composant. La stratégie de moyenne conduit à une diminution du nombre effectif de valeurs à convertir et à diminuer l'intervalle de temps entre deux images. Toutefois, une moyenne trop forte conduit à un abaissement de la résolution. Afin d'augmenter substantiellement la cadence du système d'imagerie, nous avons mis en place le schéma *crop mode* de notre caméra Andor. Celui-ci est illustré avec la figure 2.7 tirée du site web du constructeur. L'astuce mise en place consiste alors à n'imager qu'une partie des pixels composant le capteur et le temps de transfert se trouve ainsi diminué. Cette stratégie impose toutefois que la partie inutilisée du capteur ne reçoive pas de lumière. Aussi avons nous intercalé un masque, composé de 4 lames ajustables, afin de définir la zone d'intérêt<sup>12</sup>. Considérant que pour un binning 2x2, la cadence maximale est d'environ 30 Hz (matrice complète), nous avons atteint à l'aide de cette stratégie, et à taille de pixel constante, des cadences de l'ordre de 130 Hz, pour des zones composées (avant moyennage) de 400x800 pixel<sup>2</sup>. Notons que l'orientation préférentielle de la zone éclairée (sa longueur étant alignée selon le registre) n'est pas accessoire. En effet, le capteur étant lu ligne à ligne du bas vers le haut, mal orienter la zone d'éclairage revient à perdre beaucoup du bénéfice de ce mode particulier. On préférera ainsi faire pivoter l'objet observé ou la caméra pour parvenir à cette fin.

<sup>11</sup> On remarquera l'indication DG (dispositif de grandissement) sur la figure 2.5

<sup>12</sup> On remarquera l'indication CM pour *Crop Mode* dans la figure 2.5

### Contrôles et synchronisation

Les contrôles du générateur de pression (Fluigent 1 et 7 bar), de la caméra (Andor) ainsi que de la source lumineuse (Lumencor) ont été conduits par l'utilisation de logiciels constructeurs. Le générateur de tension (Agilent) a été contrôlé manuellement et la tension délivrée contrôlée au voltmètre. Toutefois, pour les expériences nécessitant l'emploi de la platine de positionnement (Physik Instrumente), nous avons développé un système de synchronisation platine-caméra. Celle-ci a été conduite en basculant la caméra en mode *esclave*, asservie par un signal TTL généré par un boîtier NI-DAQmx (National instrument). Nous avons à cet effet développé un programme de contrôle de la platine à l'aide du logiciel Labview, dérivé des pilotes constructeur, pour permettre l'acquisition d'une image par altitude de la caméra. À l'intérieur de la boucle de contrôle commandant un saut suivant la direction axiale Z de la platine, nous avons inséré la génération d'un signal de synchronisation via le DAQ, contrôlé par port USB, vers le port de synchronisation externe de la caméra. Remarquons que pour ce mode particulier de fonctionnement, la caméra a opéré en mode d'acquisition normal, et le temps nécessaire à la stabilisation de la platine et à l'acquisition complète d'une image a été observé entre chaque créneau TTL de synchronisation.

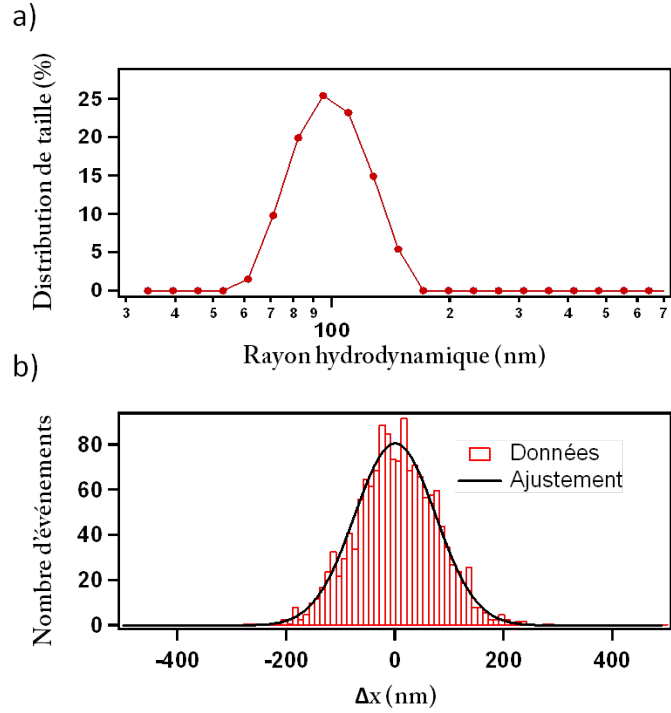
## 2.3 Fluides et particules

### 2.3.1 Solutions tampon

Nos expériences ont essentiellement été conduites dans une solution classique pour l'électrophorèse TBE 2X. Une solution stock TBE 10X de 20 ml a été préparée à partir de 2.16 g Tris (trishydroxyméthylaminométhane), 1.1 g d'acide borique, 0.116 g d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique). Après dissolution complète, la solution mère a été filtrée. Les solutions dédiées à la manipulation d'ADN ont été complétées par l'ajout de PVP (Polyvinylpyrrolidone) de poids moléculaire 360 kDa, à raison de 2 % en masse. Après dilution totale du polymère, ces solutions ont également été filtrées (filtre pour seringue, diamètre des pores 200 nm).

### 2.3.2 Marquage de l'ADN

Nous avons essentiellement travaillé avec des ADN d'échelles moléculaire standards (100 bp, 1 kbp), ainsi que des ADN viraux  $\lambda$  (48502 bp) et  $\Phi$ X174 (5386 bp) (NewEngland Biolabs). Des alicots de solution mère ont été faits, pour éviter une dégradation des échantillons au grès des congélations/décongélations. Le marquage de ces molécules a été conduit à l'aide de YOYO-1 (Molecular Probes) bi-intercalant de l'ADN. Afin de limiter le bruit de fond lors de l'imagerie, les concentrations en sonde fluorescente et en ADN des solutions mères diluées à partir des alicots ont été contrôlées à l'aide d'un spectromètre d'absorbance. Nous avons ainsi fixé des concentrations relatives à 1 molécule de YOYO pour 5 paires de base d'ADN. Notons que les techniques de marquage à l'aide de marqueurs fluorescents s'intercalant entre les monomères constitutifs de la molécule conduisent à une augmentation de la longueur de contour [Gunther et al., 2010], jusqu'à 50% de sa longueur initiale pour un ratio nombre d'intercalants / nombre de paires de bases supérieur à 0.4. Compte tenu du ratio utilisé ici, l'augmentation de longueur de contour inhérente au marquage s'évalue autour de 15 à 25 % de la longueur originelle. Afin de limiter le photo-blanchiment des sondes, 5 % d'agent réducteur DTT (dithiothréitol) ont été ajoutés dans les solutions.



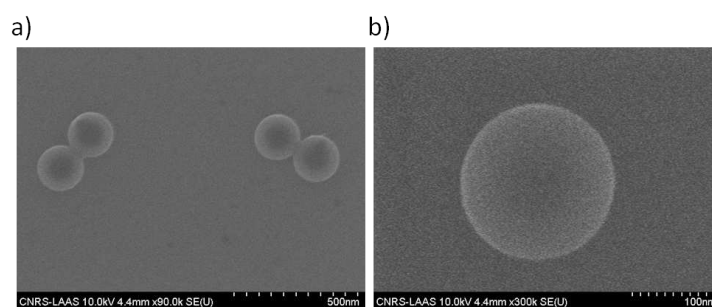
**FIGURE 2.8** – Caractérisation de la taille des particules. a) Distribution de taille déduite par diffusion de lumière. b) Histogramme sur la longueur de pas après un temps  $\tau$  effectué par le centre de masse du traceur.

### 2.3.3 Contrôle en taille des colloïdes

Nous avons utilisé pour les études d'écoulements confinés des microsphères fluorescentes (BangsLab) avec des groupements carboxyles en surface. Celles-ci ont été diluées à une fraction volumique  $\sim 10^{-5}$  dans une solution tampon TBE 2X (alternativement TBE 2X-glycérol) et disposées dans un bain à ultrason pour prévenir toute aggrégation. Afin de caractériser précisément leur rayon, nous avons préférentiellement utilisé un instrument de diffusion dynamique de lumière (DLS- Malvern). Alternativement, le suivi de particule, entre lame et lamelles suffisamment espacées, nous a permis d'aussi remonter à la taille des traceurs, et de confirmer la consistance des mesures de viscosité faite à l'aide d'un rhéomètre à chute bille, pour des fluides Newtonien. La figure 2.8 présente a) un histogramme de répartition des tailles d'un traceur de rayon théorique 100 nm, obtenu par diffusion de lumière pour des traceurs dilués dans de l'eau désionisée. La figure b) présente un histogramme de la distance  $\Delta x$  (algébrique) parcourue par un traceur durant un intervalle de temps caméra ( $\tau = 7.66$  ms). Ces données expérimentales ajustées à l'aide de la loi donnant la probabilité pour le traceur d'avoir fait un saut de pas  $\Delta x$  après un temps  $\tau$  :

$$P(\Delta x) = \frac{A}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \exp\left(\frac{-\Delta x^2}{4D_0 \tau}\right) \quad (2.3)$$

permettent de remonter au rayon du traceur  $a$  via la relation de Stokes-Einstein donnant  $D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\mu a}$ , avec  $D_0$ ,  $T$  et  $\mu$  respectivement le coefficient de diffusion de la particule, la température de la solution et sa viscosité. Pour ces expériences, la taille moyenne des traceurs déduite par DLS est de 100.5 nm. Considérant la valeur de viscosité du fluide (mélange glycérol-eau-TBE)  $\mu = 5.8$  mPas et la valeur  $D_0 = 3.6 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  déduite de l'ajustement, et une température de 22 °C, la valeur  $a = 103.5 \pm 10$  nm est dérivée à partir des données présentée en b). Les deux valeurs sont donc en bon accord.



**FIGURE 2.9** – Caractérisation de la forme des particules par microscopie électronique. a) Association en dimère de particules. b) Bille isolée permettant une mesure.

Nous nous sommes interrogés au cours du projet sur la forme des particules et si celles-ci adoptaient bien une géométrie sphérique. Aussi avons-nous conduit une mesure au microscope à balayage électronique de particules de rayon théorique 100 nm déposées sur une surface de silicium. L'analyse des clichés ainsi acquis nous a permis confirmer leur sphéricité en ajustant leur forme. Cette analyse a conduit à un rayon moyen de  $104 \pm 3$  nm avec une ellipticité (rapport axe majeur/axe mineur)  $e=1.016$ . La figure 2.9 présente deux clichés acquis.



# Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques

## 3.1 Introduction

Notre travail est parti d'un constat à la fois simple et inattendu : il n'existe pas de méthode calibrée et établie permettant de caractériser des débits dans des canalisations de faibles dimensions. Indépendamment de l'actionnement du fluide lui-même, un premier problème vient de la caractérisation des dimensions des canalisations, qui est effectuée le plus souvent par profilométrie mécanique avant scellement. Or, ce dernier procédé, souvent conduit à haute température, est susceptible d'être suivi de dilatation des matériaux. En outre, les systèmes microfluidiques sont souvent fabriqués dans des matériaux déformables sous l'effet mécanique de la pression d'un fluide. De même, les tubes assurant la connexion entre contrôleur de débit et puce microfluidique présentent toujours une certaine élasticité, même résiduelle, et sont eux aussi susceptibles de se dilater. Cet effet capacitif impose l'attente d'un certain temps de relaxation à l'utilisateur, avant d'être assuré de la stabilité de l'écoulement. Le temps de relaxation peuvent être très longs dans des nanocanaux [Fütterer et al., 2004]. L'actionnement par pression n'est pas soumis à ces effets de relaxation, mais il ne donne pas accès aux caractéristiques de l'écoulement sauf à connaître la résistance hydraulique du circuit, qui n'est pas mesurable expérimentalement une fois la canalisation scellée, sauf à développer les méthodes que nous allons présenter !

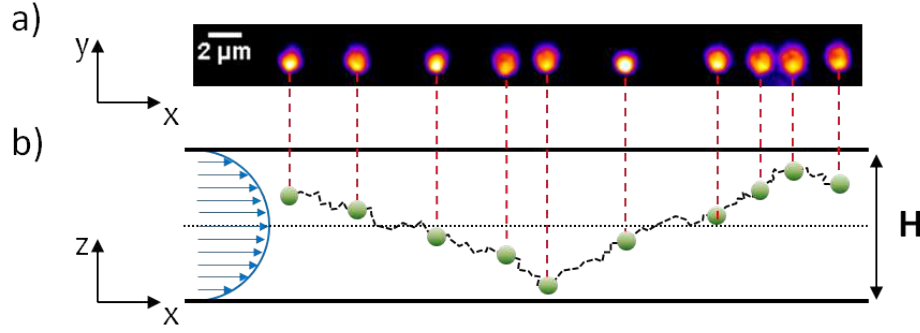
Dans ce chapitre nous décrirons une méthode innovante permettant la caractérisation d'écoulements confinés, ici définis comme ayant lieu dans des canaux dont une dimension au moins est inférieure à  $2\text{ }\mu\text{m}$ . Par caractérisation nous entendons à la fois la donnée de la vitesse de l'écoulement mais aussi les caractéristiques géométriques du canal le guidant. Pour atteindre cet objectif, nous reviendrons d'abord sur quelques résultats fondamentaux d'hydrodynamique décrivant l'écoulement fluide au sein des systèmes microfluidiques ainsi que les résultats relatifs à la translation d'une sphère solide dans de tels écoulements. Nous proposerons ensuite une description d'un modèle analytique permettant d'ajuster les données expérimentales puis sa validation par simulation de dynamique brownienne. Nous donnerons enfin les résultats expérimentaux obtenus pour un fluide newtonien pour différentes valeurs de viscosité et l'application de la méthode au suivi de la déformation d'une canalisation microfluidique en polymère déformable.

**Suivi de particules dans un écoulement : principe de notre mesure** Avant de développer de manière plus extensive les bases de notre méthode, il paraît important de décrire à quelles grandeurs nous donne accès l'expérience. L'homogénéité d'un liquide nous interdit un accès direct à la visualisation du champ de vitesse en son sein : l'obtenir impose l'utilisation de traceurs, qui, advectionnés, rendent compte à l'expérimentateur et lui permettent de déduire la vitesse des particules de fluide. Une telle expérience possède ainsi deux pré-requis forts : 1) l'expérimentateur connaît avec précision la position  $(x,y,z)$  du traceur et 2) il connaît la relation liant vitesse du traceur  $\mathbf{U}(\mathbf{r})$  à vitesse de fluide  $\mathbf{v}_f(\mathbf{r})$  pour toute position  $\vec{r}$  repérant le centre de masse de ce dernier. Comme nous le verrons un peu plus tard, et notamment dans le cas d'écoulements confinés, cette dernière condition est loin d'être triviale lorsque la taille du traceur n'est plus négligeable devant la courbure et l'extension de l'écoulement de fluide en présence parois.

**De l'impossibilité de repérer axialement le traceur** La résolution d'un objet à l'aide d'un microscope est limitée par le critère d'Abbe [Abbe, 1873]. Toutefois, cette limite peut être dépassée si l'on s'intéresse uniquement au repérage du centre de masse d'un objet de dimension inférieure à la longueur d'onde. Cette dernière propriété nous permet ainsi de pouvoir revendiquer une résolution latérale de l'ordre de 30 nm comme précédemment démontré. Ainsi nous avons accès, avec une bonne précision, aux vitesses en translation des traceurs sphériques dans le plan  $(x, y)$ . Obtenir une résolution comparable selon l'axe optique nous est beaucoup plus compliquée, sauf à établir des calibrations billes par billes [Wu et al., 2005], ou utiliser des montages optiques dédiés [Toprak et al., 2007]. La configuration d'imagerie mise en œuvre (microscopie en champ large) ne permet d'obtenir que la projection sur le capteur de la caméra de l'intensité de fluorescence émise par le traceur. De plus, ce dernier étant en mouvement, il apparaît impossible de procéder à un échantillonnage suivant l'axe optique à l'aide d'une platine de positionnement afin de repérer plus précisément la position suivant l'axe  $z$ . En réalité, le manque de résolution verticale a été traité comme un avantage, alors qu'il est considéré comme une difficulté en vélocimétrie conventionnelle. En effet, pour des canalisations plus petites que 2  $\mu\text{m}$ , nous pouvons échantillonner toute la profondeur de la canalisation avec un seul plan focal d'observation.

**Le transport de la particule : combinaison d'advection et de diffusion** Compte tenu de la taille des traceurs utilisés dans nos expériences qui est imposée par l'extension typique de la canalisation microfluidique, il nous est impossible d'ignorer l'effet de l'agitation thermique. A ce stade un bref calcul d'ordre de grandeur s'impose. Prenons une particule de rayon  $a = 100 \text{ nm}$  dans un fluide de viscosité comparable à celle de l'eau à température ambiante  $\eta = 1 \text{ mPa.s}$ , le coefficient de diffusion de cette dernière est donc donné par  $D = \frac{k_B T}{\xi} \approx 2.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . Ainsi pour un cadence d'acquisition de  $\tau = 10 \text{ ms}$  entre chaque image, le phénomène de diffusion implique un déplacement typique de  $\Delta x_{Diff} \sim \sqrt{D\tau} \approx 150 \text{ nm}$ . Ce déplacement doit être comparé au déplacement induit par advection  $\Delta x_F = v_F \tau \approx 100 \text{ nm}$  pour une vitesse de fluide caractéristique  $v_F \approx 100 \mu\text{m}.\text{s}^{-1}$ . Ainsi les effets diffusifs ne peuvent nullement être négligés. Notons tout de même que cet ordre de grandeur correspond à une limite haute. En effet, l'utilisation de fluides de viscosités supérieures et les interactions hydrodynamiques traceur-parois tendent à diminuer le phénomène de diffusion. Cet effet sera plus longuement considéré dans une partie ultérieure de ce rapport.

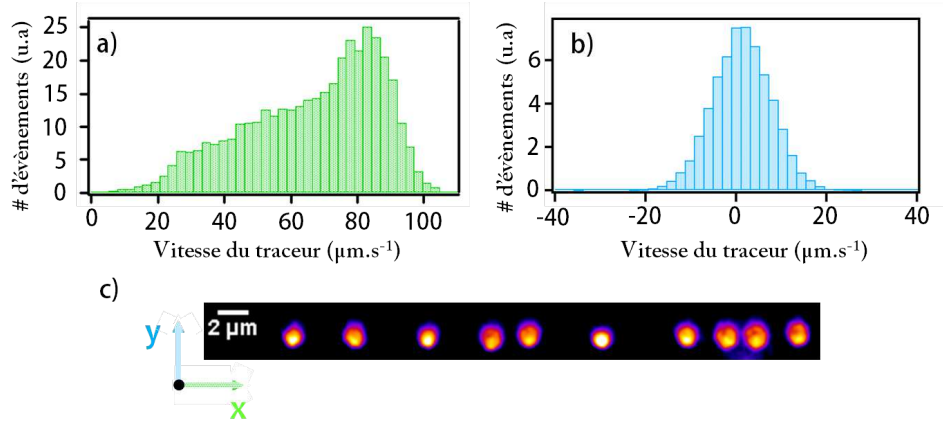
L'effet de la diffusion est directement visible en considérant une trajectoire réelle de bille. La figure 3.1 présente en effet une trajectoire typique d'un traceur sphérique fluorescent de 200 nm de diamètre dans une canalisation de hauteur  $H = 1.6 \mu\text{m}$ . Le pas de temps entre chaque image correspond à 10 fois l'intervalle caméra soit environ soixante-dix millisecondes. À intervalle constant, le déplacement



**FIGURE 3.1** – a) Séquence d'images de fluorescence d'une bille ( $a=100$  nm) s'écoulant dans un canal de hauteur  $H=1.6$  μm. b) Trajectoire possible suivant la hauteur de la canalisation. L'intervalle de temps entre chaque image est pris à dix fois l'intervalle de temps caméra  $\tau = 7$  ms. Si le mouvement global de la bille est dirigé vers les  $x$  positifs (dans le sens de l'écoulement) l'espacement entre chaque position n'est pas constant : à l'advection du fluide s'ajoute le phénomène de diffusion.

longitudinal  $\Delta x$  de la particule suivant l'écoulement varie dans des proportions de 1 à 3. La diffusion a un effet double au sein de notre système. Dans le plan d'observation, elle se superpose au déplacement lié à l'advection par le fluide, si bien que l'on peut écrire  $\Delta x_{global} = \Delta x_{advection} + \Delta x_{diffusion}$  soit que le déplacement global du centre de masse de la bille résulte de la somme du bruit brownien au déplacement lié à l'entraînement par le fluide. Mais là n'est pas l'unique origine de la disparité des distances parcourues. En effet, si la particule diffuse dans le plan  $(x, y)$  elle diffuse aussi selon l'axe  $z$ . Si bien qu'au temps long, la probabilité de présence de la particule suivant la hauteur de la canalisation est homogène. Ainsi est-il attendu que la particule change constamment d'altitude  $z$  et donc de ligne de champ de fluide et acquiert des vitesses très différentes au cours de sa trajectoire.

**Probabilité de vitesse d'un traceur sphérique dans un écoulement** Nous pouvons dresser ici un bilan des observables accessibles. La profondeur de champ ou encore la longueur de corrélation dans le langage de la technique dite de vélocimétrie par image de particule [Olsen and Adrian, 2000] [Meinhart and Wereley, 2003], est telle qu'il est impossible de repérer axialement la particule. Nous perdons ainsi un degré de liberté essentiel à la description du champ de fluide dans la canalisation, celui-ci dépendant fortement de cette même coordonnée. Les données accessibles sont présentées dans la figure 3.2. Les histogrammes présentent la *probabilité* expérimentale  $f$  pour un traceur d'être mu d'une vitesse  $U_x$  dans la direction de l'écoulement et  $U_y$  dans sa direction transverse. A ce stade ces données peuvent être rationalisées tel que suit. Selon la direction transverse à l'écoulement, le mouvement du traceur est uniquement d'origine diffusive. Ainsi  $f(v_y)$  est une distribution symétrique et centrée en zéro. A l'inverse,  $f(v_x)$  est biaisée et s'étend vers des valeurs de  $U_x$  positives. Cet effet est la résultante de l'addition à la diffusion de l'advection du fluide. Ces distributions constitueront les données expérimentales essentielles à notre approche expérimentale.



**FIGURE 3.2** – Dynamique d'une bille dans un écoulement de Poiseuille : les données accessibles. a) Histogramme sur la vitesse  $v_x$  du traceur suivant la direction  $x$  parallèle à l'écoulement. b) Histogramme sur la vitesse  $v_y$  du traceur selon la direction  $y$  perpendiculaire à l'écoulement. c) Séquences d'images de fluorescence obtenues pour un traceur de diamètre  $d = 200\text{nm}$  dans une fente de hauteur  $H = 1.6\text{ }\mu\text{m}$ .

### 3.2 Hydrodynamique et dynamique de particule à bas nombre de Reynolds : quelques fondements nécessaires à notre étude

Notre travail est toujours effectué avec des surfaces hydrophiles et en utilisant de l'eau ou de l'eau et du glycérol en tant que solvant. Nous faisons donc l'hypothèse qu'il n'y a pas de phénomène de glissement aux parois, et que profil de fluide suit un écoulement quadratique dit de Poiseuille. Le champ de vitesse de fluide peut donc être écrit avec deux paramètres que sont la vitesse maximale du fluide au centre de la canalisation et la hauteur de la canalisation. Ainsi la partie suivante sera-t-elle consacrée à la brève introduction des écoulements dits de Stokes à bas nombre de Reynolds. Nous introduirons en particulier quelques notions sur l'interaction hydrodynamique particule-particule et particule-surface. Cette notion sera démontrée comme fondamentale dans notre problème pour obtenir une relation entre vitesse d'un traceur sphérique et vitesse du fluide en son centre compte tenu du fort confinement caractérisé par un rapport diamètre de bille ( $d = 2a$ ) sur hauteur de canalisation ( $H$ )  $0.05 < d/H < 0.3$ .

#### 3.2.1 Hydrodynamique à bas nombre de Reynolds : équation de Stokes

La dynamique d'un fluide visqueux newtonien homogène et incompressible est décrite par les équations de Navier-Stokes décrites par Navier en 1827 [Navier, 1827]. Celles-ci s'écrivent, considérant un champ de vitesse  $\mathbf{v}(\mathbf{r}, t)$  et de pression  $p(\mathbf{r}, t)$  fonctions de l'espace et du temps comme :

$$\rho \left( \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \mu \Delta \mathbf{v} \quad (3.1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (3.2)$$

$\rho$  étant la densité du fluide,  $\mu$  représentant sa viscosité. Notons que l'équation présentée est valable sans force externe, (on néglige la force de pesanteur dans le cas d'écoulements confinés par rapport aux forces de pression). L'équation 3.2 traduit l'équation de continuité pour un fluide incompressible. Du fait de son caractère non-linéaire, peu de problèmes physiques décrits par l'équation de Navier-Stokes

### 3.2. Hydrodynamique et dynamique de particule à bas nombre de Reynolds : quelques fondements nécessaires à notre étude

sont solubles. Plus difficile encore est de trouver des solutions à cette équation pour de très hautes vitesses de fluide où le phénomène de turbulence apparaît. Les grandeurs telles que la vitesse et la pression ne sont plus seulement des fonctions de l'espace et du temps mais doivent être décrites par des lois stochastiques. Toutefois, 3.1 peut être par exemple simplifiée en négligeant le terme de convection ou de viscosité l'un par rapport à l'autre. Choissant pour vitesse et longueur caractéristiques  $U$  et  $L$  on peut en effet ré-exprimer les termes inertiels et visqueux de 3.1 par

$$\rho ((\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}) = \frac{\rho U^2}{L} (\mathbf{v}^* \cdot \nabla^*) \mathbf{v}^* \quad (3.3)$$

$$\mu \Delta \mathbf{v} = \frac{\mu U}{L^2} \Delta^* \mathbf{v}^* \quad (3.4)$$

L'étoile  $*$  indiquant des grandeurs adimensionnées. Le rapport entre forces inertielles et visqueuses peut s'exprimer par une quantité adimensionnée appelée nombre de Reynolds  $R_e$ .

$$R_e = \frac{\rho U^2}{L} \frac{L^2}{\mu U} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (3.5)$$

Pour notre étude, ce nombre prend une valeur caractéristique donnée par  $R_e \approx 10^{-3}$  pour  $L = 1 \mu m$ ,  $U = 1 mm.s^{-1}$ ,  $\rho = 1000 kg.m^{-3}$  et  $\mu = 1 mPa.s^{-1}$  pris comme dimension, vitesse, densité et viscosité caractéristiques du fluide. Ainsi peut-on approximer l'équation de Navier-Stokes pour un écoulement stationnaire  $\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = \mathbf{0}$  par

$$\mu \Delta \mathbf{v} = \nabla p \quad (3.6)$$

L'équation 3.6 décrit alors des fluides *rampants* et est plus connue sous le nom d'équation de Stokes. Son caractère linéaire en fait une équation bien plus aisément soluble. Il est toutefois hasardeux de fixer un domaine de validité à celle-ci par la simple donnée du nombre de Reynolds. Bien sûr, plus celui-ci sera faible plus l'approximation des fluides rampants sera valide. Mais puisqu'aucun mouvement de fluide n'est possible à nombre de Reynolds identiquement nul, les effets inertiels existent toujours et ce dans tout système réel. Ainsi la résolution de cette équation donne-t-elle lieu à différents paradoxes comme discuté par Happel et Brenner [Happel and Brenner, 1983]. Aussi, si l'équation de Stokes est tout à fait adaptée à la description des écoulements de fluide dans le domaine de la microfluidique, l'inclusion d'effets inertiels d'ordre supérieur en  $R_e$  est parfois nécessaire pour la description de la dynamique de particules [Di Carlo et al., 2009]. Pour terminer, il est important de mentionner un effet physique popularisé par de nombreux films scientifiques : l'équation de Stokes implique une réversibilité temporelle des phénomènes. Cette conclusion implique que dans un écoulement confiné, il n'existe pas de forces hydrodynamiques transverses à l'axe de l'écoulement. Comme nous le verrons plus loin, cet argument nous a joué quelques surprises!

#### 3.2.2 Écoulement fluidique au sein de fente fine

Comme décrit dans le chapitre *méthode*, nos dispositifs microfluidiques sont constitués de canalisation de section rectangulaire, de largeur  $W$  de hauteur  $H$  et de longueur  $L$  (figure 3.3). Compte tenu de cette géométrie, l'écoulement est rectiligne et la vitesse du fluide se réduit à  $\mathbf{v} = v_x \mathbf{e}_x$ . Expriment l'équation de continuité 3.2, pour cette géométrie particulière il apparaît que  $\frac{\partial v_x}{\partial x} = 0$  et l'écoulement se trouve indépendant que la coordonnée  $x$ . L'expression de l'équation de Stokes dans cette géométrie

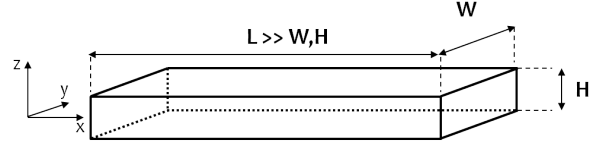


FIGURE 3.3 – Repère associé au fentes microfluidiques.

particulière donne :

$$\begin{cases} \frac{\partial P}{\partial x} = \mu \left( \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) \\ \frac{\partial P}{\partial y} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial z} = 0 \end{cases} \quad (3.7)$$

Considérant une variation linéaire de la pression  $\frac{\partial P}{\partial x} = \frac{\Delta P}{L}$ , et que les conditions de non-glissement sont satisfaites aux interfaces fluide-solide, l'équation à résoudre s'exprime donc sous la forme :

$$\begin{cases} \frac{\Delta P}{L} = \mu \left( \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) \\ v_x(y = (0, W), z) = 0 \quad \forall z \\ v_x(y, z = (0, H)) = 0 \quad \forall y \end{cases} \quad (3.8)$$

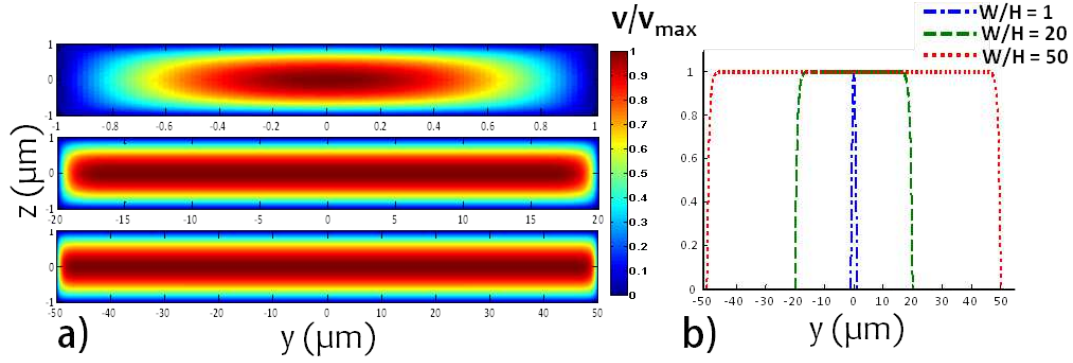
Cette équation peut être résolue par décomposition en série de Fourier. Le résultat est donné par :

$$\begin{cases} v_x(y, z) = \frac{\Delta P}{2\mu L} \left\{ [zH - z^2] \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos\left(\frac{\lambda_n(z-H/2)}{H/2}\right) \cosh\left(\frac{\lambda_n(y-W/2)}{H/2}\right) \right\} \\ \lambda_n = \frac{(2n+1)\pi}{2} \\ a_n = \frac{H^2(-1)^n}{\lambda_n \cosh\left(\frac{\lambda_n W}{H}\right)} \end{cases} \quad (3.9)$$

La figure 3.4 présente quelques profils de vitesse de fluide pour différents rapport d'aspects  $W/H$ . Compte-tenu des valeurs expérimentales de  $W/H$ , ne considérant uniquement les lignes de fluides telles que  $2H < y < W - 2H$ , nous pouvons approximer le profil à l'aide de la solution de l'équation de Stokes dans une fente infiniment large, soit :

$$v_x(z) = \frac{\Delta P H^2}{2\mu L} \frac{z}{H} \left(1 - \frac{z}{H}\right) = 4\nu_0 \frac{z}{H} \left(1 - \frac{z}{H}\right) \quad (3.10)$$

Par la suite nous ne ferons plus que référence à des écoulements planaires, ne dépendant que de la seule coordonnée  $z$ . L'écoulement suit une loi quadratique et dépend de deux paramètres essentiels que sont la vitesse maximale au plan équatorial de la canalisation  $\nu_0$  et la hauteur totale  $H$  de cette dernière. La mesure de ces deux paramètres constituera notre caractérisation.



**FIGURE 3.4** – Vitesse du fluide pour différentes géométries de canal. Les valeurs sont normées sur la vitesse maximale atteinte. a) Vitesse dans le plan  $(y, z)$  pour différents rapports d'aspect. De haut en bas :  $W/H = 1, 20, 50$ . b) Profil de vitesse selon le plan équatorial  $z = \frac{H}{2}$ . Pour les rapports d'aspect expérimentaux  $W/H > 25$ , nous ne considérerons que les particules situées dans l'intervalle  $2H < y < W - 2H$  et prendrons considérerons l'écoulement dit de Poiseuille plan Cf. 3.10.

### 3.3 Dynamique d'une bille entre deux parois

Après avoir caractérisé les propriétés de l'écoulement du fluide à bas nombre de Reynolds dans des fentes microfluidiques il nous reste à définir sa relation avec la vitesse des traceurs. Il est communément assumé que la vitesse d'un objet sphérique dans un écoulement anisotrope (au sens où la vitesse de fluide n'est pas constante suivant au moins une coordonnée, ici  $z$ ) est égale à celle du fluide au centre de la particule. Ainsi la caractérisation est-elle rendue aisée, puisqu'une fois repérée la particule et sa vitesse, la vitesse du fluide à cette même position est directement accessible. Cette hypothèse est valide dans la limite  $\frac{a}{H} \ll 1$ . Dans le cas contraire deux effets majeurs se doivent d'être pris en compte si :

- La variation de vitesse de fluide sur le diamètre n'est pas constante
- Les interactions hydrodynamiques particule-parois ne sont pas négligeables

La discussion de ces deux éléments, essentiels dans notre problème, sera menée dans les lignes suivantes. Pour un écoulement planaire la variation spatiale de la vitesse peut être appréhendée via le calcul du taux de cisaillement  $\dot{\gamma} = \frac{dv(z)}{dz}$ . Ainsi à partir de 3.10 obtient-on :

$$\dot{\gamma} = \frac{4v_0}{H} \left( 1 - \frac{2z}{H} \right) \quad (3.11)$$

La variation de vitesse du fluide sur le diamètre de la bille n'est pas constante et travaillant à  $0.05 < \frac{a}{H} < 0.3$ , l'approximation d'égalité en vitesse d'un traceur et vitesse de fluide en son centre doit donc être discutée. Revenons d'abord sur le cas de la force visqueuse s'exerçant sur une sphère solide de rayon  $a$  en mouvement avec une vitesse  $\mathbf{U}$  dans un fluide de viscosité  $\mu$ . Lorsque l'espace n'est pas borné (pas d'interaction avec des parois), la loi de Stokes donne [Stokes, 1851] :

$$\mathbf{F} = 6\pi\mu a\mathbf{U} \quad (3.12)$$

### Chapitre 3. Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques

La force s'exerçant sur une sphère dans un écoulement non perturbé  $\mathbf{v}_\infty$  peut être estimée par simple composition des vitesses (cet argument tient à la linéarité de l'équation de Stokes) :

$$\mathbf{F} = 6\pi\mu a (\mathbf{v}_\infty - \mathbf{U}) \quad (3.13)$$

À l'équilibre, la vitesse de l'objet (libre) est égale à :

$$\mathbf{U} = \mathbf{v}_\infty \quad (3.14)$$

Une approximation d'ordre supérieure revient à prendre en compte les effets de courbure du champ de vitesse fluide sur le diamètre de la sphère. Cette loi est désignée sous l'appellation de loi de Faxen [Happel and Brenner, 1983] et s'énonce telle que suit pour la force exercée sur la sphère :

$$\mathbf{F} = 6\pi\mu a (\mathbf{v}_\infty - \mathbf{U}) + \mu\pi a^3 \nabla^2 \mathbf{v}_\infty \quad (3.15)$$

Ainsi, pour un écoulement de type Couette, de cisaillement  $\dot{\gamma}$  constant dans tout l'espace le terme de droite disparaît-il. Toutefois, dans le cas présent du Poiseuille plan, celui-ci vaut  $\frac{-8\pi\mu a^3 v_0}{H^2}$ . La vitesse selon l'axe  $x$  d'une bille libre dans un tel écoulement est alors donnée par :

$$U_x(z) = 4v_0 \left[ \frac{z}{H} \left( 1 - \frac{z}{H} \right) - \frac{a^2}{3H^2} \right] \quad (3.16)$$

Nous en déduisons que la sphère, du fait de la courbure de l'écoulement, est toujours animée d'une vitesse moins rapide que le fluide non perturbé à une même hauteur  $z$ . Par exemple, la bille aura une vitesse maximale donnée par

$$U_x^{max} = U_x \left( z = \frac{H}{2} \right) = v_0 \left( 1 - \frac{4a^2}{3H^2} \right) \quad (3.17)$$

Et cette vitesse maximale est forcément inférieure à  $v_0$  et égale à la vitesse moyenne du fluide  $\frac{2}{3}v_0$  pour  $a = \frac{H}{2}$ . Pour comprendre de manière plus intuitive ce résultat, il convient de calculer la vitesse moyenne du fluide sur la diamètre d'une particule. Cette grandeur est donnée par le simple calcul :

$$U_x(z) = \frac{1}{2a} \int_{z-a}^{z+a} dz' 4v_0 \frac{z'}{H} \left( 1 - \frac{z'}{H} \right) = 4v_0 \left[ \frac{z}{H} \left( 1 - \frac{z}{H} \right) - \frac{a^2}{3H^2} \right] \quad (3.18)$$

Ce qui fait apparaître la même correction que dans l'expression 3.16. De la même manière, compte-tenu de la non inter-pénétrabilité des surfaces solides de la sphère et des parois contenant l'écoulement, l'équation 3.16 fait apparaître une vitesse minimale pour la bille donnée par :

$$U_x^{min} = U_x(z = a) = 4v_0 \left( \frac{a}{H} - \frac{4a^2}{3H^2} \right) \quad (3.19)$$

Il est très intéressant de noter que cette dépendance de la vitesse minimale de la particule suivant sa taille physique est très utilisée dans les techniques de fractionnement en milieu liquide libre ("free flow fractionation" en anglais). En effet, il suffit de plaquer des particules en écoulement sur une surface à l'aide d'une force externe pour induire une différence de vitesse de migration suivant leurs tailles.



### 3.3.1 Impact des interactions hydrodynamiques sur la dynamique d'une bille confinée

Une particule se déplaçant au sein d'un fluide au repos imprime sur ce dernier une force et induit un écoulement. Cet écoulement *secondaire* est à l'origine d'une interaction de cette particule avec d'autres billes à son voisinage mais aussi avec des parois limitant l'espace. Cette interaction est dite *hydrodynamique* et décroît comme  $1/r$ ,  $r$  indiquant la distance à l'origine de l'application de la force (e.g la surface de la particule). Ainsi, compte-tenu du confinement important de la particule dans nos expériences et du fait que la particule soit libre et possiblement en contact proche avec les parois, la prise en compte de cette interaction n'est pas accessoire. Dans un fluide au repos, considérant des distances  $r \gg a$ , la force imprimée par une particule à l'origine d'un repère peut être considérée comme ponctuelle  $\mathbf{F}_p \delta(\mathbf{r})$ . L'écoulement engendré est donné par la résolution des équations de Stokes (Cf. par exemple [Doi, 1988]) sous cette force externe. Celui-ci, sous forme tensorielle, est donné par :

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) = \mathbf{H}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{F}_p \quad (3.20)$$

Où  $\mathbf{H}$  est le tenseur d'Oseen qui s'exprime comme :

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}) = \frac{1}{8\pi\mu r} \left( \mathbb{1} + \frac{\mathbf{r}\mathbf{r}^t}{r^3} \right) \quad (3.21)$$

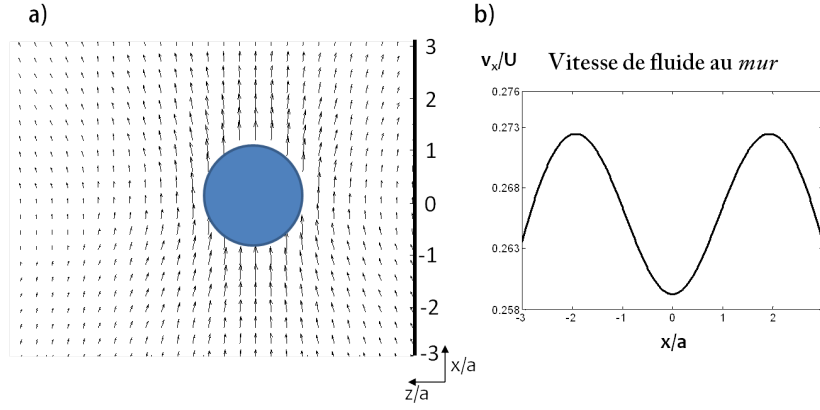
On retrouve alors la dépendance en  $1/r$  de l'interaction décrite plus tôt. Considérons maintenant une sphère de rayon  $a$  se déplaçant à une vitesse  $U$  parallèlement à l'axe des  $x$  et située à l'origine d'un repère  $(x, y, z)$  centré en son centre. Cette sphère imprime alors une force donnée par  $F_x = 6\pi\mu a U \delta(\mathbf{r})$  sur le fluide. Le champ de vitesse de fluide (au repos à l'infini) est alors décrit, en coordonnée sphérique dans le plan  $(x, y)$ , par (Cf. par exemple [Guyon et al., 2001] p 462)

$$\begin{cases} v_r = U \cos\phi \left( \frac{3a}{2r} - \frac{a^3}{2r^3} \right) \\ v_\phi = -U \sin\phi \left( \frac{3a}{4r} + \frac{a^3}{4r^3} \right) \end{cases} \quad (3.22)$$

Si l'on positionne alors une paroi à une distance  $3a$  du centre de la sphère, garder pour description celle d'une sphère dans un milieu infini conduit à violer la condition de non glissement au bord tel qu'illustré à l'aide de la figure 3.5. Afin de palier à cette déviation, on peut employer une méthode consistant ajouter un écoulement *imaginaire*, tel que la somme de ce dernier avec l'écoulement généré par la particule réelle satisfasse la condition de non glissement à la paroi solide. Cette approche constitue l'ordre 1 d'une méthode dite des *réflexions* [Lorentz, 1897] et est rendue possible grâce à la linéarité des équations de Stokes. Cette méthode consiste à traduire l'écoulement induit en termes de vitesse et de pression par :

$$\begin{cases} \mathbf{v} = \mathbf{v}^{(0)} + \mathbf{v}^{(1)} + \mathbf{v}^{(2)} + \dots \\ p = p^{(0)} + p^{(1)} + p^{(2)} \dots \end{cases} \quad (3.23)$$

Dans cet exemple précis,  $\mathbf{v}^{(0)}$  est l'écoulement induit par la particule dans un milieu infini,  $\mathbf{v}^{(1)} = -\mathbf{v}^{(0)}$  à la paroi et s'annule à l'infini et enfin  $\mathbf{v}^{(2)} = -\mathbf{v}^{(1)}$  à la surface de la particule et s'annule à l'infini. L'ordre un de cette méthode a été décrit par Lorentz (voir par exemple [Happel and Brenner, 1983] pp 88-89) pour une sphère se déplaçant perpendiculairement à une paroi. Ce dernier a montré qu'il était possible, à partir d'une solution  $(\mathbf{v}', p')$  de l'équation de Stokes d'exprimer une autre solution  $(\mathbf{v}'', p'')$  à cette même équation telle que la somme des deux satisfasse la condition de non glissement à la paroi. La solution  $\mathbf{v}''$  correspond alors à l'image miroir du mouvement  $\mathbf{v}'$  induit par la particule du côté des  $x$



**FIGURE 3.5** – Représentation de l'écoulement induit par le déplacement d'une sphère solide dans un milieu infini. a) Représentation de l'écoulement défini selon 3.22. Une paroi est arbitrairement positionnée à  $3a$  du centre de la sphère : le caractère longue portée des interactions hydrodynamiques conduit à la violation de la condition de non glissement à la paroi avec une telle description de l'écoulement induit. b) Vitesse tangentielle à la paroi fictive illustrant le non respect du non glissement. Dans une telle situation, la loi de Stokes 3.12 et de Faxen 3.15 doivent être redéfinies.

négatifs. Un des résultats majeur de cette approche est de pouvoir déduire l'effet sur la force de friction sur la sphère induite par la superposition des écoulements. Pour une sphère, à une distance  $l$  d'un mur, et translatant suivant  $\mathbf{e}_x$  perpendiculairement à ce dernier à une vitesse  $\mathbf{U} = U\mathbf{e}_x$ , cette force est donnée par :

$$\mathbf{F}_x = -6\pi\mu a(v'_x + v''_x) = 6\pi\mu a \left(1 + \frac{9a}{8l}\right) \quad (3.24)$$

Ainsi la force de friction en présence d'une paroi est-elle supérieure à la force donnée par la formule de Stokes en milieu non confiné. Cette dernière formule a été étendue par Brenner ([Happel and Brenner, 1983] p330). Pour une sphère en mouvement de translation perpendiculaire à une distance  $z$  au dessus d'une paroi cette force s'exprime par :

$$\begin{cases} F_{\perp} = 6\pi\mu a U \lambda_{\perp} \\ \lambda_{\perp} = \frac{4}{3} \sinh \alpha \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+1)}{(2n-1)(2n+3)} \left[ \frac{2 \sinh(2n+1)\alpha + (2n+1) \sinh(2\alpha)}{4 \sinh^2(n+\frac{1}{2}) - (2n+1)^2 \sinh^2 \alpha} - 1 \right] \end{cases} \quad (3.25)$$

Avec  $\alpha = \cosh^{-1}(\frac{z}{a})$ . Pour un mouvement parallèle à une paroi, Faxen a donné l'approximation suivante :

$$\begin{cases} F_{\parallel} = 6\pi\mu a U \lambda_{\parallel} \\ \lambda_{\parallel} = \left[ 1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{z}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{z}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{z}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{z}\right)^5 \right]^{-1} \end{cases} \quad (3.26)$$

Ainsi ces résultats montrent bien l'impact drastique que peut avoir la proximité d'une paroi sur la dynamique d'une sphère solide. Les résultats 3.26 et 3.25 nous seront d'une grande importance dans la construction de la dynamique brownienne pour valider notre travail de modélisation analytique.

La définition des forces de friction agissant sur une sphère nous permet de redéfinir son coefficient de diffusion. En effet, les facteurs correctifs  $\lambda_{\perp}$  et  $\lambda_{\parallel}$  permettent de définir une viscosité apparente (divergeant à la paroi)  $\mu_{app} = \mu \lambda_{\perp, \parallel}$  que l'on peut introduire dans la relation de Stokes-Einstein, liant les fluctuations à la dissipation, et définissant le coefficient de diffusion  $D_0$  d'une particule sphérique

dans un milieu infini :

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\mu a} \quad (3.27)$$

$k_B$  et  $T$  étant respectivement la constante de Boltzmann et la température du système. Dans la situation où la particule est placée à proximité d'un mur, on peut ainsi exprimer les coefficients de diffusion parallèle et perpendiculaire à la paroi par :

$$\begin{cases} D_{\parallel}^I = \frac{D_0}{\lambda_{\parallel}} \\ D_{\perp}^I = \frac{D_0}{\lambda_{\perp}} \end{cases} \quad (3.28)$$

Avec  $D_0$  défini par 3.27. L'exposant  $.^I$  indiquant des résultats adaptés à la présence d'une seule paroi. On trouvera dans la littérature la confirmation expérimentale de cette diffusion ralentie [Feitosa and Mesquita, 1991] [Fauchaux and Libchaber, 1994]. Pour des rapports  $0.1 < 2a/H < 0.3$  tels que dans nos expériences, l'influence des deux murs sur la friction apparente doit être prise en compte. Celle-ci peut être, en première approximation, déduite de la superposition linéaire de l'impact sur la friction des deux murs, distants de  $z$  et  $H - z$  du centre de la particule. Cette approche a initialement été proposée par Oseen (voir par exemple [Happel and Brenner, 1983]). Ainsi, en utilisant les deux premiers termes des développements 3.25 et 3.26 obtient-on :

$$\begin{cases} \frac{D_{\parallel}^{II}}{D_0} = 1 - \frac{9a}{16} \left( \frac{1}{z} + \frac{1}{H-z} \right) \\ \frac{D_{\perp}^{II}}{D_0} = 1 - \frac{9a}{8} \left( \frac{1}{z} + \frac{1}{H-z} \right) \end{cases} \quad (3.29)$$

L'exposant  $.^{II}$  indiquant les quantités en présence de deux murs. Cette approximation se révèle être inadaptée pour une particule très proche d'un des murs car elle se traduit par des valeurs négatives du coefficient de diffusion. Cette dernière n'a donc cessé d'être raffinée depuis Oseen, à l'aide de la méthode des réflexions. Ces approximations ont pris pour noms *hypothèse de superposition cohérente* [Lobry and Ostrowsky, 1996] [Lin et al., 2000], ou encore *approximation de superposition cohérente modifiée* (MCSA) [Benesch et al., 2003]. Nous avons fait ici le choix de suivre cette dernière méthode, qui s'est montrée prédire de manière plus précise les résultats d'expériences de diffusion en régime confinée par ses auteurs, mais surtout, de tendre vers 0 pour le coefficient de diffusion perpendiculaire lorsque la particule s'approche des parois  $z \rightarrow a$  et  $z \rightarrow H - a$ . Ce dernier critère n'étant, dans le cas du mouvement parallèle à la paroi, pas atteint du fait de l'absence de résultat analytique complet pour un seul mur. Dans le cadre de cette approximation, les coefficients de diffusion pour une particule s'expriment à l'aide du développement en série suivant :

$$\begin{aligned} \frac{D^{II}}{D_0} = & \left\{ 1 + \left[ \frac{D_0}{D^I(z)} - 1 \right] + \left[ \frac{D_0}{D^I(H-z)} - 1 \right] + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{nH-z-a}{nH-z} \left[ \frac{D_0}{D^I(nH+z)} - 1 \right] \right. \\ & \left. + \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{(n-1)H+z-a}{(n-1)H+z} \left[ \frac{D_0}{D^I((n+1)H-z)} - 1 \right] \right\}^{-1} \end{aligned} \quad (3.30)$$

Le résultat de cette superposition pour les coefficients de diffusion perpendiculaire et parallèle à la paroi est présenté dans la figure 3.6 pour  $\lambda_{\perp}$  et  $\lambda_{\parallel}$  décrits à l'aide de 3.25 et 3.26. Outre le fait que le coefficient de diffusion décroisse très rapidement lorsque la particule est située près des parois, on observe que cette grandeur devient anisotrope dans une géométrie confinée. De plus, le coefficient de diffusion moyen à l'intérieur d'une canalisation est inférieur au coefficient libre, même lorsqu'on se

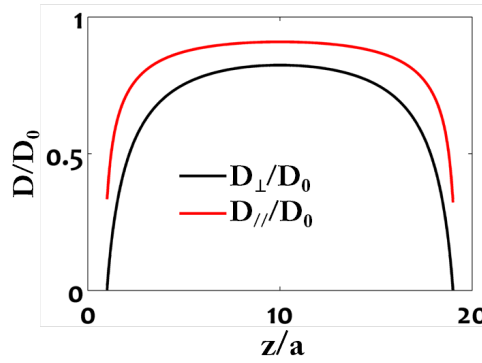


FIGURE 3.6 – Coefficients de diffusion d'une sphère entre deux parois pour  $a/H = 0.05$  d'après la superposition MCSA (eq. 3.30). Les données sont normées sur le coefficient de diffusion en milieu infini 3.27.

place au centre du canal. On peut aussi définir un coefficient de diffusion moyen sur la hauteur de la canalisation, dont la valeur est typiquement divisée par deux pour  $a/H = 0.05$ .

### 3.3.2 Vitesse de translation d'une sphère confinée entre deux murs dans un écoulement de Poiseuille

A partir des équations de Stokes, lesquelles impliquent et décrivent des interactions hydrodynamiques longue portée non négligeables dans l'écoulement de particules proches de parois, nous avons présenté les équations gouvernant les forces de friction entre une bille et un mur. Nous souhaitons maintenant synthétiser les travaux permettant d'exprimer la vitesse de migration d'un traceur dans une canalisation confinée. Il existe une vaste littérature de travaux théoriques décrivant la translation d'objets sphériques proches d'une paroi en régime visqueux. Différentes méthodes ont été éprouvées pour donner une solution à ce problème, comme la méthode des réflexions décrite plus tôt [Ho and Leal, 1974], l'utilisation des coordonnées bisphériques [Pasol et al., 2006], des développements multipolaires [Jones, 2004], ou encore des éléments de frontière [Staben et al., 2003]. Notre ambition n'est pas ici d'en donner une description approfondie (une telle discussion nous est hors de portée mais serait surtout hors de propos), mais plutôt de donner quelques résultats utiles à l'expérimentateur. Dans cette optique, les travaux de Williams [Williams et al., 1992], Chaoui [Chaoui and Feuillebois, 2003], Ekiel-Jeżewska [Ekiel-Jeżewska and Wajnryb, 2006], Pasol [Pasol et al., 2006] [Pasol et al., 2011] sont les plus adéquats. Pour les résumer, revenons d'abord sur l'approche de Goldman [Goldman et al., 1967], reprise par Williams et al. [Williams et al., 1992]. L'approximation de cisaillement simple est très largement utilisée dans la littérature expérimentale, et elle est justifiée pour étudier l'écoulement de particules lorsque  $\frac{a}{H} \ll 1$ . Dans cette situation, on peut au premier ordre négliger la courbure du fluide proche de la paroi mais aussi l'influence d'un deuxième mur sur la dynamique des particules. Dans un écoulement de ce type, la vitesse du fluide est donnée par

$$v_{\infty}^S = \dot{\gamma}_0 z \quad (3.31)$$

L'exposant  $^S$  signifiant cisaillement simple. Pour une distance paroi-bille très faible, le régime de lubrification est atteint. La vitesse  $U$  d'une sphère en translation suivant  $x$  est alors donnée par la

formule suivante (valable seulement au voisinage des parois  $z \in [a, 1.1a]$ ) :

$$U = \frac{v_{\infty}^S}{0.66 - 0.26393 \log\left(\frac{z}{a} - 1\right)} \quad (3.32)$$

Notons que cette formule a été obtenue par ajustement par Williams et *al.* des résultats de Goldman et *al.*. Les autres travaux sus-cités ont œuvré à l'extension des solutions à un plus grand domaine en  $z$  et donc à traiter les influences simultanées des deux parois contenant l'écoulement. Les travaux de Pasol et *al.* [Pasol et al., 2011] seront pris comme référence dans ce manuscrit. Ce choix est motivé par le fait que leur auteurs fournissent des formules analytiques, résultats de l'ajustement de travaux numériques, donnant la vitesse de translation d'une bille sur tout le domaine compris entre deux parois solides. Pour le résumer, le problème abordé par Pasol et al. consiste à exprimer la force  $\mathbf{F}$  et le couple  $\mathbf{C}$  appliquée sur une sphère de rayon  $a$  ayant une vitesse en translation  $\mathbf{U}$  et en rotation  $\Omega$ . Comme nous avons déjà pu y faire référence, les équations de Stokes étant linéaires, il est possible d'obtenir la solution globale à un problème en la décomposant en diverses situations physiques constitutives. La première décomposition consiste à remarquer que le profil Poiseuille peut se décomposer en la somme d'une profil de cisaillement simple (noté  $s$ ) avec un profil quadratique (noté  $q$ ) tels que :

$$v_{\infty} = k_s z + k_q z^2 \quad (3.33)$$

Par identification avec l'équation 3.10 on obtient :

$$\begin{cases} k_s = \frac{4v_0}{H} \\ k_q = \frac{-4v_0}{H^2} \end{cases} \quad (3.34)$$

On peut ensuite exprimer la relation entre force, couple, vitesse de translation et de rotation de la sphère à l'aide de facteurs de friction [Chaoui and Feuillebois, 2003] [Pasol et al., 2006] [Pasol et al., 2011], comme présenté dans la table 3.1.

Pour une sphère libre, force  $F_x^t + F_x^r + F_x^s + F_x^q = 0$  et couple  $C_y^t + C_y^r + C_y^s + C_y^q = 0$  totaux selon  $x$  et  $y$  s'annulent et l'on peut alors exprimer :

$$\frac{U}{4v_0} = \frac{c_{yy}^r f^p + f_{xy}^r c^p}{c_{yy}^r f_{xx}^t - f_{xy}^r c_{yx}^t} \quad (3.35)$$

Avec  $f^p = \frac{z}{a} f_{xx}^s - \left(\frac{z}{a}\right)^2 f_{xx}^q$  et  $c^p = \frac{a}{2H} c_{yx}^s - \frac{az}{H^2} c_{yx}^q$ . Les formules issues de leur ajustement sont disponibles dans la référence [Pasol et al., 2011]. Les résultats obtenus pour la vitesse d'une bille dans un écoulement de Poiseuille planaire sont présentés dans la figure 3.7 parallèlement aux résultats obtenus avec la formule de Faxen 3.15 pour différents rayons de traceur dans une canalisation de hauteur  $H = 1 \mu\text{m}$ . Les données sont normées sur la vitesse maximale du fluide. Il est clairement visible que la prise en compte des interactions hydrodynamiques (abrégées IH) conduit à un ralentissement plus important de la vitesse de la bille que celui prédit par la formule de Faxen. Ce ralentissement est d'autant plus fort que le traceur est proche de la paroi ou que son diamètre est important par rapport à la hauteur de la canalisation (confinement accru).

Cas d'une sphère en translation simple, de vitesse  $U_x$  dans un fluide au repos :

$$F_x^t = -6\pi a\mu U f_{xx}^t$$

$$C_y^t = 8\pi a^2 \mu U c_{xy}^t$$

Cas d'une sphère en rotation avec une vitesse  $\Omega_y$  dans un fluide au repos :

$$F_x^r = 6\pi a^2 \mu \Omega_y f_{xy}^r$$

$$C_y^r = -8\pi a^3 \mu \Omega_y c_{yy}^r$$

Cas d'une sphère fixe dans un cisaillement simple  $k_s z$  selon x :

$$F_x^s = 6\pi a z \mu k_s f_{xx}^s$$

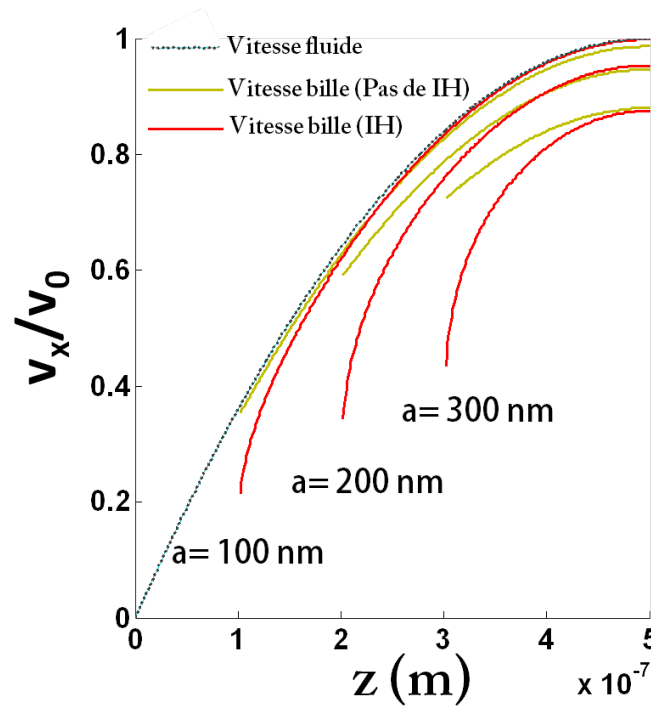
$$C_y^s = 4\pi a^3 \mu k_s c_{yx}^s$$

Cas d'une sphère fixe dans un écoulement quadratique  $k_q z^2$  selon x :

$$F_x^q = 6\pi a z^2 \mu k_q f_{xx}^q$$

$$C_y^q = 8\pi a^3 z \mu k_q c_{yx}^q$$

**TABLE 3.1** – Coefficient de friction tels que définis par Pasol et *al.*. Les exposants  $r$  et  $t$  signifiant les situations de rotation et de translation respectivement. Les exposants  $s$  et  $t$  décrivant les éléments imputables aux composantes de cisaillement simple et quadratique du profil de Poiseuille.



**FIGURE 3.7** – Vitesse d'un traceur sphérique de rayon  $a$  dans un écoulement Poiseuille planaire. Sont représentées les vitesses du fluide, du traceur telle que donnée par la formule de Faxen et suivant les travaux de Pasol et *al.* pour différents rayons  $a$  dans une canalisation de hauteur  $H=1\text{ }\mu\text{m}$ . L'inclusion des interactions hydrodynamiques (IH) conduit à un ralentissement d'autant plus important que  $a/H$  est grand ou que la particule est proche d'une des deux parois. N'est représentée que la partie basse de la canalisation, le champ de vitesse étant symétrique par rapport au plan équatorial  $z = \frac{H}{2}$ .

### 3.4 Construction d'un modèle d'ajustement des données expérimentales

Nous avons clarifié nos objectifs de caractérisation des écoulements confinés, précisé les données qui nous sont expérimentalement accessibles ainsi que les modèles essentiels décrivant le transport d'une particule sphérique dans un écoulement de Poiseuille. Pour extraire les paramètres intrinsèques d'un écoulement que sont la vitesse maximum du fluide  $v_0$  et la hauteur de la canalisation  $H$ , nous avons construit un modèle analytique permettant d'ajuster les données expérimentales. Nous nous proposons de présenter ce modèle dans la partie suivante.

#### 3.4.1 Densité de probabilité de vitesse du traceur

La dimension  $z$  perpendiculaire à l'écoulement nous étant inaccessible, et les traceurs browniens, il nous est impossible de procéder à une caractérisation par vélocimétrie de particule (voir la figure 3.2 qui donne un exemple de trajectoire). Afin d'ajuster ces données nous devons donner une expression à la densité de probabilité de vitesse des traceurs selon la direction de l'écoulement et perpendiculairement à cette dernière. Les développements qui suivent sont donnés à titre d'exemple dans la limite donnée par Faxen, c'est à dire sans interaction hydrodynamique avec les parois, et ce parce-qu'elle permet un développement analytique. Pour la construction du modèle d'ajustement, nous utiliserons des formules numériques incluant les effets d'interaction hydrodynamique aux parois.

#### Densité de probabilité de vitesse selon la direction de l'écoulement

Le problème à résoudre ici consiste à, connaissant la relation position vitesse donnée par 3.16, de donner la fréquence  $f(U_x)$  d'apparition d'état  $U_x$  tels que  $U_x - dU < U_x < U_x + dU$  indépendante de la position  $z$ . Ce raisonnement se retrouve en mécanique du solide pour faire la relation entre densité d'état en vecteur d'onde et densité d'état en énergie. À la limite infinitésimale, pour une probabilité de présence en  $z$  donnée par  $n(z)$ , on peut écrire l'égalité du nombre d'états en  $z$  et en  $v$  :

$$f(U_x) dU_x = n(z) dz \quad (3.36)$$

Soit encore :

$$f(U_x) = n(z) \frac{dz}{dU_x} \quad (3.37)$$

De 3.16 on tire :

$$\frac{dz}{dU_x} = \frac{1}{4v_0 \left( \frac{1}{H} - \frac{2z}{H^2} \right)} \quad (3.38)$$

Afin d'éliminer la coordonnée  $z$  des équations il est possible d'inverser 3.16 d'où l'on tire :

$$z_{\pm} = \frac{H}{2} \pm \frac{H}{2} \sqrt{1 - \frac{4a^2}{3H^2} - \frac{v}{v_0}} \quad (3.39)$$

Nous nous restreindrons par la suite à la solution  $z_-$  et donc à la partie basse de la canalisation et ce sans incidence sur le résultat final. En effet, le champ de vitesse étant symétrique par rapport au plan  $z = \frac{H}{2}$  nous pouvons nous restreindre au domaine  $z \in [0, \frac{H}{2}]$  puis compter 2 fois les états, ce préfacteur disparaissant par la suite lors de l'étape de normalisation. Ainsi pouvons-nous exprimer  $f(U_x)$  à un

facteur de normalisation  $A$  près :

$$f(U_x) = A \frac{n(z) H}{v_0 \sqrt{1 - \frac{4a^2}{3H^2} - \frac{U_x}{v_0}}} = A \frac{n(z) H}{\sqrt{v_0 (U_{max} - U_x)}} \quad (3.40)$$

Le préfacteur  $A$  pouvant être évalué par :

$$\int_{U_x^{min}}^{U_x^{max}} f(U_x) dU_x = 1 \quad (3.41)$$

Reste à évaluer ici la quantité  $n(z)$ , densité de probabilité de présence de la particule suivant  $z$ . Comme discuté par [Bretherton, 1962], il ne peut exister de force de portance pour une sphère et un plan en régime de Stokes. Et comme décrit en introduction, dans nos conditions expérimentales, les forces de lift d'origine inertielle et électrovisqueuse sont négligeables devant l'agitation thermique. La longueur de Debye dans notre système ne dépasse pas quelques nm [Hsieh et al., 2008]. Aussi pouvons nous exclure toute interaction électrostatique de la particule avec la surface. Ainsi pouvons-nous faire l'hypothèse que la densité de probabilité de présence est homogène sur toute la hauteur de la canalisation et écrivons :

$$n(z) = \frac{1}{H - 2a} \quad (3.42)$$

La normalisation de la distribution nous donne l'expression finale de la densité de probabilité de présence en  $U_x$ .

$$f(U_x) = \frac{1}{2v_0^{-1/2} \sqrt{\left(1 - \frac{4a}{H} - \frac{4a^2}{3H^2}\right) (U_{max} - U_x)}} \quad (3.43)$$

Avec :

$$U_x^{max} = v_0 \left(1 - \frac{4a^2}{3H^2}\right) \quad (3.44)$$

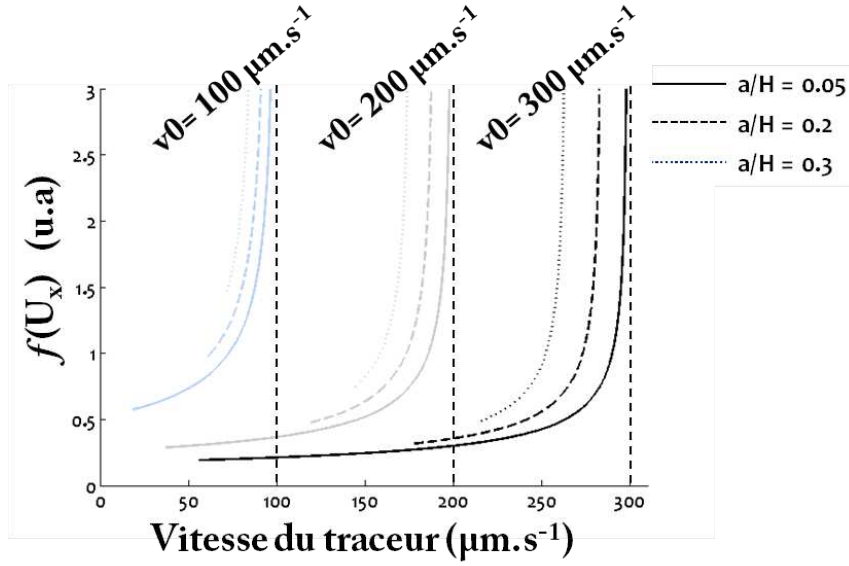
Le tracé de cette distribution est donné en figure 3.8 pour différentes vitesses de fluide et tailles de traceurs. Ces distributions font apparaître une dépendance très forte aux paramètres  $v_0$  et  $H$ . Qualitativement, le paramètre  $v_0$  détermine la position du pic de la distribution. Ce dernier se décale vers les basses vitesses lorsque la taille du traceur utilisé augmente. Ceci est cohérent avec la définition de la vitesse maximale que peut atteindre la bille du fait de la courbure du champ de vitesse du fluide. Cette vitesse maximale tend vers  $v_0$  pour  $a \ll H$  et tend vers  $2/3 v_0$  pour  $a$  tendant vers  $H/2$ . A vitesse de fluide donnée, l'influence du paramètre hauteur de la canalisation se retrouve vers la queue de la distribution, vers les basses vitesses. Compte-tenu de l'exclusion de la particule de la zone  $z \in [0, a]$ , la vitesse minimale accessible par le traceur sera d'autant plus basse que  $H$  grand à rayon de particule constant.

Comme dit plus haut, le calcul des distributions incluant les effets des interactions hydrodynamiques traceur-paroi ne peut être mené que numériquement. Les calculs précédents nous ont toutefois permis d'élarguer le comportement des distributions en fonction des paramètres d'ajustement  $v_0$  et  $H$ .

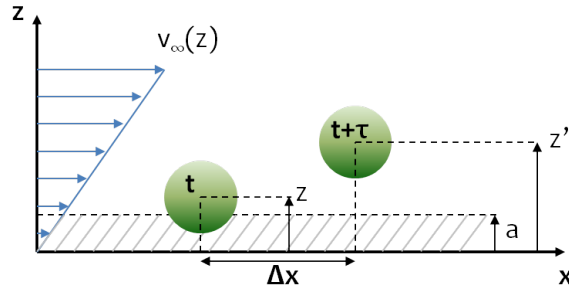
#### Convolution des distributions théoriques

Comme nous pouvons le constater à l'aide des figures 3.2 et 3.8, modèle et expérience semblent à ce stade difficilement comparables. Cet effet est lié à la nature brownienne des traceurs utilisés. Comme nous pouvons le voir sur la figure 3.1, le phénomène de diffusion impacte les distributions





**FIGURE 3.8** – Tracé de la densité de probabilité  $f(U_x)$  pour différents paramètres  $v_0$  et  $a/H$ . De gauche à droite, chaque groupe de trois distributions correspondent à  $v_0 = 100, 200$  et  $300 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Ces tracés illustrent clairement la dépendance de  $f(U_x)$  au paramètres  $v_0$  et  $H$ .

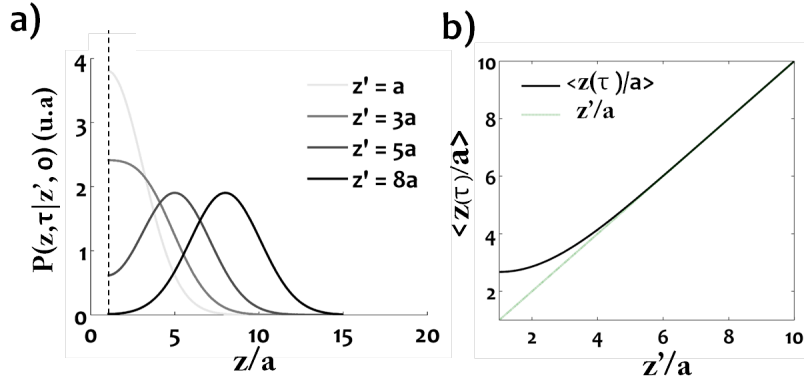


**FIGURE 3.9** – Schéma descriptif d'un traceur sphérique proche d'une paroi.

de vitesse du fait 1) du changement de ligne de fluide de la particule en  $z$ , mais aussi 2) se superpose aux déplacements liés à l'advection suivant l'axe  $x$  de l'écoulement. Prendre correctement en compte l'effet 1) impose la résolution de l'équation de Fokker-Planck pour la probabilité de présence d'une particule après un intervalle de temps de caméra. Cette opération est rendue délicate par la dépendance à la coordonnée  $z$  du coefficient de diffusion des traceurs. En présence d'un simple mur, avec une approximation de l'expression du coefficient de diffusion perpendiculaire à la paroi, cette approche a été numériquement menée Sadr et *al.* [Sadr et al., 2007]. Cet effet peut être, sans trop de complexité, appréhendé pour un coefficient de diffusion constant. La géométrie du problème est rappelé dans la figure 3.9. Dans une telle situation, la diffusion de la particule suivant  $z$  est décrite par l'équation suivante :

$$\frac{\partial P(z, t|z', 0)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 P(z, t|z', 0)}{\partial z^2} \quad (3.45)$$

Où  $P(z, t|z', 0)$  est la probabilité conditionnelle de trouver la particule à une altitude  $z$  après un temps  $t$  alors qu'elle se trouvait en  $z'$  en  $t = 0$ . Le coefficient de diffusion étant donné par la relation de Stokes Einstein 3.27. En présence de la paroi réfléchissante que constitue la mur de la canalisation en  $z = 0$ , la



**FIGURE 3.10** – Effet de la diffusion en  $z$ . a) Probabilité conditionnelle  $P(z, \tau | z', 0)$  pour  $z' = a, 2a, 5a, 8a$  et  $a=100$  nm,  $D_0 = 2.2 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $\tau = 10$  ms. b) Position moyenne  $\langle z(\tau) \rangle$  de la particule en fonction de son altitude initiale  $z'$ .

solution de 3.45 prend la forme :

$$P(z, \tau | z', 0) = A \left[ \exp\left(-\frac{(z - z')^2}{4D_0\tau}\right) + \exp\left(-\frac{(z + z' - 2a)^2}{4D_0\tau}\right) \right] \quad (3.46)$$

Où la constante  $A$  assure la normalisation sur le domaine  $z \in [a, +\infty]$ . Pour quelques valeurs de  $z'$  les distributions  $P(z, t | z', 0)$  sont représentées sur la figure 3.10 a) en prenant pour traceur une particule sphérique de 100 nm de diamètre dans un fluide de viscosité  $\mu = 1.10^{-3} \text{ Pa.s}$  à température ambiante. Par suite il est possible d'évaluer la position moyenne de la particule  $\langle z(\tau) \rangle$  après un temps  $\tau$  pour différentes position initiales  $z'$ . Ces valeurs sont représentées sur la figure 3.10 b) et obtenues à l'aide de

$$\langle z(\tau) \rangle = \int_a^{+\infty} dz z P(z, \tau | z', 0) \quad (3.47)$$

De cette figure transparaît que la position moyenne de la particule dévie fortement de sa position initiale lorsqu'elle se trouve initialement proche du mur. A quel impact doit-on alors s'attendre sur les distributions de vitesses? Loin de la paroi, le profil de vitesse du fluide peut être vu comme quasi-linéairement variant ou même comme très peu variant vers le centre de la canalisation. Dans la région de variation quasi linéaire du fluide, la diffusion durant  $\tau$  conduit à un déplacement tantôt vers des lignes de fluide de plus haute vitesse, tantôt vers des lignes de plus basse vitesse. Si bien qu'au premier ordre et en valeur moyenne, la particule peut être vue comme n'ayant pas diffusé. Dans la zone centrale de la canalisation, le gradient de vitesse est faible, l'effet de moyenne par diffusion peut donc être également au premier ordre négligé. Proche des parois, le phénomène n'est plus négligeable. Le mur près duquel la particule s'écoule brise la symétrie de sa diffusion. Imageant deux positions successives, un traceur initialement à une altitude  $z(t=0) = a$  (au plus proche de la paroi) aura, du fait de la présence du mur une position moyenne après un temps  $\tau$   $\langle z(t=\tau) \rangle > a$ . Ce biais est bien connu des expériences de vélocimétrie proche d'un mur [Lumma et al., 2003] [Sadr et al., 2005] [Pouya et al., 2008]. Nous négligerons toutefois pour l'heure cet effet de diffusion en  $z$  et nous justifions comme suit.

Le temps d'exposition doit répondre à deux critères, être assez long pour minimiser les effets de

### 3.4. Construction d'un modèle d'ajustement des données expérimentales

diffusion dans le plan  $(x, y)$  devant l'entraînement du fluide mais aussi assez réduit pour éviter la disparition des états de basse vitesse, pour les particules en bord de canalisation. Ces deux conditions peuvent s'exprimer simplement, en terme de coefficient de diffusion, de hauteur de canal et de vitesse en son centre. Nous prendrons ici pour exemple le cas limite d'un coefficient de diffusion constant, et un traceur dans un cisaillement simple de vitesse  $U_x = \frac{4v_0}{H}z = \dot{\gamma}z$ . Cette approche est analogue à celle menée par Saffman étudiant la dispersion de traceurs emportés par le vent au dessus du sol [Saffman, 1962] et a pour effet de maximiser l'effet de la diffusion aux bords : elle implique des conditions plus rigides que réellement nécessaires [Sadr et al., 2007]. La première condition revient à exprimer le rapport entre déplacement d'origine diffusive ou lié au mouvement du fluide. Celle-ci s'exprime comme :

$$\frac{\Delta x^{diff}}{\Delta x^{Advection}} = \frac{\sqrt{D\tau}}{v\tau} < 1 \quad (3.48)$$

Soit encore :

$$\tau \gg \frac{D}{v^2} \quad (3.49)$$

Considérant  $D \approx 10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  et  $v \approx 100 \mu\text{m}.\text{s}^{-1}$  on obtient une limite basse  $\tau_{min} \approx 0.1 \text{ ms}$ . La deuxième condition provient du fait que nous négligeons les effets de diffusion suivant  $z$  et considérons que les fluctuations de vitesses sont dominées par les fluctuations en  $x$ . Pour un traceur de vitesse instantanée  $v_1 = \frac{\Delta x}{\tau}$  suivant  $x$ , l'effet de la diffusion selon la même direction lui confère une vitesse effective moyenne donnée par :

$$\bar{v} = \frac{\delta x + \sqrt{D\tau}}{\tau}$$

Soit une dispersion de vitesse suivant  $x$  dictée par

$$\frac{\Delta v_1^x}{v_1} = \frac{|v_1 - \bar{v}|}{v_1} \approx \frac{\sqrt{D}}{\sqrt{\tau} v_1}$$

Pour ce même traceur, de vitesse instantanée  $v_1$  suivant  $x$  et à l'altitude  $z_1$ , la moyenne sur un temps  $\tau$  lui confère une vitesse moyenne

$$\bar{v} = \frac{1}{\sqrt{D\tau}} \int_{z_1}^{z_1 + \sqrt{D\tau}} dz' \dot{\gamma} z' = v_1 + \frac{\dot{\gamma}}{2} \sqrt{D\tau}$$

Soit une dispersion de vitesse due à la diffusion en  $z$  donnée par

$$\frac{\Delta v_1^z}{v_1} = \frac{|v_1 - \bar{v}|}{v_1} \approx \frac{2 \cdot \gamma \sqrt{D\tau}}{2 v_1}$$

Ainsi, négliger la dispersion de vitesse suivant la direction  $z$  revient à satisfaire :

$$\frac{\Delta v_1^z}{\Delta v_1^x} \approx \frac{\dot{\gamma}\tau}{2} < 1$$

Soit encore pour  $\tau$  :

$$\tau < \frac{2}{\dot{\gamma}} \quad (3.50)$$

Pour des taux de cisaillement typiques de nos expériences ( $\dot{\gamma} \approx 100 \text{ s}^{-1}$ ), on obtient ainsi  $\tau < 20 \text{ ms}$ . Il est assez remarquable que le coefficient de diffusion n'apparaissent pas dans l'expression finale. Ceci a

### Chapitre 3. Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques

trait à la méthode employée. Contrairement aux techniques classiques de de vélocimétrie de particules, nous mettons à profit la diffusion pour échantillonner l'espace en  $z$  et ne requérons pas  $D \rightarrow 0$ . Cette deuxième condition semble assez forte, compte tenu du fait que nous travaillons principalement à  $\tau \approx 8ms$ . Rappelons toutefois que cette dernière est plus forte que nécessaire, car nous n'avons pas pris en compte pour la dériver le fait que le coefficient de diffusion n'est pas homogène dans la canalisation. Nous faisons donc l'hypothèse que le processus de diffusion affecte majoritairement le mouvement dans le plan  $(x, y)$ . Cette approximation sera plus amplement discutée à la lumière des résultats des dynamiques browniennes

La distribution expérimentale est la résultante de la convolution de la distribution théorique par une certaine distribution de bruit qu'il nous incombe de caractériser. Dans un milieu infini, où la diffusion est caractérisée par un coefficient constant, la probabilité conditionnelle de trouver la particule à une position  $x$  après un temps  $\tau$  alors qu'elle se trouvait en  $x'$  en  $t = 0$  est solution de l'équation 3.45 pour la coordonnée  $x$ . Cette solution prend la forme d'une gaussienne d'équation :

$$P^{Diff}(x, \tau | x', 0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \exp\left(-\frac{(x - x')^2}{4D_0 \tau}\right) \quad (3.51)$$

Donner une expression à la distribution de bruit sur la vitesse repose sur la donnée de  $P^{Diff}(U_x, \tau)$ , probabilité d'acquérir une vitesse  $U_x$  moyenne sur un temps  $\tau$  pour un mouvement diffusif. Par analogie avec 3.51 on peut exprimer :

$$P^{Diff}(U_x, \tau | U'_x, 0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 f_{aq}}} \exp\left(-\frac{(U_x - U'_x)^2}{4D_0 f_{aq}}\right) \quad (3.52)$$

$f_{aq}$  étant la fréquence d'acquisition de la caméra reliée à l'intervalle de temps par  $f_{aq} = 1/\tau$ .

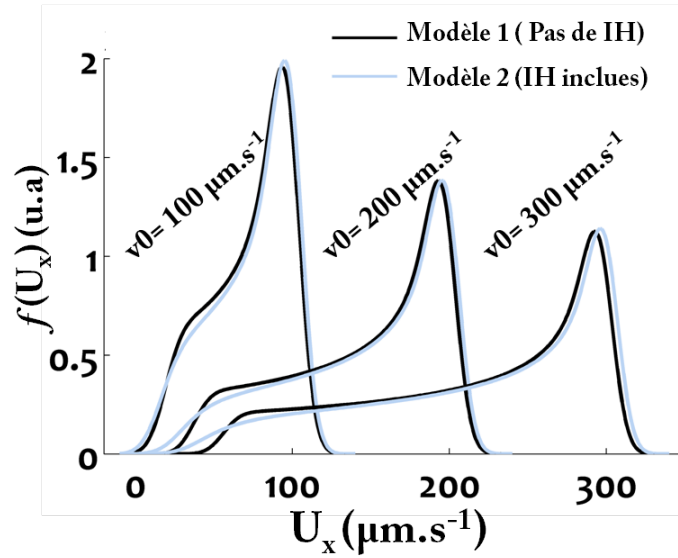
Compte tenu de la non homogénéité du coefficient de diffusion sur la hauteur de la canalisation, donner une expression adaptée à notre expérience requiert plus d'attention. Ainsi procéder possède deux désavantages majeurs. 1) Elle impose à l'expérimentateur la connaissance de l'expression de la variation avec  $z$  du coefficient de diffusion parallèlement aux deux parois et 2) elle impose également une connaissance précise de la viscosité de la solution utilisée. Dans le but de développer un modèle reposant sur le moins de paramètres possibles (un seul en définitive, le diamètre des traceurs) il est possible d'invoquer l'isotropie de la diffusion dans le plan  $(x, y)$ . Ainsi, alors que l'on souhaite obtenir  $P(U_x, \tau)$ , l'astuce consiste à étudier expérimentalement la direction  $y$  perpendiculaire à celle de l'écoulement, direction dans laquelle le mouvement est uniquement d'origine diffusive.

Ainsi ajustons nous les distributions expérimentales de vitesse  $U_y$  à l'aide d'une gaussienne, sans intention d'en retirer un coefficient de diffusion effectif, mais le but d'en extraire une distribution de bruit à l'aide d'une expression du type

$$N(U_y) = B \exp\left(-\frac{U_y^2}{w^2}\right) \quad (3.53)$$

Par suite, les données peuvent être ajustée par une distribution  $f^{Bruitee}(v_0, H, w, U_x)$  issue de la convolution :

$$f^{Bruitee}(v_0, H, w, U_x) = f_{theo}(v_0, H, w, U_x) * N(w, U_x) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} du f_{theo}(u) \exp\left(-\frac{(U_x - u)^2}{w^2}\right) \quad (3.54)$$



**FIGURE 3.11** – Distribution bruitées  $f^{Bruitee}(U_x)$  pour différentes vitesses maximale de fluide pour les modèles incluant ou non les interactions hydrodynamiques. Paramètres :  $a=100$  nm,  $w = 12 \mu m.s^{-1}$ ,  $H=1500$  nm

Où  $f_{theo}$  est la distribution théorique issue de 3.37. Quelques distributions sont représentées sur la figure 3.11 pour les modèles de vitesse de bille incluant ou non les interactions hydrodynamiques aux parois pour un traceur de 200 nm de diamètre, un paramètre  $w = 12 \mu m.s^{-1}$  et dans une canalisation de hauteur  $H = 1500$  nm.

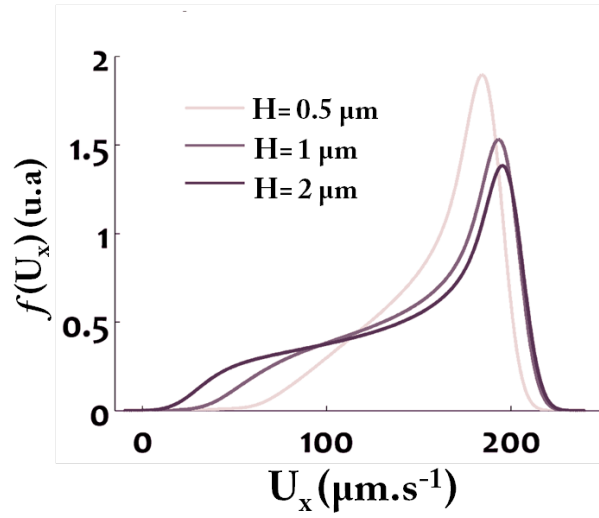
L'inclusion des interactions hydrodynamiques se retrouve ici essentiellement au niveau de la queue des distributions associée aux basses vitesses. Les interactions hydrodynamiques tendent en effet à ralentir la bille, comme nous l'avons décrit dans la figure 3.7, mais également à changer la densité d'état au voisinage de la paroi puisque la variation de la vitesse du traceur avec  $z$  est plus forte proche de la paroi. Pour chacun des modèles, pour  $2a/H = 0.13$ , l'influence des interactions ne se reporte que peu au niveau de la vitesse maximale du traceur. La hauteur du pic principal est essentiellement liée à la normalisation, à savoir que les données sont divisées par l'intégrale des distributions.

La variation des distributions en fonction de la hauteur de la canalisation à un  $v_0$  constant est présentée dans la figure 3.12 pour le modèle incluant les interactions hydrodynamiques. L'effet de la diminution de la hauteur à diamètre de traceur constant impacte directement la distributions pour les basses vitesses. L'exclusion de la bille des lignes de fluide telles que  $z \in [0, a]$  a pour effet d'augmenter la vitesse minimale accessible. L'effet des interactions hydrodynamiques augmente également avec le confinement et conduit à la diminution de la vitesse maximale et donc au décalage du pic principal.

#### 3.4.2 Ajustement des données expérimentales

Notre modèle permet de dériver une distribution théorique  $f(U_x)$  dépendant de deux paramètres ajustables  $v_0$  et  $H$  un paramètre fixe  $a$ . Deux stratégies s'offrent à nous afin d'ajuster les données expérimentales. La première consiste en la déconvolution des distributions expérimentales  $f^{Bruitee}(U_x)$  afin d'en extraire  $f_{theo}$  comme suit à l'aide de transformées de Fourier :

$$f_{theo} = \mathcal{F}^{-1} \left[ \frac{\mathcal{F}[f^{Bruitee}]}{\mathcal{F}[N]} \right] \quad (3.55)$$



**FIGURE 3.12** – Distribution bruitées  $f^{Bruitee}(U_x)$  pour différentes hauteur  $H$  de canalisation à un débit constant. Paramètres :  $a=100$  nm,  $w = 12 \mu m.s^{-1}$ ,  $H = 0.5, 1, 2 \mu m$ .

Toutefois, cette procédure est difficilement applicable quand  $f^{Bruitee}$  est définie sur peu de points. De plus, le modèle incluant les interactions hydrodynamiques étant essentiellement numérique, un ajustement classique post-déconvolution est impossible en l'absence d'expression analytique pour  $f_{theo}$ . Ainsi avons-nous opté pour une méthode *tout numérique*, basée sur le calcul des distributions  $f_{theo}$  pour des couples  $(v_0, H)$  définis par l'utilisateur, le paramètre  $a$  étant préalablement fixé<sup>1</sup>. Ces distributions sont ensuite convoluées par une distribution gaussienne de bruit telle que définie par l'équation 3.53. Enfin, l'ajustement repose sur 1) la construction d'une *matrice d'ajustement* à trois dimensions, une pour chaque paramètre  $v_0$  et  $H$ , une troisième pour  $U_x$  et 2) sur la minimisation de la fonction  $\chi(v_0, H)^2$  que l'on définit par :

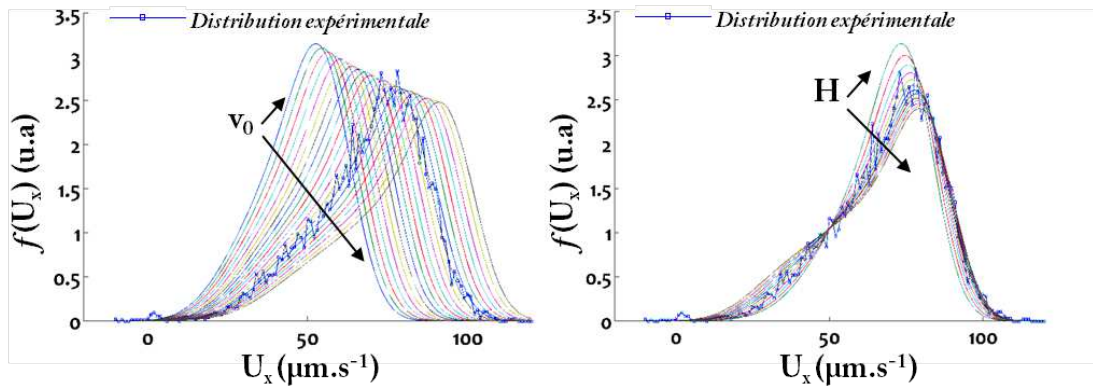
$$\chi(v_0, H)^2 = \sum_n \left( f^{Bruitee}(v_0, H, U_x) - f^{exp}(U_x) \right)^2 \quad (3.56)$$

La figure 3.13 présente la superposition des valeurs expérimentales et des distributions théoriques créées pour l'ajustement. En a) se trouvent les distributions pour  $v_0$  variant de  $60 \mu m.s^{-1}$  à  $90 \mu m.s^{-1}$  pour une hauteur de  $600$  nm. En b) se trouvent les distributions pour  $H$  variant de  $400$  à  $900$  nm pour un paramètre  $v_0 = 86 \mu m.s^{-1}$ . Les flèches indiquent le déplacement des distributions pour  $v_0$  et  $H$  croissant.

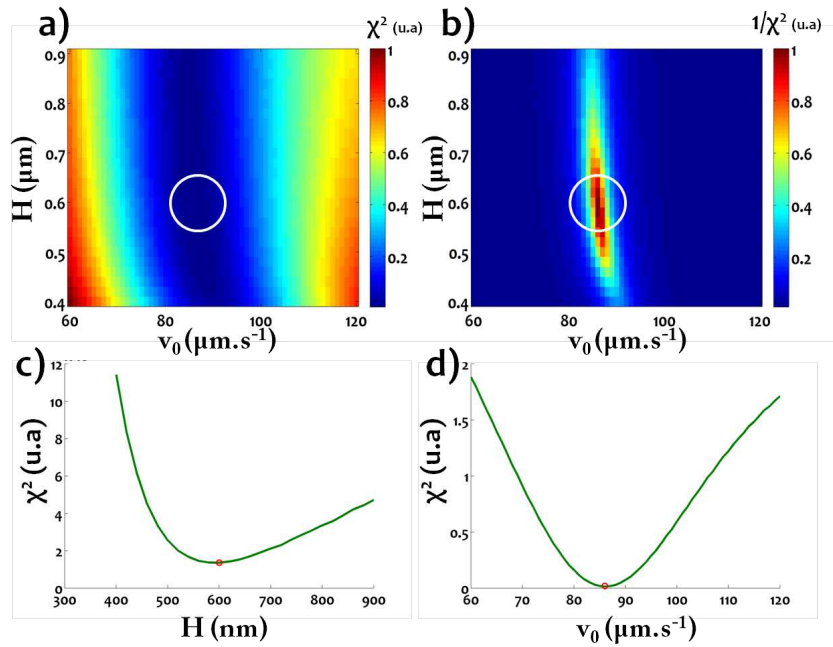
La fonction  $\chi^2$  est illustrée en figure 3.14 pour les mêmes données expérimentales. Le cadran a) fait apparaître une *vallée* très prononcée qui montre une forte convergence pour le paramètre  $v_0$  et ce sur une grande plage de paramètre  $H$  autour de la valeur  $v_0 = 86 \mu m.s^{-1}$ . Cette observation démontre la robustesse de l'ajustement pour ce paramètre. Le cadran b) présente l'inverse de la matrice  $\chi(v_0, H)^2$  (au sens où chaque élément est l'inverse de  $\chi(v_0, H)^2$ ). Cette transformation permet de mieux visualiser la position du couple  $(v_0, H)$  donnant le meilleur ajustement. Pour chacun des paramètres  $v_0$  et  $H$  ajusté, les graphes présentés en c) et d) donne la variation de la valeur de  $\chi(v_0, H)^2$ . Ceux-ci font apparaître clairement la convergence de l'ajustement pour les deux paramètres  $v_0 = 86 \mu m.s^{-1}$  et  $H = 600$  nm.

<sup>1</sup> Comme indiqué dans la partie expérimentale, les techniques par diffusion de lumière (DLS) et suivi de particules nous permettent d'obtenir avec une très bonne précision ce paramètre.

### 3.4. Construction d'un modèle d'ajustement des données expérimentales



**FIGURE 3.13** – Superposition de données expérimentales aux distributions théoriques créées pour l'ajustement. a) Paramètre  $H$  fixé ( $H=600$  nm)  $v_0$  varie de 60 à 90  $\mu\text{s}^{-1}$ . Vitesse maximale fixée  $v_0 = 86 \mu\text{s}^{-1}$   $H$  variant de 400 à 900 nm.



**FIGURE 3.14** – Matrice des résidus  $\chi^2$  pour l'ajustement de données expérimentales.

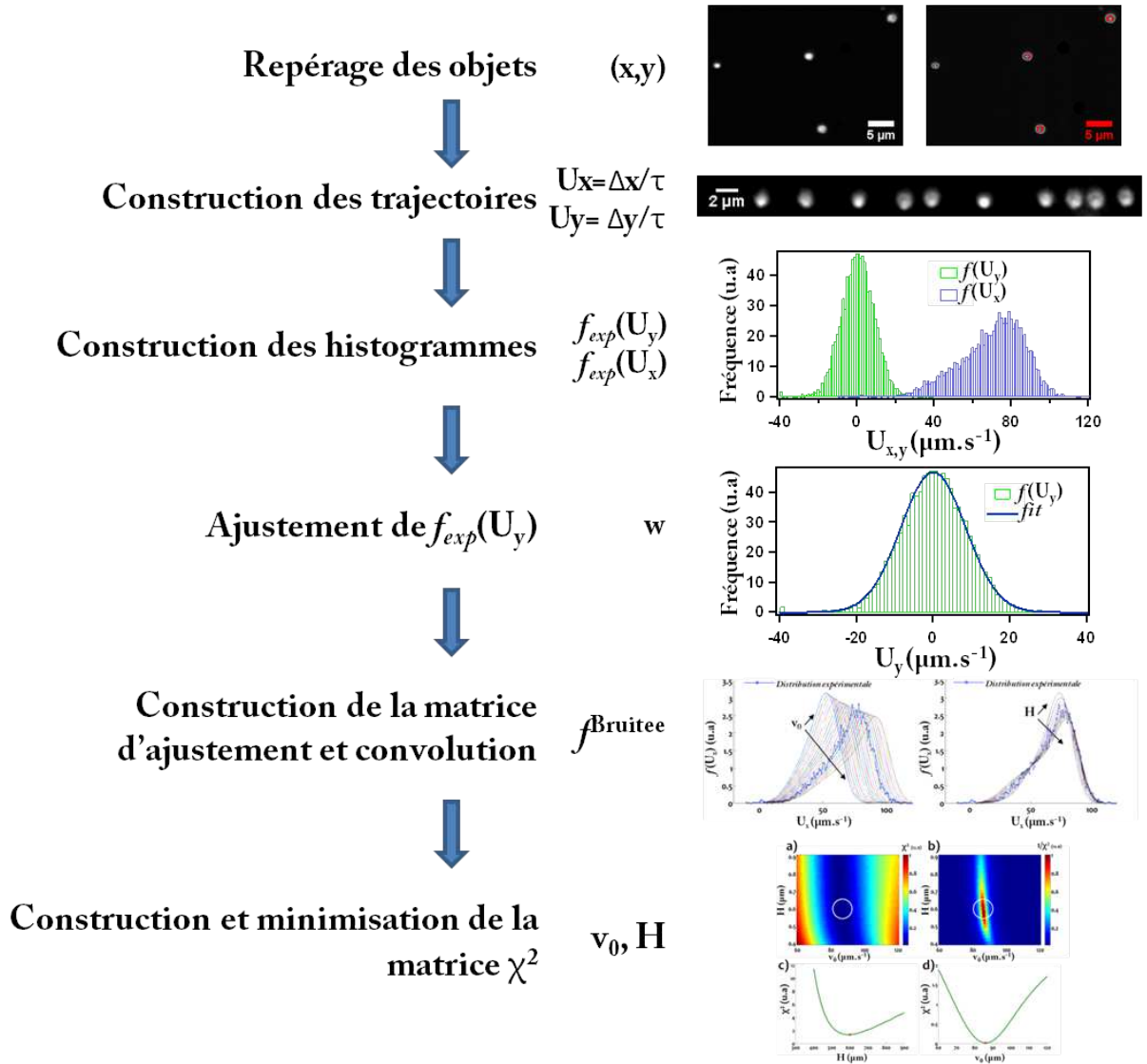


FIGURE 3.15 – Étapes composant l'analyse pour la caractérisation d'un écoulement sub-micronique.

La procédure de traitement des données et leur ajustement est décrite dans un diagramme en figure 3.15. Celui dépeint étape par étape la procédure d'ajustement. Le suivi de particule est réalisé à l'aide du logiciel ImageJ [Schneider et al., 2012]. La construction des trajectoires a été conduite sous Matlab à l'aide d'une routine libre disponible en ligne [Blair and Dufresne, ]. Les étapes d'ajustement ont été réalisées à l'aide d'une routine développée sur le logiciel Matlab et donnée en annexe.



### 3.5 Validation du modèle par dynamique brownienne

Afin de valider notre approche théorique, nous avons mené des simulations de dynamique brownienne au plus proche des expériences. Celles-ci avaient pour but de vérifier que les paramètres de l'écoulement étaient correctement mesurés à partir de la procédure d'ajustement décrite dans la partie précédente. Il s'agissait aussi de valider un certain nombre de nos hypothèses simplificatrices, notamment celle concernant la non diffusion des particules durant l'intervalle de temps caméra.

#### 3.5.1 Équation de Langevin et non-homogénéité du coefficient de diffusion

A l'origine de la théorie du mouvement brownien, et de sa dénomination, est l'observation du naturaliste Brown [Brown, 1828]. Celui-ci avait décrit dès 1827 le mouvement erratique de grains de pollen dans un fluide et observés au microscope. Dès lors, et après avoir réfuté toute "force vitale" [Brown, 1829] à l'origine de ce mouvement, le naturaliste Ecossais avait soupçonné que l'effet devait être physique plus que biologique. L'origine de la théorie du mouvement brownien est souvent associée à la publication d'un article d'Einstein en 1905 [Einstein, 1905]. Trois années plus tard, les expériences de Jean Perrin [Perrin, 1908b] [Perrin, 1908a] [Perrin, 1909], qui lui vaudront de recevoir le prix Nobel, viennent asseoir cette théorie : *"Ainsi apparaît une propriété profonde, éternelle, de ce qu'on nomme un fluide en équilibre. Cet équilibre n'existe que de façon moyenne et pour des grandes masses : c'est un équilibre statistique"*. La théorie du mouvement brownien n'a cessé d'être raffinée depuis l'article fondateur d'Einstein. On peut citer ici les noms de scientifiques à la contribution au moins aussi importante que celle de ce dernier dans le domaine, tels que Smoluchowski [Smoluchowski, 1916], Langevin [Langevin, ], Fokker [Fokker, 1914] ... Le mouvement brownien caractérise le comportement de particules dont la masse et la taille sont bien plus grandes que celles des molécules du milieu dans lequel elles se trouvent immergées. Les collisions des molécules de solvant sur la surface de la particule lui confère un mouvement erratique. Selon le formalisme de Langevin [Coffey et al., 1996], le mouvement d'une particule brownienne est régi, en l'application du principe fondamental de la dynamique, par l'équation suivante :

$$m \frac{d\mathbf{U}}{dt} = -\gamma \mathbf{U} + \mathbf{F}_{al} \quad (3.57)$$

Où  $\mathbf{U}$  est la vitesse de la particule,  $\gamma$  un coefficient de friction donné par 3.1 pour une particule sphérique, et  $\mathbf{F}_{al}$  est une force aléatoire simulant un bruit blanc et donc l'impact des collisions avec les molécules du solvant. Celle-ci admet les propriétés de moyenne et de corrélation suivantes :

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{F}_{al}(t) \rangle &= \mathbf{0} \\ \langle \mathbf{F}_{al}(t) \cdot \mathbf{F}_{al}(t') \rangle &= q \delta(t - t') \end{aligned} \quad (3.58)$$

Avec  $q$ , l'amplitude des corrélation, déterminé à l'aide du théorème d'équipartition par  $q = 2k_B T \gamma$ . La résolution de 3.57 pour la vitesse en valeur moyenne sous la condition  $\mathbf{U}(t=0) = \mathbf{U}_0$  nous permet d'exprimer :

$$\langle \mathbf{U} \rangle = \mathbf{U}_0 \exp(-\gamma t / m) \quad (3.59)$$

Ainsi voit-on apparaître un temps caractéristique de la relaxation des effets inertiels  $\tau_i = \frac{m}{\gamma} = \frac{m}{6\pi\mu a}$ . Pour un bille de polystyrène (densité  $\rho = 1050 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) de 200 nm de diamètre dans un fluide de viscosité  $\mu = 110^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$  à température ambiante, ce temps caractéristique vaut environ 2 ns. Ainsi, discrétisant

la fonction aléatoire  $\mathbf{F}_{al}$  sur des intervalles de temps  $\Delta t \gg \tau_i$  autorise de négliger le terme inertiel  $\frac{d\mathbf{U}}{dt}$  dans 3.57 et de remplacer la vitesse  $\mathbf{U}$  par la quantité  $\frac{\Delta \mathbf{r}}{\Delta t} = \frac{\mathbf{r}(t+\Delta t) - \mathbf{r}(t)}{\Delta t}$ ,  $\mathbf{r}$  indiquant la position de la particule. Ainsi obtient-on l'équation discrétisée associée au mouvement brownien de la particule :

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \sqrt{2D\Delta t}\xi \quad (3.60)$$

Avec  $\xi_{x,y,z}$  un nombre aléatoire, de moyenne nulle et d'écart-type égal à un. Comme nous avons pu le mettre en relief plus tôt, les interactions hydrodynamiques dans un système confiné font que le coefficient de diffusion d'un traceur dépend de son altitude  $z$ . L'algorithme décrit par 3.60, valable pour un coefficient  $D$  homogène, se doit d'être raffiné. En effet, durant chaque intervalle de temps, la particule simulée fait un pas d'amplitude caractéristique  $\sqrt{2D\Delta t}$ , dépendante de sa position. Doit-on alors calculer cette quantité au point de départ  $\mathbf{r}(t)$ , au point d'arrivée, ou encore à un autre point au milieu de la trajectoire ? Ces choix sont des conventions, souvent dites de Ito ou Stratonovich et peuvent conduire à des résultats sensiblement différents [Lançon et al., 2001]. Dans le cas spécifique où la non-homogénéité du coefficient de diffusion provient de l'inclusion des interactions hydrodynamiques, Ermak et McCammon [Ermak and McCammon, 1978] ont montré que l'on pouvait redéfinir l'équation de Langevin 3.60 par :

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \nabla \cdot \mathbf{D}\Delta t + \mathbf{R} \quad (3.61)$$

Où  $\mathbf{D}$  est un coefficient de diffusion sous forme tensorielle, qui compte tenu de la géométrie de notre système s'exprime comme :

$$\begin{pmatrix} D_{\parallel}(z) & 0 & 0 \\ 0 & D_{\parallel}(z) & 0 \\ 0 & 0 & D_{\perp}(z) \end{pmatrix} \quad (3.62)$$

le terme  $\nabla \cdot \mathbf{D}\Delta t$  introduisant une dérive liée à la non-homogénéité du coefficient de diffusion. Le terme  $\mathbf{R}$  traduit lui la contribution brownienne classique au mouvement soit :

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} \sqrt{2D_{\parallel}(z(t))\Delta t}\xi_x \\ \sqrt{2D_{\parallel}(z(t))\Delta t}\xi_y \\ \sqrt{2D_{\perp}(z(t))\Delta t}\xi_z \end{pmatrix} \quad (3.63)$$

Ainsi, projeté sur les trois axes du repère  $(x, y, z)$ , incluant l'influence de l'écoulement  $\mathbf{v}_{\infty} = v_{\infty}(z(t))\mathbf{e}_x$  l'équation 3.61 donne :

$$\begin{aligned} x(t + \Delta t) &= x(t) + v_{\infty}(z(t))\Delta t + \sqrt{2D_{\parallel}(z(t))\Delta t}\xi_x \\ y(t + \Delta t) &= y(t) + \sqrt{2D_{\parallel}(z(t))\Delta t}\xi_y \\ z(t + \Delta t) &= z(t) + \left. \frac{dD_{\perp}}{dz} \right|_{z(t)} \Delta t + \sqrt{2D_{\perp}(z(t))\Delta t}\xi_z \end{aligned} \quad (3.64)$$

### 3.5.2 Résultats des simulations

Avant d'exécuter le code de dynamique brownienne décrit par l'équation 3.64, nous devons préciser trois paramètres, à savoir le pas de temps  $\Delta t$ , la loi de déplacement de la particule par advection, et les lois de diffusion. Nous allons décrire ces différents éléments dans le prochain paragraphe.

#### Paramètres numériques et ingrédients de la simulation

**Paramètre de temps  $\Delta t$**  La validité de l'équation 3.64 est notamment dictée par le choix du paramètre de temps  $\Delta t$ . Celui-ci se doit d'être supérieur au temps caractéristique de relaxation de l'impulsion (quelques ns comme décrit plus haut), mais il doit rester assez faible pour que le coefficient  $D$  n'ait que peu varié durant l'intervalle [Sadr et al., 2005]. Aussi imposons nous que la distance parcourue par advection par le fluide reste faible devant le rayon de la bille. Nous avons donc choisi un pas de temps de  $50 \mu s$ . Les distances typiques parcourues par diffusion et advection durant cet intervalle valent  $L_d \sim \sqrt{D\Delta t} \sim 10 \text{ nm}$  et  $L_a \sim v_0 \delta t \sim 15 \text{ nm}$ . Ces valeurs sont des limites hautes correspondant aux plus faibles viscosités et aux vitesses d'écoulement les plus rapides que nous avons simulées.

**Vitesse de fluide** Afin de prendre en compte les effets hydrodynamiques sur la vitesse de translation de la sphère, nous utilisons le champ de vitesse décrit par Pasol et al. pour la vitesse d'advection de la particule.

**Coefficient de diffusion et conditions aux bords** Un coefficient de diffusion non homogène prenant en compte l'effet des interactions hydrodynamiques est considéré dans nos simulations. Les coefficients de diffusions parallèle et perpendiculaire aux parois sont obtenus à l'aide de l'algorithme de superposition MCSA de Benesch et al. 3.30. Cette formule s'exprimant sous forme de séries, leurs convergences nécessitent un temps de calcul relativement important. Afin de pallier à cette limitation, nous avons opté pour un calcul pré-simulation des paramètres  $D_\perp, D_\parallel, \frac{dD_\perp}{dz}$  sur une grille en  $z$  de 1 nm de pas. Les valeurs nécessaires à la simulations ont ensuite été interpolées à chaque pas de temps à partir de ces valeurs initialement calculées.

Considérant la géométrie spécifique de notre système, aucune condition aux bords n'a été appliquée selon les directions  $x$  et  $y$ . Afin de simuler la présence des paroi, une condition classique consiste à refléter les marcheurs sortant de la boîte de simulation en  $z$ . Toutefois, pour un pas de temps assez faible, aucun marcheur n'a été observé dépassant les limites  $z = a$  et  $z = H - a$ . Cet effet est à relier à la l'équation de Ermak et McCammon 3.61. La condition de flux nul aux bords est en effet assurée par le fait que  $D \rightarrow 0$  proche de la paroi.

**Nombre de marcheurs, temps de simulation, conditions initiales** La modélisation par dynamique brownienne a cet attrait qu'elle peut être parallélisée au sens où, négligeant les interactions entre particules,  $N$  marcheurs indépendants peuvent être simulés parallèlement. Invoquant l'ergodicité du système, nous simulons  $N$  marcheurs durant un temps correspondant à un intervalle de temps de la caméra (faire l'inverse étant quasi  $N$  fois plus gourmand en temps de calcul). Cette approche présente un biais, celui d'imposer le choix d'une distribution initiale des marcheurs suivant  $z$ .

Comme l'avons justifié plus tôt lors des discussions sur l'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds, nous faisons l'hypothèse d'une distribution homogène de marcheurs suivant  $z$ . 50000 marcheurs, répartis de manière homogène en  $z$ , ont donc été lancés lors de chacune des simulations. Le fait d'utiliser un coefficient de diffusion inhomogène implique potentiellement une inhomogénéité spatiale de répartition des marcheurs, via le terme de dérive dans l'équation 3.61. Pour tester cette question, nous avons mené des expériences numériques avec des marcheurs répartis de manière homogène suivant  $z$ , et mesuré leur distribution après un temps supérieur au temps de mélange dans l'épaisseur de la canalisation. Cette approche a montré une persistance de la répartition homogène au court du

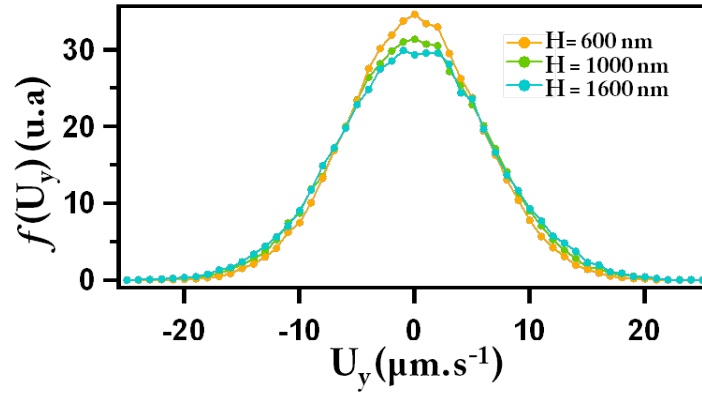


FIGURE 3.16 – Distributions de vitesse selon l'axe  $y$   $f(U_y)$  pour trois hauteurs de canalisation simulées

temps en accord avec la situation de *dérive sans flux* qu'impose l'algorithme utilisé<sup>2</sup>.

Afin de rester au plus près de l'expérience, la position de chacun d'entre eux en  $x$  et  $y$  a été moyennée durant un temps d'environ 8 ms correspondant à un temps d'intégration caractéristique  $\tau_{expo}$  de notre caméra EMCCD.  $N$  positions moyennes  $(x_i(\tau_{expo}), y_i(\tau_{expo}))$  avec  $i \in [1, N]$  sont extraites de cette première étape. Puis les marcheurs évoluent durant un temps d'environ 0.5 ms, cet intervalle simulant le temps de transfert  $\tau_{trans}$  de l'image par la caméra. Puis ils évoluent enfin une dernière fois durant  $\tau_{expo}$  et on tire encore une fois  $N$  positions moyennes  $(x_i(2\tau_{expo} + \tau_{trans}), y_i(2\tau_{expo} + \tau_{trans}))$ . Les vitesses de chacun sont ensuite calculées par  $v_x^i = \frac{x_i(2\tau_{expo} + \tau_{trans}) - x_i(\tau_{expo})}{\tau_{expo} + \tau_{trans}}$ .

### Validation du modèle

Afin de valider le modèle, 6 simulations ont été menées pour différentes valeurs du débit dans une canalisation de hauteur de l'ordre du  $\mu\text{m}$ . Afin de respecter au mieux les conditions expérimentales, nous avons choisi un fluide de viscosité  $\mu = 5.8 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$ , des temps d'exposition et de transfert  $\tau_{expo} = 8.7 \text{ ms}$  et  $\tau_{trans} = 0.5 \text{ ms}$ . Les histogrammes des vitesses des traceurs selon la direction de l'écoulement ont ensuite été analysés à l'aide du modèle décrit plus tôt. Trois débits  $v_0 = 100, 200, 300 \mu\text{m.s}^{-1}$  et trois hauteurs de canalisations  $H = 600, 1000, 1600 \text{ nm}$  ont été simulés en utilisant des marcheurs sphériques de 200 nm de diamètre.

Ces données sont présentées dans les figures 3.16 et 3.17. La figure 3.16 présente les histogrammes pour les vitesses des traceurs selon la direction  $y$  perpendiculaire à la direction de l'écoulement. Comme décrit plus tôt, ces distributions suivent des lois gaussiennes et sont indépendantes de la vitesse de l'écoulement. La largeur de ces dernières varie en décroissant pour des  $H$  décroissant. Cet effet est le reflet de la diminution de la valeur du coefficient de diffusion moyen (de par la présence des interactions hydrodynamiques) avec un confinement accru. Les histogrammes de vitesse selon la direction de l'écoulement sont présentés sur la figure 3.17.

Afin de simplifier leur lecture, ceux-ci sont présentés en deux groupes correspondant aux simulations pour des hauteurs constantes et des débits variants (gauche) et inversement (droite). Les résultats des ajustements sont présentés dans la table 3.18. Les barres d'erreurs ont été estimées à l'aide des courbes de résidus sur l'ajustement pour  $\chi^2(H^\pm) = 1.05\chi_{min}^2$ . L'estimation des barres d'erreur sera considérée dans une section ultérieure.

<sup>2</sup>Cette subtilité est discutée dans les travaux de Lançon *et al* [Lançon et al., 2001], la situation  $\alpha = 1$  (selon leur notation) correspondant à l'algorithme de Ermak et McCammon utilisé ici.

### 3.5. Validation du modèle par dynamique brownienne

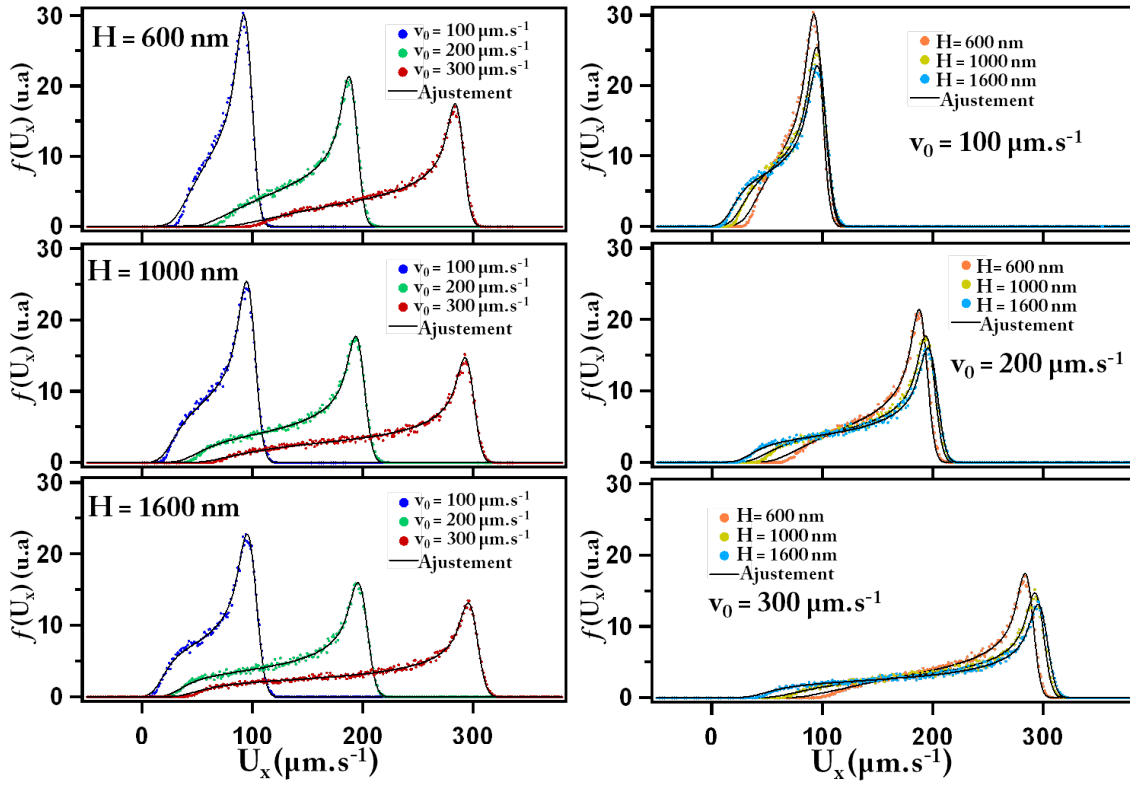
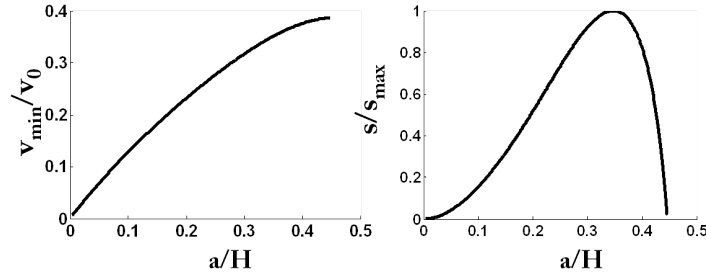


FIGURE 3.17 – Distributions de vitesse selon l'axe x de l'écoulement  $f(U_x)$  pour trois hauteurs de canalisation et trois débits simulés

$v_0$ ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) $H$ (nm)	100	200	300
600	$v_0 = 98 \pm 3$ $H=600 \pm 50$	$v_0 = 197 \pm 3$ $H=600 \pm 50$	$v_0 = 296 \pm 3$ $H=600 \pm 50$
1000	$v_0 = 99 \pm 3$ $H=1000 \pm 100$	$v_0 = 198 \pm 3$ $H=1050 \pm 100$	$v_0 = 98 \pm 3$ $H=950 \pm 100$
1600	$v_0 = 99 \pm 3$ $H=1650 \pm 200$	$v_0 = 199 \pm 3$ $H=1600 \pm 200$	$v_0 = 298 \pm 3$ $H=1700 \pm 300$

FIGURE 3.18 – Résultats des ajustements des données extraites des dynamiques browniennes.



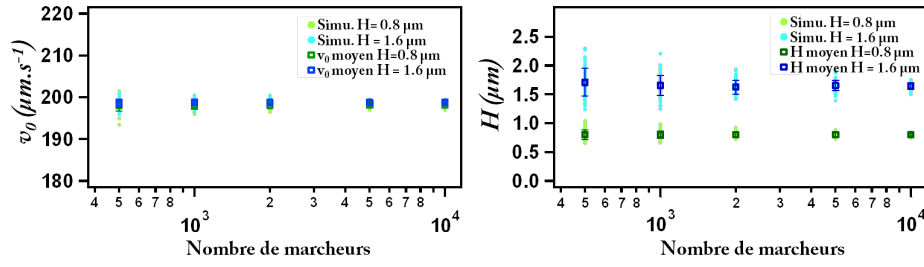
**FIGURE 3.19** – Vitesse minimale et sensibilité en fonction du rapport  $a/H$ . La sensibilité admet un maximum pour  $a \approx 0.34H$ .

Résultats d'expérience et modèles semblent donc être en très bon accord. L'effet de la diffusion en  $z$  ne semble que peu impacter les résultats pour l'intervalle de temps caméra choisi ici. La convergence de l'ajustement sur le paramètre  $H$  semble détériorée pour des valeurs de  $\frac{a}{H}$  faible. Comme discuté plus tôt, l'impact du paramètre hauteur se retrouve essentiellement sur les valeurs minimales de la vitesse du traceur et donc sur le bas des distributions. Pour des valeurs  $a/H$  modérées, la vitesse minimale que peut avoir un traceur augmente avec  $a$  (exclusion du bord de la canalisation et des lignes de basse vitesse).

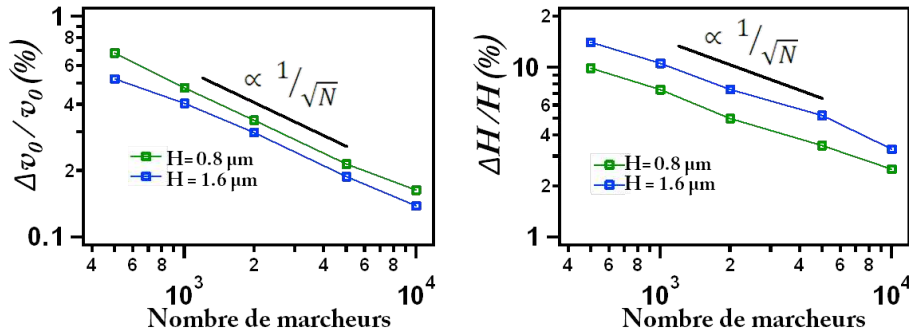
Afin de déterminer le traceur idéal pour la calibration de la hauteur d'une canalisation, il est possible de s'intéresser à la variation de vitesse minimale en fonction du rayon  $a$ . Nous définissons alors une sensibilité ( $s$ ) de la mesure comme  $s = a \left| \frac{dU_{min}(a,H)}{dH} \right|$  telle que le rayon du traceur optimal maximise sa valeur. La vitesse minimale accessible aux traceurs en fonction du rapport  $a/H$  ainsi que la sensibilité de la mesure sont présentées sur la figure 3.19 pour un modèle de vitesse incluant les interactions hydrodynamiques. La courbe b) fait apparaître un maximum pour la sensibilité lorsque  $\frac{a}{H} \sim 0.34$ . Cette approche nous permet de qualitativement interpréter la plus faible convergence de l'ajustement pour  $H=1600$  nm dans les données précédentes. Toutefois, le respect strict de cette condition peut conduire à d'autres artefacts expérimentaux, comme par exemple l'apparition de phénomènes de collage ou de sédimentation, qui remettraient en cause tout le modèle précédemment décrit. Aussi, pour  $H < 2000$  nm choisirons nous préférentiellement des traceurs de 200 nm de diamètre, et plus rarement de 300 et 500 nm. Un autre facteur déterminant l'erreur statistique sur les paramètres  $v_0$  et  $H$  est bien sûr le nombre de traceurs considérés pour construire la statistique. Ces considérations font l'objet du prochain paragraphe.

#### Erreur statistique et systématique sur les paramètres $v_0$ et $H$

De la même manière que le nombre de photons collectés détermine la résolution de pointé dans les expériences de positionnement optique [Thompson et al., 2002], le nombre de traceurs analysés influe sur la résolution des paramètres  $v_0$  et  $H$ . Les expériences numériques nous permettent de mettre en avant l'erreur statistique impactant les paramètres tirés de l'ajustement. Ainsi avons-nous conduit 100 expériences numériques pour deux hauteurs  $H=800$  et  $1600$  nm pour des traceurs de 200 nm de diamètre et un débit intermédiaire caractérisé pour une vitesse maximale au centre de la canalisation de  $200 \mu m.s^{-1}$ . Chaque groupe de 100 expériences ont été menées pour  $N= 500, 1000, 2000, 5000$  et  $10000$  traceurs et les distributions  $f(U_{x,y})$  ont été construites avec autant d'éléments. Chacune de ces courbes a été ensuite ajustée à l'aide du modèle théorique pour en retirer les paramètres  $H$  et  $v_0$ . Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.20. Comme attendu, la dispersion autour des valeurs  $v_0$  et  $H$  imposées dans la dynamique brownienne, diminue avec le nombre de marcheurs. L'erreur sur le



**FIGURE 3.20** – Paramètres vitesse maximale et hauteur ajustés en fonction du nombre de marcheurs pris en compte pour créer les histogrammes de vitesse.



**FIGURE 3.21** – Erreurs relatives  $\frac{\Delta v_0}{v_0}$  et  $\frac{\Delta H}{H}$

paramètre hauteur semble toutefois supérieure pour la canalisation la plus profonde. Cet effet, anticipé dans la paragraphe précédent, provient de la plus faible dépendance de la vitesse minimale avec  $H$  pour de faibles rapport  $a/H$ . Cette analyse montre aussi que la mesure de  $v_0$  est inférieure à la valeur maximale de la vitesse de l'écoulement imposée dans la dynamique brownienne (noter que les points expérimentaux sont légèrement en dessous de  $200 \mu\text{m/s}$  dans la figure 3.20. Cet écart, de l'ordre de 0.5 %, est en général inférieur à l'erreur statistique de mesure. Cet effet peut être interprété en considérant la diffusion suivant  $z$  : en moyennant les lignes de champ pendant l'intervalle d'acquisition, les traceurs sont advectionnés à une vitesse légèrement plus faible que le maximum théorique de l'écoulement.

La figure 3.21 présente l'erreur relative par rapport à la valeur moyenne de  $v_0$  et  $H$  calculée à partir de  $\frac{\Delta Y}{Y} = \frac{\sigma_Y}{Y}$  où  $\sigma_Y$  est l'écart-type de la distribution de  $Y$  ( $Y=v_0, H$ ). On retrouve ainsi une décroissance en  $\frac{1}{\sqrt{N}}$ . Ces résultats font apparaître une très bonne convergence sur le paramètre vitesse maximale dès 500 marcheurs analysés (erreur inférieure à 2 % en prenant en compte l'erreur systématique). La convergence sur le paramètre  $H$  est moins rapide. Atteindre une erreur de 5 % nécessite l'analyse d'au moins 5000 traceurs. C'est dans cette gamme que nous tâcherons de mener nos expériences. Cette étude justifie pleinement la nécessité de travailler avec des fréquences d'acquisition rapide pour augmenter le nombre de vitesses prises en compte pour la construction des distributions  $f(U_{x,y})$ . Le mode transfert d'image de la caméra EMCCD utilisée pour notre étude permet d'augmenter cette fréquence. L'influence de ce dernier paramètre est analysé dans la prochaine section.

#### Effet du temps d'exposition

Comme nous avons pu l'exposer plus tôt, la fréquence d'acquisition est un paramètre critique de notre étude. Notre modèle négligeant les fluctuations en  $z$  pour ne prendre en compte que celles selon la direction du fluide, il est par essence faux pour des fréquences d'acquisition faibles. En effet pour des

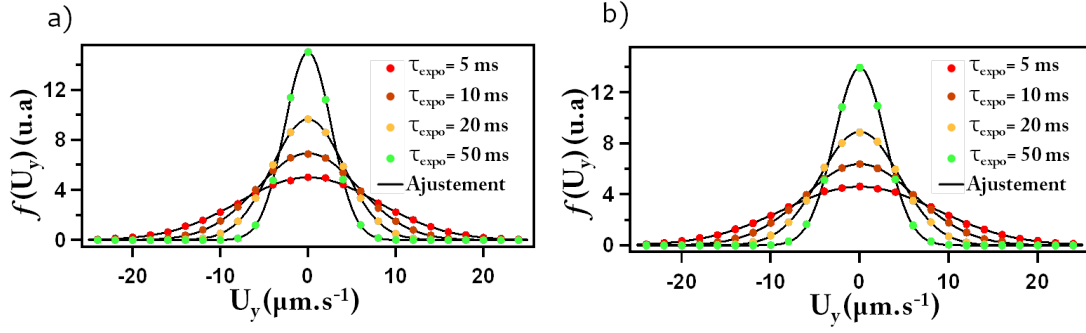


FIGURE 3.22 – Distribution suivant de vitesse suivant  $y$  pour deux hauteurs de canalisation et 4 temps d'exposition. a)  $H=800\text{nm}$ . b)  $H=1600\text{nm}$

intervalles de temps  $\tau \rightarrow \infty$ , on s'attend à ce que tous les traceurs aient une vitesse égale à la vitesse moyenne du fluide (aux interactions hydrodynamiques près), comme dans le modèle de diffusion de Taylor [Taylor, 1953]. Ainsi avons-nous mené quatre expériences numériques pour un débit caractérisé par une vitesse au centre de canalisation de  $200 \mu\text{m.s}^{-1}$  pour des hauteurs  $H=800$  et  $1600 \text{ nm}$  et des traceurs de  $200 \text{ nm}$  de diamètre. Nous avons choisi quatre temps d'exposition de  $5, 10, 20$  et  $50 \text{ ms}$  et un temps de transfert de  $0,5 \text{ ms}$ . Les résultats de ces simulations sont donnés dans la figure 3.22 pour  $f(U_y)$  pour chacune des hauteurs  $H=800$  et  $1600 \text{ nm}$ . Les données selon la direction  $y$  sont, quelque soit le temps d'exposition considéré, toujours ajustables à l'aide de gaussienne. Toutefois, sans advection dans cette direction, les fluctuations autour de la valeur moyenne nulle diminuent avec  $\tau_{\text{expo}}$ . Les figures 3.23 et 3.24 présentent les distributions  $f(U_x)$  ainsi que leurs ajustements. La table 3.25 présente les valeurs ajustées. Il apparaît qu'augmenter le temps d'exposition a un effet drastique sur l'ajustement. Les états de basse vitesse disparaissent clairement pour  $\tau_{\text{expo}} = 20$  et  $50 \text{ ms}$ . La variation de la valeur des résidus en fonction de  $H$  et  $\nu_0$  devient erratique, si bien que même si l'on trouve un minimum, il ne peut être considéré comme correct. L'effet sur l'ajustement de la vitesse maximale reste quant à lui réduit.

Ces simulations viennent confirmer qu'un intervalle de temps entre chaque image  $\tau < 15 \text{ ms}$  est suffisant pour une correcte caractérisation de l'écoulement des conditions expérimentales typiques.

### Effet du comptage

Le nombre de vitesses considérées afin de construire les distributions  $f(U_{x,y})$  impacte directement la sensibilité de notre méthode. Travaillant en microscopie à champ large, une particule reste plusieurs temps d'exposition dans la région d'intérêt. Une question se pose alors, peut-on considérer toutes les valeurs de vitesse que l'on peut retirer d'une trajectoire unique ou cela induit-il un biais dans notre mesure? En effet, pour deux traceurs de vitesses  $v_1$  et  $v_2$  telles que  $v_1 < v_2$ , le traceur 1 restera plus longtemps dans la région d'observation et considérer chacune des vitesses de sa trajectoire peut conduire à biaiser la distribution totale, telle qu'elle surreprésente au final les états de basse vitesse. Afin de tester si cet effet impacte nos mesures, nous avons entrepris une simulation reproduisant exactement la collecte de données expérimentales. 500 marcheurs ont été lancés à une distance  $L=2 \text{ mm}$  en amont d'une zone de détection, reproduisant un champ de caméra de  $L_0=45 \mu\text{m}$  de longueur, et ont évolué selon l'algorithme de Langevin décrit plus tôt. Les distributions expérimentales ont ensuite été construites par accumulation des positions des centres de masse  $x_{\text{cdm}}$  des particules telles que  $L < x_{\text{cdm}} < L + L_0$ . La simulation a été menée pour une hauteur  $H=2 \mu\text{m}$  pour des traceurs



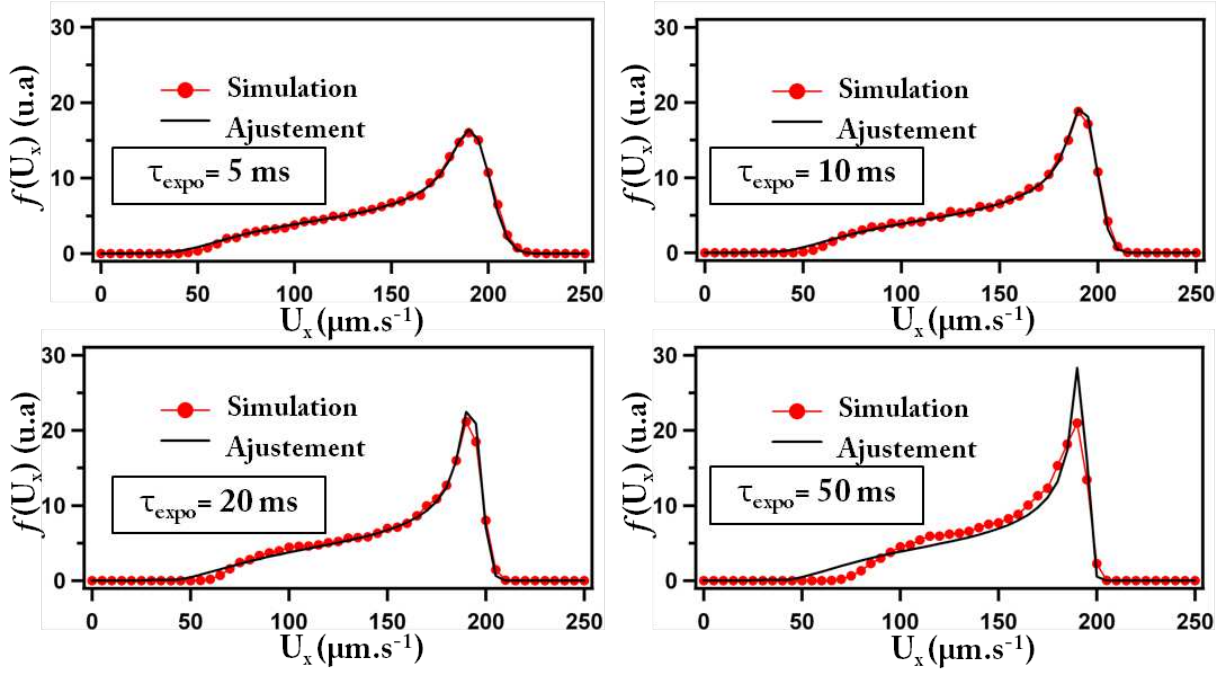


FIGURE 3.23 – Distribution suivant de vitesse suivant  $x$  pour différents temps d'exposition et  $H=800$  nm. Sont représentées en trait plein les courbes donnant le meilleur ajustement.

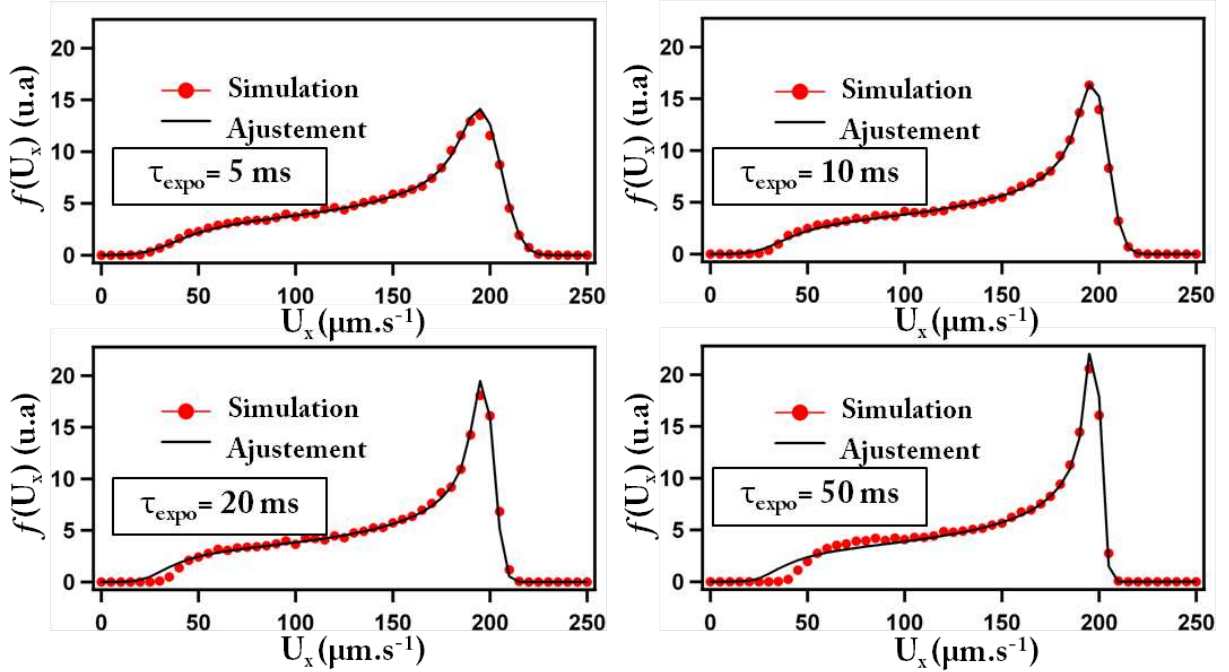


FIGURE 3.24 – Distribution de vitesse suivant  $x$  pour différents temps d'exposition et  $H=1600$  nm. Sont représentées en trait plein les courbes donnant le meilleur ajustement.

$\tau_{\text{expo}}(\text{ms})$	5	10	20	50
H (nm)				
800	$v_0 = 198 \pm 4$ $H=860 \pm 50$	$v_0 = 198 \pm 3$ $H=820 \pm 50$	$v_0 = 198 \pm 3$ $H=740 \pm 100$	$v_0 = 196 \pm 3$ $H=740 \pm 100$
1600	$v_0 = 200 \pm 5$ $H=1520 \pm 100$	$v_0 = 200 \pm 4$ $H=1550 \pm 100$	$v_0 = 198 \pm 3$ $H=1750 \pm ??$	$v_0 = 198 \pm 3$ $H=1600 \pm ??$

FIGURE 3.25 – Résultats de l'ajustement des données présentées en figures 3.23 et 3.24. L'apparition du symbole ?? signifie la non convergence.

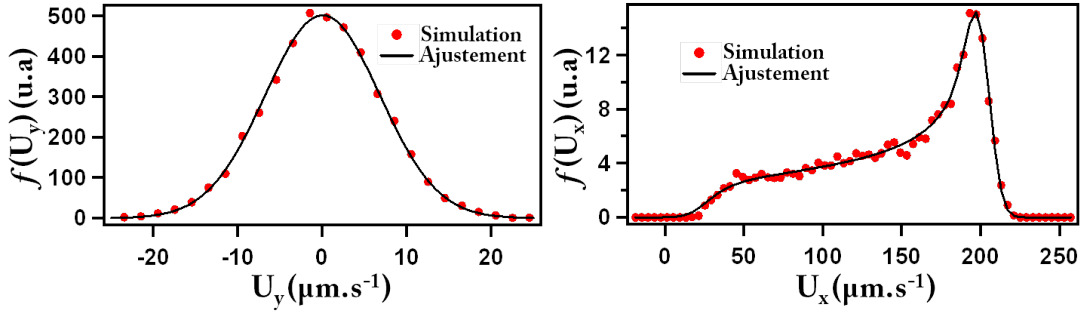


FIGURE 3.26 – Distributions de vitesses suivant les directions  $y$  (gauche) et  $x$  (droite) pour la simulation visant à tester l'effet du comptage.

sphériques de 200 nm de diamètre dans une fluide de viscosité  $5.8 \text{ mPa.s}$  et une vitesse maximale du fluide  $v_0 = 200 \mu\text{m.s}^{-1}$ . Les données expérimentales ainsi que le résultat de l'ajustement est visible sur la figure 3.26. Ce dernier conduit aux valeurs  $v_0 = 200 \mu\text{m.s}^{-1}$  et  $H = 2100 \text{ nm}$ . Ainsi est-il démontré que traiter toutes les données accessibles, et ne pas tronquer les trajectoires, ne conduit pas à biaiser la distribution. Cet effet peut-être rationalisé comme suit : pour deux traceurs de vitesses  $v_1$  et  $v_2$  telles que  $v_1 < v_2$ , non-browniens, on peut s'attendre extraire  $N_{1,2}^p \propto \frac{L_0}{v_{1,2}\tau}$  points par trajectoire dans le champ de la caméra. Soit un nombre supérieur pour le traceur de vitesse  $v_1$ . Toutefois, si le traceur de vitesse  $v_2$  reste moins longtemps dans le champ d'observation, plus nombreux sont les traceurs ayant cette même vitesse. Le nombre total de traceurs de type 1 et 2 est proportionnel aux *débits* des lignes de fluide sur lesquelles ils se trouvent. Le nombre total de trajectoires vues dans la zone et donc donné par  $N_{1,2}^{\text{traj}} \propto v_{1,2}$ . Ainsi les deux effets se compensent-t-il pour au final donner un nombre de points pour les traceurs 1 et 2 indépendants de leurs vitesses respectives  $N_{1,2} = N_{1,2}^{\text{traj}} \cdot N_{1,2}^p \propto \frac{L_0}{\tau}$ .

## 3.6 Confrontation à l'expérience pour des fluides Newtoniens

### 3.6.1 Conditions expérimentales

**Solution tampon** Dans les expériences détaillées ci-après, deux types de solution ont été utilisés et ce afin de tester l'impact de la viscosité sur la précision de notre méthode. Ces deux fluides consistent en une base tampon commune (TBE 2X) à laquelle nous avons ajouté du glycérol pour obtenir une viscosité supérieure. Le détail de leur composition est donné dans la partie considération expérimentale. La caractérisation à l'aide d'un rhéomètre à chute de bille nous a permis de révéler leur viscosité à 23°C (température de la salle d'expérimentation) :

- Solution 1 : tampon TBE 2X + glycérol  $\mu = 5.78 \times 10^{-3} Pa.s$
- Solution 2 : tampon TBE 2X  $\mu = 1.01 \times 10^{-3} Pa.s$

**Passivation des surfaces** Les puces microfluidiques sont scellées tel que décrit dans la partie méthode. Les surfaces des canaux ont été passivées à l'aide d'albumine de sérum bovin (BSA). Une fois les canaux remplis, nous avons fait circuler une solution à 50 mg/ml de BSA durant 10 min, puis avons stoppé l'actionnement fluide pour 10 minutes supplémentaires. Ce protocole a été montré efficace afin de limiter le collage des particules sur les murs de la canalisation, notamment au niveau des trous d'accès.

**Particules** Des particules sphériques de polystyrène de 200 et 300 nm de diamètre ont été utilisées pour nos expériences. Celles-ci ont été diluées à hauteur de  $\approx 5 \times 10^{11}$  billes/ml et donc une fraction volumique  $\approx 10^{-5}$  dans les solutions décrites plus tôt. Afin de prévenir toute aggrégation, les dispersions ont été laissées au bain à ultrasons durant 2 min avant chaque expérience.

**Imagerie** Chacune des expériences a été menée sur le banc expérimental décrit dans la partie méthode de ce manuscrit. Les puces ont été montées sur un microscope à fluorescence et chacune des entrées asservies à l'aide d'un contrôleur de pression. Le signal de fluorescence a été recueilli via un objectif à immersion à huile de grossissement 100 X. Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, les pixels de la caméra ont été moyennés deux par deux. Afin de limiter la perte de définition par l'augmentation subséquente de la taille du pixel, une lentille de grossissement 1,6 X a été intercalée sur le trajet optique, pour une taille de pixel finale de 100 nm. Afin d'augmenter la cadence d'acquisition, les images ont été acquises selon le schéma du *crop-mode* décrit plus tôt. La fréquence d'acquisition a ainsi pu atteindre 130.55 Hz soit un intervalle caméra de 7.66 ms.

### 3.6.2 Application de notre méthode de caractérisation pour différentes fentes microfluidiques

#### Comparaison de plusieurs fentes pour le fluide de viscosité $\mu = 5.78 \times 10^{-3} Pa.s$

Dans cette section, nous présenterons les résultats obtenus dans 4 types de fentes associées à des hauteurs  $H = 0.95, 1.2, 1.4, 1.95 \mu m$ . Les débits imposés en leur sein sont ajustés par modification de la chute de pression  $\Delta P$  entre leurs entrées et sorties. Les figures 3.27 et 3.28 présentent respectivement

les distributions  $f(U_x)$  ainsi la variation de la vitesse maximale et de la hauteur ajustées en fonction de la chute de pression pour les quatre conditions sus-citées.

De manière globale, les ajustements reproduisent fidèlement les distributions. L'augmentation de la chute de pression se traduit par un décalage du pic des distributions vers les hautes vitesses. La variation de la vitesse maximale ajustée pour chacun des débit varie bien, et ce pour chaque type de fente, de manière linéaire avec  $\Delta P$ . Les droites en trait plein sur la figure 3.28 sont des ajustements linéaires des courbes  $v_0(\Delta P)$ . Si l'ajustement des distributions et la variation de  $v_0$  peut donner satisfaction, cela n'est pas le cas pour le paramètre hauteur ajusté. Dans chacun des cas, ce dernier prend des valeurs bien inférieures aux valeurs connues avant scellement comme présenté dans la table 3.29. L'ajustement conduit à des hauteurs effectives de canalisation jusqu'à environ trois fois inférieures aux valeurs attendues.

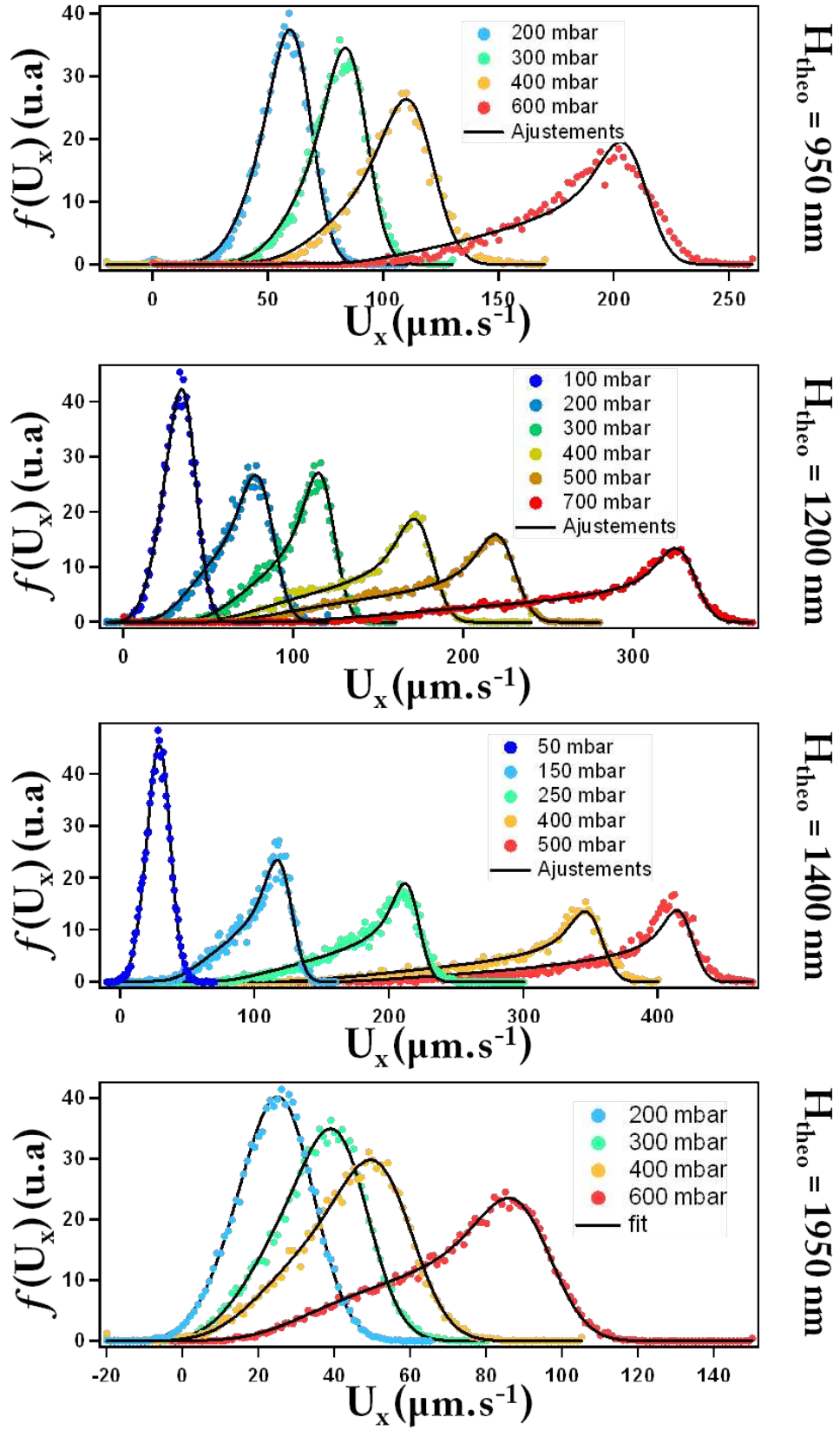
#### Quelques causes possibles à cette déviation

Nous souhaitons ici mettre avant diverses causes possibles à l'origine de cette mesure de hauteur anormale. Celles-ci peuvent être d'ordre structurel, au sens où la géométrie du canal est possiblement mise à mal au cours du scellement, ou peuvent prendre leur essence dans la mauvaise description de la vitesse d'une bille dans un canal. Ces diverses origines sont discutées dans les paragraphes qui suivent.

**Effondrement du canal** A ce stade nous pouvons nous interroger sur l'intégrité de la structure après scellement. En effet, fixant nos dispositifs sur une couche de polymère, nous pouvons envisager un effondrement partiel de la canalisation tel que schématisé sur la figure 3.30. Cet effet expliquerait alors de manière directe l'écart rencontré.

Les données de la vitesse maximale nous permettent de répondre à cette question. En effet, comme le décrit l'équation 3.9, les caractéristiques géométriques du canal rectangulaire ( $L, W$ ), la viscosité du fluide ( $\mu$ ), et la chute de pression entre entrée et sortie définissent la vitesse maximale au sein de la canalisation. Prenons pour exemple les canalisations de hauteur théoriques 1.2 et 1.4  $\mu\text{m}$ . Leurs dimensions respectives sont données par  $(L \times W \times H) = (7400 \times 100 \times 1,2)$  et  $(4250 \times 50 \times 1,4) \mu\text{m}^3$ . L'évolution *théorique* de la vitesse maximale en leur centre est tracée en figure 3.31 et superposée aux données expérimentales. Les mêmes données, obtenues à l'aide de la formule 3.9, mais pour les hauteurs effectives ajustées précédemment sont aussi représentées. De ce graphique transparaît clairement que l'hypothèse d'un effondrement se traduit par un paradoxe concernant les vitesses mesurées. L'augmentation de la résistance hydrodynamique pour des hauteurs de canaux plus faibles conduit en effet à un abaissement drastique du débit à l'intérieur de la canalisation, incompatible avec les valeurs  $v_0$  observées. L'hypothèse de l'effondrement du canal n'est donc pas justifiée. D'autre part, cette comparaison nous permet d'affirmer la validité du paramètre  $v_0$  tiré de nos mesures.

**Remise en cause du modèle incluant les interactions hydrodynamiques** Retirer de l'ajustement de telles valeurs de hauteur est impliqué par la disparition des états de basse vitesse. Comme nous avons pu en discuter plus tôt, l'inclusion des interactions hydrodynamiques conduit à ralentir la vitesse de la bille, notamment au bord de la canalisation. Il est possible d'analyser nos données en donnant pour modèle à la vitesse de migration le modèle de Faxen (formule 3.16). Ce dernier donnant ne prenant en compte que la courbure du champ de vitesse fluide, il implique une vitesse de traceur



**FIGURE 3.27** – Distributions de vitesses suivant les directions  $x$  pour différentes chutes de pression dans quatre fentes de hauteur (du haut vers le bas)  $H=0.95, 1.2, 1.4, 1.95 \mu\text{m}$ .

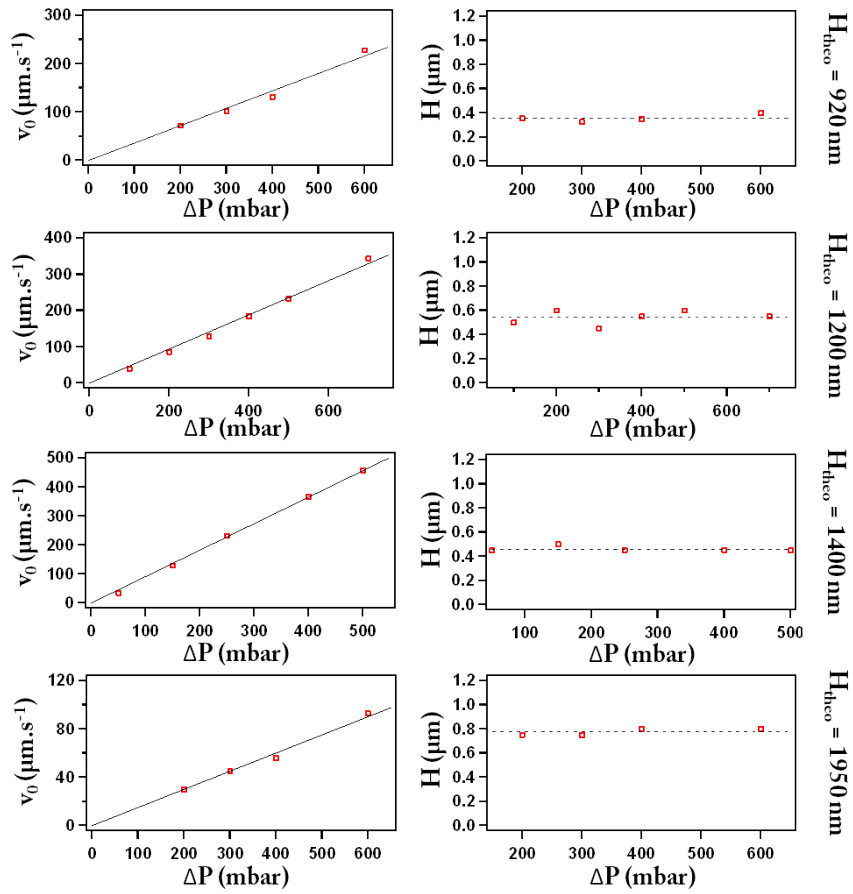


FIGURE 3.28 – Variation des paramètres  $\nu_0$  et  $H$  ajustés pour différentes chutes de pression dans quatre fentes de hauteur (du haut vers le bas)  $H=0.95, 1.2, 1.4, 1.95 \mu\text{m}$ .

$H_{théo} \mu\text{m}$	0.95	1.2	1.4	1.95
$H_{ajust} \mu\text{m}$	0.35	0.54	0.46	0.76

FIGURE 3.29 – Variation de la hauteur ajustée avec la hauteur avant scellement des canalisations

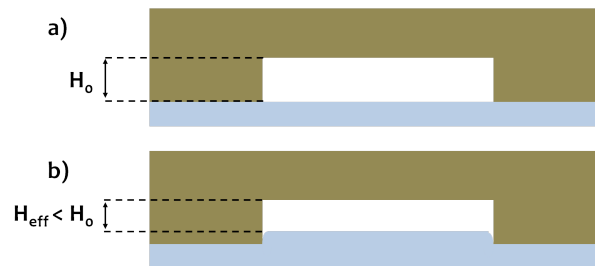
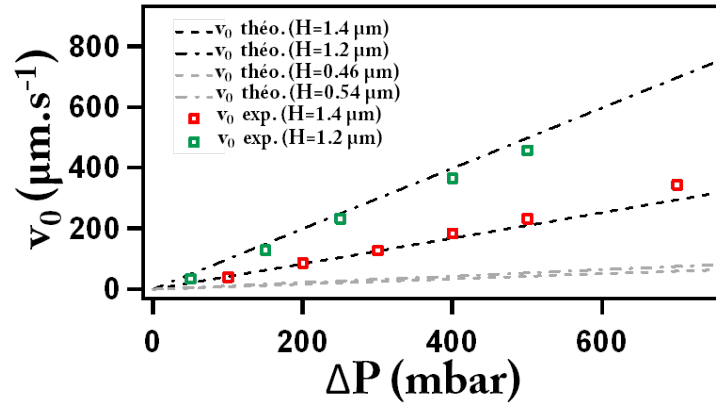
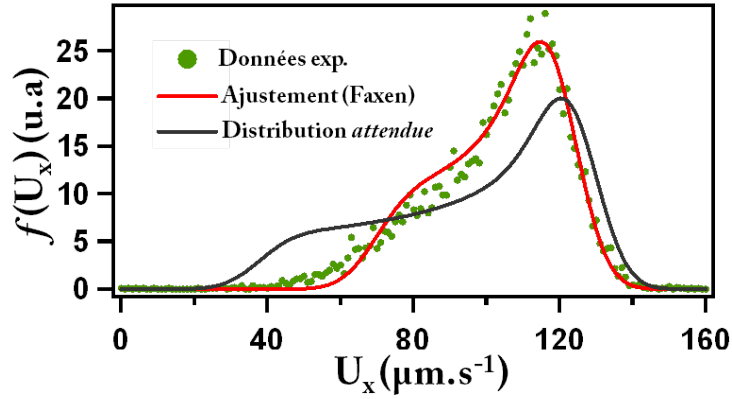


FIGURE 3.30 – Illustration du flambage du polymère support. a) Structure intacte de hauteur  $H_0$ . b) Effondrement partiel du canal faisant apparaître une hauteur effective  $H_{eff} < H_0$



**FIGURE 3.31** – Évolution de la vitesse maximale au sein du canal en fonction de la chute de pression. Points : données expérimentales. Pointillés noirs : données calculées suivant 3.9 pour les hauteurs connues avant scellement. Pointillés gris : données calculées suivant 3.9 pour les hauteurs tirées de l'ajustement.



**FIGURE 3.32** – Ajustement d'une distribution expérimentale  $f(U_x)$  à l'aide de modèles n'incluant pas l'effet des interactions hydrodynamiques (IH). En noir est représentée la distribution *attendue* pour  $H=1.2 \mu m$  et  $v_0 = 126 \mu m.s^{-1}$ .

supérieure au modèle incluant des interactions hydrodynamiques. Le résultat de l'ajustement des données acquises pour la fente de  $1.2 \mu m$  de hauteur pour 300 mbar de chute de pression en utilisant le modèle de Faxen est représenté en figure 3.32. Cet ajustement conduit à des valeurs de vitesse et de hauteur  $v_0 = 126 \mu m.s^{-1}$ ,  $H = 550 nm$ . Ainsi, comme attendu, l'utilisation du modèle n'incluant pas les interactions hydrodynamiques conduit à une valeur de hauteur supérieure (550 nm au lieu des 450 nm précédemment obtenus). Toutefois, cette valeur n'est toujours pas en accord avec la hauteur réelle de  $1.2 \mu m$ . La distribution *théorique* attendue est aussi représentée sur la figure 3.32 pour  $H=1.2 \mu m$  et  $v_0 = 126 \mu m.s^{-1}$ . Il apparaît clairement que les états de basse vitesse sont sous-représentés dans nos expériences. Aussi, et plus important encore, le paramètre  $v_0$  ajusté ne semble pas forcément en accord avec les données.

**Glissement aux parois** L'importante différence entre paramètre  $H$  ajusté et la valeur théorique est la cause de la disparition d'états de basse vitesse pour les traceurs. L'effet de la diffusion durant l'intervalle caméra a été analysé à l'aide des simulations browniennes et l'écart obtenu, comme précédemment démontré, est sans commune mesure avec celui extrait des simulations (Cf. figure 3.32). Une cause directe envisageable serait le glissement du liquide aux parois. En effet, incluant ou non les interactions

hydrodynamiques, chacun des modèles de vitesse de traceurs sphériques ont pour hypothèse le non glissement du liquide à la paroi. En présence d'un tel effet, le fluide admet une vitesse apparente en bord de canalisation non-nulle. L'effet du glissement des liquides au dessus d'une surface a une longue histoire et se trouve résumé dans différentes revues [Neto et al., 2005] [Tabeling, 2009]. En de telles conditions, le fluide admet une vitesse apparente à la paroi donnée par

$$v_{\infty} = b \frac{\partial v_{\infty}}{\partial z} \quad (3.65)$$

où  $b$  est la longueur de glissement. Diverses techniques expérimentales ont été mises en place afin d'analyser cet effet pour des géométries et des chimies de surfaces diverses [Joseph and Tabeling, 2005] [Joseph et al., 2006]. Un consensus s'établit aujourd'hui peu à peu pour avancer une valeur de  $b$  égale à environ 30 nm pour des surfaces hydrophobes et  $O(nm)$  pour des surfaces hydrophiles. Considérant que le vieillissement du PDMS après oxydation par plasma conduit progressivement à le rendre hydrophobe [Hillborg et al., 2000], il est tout à fait envisageable qu'un effet de glissement apparaisse dans nos expériences, même si son amplitude devrait être limitée. Afin de vérifier cette hypothèse, il nous est possible de raisonner par l'absurde, soit, supposer le glissement avéré, trouver la longueur de glissement nécessaire, et conclure sur la réalité de cette dernière. En présence de glissement aux parois, la loi du Poiseuille plan 3.10 doit être modifiée tel que suit :

$$v_{\infty}^g = b \frac{\Delta PH}{2\mu L} + \frac{\Delta PH^2}{2\mu L} \frac{z}{H} \left(1 - \frac{z}{H}\right) \quad (3.66)$$

Le profil de vitesse de fluide correspond à la loi d'écoulement sans glissement que l'on translate d'une quantité  $v_G = b \frac{\Delta PH}{2\mu L} = b\dot{\gamma}_{wall}$  qui correspond à la vitesse de glissement aux bords. La dynamique d'une particule sphérique incluant les interactions hydrodynamiques dans un écoulement parabolique avec glissement à la paroi n'a été traitée que récemment [Ghalya, 2012] et il n'existe pas, à notre connaissance, de formule analytique du type 3.35 donnant la vitesse d'une bille en présence de glissement à la paroi. Toutefois, la prise en compte des IH ne pouvant pas augmenter la vitesse de migration, nous prendrons pour vitesse du traceur celle donnée par la formule de Faxen 3.15 appliquée à 3.66 telle que :

$$U_x(z) = v_G + 4v'_0 \left[ \frac{z}{H} \left(1 - \frac{z}{H}\right) - \frac{a^2}{3H^2} \right] \quad (3.67)$$

Avec  $v'_0 = \frac{\Delta PH^2}{8\mu L} = \frac{\dot{\gamma}_{wall} H}{4}$ . La vitesse du fluide au centre de la canalisation étant donnée par  $v_{max} = v_G + v'_0$ . Ajustant les données précédemment présentées à l'aide de ce modèle, nous permet, à partir de  $v_G$  de déduire une longueur fictive de glissement nécessaire pour expliquer la disparition des états de basse vitesse. Ces données sont présentées en figure 3.33. L'ajustement des données à l'aide de  $v_G = b\dot{\gamma}_{wall}$  conduit à  $b \approx 180nm$ . Une valeur plus de cinq fois supérieure aux valeurs typiques au dessus d'une surface hydrophobe annoncée dans la littérature. Rappelons ici que nous nous sommes placés dans un formalisme minimisant cette longueur de glissement fictive puisque les interactions hydrodynamiques ne sont pas incluses.

Un autre argument peut être construit afin de définitivement négliger cet effet. Nous pouvons tracer l'évolution de la vitesse maximale du fluide dans la canalisation en fonction de la chute de pression et la comparer avec celle, théorique, trouvée à partir des caractéristiques géométriques de la canalisation et de la longueur de glissement fictive précédemment annoncée. D'après 3.66 il vient :

$$v_{max} = v_G + v'_0 = \frac{\Delta PH}{2\mu L} \left( b + \frac{H}{4} \right) \quad (3.68)$$



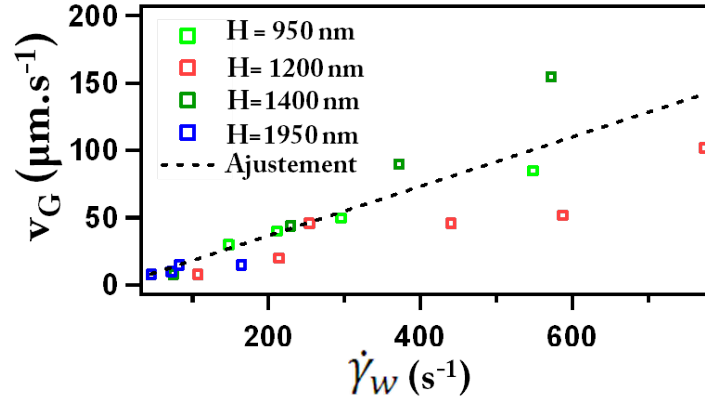


FIGURE 3.33 – Vitesse de glissement fictive ajustée en fonction taux de cisaillement pour différentes hauteurs de canalisation

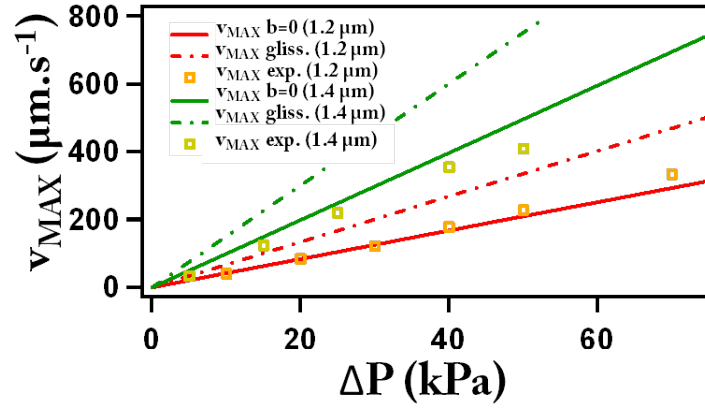


FIGURE 3.34 – Vitesse maximale du fluide déduite des ajustements en fonction de la chute de pression  $\Delta P$ . Les données expérimentales sont superposées au données déduites de l'équation 3.68 pour  $b=0$  et  $b=180$  nm.

Sur la figure 3.34 sont représentées les données expérimentales de vitesse maximale du fluide en fonction de la chute de pression. Y sont superposées les données obtenues avec 3.68 pour  $b=0$  et  $b=180$  nm. Encore une fois, les données ne semblent pas aller dans le sens du phénomène du glissement, puisque la vitesse maximale obtenue est bien supérieure aux données expérimentales, ces dernières étant bien mieux approximées en supposant un non-glissement aux bords.

### 3.6.3 Migration transverse

#### Non-homogénéité de la probabilité de présence suivant $z$

Les discussions précédentes indiquent que la déviation de l'ajustement sur la hauteur semble être un effet bien réel lié à l'écoulement des particules en solution. Il convient alors de chercher une autre explication expliquant la disparition des états de basse vitesse. De manière plus prosaïque, nous pouvons suggérer qu'il existe une exclusion simple des particules des zones proches des parois. Dans un premier temps, sans prétention de donner une origine physique, ou même une expression analytique à une potentielle force repoussant les particules des parois, il nous est possible d'expérimentalement extraire une distribution de densité de présence selon  $z$  des particules. Il s'agit alors de répondre à la question, quelle distribution  $n(z)$  permet d'ajuster les données expérimentales connaissant la

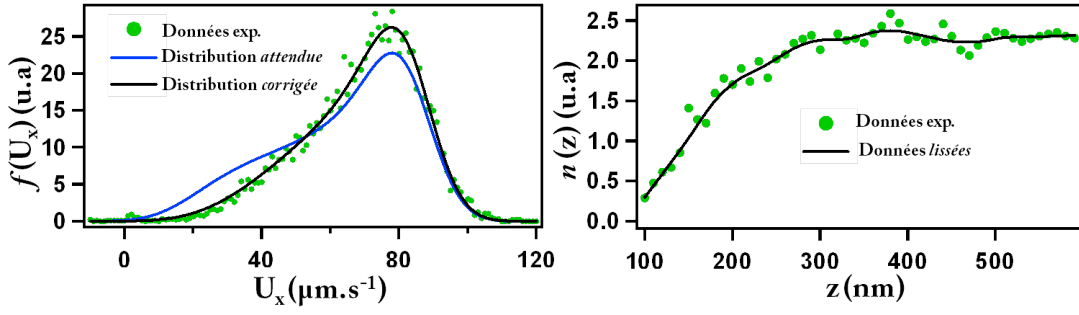


FIGURE 3.35 – Illustration de la méthode d'extraction des distributions  $n(z)$ . A gauche sont représentées les distributions (bleu) issue du seul ajustement sur  $v_0$  ( $H=1200$  nm) et (noir) celle corrigée par la densité de présence  $n(z)$ . A gauche est représentée la densité  $n(z)$  extraite de cette ajustement. Canal de hauteur  $H=1200$  nm,  $\Delta P = 200\text{mbar}$

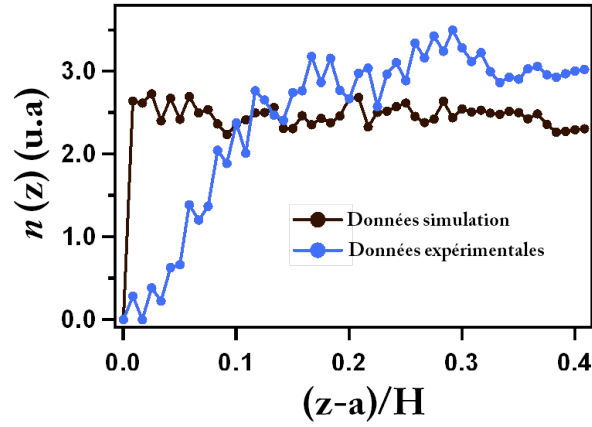


FIGURE 3.36 – Densité de présence  $n(z)$  pour  $H=1200$  nm et  $v_0 = 330\mu\text{m.s}^{-1}$ . En noir sont représentées les données simulées sans force transverse. En bleu les données expérimentales.

distribution théorique attendue. Pour ce faire, il est nécessaire de procéder en deux temps 1) ajuster la distribution expérimentale avec pour seule variable  $v_0$  en fixant la hauteur à la hauteur connue avant scellement (l'ajustement consiste alors essentiellement à repérer le pic des distributions) et 2) trouver une densité  $n(z)$  telle que les données expérimentales soient correctement reproduites.  $n(z)$  est alors obtenue par le ratio  $n(z) \propto f_{\text{exp}}(U_x) / f_{\text{theo}}(U_x)$ . La figure 3.35 explique les différentes étapes de cette procédure. Il transparaît de ces données que distributions sans état de basse vitesse peuvent s'expliquer par l'exclusion des bords des particules.

Afin donner une réalité physique à cette hypothèse, nous tâcherons dans un premier temps d'évaluer l'évolution de cet effet pour les différentes expériences décrites plus tôt, à savoir dans un fluide Newtonien ( $\mu = 5.810^{-3}\text{Pa.s}$ ), pour différents débits et hauteurs de canalisation, à diamètre de traceur fixée à 200 nm. Puis nous évaluerons l'évolution de  $n(z)$  pour un fluide de viscosité inférieure. Nous comparerons enfin l'effet de la taille de la particule sur cette exclusion. Toutefois, avant d'utiliser cette méthode, nous souhaitons ici nous assurer que la déplétion aux bords qui apparaît sur les distributions  $n(z)$  n'est pas liée au phénomène de diffusion durant l'intervalle de temps caméra. Pour ce faire, nous simulons par dynamique brownienne le mouvement de traceurs dans des conditions exactement identiques à l'expérience dans une fente de 1200 nm de hauteur pour  $v_0 = 330\mu\text{m.s}^{-1}$ . La figure 3.36 présente la densité de probabilité retrouvée par simulation ainsi que la distribution expérimentale. De ce graphique transparaît le fait que le phénomène de migration préférentielle vers le centre ne

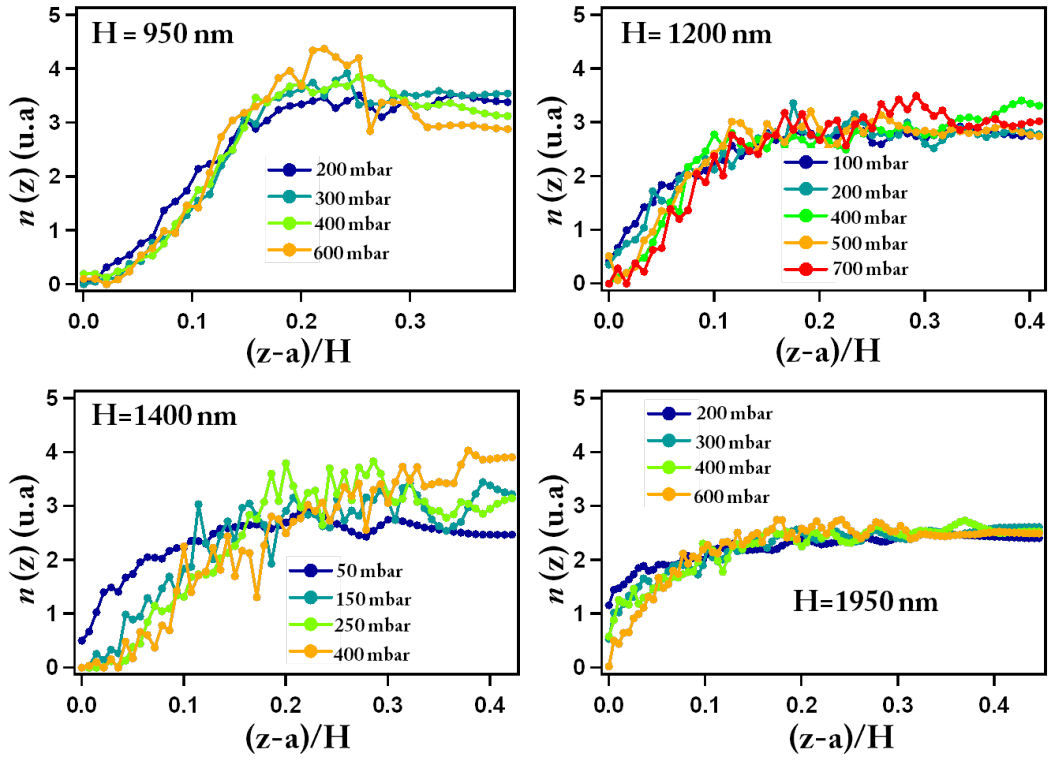


FIGURE 3.37 – Densité de présence  $n(z)$  pour différents débits pour quatre canalisation de hauteur 0.95, 1.2, 1.4 et 1.95  $\mu\text{m}$

peut être un artéfact lié à la diffusion verticale des traceurs. Cet effet, selon la simulation, n'impacte la distribution que sur quelques nm.

#### Évolution de l'exclusion aux bords pour le fluide de viscosité $\mu = 5.8 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$

Dans le cas d'un fluide porteur composé d'un mélange glycérol-tampon TBE, nous avons mesuré les différentes probabilités de présence suivant  $z$  pour différents débits et différentes canalisation. Ces résultats sont donnés dans la figure 3.37. De manière globale les états proches des bords semblent dépeuplés aux profits des états où les particules sont plus au centre de la canalisation, conduisant à une sur-représentation de ces derniers. Plus spécifiquement, ces graphiques nous permettent deux observations majeures. La première est que l'anisotropie de  $n(z)$  semble augmenter avec le confinement. Ce constat peut notamment être fait par comparaison des données obtenues pour les fentes de 0.95 et 1.95  $\mu\text{m}$  de hauteur. Mais aussi, le dépeuplement des zones proches des parois semble d'autant plus fort que la vitesse du fluide est importante. Cet effet peut être notamment appréhendé, pour une hauteur de canalisation donnée, par le décalage progressif des courbes lorsque la chute de pression s'accroît. Afin de contrôler l'effet du cisaillement, la figure 3.38 donne la densité  $n(z)$  pour deux hauteurs différentes et deux taux de cisaillement similaires. Pour des confinements modérés ( $H=1.2$  et  $1.95 \mu\text{m}$ ), les densités semblent comparables. Ce constat est plus délicat à faire pour un confinement plus important ( $H=0.95$  et  $1.2 \mu\text{m}$ ) même s'il semble que la déplétion soit plus importante pour un fort confinement.

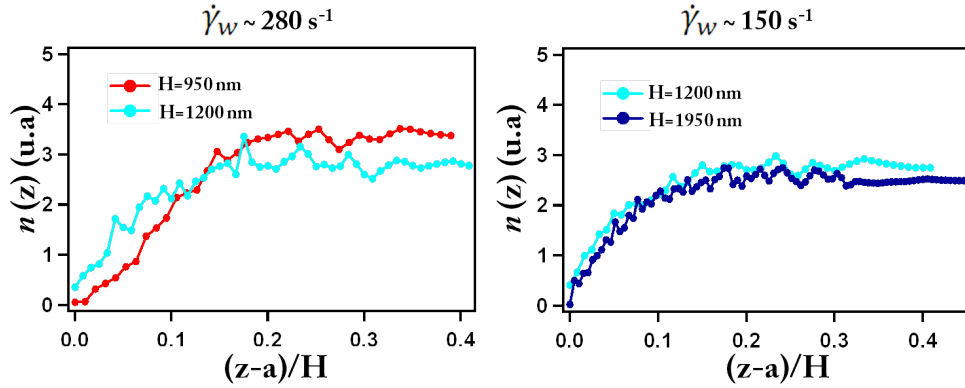


FIGURE 3.38 – Densité de présence  $n(z)$  à cisaillement constant pour plusieurs valeurs de confinement.  $\mu 5.8 \cdot 10^{-3} Pa.s$

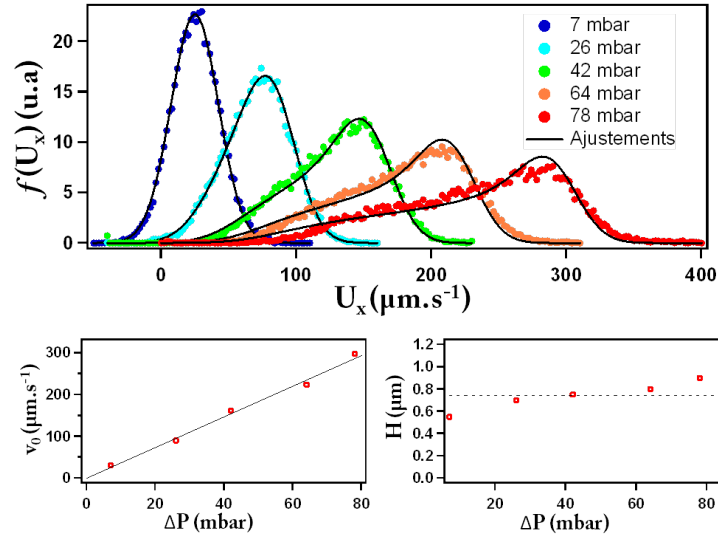


FIGURE 3.39 – Résultats des ajustements des distributions  $f(U_x)$  pour une canalisation de hauteur  $H=1.4 \mu m$  et différentes chute de pression pour un fluide de viscosité  $\mu = 1.1 mPa.s$ .

### Effet de la valeur de la viscosité

Afin de tester l'effet de la viscosité du fluide porteur sur la migration transverse des particules, une expérience dans une fente de hauteur  $H = 1.4 \mu m$  a été menée dans une solution tampon TBE sans glycérol. Le résultat des ajustements des paramètres  $v_0$  et  $H$  sont présentés sur la figure 3.39. Encore une fois, l'ajustement conduit à un paramètre  $H$  plus de deux fois inférieur au paramètre réel. La moyenne de ce dernier est de 740 nm contre 1400 nm en théorie. Toutefois, cette valeur est bien supérieure à la valeur de 460 nm précédemment dérivée pour un fluide de viscosité supérieure. Afin de confirmer ce résultat, les densités  $n(z)$  ont été calculées à partir de ces distributions et sont présentées en figure 3.40. Encore une fois, les états proches de la paroi sont d'autant plus dépeuplés que la chute de pression (et donc la vitesse de fluide) est importante. Plus remarquable,  $n(z)$  semble adopter un maximum pour une altitude  $\frac{z-a}{H} \approx 0.15$  d'autant plus prononcé que la vitesse du fluide est grande. Afin de mieux repérer les différences induites par l'abaissement de la viscosité, les trois panneaux composant la figure 3.41 représentent les distributions  $n(z)$  pour une hauteur de canalisation  $H=1.4 \mu m$  pour des

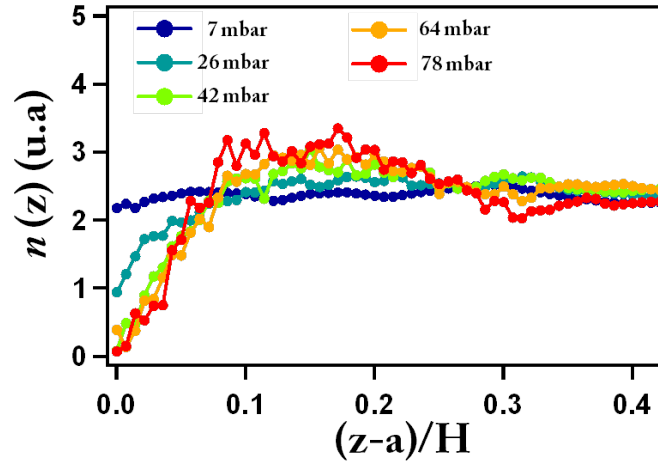


FIGURE 3.40 – Densité de présence  $n(z)$  pour différents débits pour une canalisation de hauteur  $H = 1.4 \mu m$ .

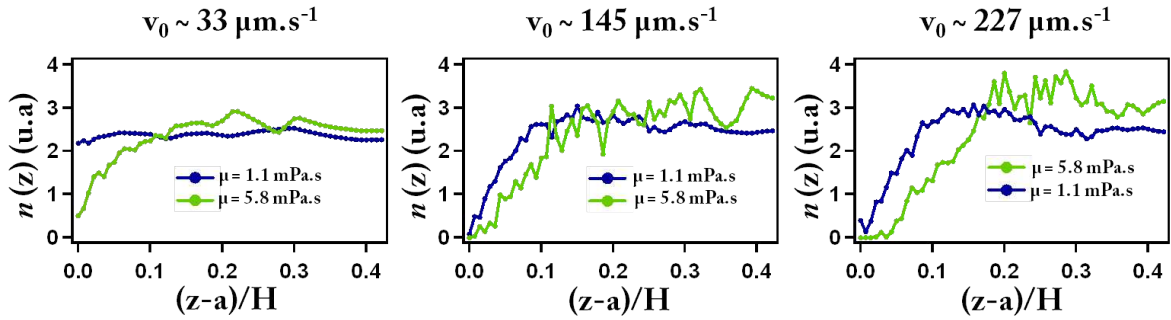
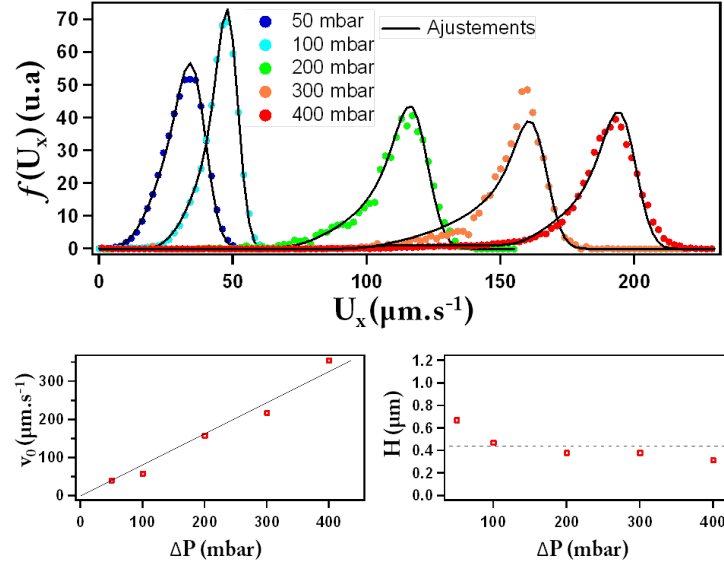


FIGURE 3.41 – Densité de présence  $n(z)$  pour différents débits pour une canalisation de hauteur  $H = 1.4 \mu m$  pour deux fluides de viscosités différentes.

viscosités  $\mu = 1.1 \times 10^{-3}$  et  $5.8 \times 10^{-3} Pa.s$  pour des vitesses maximales de fluide similaires ( $\pm 10 \mu m.s^{-1}$ ). A la vue de ces courbes un constat s'impose : à vitesse de fluide et pour une hauteur de canalisation données, l'exclusion des particules des zones proches des parois est d'autant plus forte que la viscosité est grande. Ces données amènent donc à une conclusion majeure. Nous avons en effet noté plus tôt que la diffusion des particules durant l'intervalle de temps caméra conduit irrémédiablement à la disparition des états de basse vitesse. D'autre part, l'augmentation de la viscosité du milieu conduit à ralentir la diffusion et donc à limiter ce biais. La simple observation que l'exclusion croît avec la viscosité confirme que l'abaissement de la densité  $n(z)$  proche des parois n'est pas un artéfact lié à cet effet de diffusion durant  $\tau_{cam}$ .

### Effet de la taille des traceurs

Cet effet de migration mis en avant, on peut s'interroger sur l'effet de la taille de la particule. Ainsi avons-nous mené une expérience à l'aide de traceurs de 300 nm de diamètre dans un canal de 950 nm de hauteur avec pour fluide porteur le mélange glycérol-TBE de viscosité  $\mu = 5.8 mPa.s$ . Les résultats, en termes d'ajustement des distributions  $f(U_x)$ , ainsi que les paramètres  $v_0$  et  $H$  sont présentés dans la figure 3.42. La hauteur moyenne tirée de ces ajustements est de 400 nm et semble légèrement supérieure aux 350 nm obtenus précédemment avec des particules de 200 nm de diamètre. Toutefois, comme nous avons pu le faire remarquer plus tôt, l'ajustement est très discutable pour ces niveaux



**FIGURE 3.42** – Résultats des ajustements des distributions  $f(U_x)$  pour une canalisation de hauteur  $H=0.95 \mu m$  et différentes chutes de pression pour un fluide de viscosité  $\mu = 5.8 mPa.s$ .

apparents de confinement. En effet pour de tels rapport  $a/H$ , la vitesse de la bille au centre de la canalisation est bien inférieure à la vitesse maximale du fluide et se rapproche de la vitesse moyenne. Ainsi, il y a tout lieu de croire que la vitesse maximale ajustée surestime la vitesse maximale réelle. La technique valable reste le calcul des distributions  $n(z)$ . Pour cette dernière expérience, les distributions retrouvées sont données dans la figure 3.43 pour les différentes chutes de pression  $\Delta P$ . Encore une fois, ces données mettent en avant une zone de déplétion proche de la paroi, d'autant plus étendue que la vitesse du fluide est grande. Afin de mieux mettre en avant l'effet de la taille de la particule sur la densité  $n(z)$  la figure 3.44 présente ces distributions pour une fente de hauteur 950 nm, des débits comparables et deux tailles de particules. La comparaison des densités présentées en 3.44 est rendue difficile de par le fait qu'elles ne peuvent être présentées sur un même domaine en  $z$ . Toutefois, pour le débit maximal, caractérisé par  $v_0 \approx 208 \mu m.s^{-1}$ , l'exclusion des particules semblent plus importante pour le rayon  $a=150 nm$ .

Ainsi, les résultats expérimentaux jusqu'ici présentés nous ont permis de démontrer l'existence d'un phénomène de migration préférentielle des particules vers le centre de la canalisation. Cet effet dépend du cisaillement, de la taille de la particule et de la valeur de la viscosité.

### Caractérisation de la force mise en jeu

Comme nous avons pu le mettre en avant plus tôt, plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'hétérogénéité de la probabilité de présence suivant  $z$  des traceurs. Ces phénomènes peuvent être d'origine inertielle, ou encore dus à une interaction électrostatique ou encore électrovisqueuse avec la paroi. Sans présumer la nature réelle de cette force, il nous est possible, utilisant les distributions  $n(z)$  de remonter à une force *fictive* nécessaire pour obtenir cet état d'équilibre. Considérant que  $n(z)$  est donnée par la distribution de Boltzmann :

$$n(z) = n_0 \exp(-\beta U(z)) \quad (3.69)$$

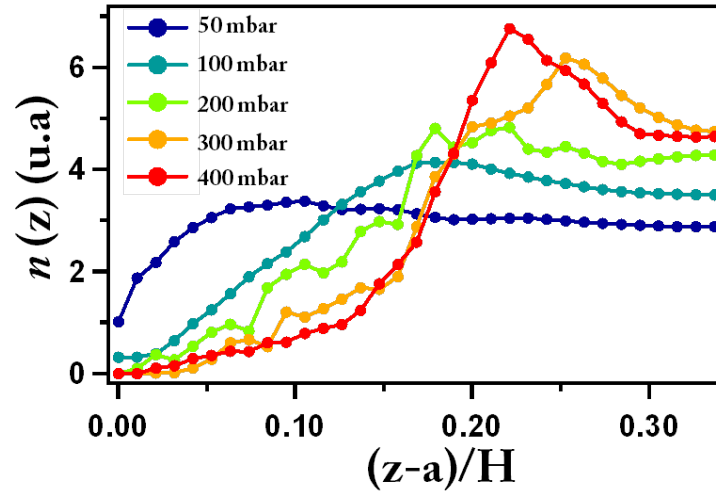


FIGURE 3.43 – Densité de présence  $n(z)$  pour différents débits pour une canalisation de hauteur  $H=0.95\mu\text{m}$  et un rayon de traceur  $a=150\text{ nm}$ .

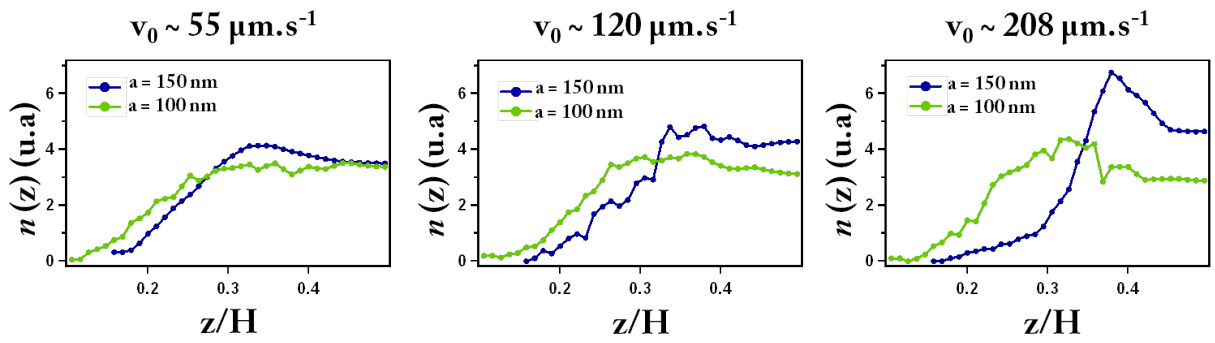


FIGURE 3.44 – Densité de présence  $n(z)$  pour différents débits pour une canalisation de hauteur  $H=0.95\mu\text{m}$  deux tailles de particules ( $a=100$  et  $150\text{ nm}$ ).

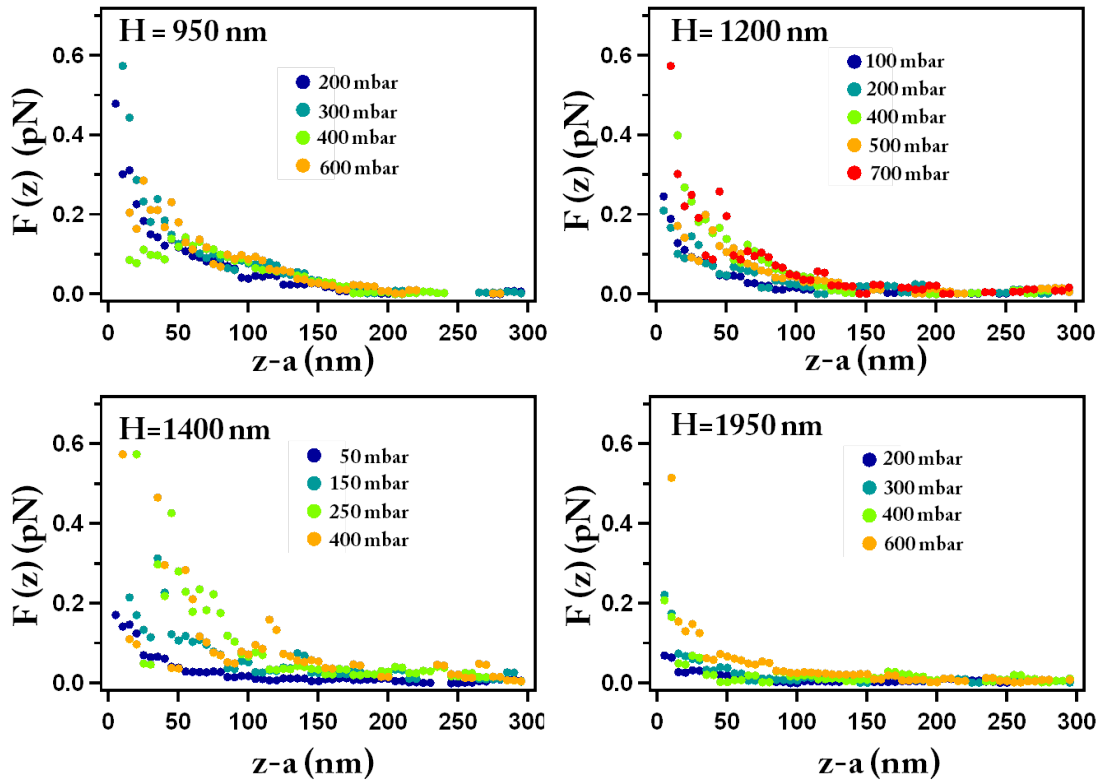


FIGURE 3.45 – Forces dérivées des distributions d'équilibre pour quatre hauteurs de canal  $H = 0.95, 1.2, 1.4$  et  $1.95 \mu m$

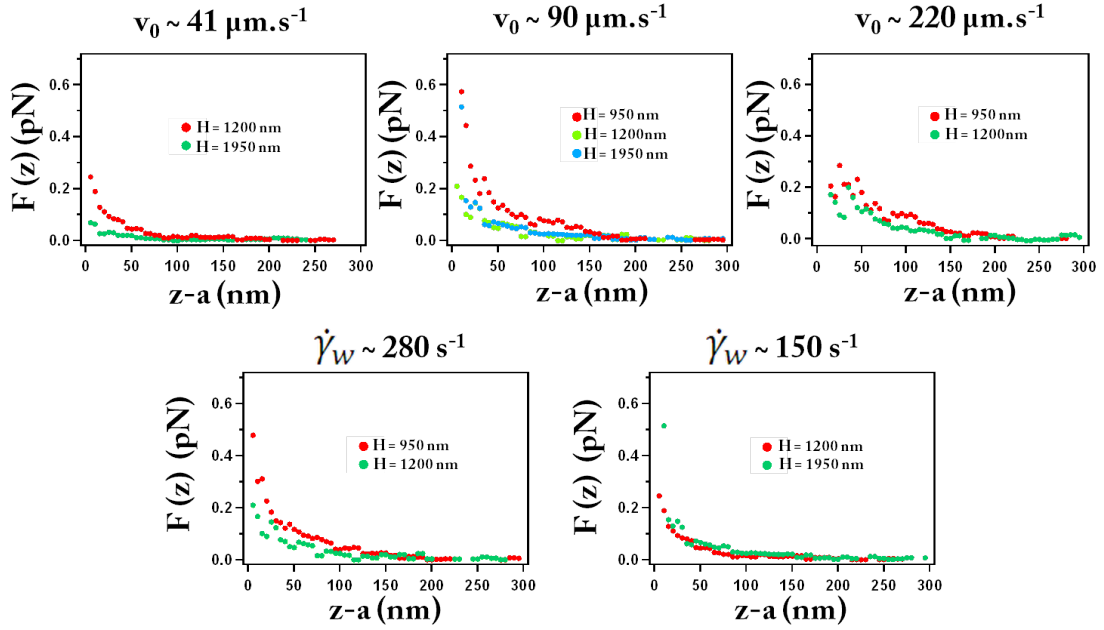
Avec  $\beta = k_B T$  et  $n_0 = \frac{1}{\int dz \exp(-\beta U(z))}$ . Ainsi est-il possible de remonter à la force "fantôme" à l'origine de la migration via :

$$F(z) = k_B T \frac{d \ln n(z)}{dz} \quad (3.70)$$

Notons que cette définition semble passer outre le fait que le coefficient de diffusion varie dans l'espace. Toutefois, selon la définition du facteur de Boltzmann généralisé [Büttiker, 1987], cette expression reste correcte si l'on observe que la mobilité est également dépendante de l'espace. La figure 3.45 présente le résultat de cette étude pour des fentes de hauteur  $H = 0.95, 1.2, 1.4$  et  $1.95 \mu m$  et pour un fluide de viscosité  $\mu = 5.8 mPa.s$ . De ces figures semble se détacher une tendance selon laquelle la force de migration augmente avec la chute de pression entre entrée et sortie du canal. Ces forces semblent diverger près de la paroi. Cette force équivalente représente quelques dixièmes de  $pN^3$  et reste non négligeable pour  $z-a < 100$  nm soit une longueur bien supérieure à la longueur de Debye (de quelques nm dans notre système considérant la concentration en ions du tampon 2X TBE). Afin de mieux cerner l'effet de la vitesse du fluide et du taux de cisaillement, la figure 3.46 présente l'évolution des forces de migration pour des expériences où ces paramètres sont comparables. Comme le montrent les graphiques à  $v_0$  comparables, il semble que la force augmente avec le confinement. Une représentation en fonction du taux de cisaillement semble plus adaptée (graphiques en bas de la figure 3.46) mais compte-tenu du bruit entachant ces forces expérimentales, il nous semble inopportun de pousser plus loin les conclusions. Afin d'abaisser ce niveau de bruit, il nous est possible de moyenniser les forces obtenues pour chacune des expériences. Ce traitement a pour défaut d'empêcher toute conclusion sur l'amplitude de ces dernières mais permet toutefois de dégager leur évolution spatiale en fonction

<sup>3</sup>Cette force est supérieure à celle générée par l'agitation thermique d'ordre de grandeur  $k_B T / a \sim 40 fN$




 FIGURE 3.46 – Forces dérivées pour des paramètres  $\nu_0$  ou  $\dot{\gamma}_W$  comparables.

de la distance au mur  $z - a$ . En effet, sans perte de généralité, nous pouvons supposer la force variant comme

$$F(z) = F_0 F^*(\epsilon) \quad (3.71)$$

avec  $F^*$  une quantité adimensionnée variant en fonction de  $\epsilon = \frac{z-a}{a}$  la distance au mur normalisée par le rayon de la particule. Comme nous avons pu le décrire plus tôt, la viscosité du fluide porteur semble avoir un effet sur la migration des particules. Afin de confirmer cette observation, nous présentons en figure 3.47 le résultat du moyennage des forces pour tous les débits et toutes les hauteurs de canalisation pour les fluides de viscosité  $\mu = 5.8$  et  $1.1 \text{ mPa.s}$ . Concernant les paramètres  $\nu_0$  et  $\dot{\gamma}_W$ , une simple moyenne conduit à  $\bar{\nu}_0 = 148 \mu\text{s}^{-1}$  et  $\bar{\gamma}_W = 473 \text{ s}^{-1}$  pour le fluide de viscosité  $\mu = 5.8 \text{ mPa.s}$  et  $\bar{\nu}_0 = 159 \mu\text{s}^{-1}$  et  $\bar{\gamma}_W = 455 \text{ s}^{-1}$  pour le fluide de viscosité  $\mu = 1.1 \text{ mPa.s}$ , soit des valeurs moyennes comparables. De cette figure semble se dégager une évolution spatiale commune de la force quelle que soit la viscosité du milieu. Pour  $\epsilon < 1$ ,  $F^*$  décroît comme  $\epsilon^{-1}$  puis comme  $\epsilon^{-3}$  pour  $\epsilon > 1$ . On remarquera que la validité de ce régime est à tempérer compte tenu que ce dernier est caractérisé par des amplitudes de force comparables ou inférieures au bruit thermique  $k_B T/a \sim 40 \text{ fN}$ . Ces deux lignes de tendances sont représentées en pointillés sur la figure 3.47. Aussi, et ce pour des paramètres  $\bar{\nu}_0$  et  $\bar{\gamma}_W$  comparables il semble que l'amplitude de la force de migration croisse avec la valeur de la viscosité, ce qui confirme les conclusions faites à l'aide des densités  $n(z)$ .

### 3.6.4 Conclusion partielle

Les expériences menées nous ont permis de mettre en avant un phénomène de migration loin des parois pour des traceurs sphériques solides à très bas nombre de Reynolds dans un écoulement de type Poiseuille. Comme décrit dans la partie introductive, plusieurs types de forces produisant un tel effet ont été caractérisées durant les vingt dernières années, tant sur le point expérimental que théorique. Toutefois, l'amplitude de la force de lift décrite dans notre étude semble sans commune mesure avec aucun des précédents présents dans la littérature. Si la portée (très supérieure à  $\lambda_D$ )

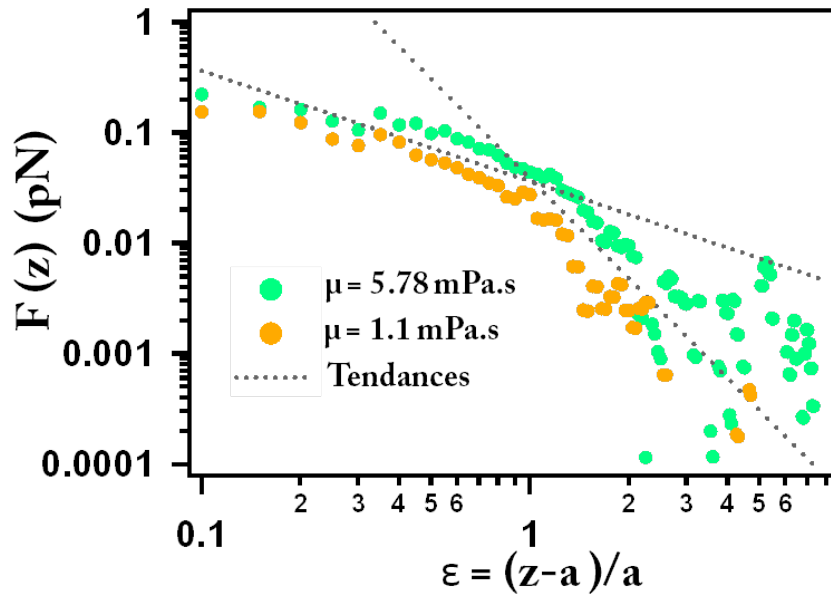
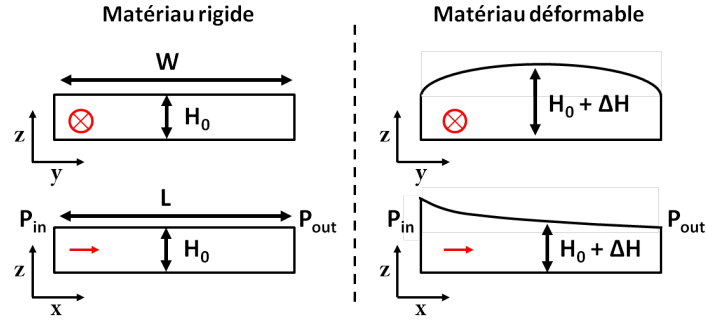


FIGURE 3.47 – Evolution de la moyenne des forces pour deux viscosité de fluide en fonction de  $\epsilon = \frac{z-a}{a}$ .

de cette force n'est pas cohérente avec un phénomène d'interaction électrostatique avec les parois, les deux régimes caractérisant son évolution spatiale ( $\epsilon^{-1}$ ,  $\epsilon^{-3}$ ) font écho à la force électrovisqueuse [Wu et al., 1996] [Tabatabaei et al., 2006], celle-ci variant de manière non monotone suivant la distance à la paroi. La forme globale décroissant comme  $1/z$  rappelle le phénomène mis en avant par Williams [Williams et al., 1992]. Une étude systématique faisant varier la viscosité et la force ionique du liquide porteur, la taille des traceurs ainsi que le potentiel des surfaces mises en jeu permettrait de mieux cerner les paramètres fondamentaux influant sur l'amplitude de la force.



**FIGURE 3.48** – Schématisation du phénomène de déformation d'une canalisation microfluidique faite en matériau élastique. La flèche rouge donne la direction de l'écoulement.

### 3.7 Application au suivi de la déformation d'une canalisation

#### 3.7.1 Le Poly-diméthylsiloxane : matériau déformable

La lithographie douce offre une alternative intéressante aux méthodes de lithographie classiques et ce dans bien des domaines d'application de la microfluidique. Cette méthode consiste en la fabrication d'un moule (e.g par gravure), lequel peut être reproduit en utilisant un matériau malléable qui sert ensuite de support aux expériences. Le Poly-diméthylsiloxane (PDMS) est un matériau largement répandu tant il possède d'avantages. Ce matériau est en effet peu onéreux, aisément mis en forme, transparent et biocompatible [Whitesides et al., 2001]. Toutefois, sa nature *élastique* peut engendrer des effets parasites, tels que la déformation des canaux conduisant un écoulement. En effet, si les modules de Young caractérisant le verre et le silicium cristallin sont de l'ordre de la centaine de giga-Pascal ( $E_{SiO_2} = 62 \text{ GPa}$ ,  $E_{Si} = 170 \text{ GPa}$ ), le PDMS est quant à lui caractérisé par un module de l'ordre de 0.5 à 4 MPa. Il s'en suit que des déformations significatives peuvent apparaître dans les gammes de pression utilisées dans le domaine de la microfluidique.

Actionner un liquide en appliquant une différence de pression entre entrée et sortie d'une canalisation peut conduire à une déformation du canal, une augmentation de son diamètre hydraulique et donc mettre à mal la linéarité entre chute de pression ( $\Delta P$ ) et débit ( $Q$ ) (la schématisation de cet effet est présentée dans la figure 3.48 (adapté de [Gervais et al., 2006] )). En effet, une canalisation de section rectangulaire est caractérisée par une résistance hydraulique  $R_H$  données par

$$R_H = \frac{12\mu L}{WH^3 \left(1 - 0.63 \frac{H}{W}\right)} \quad (3.72)$$

telle que  $\Delta P = R_H Q$ . Toute erreur sur la connaissance de la largeur ou la hauteur de la canalisation se répercute donc respectivement en  $\Delta W^{-1}$  et  $\Delta H^{-3}$  et devient très rapidement non négligeable. Si la déformabilité du PDMS a été brillamment détournée dans le but de fabriquer des valves [Unger et al., 2000], elle reste, pour la majorité des applications, un effet parasite. Des études récentes se sont intéressées à la caractérisation de ce phénomène. La plupart font appel à l'utilisation de liquide fluorescent afin de mesurer les variations géométriques des canaux [Holden et al., 2003] [Gervais et al., 2006] [Hardy et al., 2009] [Kang et al., 2013]. En effet, en microscopie en champ large, l'intensité de fluorescence récoltée est proportionnelle à l'épaisseur de liquide fluorescent imagé [Holden et al., 2003]. Toute variation de hauteur de canalisation peut donc ainsi être suivie. Compte-tenu de la complexité inhé-

rente à la description de ce problème physique, la plupart des études ayant pour objet la déformation de fentes microfluidiques sous écoulement sont menées numériquement. Toutefois, dans le régime des faibles déformations (régime linéaire), il existe une loi d'échelle reliant déformation et pression dans la canalisation [Gervais et al., 2006]. Pour des fentes caractérisée par un rapport d'aspect  $H_0/W \ll 1$  la déformation verticale  $\Delta H$  est donnée par :

$$\frac{\Delta H}{H_0} = c \frac{pW}{EH_0} \quad (3.73)$$

où  $p$  est la pression,  $H_0$  la hauteur sans déformation,  $E$  le module d'Young du matériau et  $c$  un coefficient numérique adimensionné de l'ordre de l'unité. Appliquée à une géométrie telle que  $W=50 \mu m$  et  $H_0 = 2 \mu m$ , sous une pression de 500 mbar, l'application de cette formule donne lieu à  $\frac{\Delta H}{H_0} \approx 1$ . Ainsi, peut-on s'attendre à un doublement de la hauteur de la canalisation sous pression.

Afin d'illustrer par une application notre méthode de caractérisation d'écoulements microfluidiques nous avons souhaité la mettre à l'épreuve pour le suivi de la déformation d'une canalisation de PDMS de largeur  $W = 60 \mu m$  et de hauteur avant scellement de  $H_0 = 2 \mu m$ . Comme nous avons pu le décrire plus tôt, compte tenu du fort désaccord entre hauteur issue de l'ajustement et hauteur réelle dans des systèmes modèles, nous avons renoncé mener cette étude sous cet angle. Toutefois avons-nous pu valider que le paramètre vitesse maximale était en très bon accord avec les valeurs théoriques. Pour des rapport de rayon de traceur sur hauteur  $a/H_0 \approx 0.07$  on ne s'attend pas à une variation importante entre la vitesse maximale admise par la bille et vitesse maximale du fluide au centre quelque soit la variation de hauteur. Aussi avons-nous opté pour un ajustement à un seul paramètre libre, le paramètre  $v_0$ .

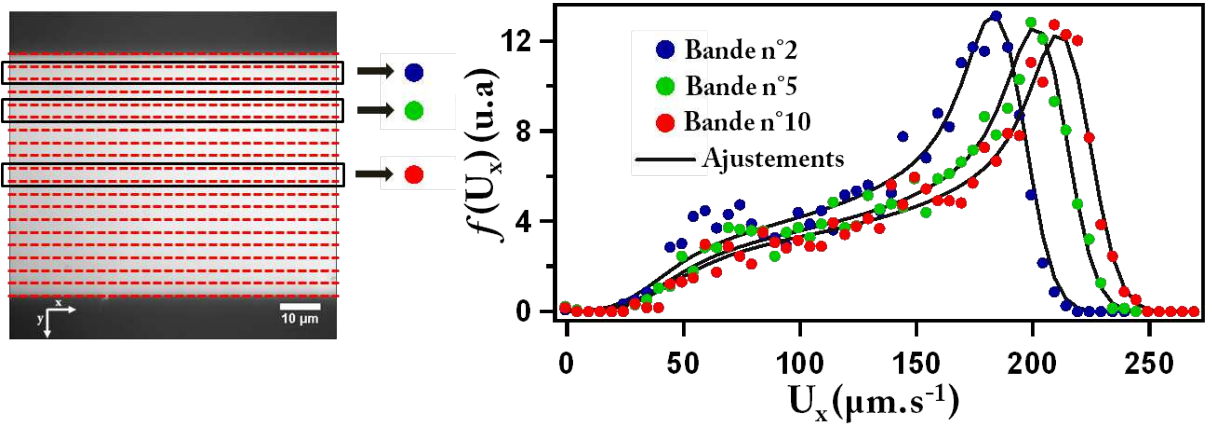
#### 3.7.2 Conditions expérimentales

##### Canalisation et condition d'actionnement

La canalisation à été obtenue par moulage de PDMS tel que décrit dans la partie méthodes de ce manuscrit. Celle-ci admet des caractéristiques géométriques  $W \times H_0 = 60 \times 2 \mu m^2$ . Entrée et sortie ont été connectées à des réservoir contrôlés en pression. Afin de créer une déformation de la canalisation sans pour autant utiliser des forts débits nous avons opté pour le protocole suivant : tout en gardant une différence de pression entre entrée et sortie constante  $\Delta P = P_{in} - P_{out} = 30 \text{ mbar}$ , nous avons appliqué une pression de décalage  $P_{dec}$  identique à l'entrée et à la sortie. Ainsi, en valeur absolue, les valeurs des pressions sont données par  $P_{in} = P_{atm} + P_{dec} + \Delta P$  et  $P_{out} = P_{atm} + P_{dec}$ . Nous avons utilisé pour cette expérience des traceurs fluorescents de 300 nm de diamètre et pour fluide porteur un tampon TBE 2X de viscosité  $\approx 1.1 \text{ mPa.s}$ .

##### Traitement des données

Comme décrit dans les lignes qui précèdent, seule la composante  $\Delta P$  contribue à l'actionnement du fluide. Dans une canalisation rigide, la vitesse maximale de l'écoulement créé devrait alors être constante. *A contrario*, l'augmentation du diamètre hydraulique de la canalisation en PDMS conduit à une augmentation de cette vitesse. De plus, suivant l'axe  $y$  du dispositif (transverse à l'écoulement), on s'attend à l'apparition d'une courbure, la hauteur maximale étant atteinte en  $y = W/2$  pour des raisons de symétrie (Cf. figure 3.48).



**FIGURE 3.49** – Illustration de la procédure de traitement des données. A gauche est représentée la canalisation microfluidique observée en lumière blanche au grossissement 100 X. Les coupes suivant  $y$  sont délimitées à l'aides des traits en tirets rouges. Pour trois zones particulières, les histogrammes construits ainsi que leurs ajustements sont présentés sur la droite.

L'hypothèse d'invariance du profil de vitesse de fluide suivant ce même axe n'est alors plus justifiée. Afin de remonter à l'information sur la variation spatiale de  $v_0(y)$  les trajectoires des billes ont été construites tel que précédemment évoqué. À chaque vitesse instantanée a été adjoint une information de position en  $y$ , à savoir, à quelle position en  $y$  était la bille lorsqu'elle a eu cette vitesse instantanée. 20 histogrammes de vitesses  $f(U_x(y))$  ont été construits à l'aide des vitesses  $U_x(y)$  telles que  $y \in [n \frac{W}{20}, (n+1) \frac{W}{20}]$  avec  $n \in [0, 19]$ . Compte-tenu de la multiplicité des paramètres pouvant influencer sur la force de lift précédemment mise en évidence, à savoir la hauteur physique du canal et la vitesse du fluide, ces deux quantités variant désormais spatialement suivant  $y$ , mener une étude en ajustant le paramètre hauteur apparaît comme hasardeuse. Chaque histogramme  $f(U_x(y))$  a donc été ajusté pour la seule valeur  $v_0$ , le paramètre  $H$  ayant été fixé à  $2 \mu\text{m}$ . L'illustration de cette procédure est donnée avec la figure 3.49.

Une fois l'ajustement sur  $v_0$  conduit, il est possible d'exprimer la variation relative de  $H$  suivant  $y$ . Considérant que, quelque-soit  $y$ , la différence de pression à l'origine de l'écoulement est donnée par  $\Delta P$  il s'en suit que  $v_0(y)$  est donnée par

$$v_0(y) = \frac{\Delta P H^2(y)}{2\mu L} \quad (3.74)$$

La formule précédente revient à estimer que chaque bande d'observation constitue un Poiseuille plan de hauteur  $H(y)$ . Ainsi peut-on estimer la variation de  $H(y)$  par

$$\frac{H(y)}{H(y_0)} = \left( \frac{v_0(y)}{v_0(y_0)} \right)^{0.5} \quad (3.75)$$

Le paramètre  $y_0$  étant une position arbitraire choisie selon  $y$ . Dans notre cas, nous choisirons  $y_0$  au plus proche d'une des parois de la canalisation, pour une pression de décalage nulle et donc pour une déformation négligeable.

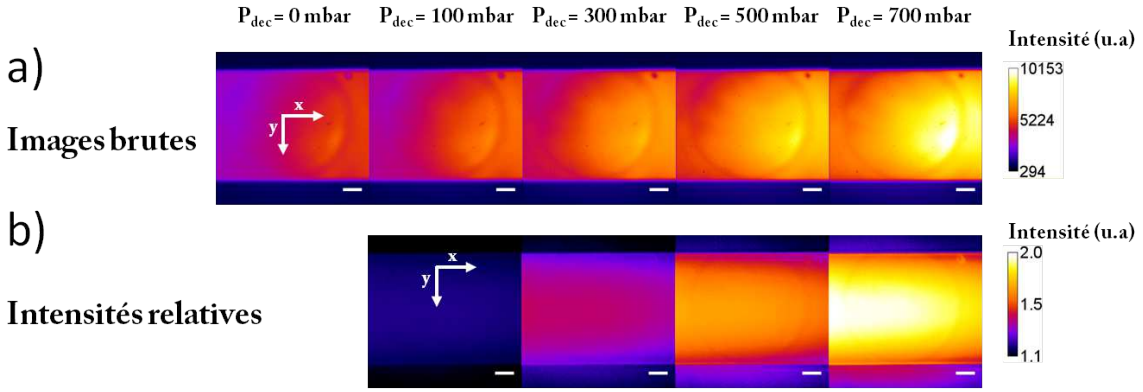


FIGURE 3.50 – Intensités de fluorescence obtenues pour différentes pressions de décalages  $P_{dec}$

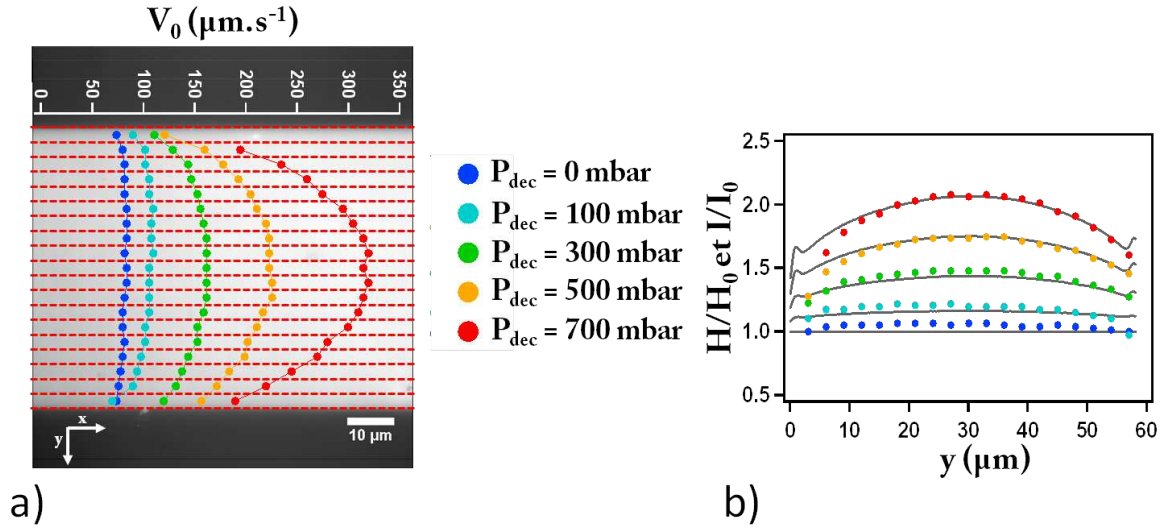
### Mesure en fluorescéine

Afin de corroborer les données acquises par suivi de particules, nous avons, pour la même canalisation, appliqué les mêmes conditions d'actionnement à une solution de fluorescéine de concentration 0.6 mM. Comme nous avons pu le dire plus tôt, l'épaisseur de liquide est alors proportionnelle à la hauteur du canal pourvu que la longueur de corrélation (profondeur de champ) ne soit pas trop faible devant  $H$ . Pour cette étude particulière nous avons alors utilisé un objectif de grossissement 100 X et d'ouverture numérique  $N.A=0,6$ . Les images de l'intensité de fluorescence récoltée sont données en figure 3.50 a). Afin de corriger l'effet d'hétérogénéité de l'illumination, nous avons retiré la valeur moyenne du bruit à chacune d'entre-elles puis avons divisé les images obtenues par celle obtenue pour la plus basse pression de décalage (figure 3.50 b).

### 3.7.3 Résultat

Pour cinq valeurs de pression de décalage  $P_{dec}$  les histogrammes de vitesses  $f(U_x(y))$  ont été construits pour 20 zones suivant la direction  $y$ . Les valeurs des vitesses maximales du profil de Poiseuille ajusté sont présentées en figure 3.51 a) superposées à l'image optique de la canalisation. Alors que pour  $P_{dec} = 0$  le profil reconstruit suivant  $y$  est relativement plan, cette observation n'est plus valable pour des pressions de décalages supérieures. La courbure des profils croît avec  $P_{dec}$  et décrit un profil parabolique admettant une vitesse maximale en  $y = W/2$ . En plus de la courbure suivant l'axe  $y$ , qui est directement reliée au flambage du PDMS sous l'effet de la pression, on note une accélération de la vitesse du fluide au centre de la canalisation à mesure que l'on augmente la partie constante de la pression  $P_{dec}$ , même si paradoxalement le moteur de l'écoulement  $\Delta P$  est constant. Cette réponse est à attribuer à l'abaissement global de la résistance hydraulique de la canalisation qu'implique la déformation du PDMS.

Sur la figure 3.51 b) sont représentées les hauteurs relatives extraites des valeurs  $v_0(y)$  à l'aide de la formule 3.75. Nous y avons superposé les données d'intensités relatives obtenues sur des coupes de images 3.50 b). On note un bon accord global de ces deux quantités à  $P_{dec}$  élevé, plus relatif à faible  $P_{dec}$ . Cette différence s'explique simplement comme suit. Les données ayant été acquises de manière séquentielle pour  $P_{dec}$ , les données acquises pour  $P_{dec} = 700$  mbar sont chronologiquement plus proches des résultats obtenus par mesure d'intensité de la fluorescéine. Considérant le bouchage inévitable de la canalisation au cours du temps, il y a fort à penser que le décalage de hauteur était bien supérieur en début d'expérience que finalement mesuré à l'aide de la fluorescéine. Cet effet est alors



**FIGURE 3.51** – Résultats de l'étude sur la déformation du canal en PDMS. a) Vitesses maximales ajustées en fonction de  $y$ . b) Hauteur relative suivant la direction  $y$  superposées aux intensités de fluorescence relatives obtenues à l'aide de fluorescéine.

cohérent avec la mesure inférieure de décalage par cette dernière méthode. Au final, cette étude met en avant un doublement de la hauteur de la canalisation pour  $P_{\text{dec}} = 700 \text{ mbar}$ .

À pression de décalage nulle, nous observons aussi une variation relative de vitesse de l'ordre de  $\frac{v_0^{\text{centre}}}{v_0^{\text{bord}}} = \frac{84}{74} \approx 1.14$ . Ainsi notre technique met en avant une variation relative de hauteur  $\frac{H}{H_0} \approx 1.14^{0.5} \approx 1.07$ , soit une différence de l'ordre de 140 nm entre le bord de la canalisation ( $H_0 \approx 2 \mu\text{m}$ ) et son centre.

Pour conclure ce paragraphe, après avoir utilisé notre méthode pour caractériser des écoulements confinés, nous établissons ici qu'elle permet de fournir des informations précises sur les écoulements dans des structures déformables. Notre méthode est quantitative par rapport au suivi de déformation fondé sur les variations de signal de fluorescéine, puisque nous obtenons une estimation de la vitesse maximum de l'écoulement alors que la fluorescence ne fournit qu'une information relative. Mis en perspective du cahier des charges initial de notre projet, visant à caractériser de manière quantitative les écoulements confinés, ce travail semble fournir donc constituer une avancée significative par rapport à l'état de l'art du domaine et espérons qu'elle trouvera d'autres applications pour étendre son champ de pertinence.

### 3.8 Conclusion du chapitre

Nous avons développé dans ce chapitre notre approche de la caractérisation d'écoulements confinés à l'aide de traceurs sphériques solides. Cette approche a été motivée par l'impossibilité de mener des mesures classiques de micro-vélocimétrie de particules ( $\mu$ PIV) compte tenu de la faible hauteur des canaux microfluidiques. À ces forts degrés de confinement, les mesures par microscopie en réflexion totale sont actuellement les plus performantes pour la mesure de vitesse d'écoulement. Toutefois, comme nous avons pu le démontrer en introduction, en plus de nécessiter un matériel dédié, elle sont limitées à la l'observation de particules éloignées de  $\sim 300$  nm d'une paroi. Aussi nécessitent-elle une procédure de calibration de l'intensité relevée en fonction de la distance des colloïdes à la paroi. Notre méthode met à profit la diffusion des traceurs pour l'exploration de la hauteur de la canalisation et ne nécessite aucun équipement dédié. Elle constitue, à notre connaissance, la seule méthode de vélocimétrie basée sur le suivi de traceurs qui ait été appliquée dans des structures hauteur aussi faible que  $1\ \mu\text{m}$ .

La réalisation de ce projet a nécessité la prise en compte des effets d'interactions hydrodynamiques des traceurs avec la paroi, la construction d'un modèle théorique pour la distribution de probabilité de vitesse selon l'axe de l'écoulement. Cette approche a été validée par développement d'une dynamique Brownienne prenant en compte la non homogénéité spatiale du coefficient de diffusion des traceurs. Nous avons pu préciser, à la lumière des résultats obtenus, les potentialités de la méthode en terme de précision sur les paramètres ajustés, et ce, en fonction du nombre de valeurs analysées, du débit imposé et du rapport  $a/H$ .

La mise en application expérimentale du protocole développé a confirmé les potentialités de la méthode pour la mesure de la vitesse au centre de la canalisation, avec un excellent accord entre les valeurs déduites de la différence de pression imposée ainsi que des paramètres géométriques des canalisations. L'accord sur le paramètre hauteur a été rapidement démontré comme insatisfaisant. Les valeurs déduites de l'ajustement ont toujours été plus faibles que celles connues avant scellement de la puce. Nous avons alors étudié les causes à cette divergence, à savoir, l'effondrement du canal, le glissement à la paroi, ainsi que l'effet de la diffusion des traceurs durant l'intervalle de temps caméra. Une plus faible divergence des résultats expérimentaux a été observée pour des fluides porteurs moins visqueux ce qui tend à démontrer que l'effet de diffusion n'est pas le moteur majeur de cet effet.

Ayant démontré les effets sus-cités comme négligeables, nous avons alors mené une étude de la force de migration transverse. Avec le recul, nous voyons aujourd'hui que ce travail consiste en l'adaptation, pour des écoulements et des particules sub-microniques, des expériences d'Alexander, Bike et Prieve, menées il y a de cela 25 ans [Alexander and Prieve, 1987] [Bike et al., 1995]. En effet, cette approche consiste à prendre la vitesse des particules comme témoin de leur altitude au dessus d'une paroi. Comme eux, nous suspectons aujourd'hui une force de lift dépendante à la fois de la vitesse de la particule, mais aussi de la viscosité du milieu et nous souhaitons mener une discussion à ce sujet en guise de conclusion à ce chapitre.

Comme démontré dans la partie introductive de ce rapport, la force de lift électrovisqueuse est à la fois d'autant plus importante que l'est la viscosité du milieu mais aussi la vitesse de la particule. Toutefois, nous avons mis en avant que compte tenu de la taille  $O(100\text{nm})$  des particules et de la concentration en ions du fluide porteur, les modèles analytiques qui ont été élaborés ne permettent pas de confirmer notre *suspicion*. Même si nous constatons dans la littérature une appréciation différente de l'amplitude



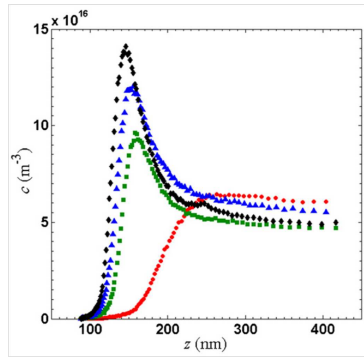
des forces électrovisqueuses suivant l'approche analytique suivie [Cox, 1997] [Warszyński et al., 1998] [Warszyński and van de Ven, 2000], il nous est difficile de nous appuyer avec certitude sur ces théories. Toutefois, nous argumentons ici que les objets jusqu'alors étudiés étaient caractérisés par des tailles supérieures au micromètre. En outre, les valeurs du taux de cisaillement dans les études passées sont jusqu'à 20 fois inférieures à celles étudiées ici. Il est important de noter que, comme précisé dans la partie introductive, la plupart des développements sont valides sous la condition de petit nombre de Péclet tel que  $Pe = Ua/D$ , avec  $U$  la vitesse du traceur,  $a$  son rayon et  $D$  le coefficient de diffusion des ions en solution. Considérant une vitesse  $U = 1.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ , un rayon de 100 nm et un coefficient de diffusion donné par  $D \sim 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  il semble que cette condition soit valide puisque nous déduisons  $Pe = 0.1$ . Cette valeur cache néanmoins des différences notables en termes de géométrie entre nos conditions expérimentales et les modèles, puisque les théories ont surtout été développées pour des niveaux de confinement peu importants. Compte tenu des rapports  $0.05 < a/H < 0.1$  expérimentés dans notre étude, la vision selon laquelle les particules n'expérimentent qu'un cisaillement simple est fortement mise à mal, et le caractère de variation quadratique mériterait sans doute d'être étudié. Ce constat est renforcé lorsque l'on regarde avec plus d'insistance les densités de présence observées pour des cisaillements au bord  $\dot{\gamma}_w$  équivalents. Nous avons alors observé que la déplétion des états de basse vitesse était d'autant plus forte que le rapport  $a/H$  croissait à  $\dot{\gamma}_w$  équivalent.

Notre étude bibliographique et notre travail expérimental semblent indiquer une sous-estimation de la force électrovisqueuse. De nombreux signaux vont en effet dans ce sens. Nous avons mis en avant que l'interprétation des données de fractionnement par flux, et notamment du mode "hyperlayer", avait nécessité l'introduction d'une force empirique [Williams et al., 1992] car ni la migration inertielle, ni la force de lift électrovisqueuse n'avait alors permis de quantifier cette migration. Il est remarquable de voir que cette force, restée pauvrement comprise, fasse encore référence. Une simple requête avec les mots "FFF hyperlayer lift force" sur un fameux moteur de recherche permet de trouver diverses contributions scientifiques récentes faisant référence à ce mécanisme [Gimbert et al., 2003] [Janca and Stejskal, 2009] [Martin and Beckett, 2012] [Dou et al., 2013]. L'interprétation des résultats de séparation nécessite la prise en compte de cette force, car dans les faits, elle est observée.

D'autres éléments récents, issus d'études de nano-PIV nous renforcent un peu plus l'idée selon laquelle cette force de lift est sous-estimée.

Comme nous avons pu le décrire plus tôt, les techniques de vélocimétrie de particules en éclairage par onde évanescence permettent d'observer le mouvement de particules sur une distance inférieure à  $\sim 300 \text{ nm}$  à une paroi. La faible extension de cette zone d'observation est rendue possible par la décroissance exponentielle de l'intensité rayonnée par les particules. Mettant à profit cette décroissance, Li et Yoda [Li and Yoda, 2008] ont montré la possibilité de faire des mesures de vitesse sur plusieurs altitudes au dessus de la paroi d'observation. En effet, triant les particules par intensité, il est possible d'estimer leur position au dessus du plan contenant l'écoulement. Il est intéressant de remarquer que ceux-ci ont ainsi construit des histogrammes donnant la probabilité de présence des particules au dessus de la canalisation. Leur résultat est reproduit en figure 3.52 pour des particules de 50 nm de rayon au dessus d'une lamelle de verre dans de l'eau déminéralisée (cercles), et des solutions de tétraborate de sodium ( $Na_2B_4O_7$ ) de 1, 10, 20 mM de concentration (resp. carrés, triangles et losanges).

Selon les auteurs ces concentrations respectives correspondent à des longueurs de Debye de 6.8, 2.1 et 1.5 nm. Ces graphiques laissent clairement apparaître une zone de déplétion proche de la paroi. Sans



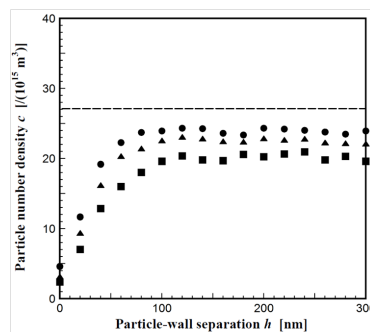
**FIGURE 3.52** – Figure donnant la densité de présence de billes de polystyrène de 50 nm de rayon au dessus d’une surface pour 4 types de fluide porteur tirée de [Li and Yoda, 2008] . Cercle : eau déminéralisée, carrés, triangles et losanges correspondent à des solutions de tétraborate de sodium à 1, 10 et 20 mM, correspondant à des longueurs de Debye de 6.8, 2.1 et 1.5 nm selon les auteurs.

interaction, et considérant le rayon des particules utilisées, les distributions devraient débiter à 50 nm. Aussi les auteurs argumentent-ils que les interactions électrostatiques avec la paroi sont sans doute à l’origine de ce décalage. Qualitativement, l’argument semble valable, puisque la zone de déplétion semble décroître avec la force ionique du liquide. Toutefois, considérant la valeur de la longueur de Debye du fluide 20 mM  $Na_2B_4O_7$  ( $\lambda_D \sim 1.5 nm$ ), cette explication semble insuffisante. Les auteurs eux-mêmes semblent circonspects :

The results suggest that there are almost no particles within 100 nm (2a) of the wall, *presumably* due to the electrostatic repulsion between the fused silica surface [...] Understanding the major factors that determine why particles are non-uniformly distributed in the near-wall region and developing appropriate methods for correcting near-wall tracer-based velocimetry data therefore remain the subject of ongoing work.

Et en effet, ceux-ci ont réétudié le phénomène. Il faut dire qu’il en va de la pérennité de leur méthode, puisque la non prise en compte de telles anisotropies peut conduire à biaiser les mesures de vitesse moyenne. Dans leur article [Li and Yoda, 2010] ceux-ci confirment la forte anisotropie des distributions de probabilité, sans pour autant donner une explication plus détaillée. La première référence à la migration électrocinétique par la même équipe intervient dans leur étude de l’électrophorèse de particules au dessus d’une paroi [Kazoe and Yoda, 2011]. Dans celle-ci, ces auteurs ont montré une déplétion croissante avec l’intensité du champ électrique en accord qualitatif avec les prédictions théoriques de Yariv [Yariv, 2006], bien que l’amplitude de la force expérimentalement retrouvée excède par 10 à 30 fois la théorie. Dans une contribution encore plus récente [Cevheri and Yoda, 2013], cet effet de lift électrocinétique est étudié pour une combinaison de champs hydrodynamique et électrophorétique et une concentration en tétraborate de sodium de 1 mM. La figure 3.53 présente la densité de présence de particules de 245 nm de rayon en fonction de la distance  $h$  à une paroi ( $h = 0$  correspond au contact) pour trois débits différents dans une canalisation de section  $30 \times 300 \mu m^2$ . Il apparaît encore une fois que la zone proche de la paroi semble progressivement dépeuplée avec la vitesse de fluide. L’effet présenté semble moins prononcé qu’avec une concentration saline supérieure comme discuté à la lumière de la figure 3.52. Remarquons que le diamètre des particules utilisées ici est plus important.

Revenant à notre travail, nous avons mis en évidence la dépendance multi-factorielle de la force électrovisqueuse. Potentiellement, les paramètres taille de particule, vitesse et viscosité du fluide,



**FIGURE 3.53** – Figure donnant la densité de présence de billes de polystyrène de 245 nm de rayon au dessus d’une surface pour 3 chutes de pression  $\Delta P$  de 0.43 bar/m (cercles) 0.74 bar/m (triangles) et 1.04 bar/m (carrés) extraite de [Cevheri and Yoda, 2013]. Ces chutes correspondent à des cisaillement au bord de 660, 1100 et 1600  $s^{-1}$ . La ligne en pointillée indique la concentration en volume de particules.

concentration ionique, charge des surfaces solides (traceur et paroi), valence des ions en solution... peuvent influencer la migration. Aussi peut-on, à la lumière des résultats obtenus ici, ajouter le confinement dans la balance. Une compréhension approfondie est nécessaire afin de mettre en cohérence les résultats de FFF, de nano-PIV et nos mesures expérimentales.

Au demeurant notre contribution semble constituer une avancée dans le domaine de la vélocimétrie, et augure une bonne adaptabilité pour l’étude des interactions physico-chimiques entre surfaces solides sous écoulement. On pourra garder comme message clé que cette étude a mis notamment en avant que des particules s’écoulant dans un canal sous un flux parabolique, au delà des interactions hydrodynamiques avec les parois, ont une vitesse moyenne d’autant plus grande qu’elles sont confinées. En d’autres termes, celle-ci statue l’impossibilité de relier de manière simple vitesse moyenne de particule et vitesse moyenne du fluide, un résultat aux conséquences non négligeables dans le domaine du transport dans les milieux poreux.



# Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme

## 4.1 Introduction

Nous avons, dans la partie revue bibliographique de ce manuscrit, mis en avant à la fois l'intérêt de la séparation en taille d'entités biologiques mais aussi dressé un inventaire des différentes techniques mises en place depuis la moitié du siècle dernier pour y parvenir. Les techniques reines des laboratoires sont aujourd'hui l'électrophorèse sur gel, l'électrophorèse capillaire ou l'électrophorèse en champ pulsé. La longue expérience que les biologistes possèdent dans l'application de ces techniques font qu'elles sont utilisées de manière quotidienne : leur développement a permis l'apparition du séquençage haut débit. En plus d'être résolutive, les techniques de séparation doivent être rapides, reproductibles et à faible coût. À la lumière de l'étude bibliographique, nous souhaitons préciser ici les critères qui nous confortent dans le choix de développer une technique de séparation *sans support solide* et surtout de l'intégrer dans un système du type laboratoire sur puce.

**De l'intérêt de la séparation sans matrice** En solution, la déprotonation des groupements phosphates du squelette de l'ADN confère à cette molécule une charge globale négative. Historiquement, la communauté scientifique s'est donc naturellement orientée vers le développement de techniques de séparation mettant à profit l'actionnement par électrophorèse. Comme décrit plus tôt, l'indépendance de la mobilité électrophorétique avec la taille des molécules de taille supérieure à ~ 400 bp [Stellwagen et al., 1997] [Stellwagen et al., 2003] a amené à l'émergence de techniques utilisant un support solide pour la séparation. Conduite en routine sur des plaquettes de gels réticulés d'agarose ou de poly-acrylamide la séparation s'encombre alors de bien des travers [Wang et al., 2012b]. En effet, la séparation sur gel est gourmande en consommable, en temps et possède des limitations intrinsèques liées à l'échauffement (causant l'élargissement des bandes) et a été démontrée inadaptée à la séparation d'espèces de tailles supérieures à ~ 40, 50 kbp [Chou et al., 1999] [Viovy, 2000]. La séparation de larges fragments se fait par la technique d'électrophorèse en champ pulsé [Schwartz and Cantor, 1984] [Cantor et al., 1988], mais celle-ci nécessite des temps de migration de l'ordre de la dizaine d'heure voire de la journée. L'électrophorèse capillaire constitue aujourd'hui la méthode de pointe pour la séparation. Un de ces intérêts majeurs réside dans l'utilisation d'un fin capillaire, maximisant les transferts de chaleur et ainsi limitant l'échauffement par effet Joule. Cette technique nécessite l'emploi d'une matrice sous forme de gel, ou d'une solution de polymères enchevêtrés. Chacune de ces approches

## Chapitre 4. Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme

---

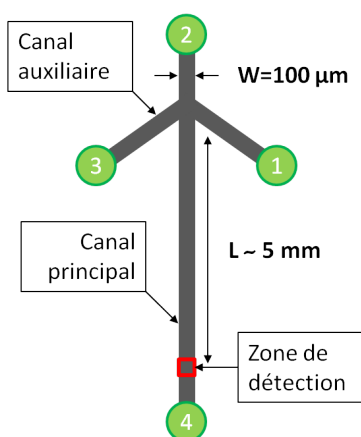
possédant ses travers, les gels étant difficilement préparés de manière reproductible [Heller, 2001] et les matrices de polymères enchevêtrés nécessitant des hautes pressions pour leur injection et leur remplacement après chaque migration [Fang et al., 1996].

Ainsi, il apparaît que la majorité des problèmes rencontrés par les méthodes de séparation classiques proviennent de l'utilisation d'une matrice comme support de la migration. Les méthodes alternatives en solution libre apparaissent comme prometteuses, mais il reste à les développer pour atteindre des résolutions comparables à l'électrophorèse capillaire.

**Pourquoi miniaturiser** L'intérêt de la miniaturisation est plus large que pour le seul domaine de la séparation de biomolécules. Analogie souvent reprise, on attend du développement de la microfluidique un bouleversement aussi fort que celui qui a accompagné le passage de l'électronique à la microélectronique. La miniaturisation a comme intérêts premiers de permettre l'intensification des opérations, une consommation moindre en réactifs, d'avoir une sensibilité accrue le tout pour des coûts plus faibles. Aujourd'hui, des techniques d'amplification par réaction en chaîne ont été intégrées sur puce [Kopp et al., 1998] [Oblath et al., 2013] mais bien plus rarement accompagnées d'un système de séparation innovant, au sens il s'agit souvent d'une miniaturisation d'un procédé de séparation sur gel [Easley et al., 2006] [Huang et al., 2006a] si bien qu'une intégration globale de l'analyse d'échantillons d'ADN reste encore aujourd'hui délicate [Chen et al., 2007] [Zhang and Xing, 2007]. C'est dans ce contexte de développement de systèmes *tout-en-un* que s'intègre notre étude. Compte tenu des difficultés actuelles d'intégration des procédés de séparation existants, il convient de proposer d'autres méthodes : ce constat constitue la motivation de ce projet.

**Notre approche** Notre approche vise à l'intégration sur puce microfluidique d'un système de séparation sans matrice. Nos travaux se sont inspirés, au moins à leur genèse, de l'approche de Liu, Wang *et al.* [Liu et al., 2011] [Wang et al., 2010] [Wang et al., 2012a]. Ces derniers ont démontré la possibilité de séparer des brins d'ADN en solution libre dans des capillaires de diamètre interne  $\sim 1 \mu\text{m}$  et de longueur  $\sim 40$  à  $400 \text{ cm}$ . Le mécanisme mis en avant pour expliquer cette séparation tient à l'exclusion (de fait) plus forte des molécules les plus grosses des bords de la canalisation. Cet effet, d'origine simple (stérique), conjugué à l'anisotropie de la vitesse du fluide porteur dans la canalisation (profil Poiseuille) conduit à ce que les espèces aux rayons hydrodynamiques les plus grands, migrent plus rapidement : ainsi une séparation par taille est possible. Ce mécanisme fait de cette méthode une technique de *chromatographie hydrodynamique* [Striegel, 2011] [Striegel and Brewer, 2012]. À la lecture des dimensions annoncées (capillaire de longueur supérieure à  $40 \text{ cm}$ ), notre souhait d'intégration sur puce microfluidique paraît hors d'atteinte. Toutefois la combinaison des actionnements électrophorétique et hydrodynamique nous a permis de proposer une méthode innovante et performante de séparation de molécules d'ADN en solution libre.

Dans ce chapitre, nous nous attacherons dans un premier temps à la description de notre méthode de séparation en actionnement croisé. Une fois dépeints la géométrie de la puce microfluidique et les modes d'actionnement, nous décrirons les performances de séparation atteintes pour deux échelles moléculaires typiques et des tailles de fragments allant de  $10^2$  à  $10^4$  paires de bases (bp). Nous verrons par la suite les différentes expériences de suivi de molécules uniques que nous avons mises en œuvre afin de mieux caractériser le phénomène physique à l'origine des performances de séparation atteintes.



**FIGURE 4.1** – Schéma descriptif de la puce microfluidique. Afin de faciliter la lisibilité la représentation n'est pas à l'échelle.

## 4.2 Conditions expérimentales

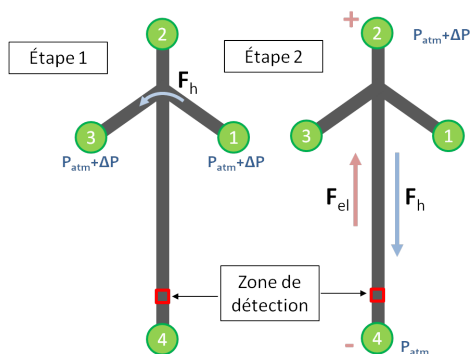
Cette section a pour but de dépeindre le déroulement d'une expérience de séparation. Nous présentons ici la géométrie de la puce, les fluides porteurs utilisés, les modes d'actionnement des molécules et la construction des chromatogrammes.

### Géométrie de la puce microfluidique et étapes de l'expérience de séparation

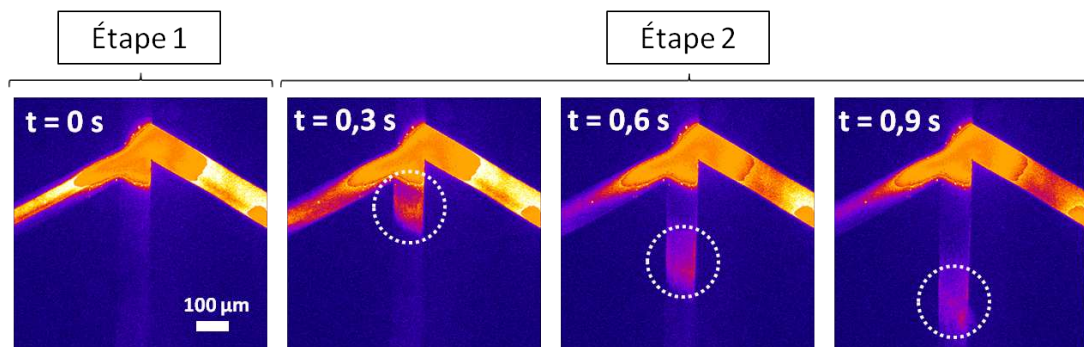
Notre puce microfluidique consiste en deux canaux croisés de section rectangulaire. Nous dénoterons par canal principal le canal de plus grande longueur, le long duquel la séparation s'opère. Un canal auxiliaire, de plus faible longueur, vient croiser le canal principal comme illustré par la figure 4.1.

Ce dessin laisse apparaître quatre extrémités connectées à des réservoirs contenant l'échantillon à séparer (réservoir 1), ou une solution tampon adaptée à l'électrophorèse de molécules (réservoirs 2,3,4). La pression dans chacun des réservoirs est asservie individuellement à l'aide d'un contrôleur. Dans les réservoirs 2 et 4 sont immergées des électrodes de platine permettant un contrôle par électrophorèse des molécules. Les dimensions typiques des canaux sont  $2 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 8 \text{ mm}$  respectivement pour la hauteur, largeur et la longueur. Le dessin emprunte aux systèmes classiques de séparation sur puce [Wu et al., 2008], plus précisément selon le schéma de l'injection hydrodynamique [Gai et al., 2004] [Luo et al., 2006]. Cette géométrie permet de concentrer les espèces à analyser sur une même ligne de départ avant de procéder à la migration. L'extension de cette bande d'injection doit être minimale devant la longueur du canal pour ne contribuer que de manière minimale à la dispersion des bandes du chromatogramme.

Les expériences de séparation se déroulent en deux étapes consécutives telles qu'illustrées avec la figure 4.2. Durant la première d'entre-elles les pressions dans chacun des réservoirs sont ajustées telles que l'ensemble des molécules s'écoule du réservoir 1 vers le réservoir 3 suivant le canal auxiliaire. Cette étape a pour but de créer la fine bande de molécule décrite plus haut. La deuxième étape correspond à la migration des molécules suivant le canal principal. Alors que la pression du réservoir 4 est annulée, celle dans le réservoir 2 est brusquement augmentée. Les molécules se trouvant à l'embranchement des deux canaux sont alors dirigées vers la zone de détection repérée en rouge sur la figure 4.2. De manière simultanée à ce basculement de pression, un champ électrique est appliqué suivant le canal principal. La force électrophorétique résultante sur les molécules d'ADN est alors dirigée vers le réservoir 2 et



**FIGURE 4.2** – Schéma illustrant les étapes de la séparation. L' étape 1 permet la formation d'une fine bande de molécules à l'embranchement des canaux. L'étape 2 correspond à l'étape de migration où les ADN sont mus par la superposition d'une force électrophorétique ( $F_{el}$ ) et hydrodynamique ( $F_h$ ).



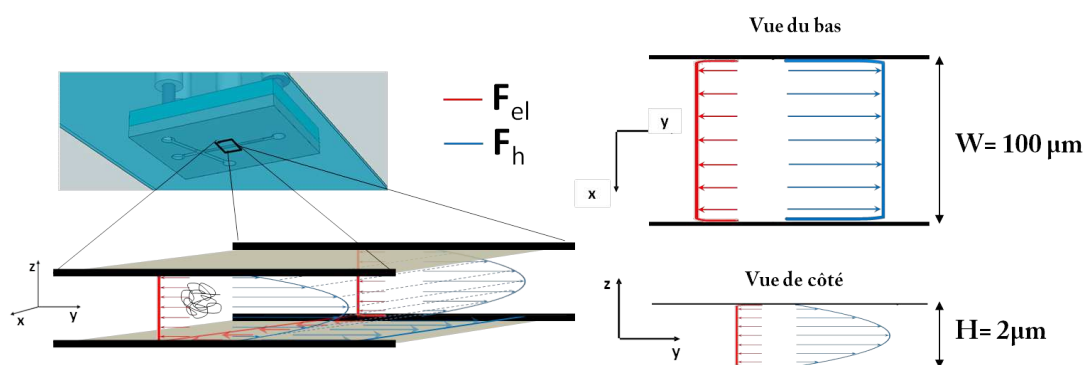
**FIGURE 4.3** – Séquence d'images de fluorescence illustrant l'injection des molécules dans le canal de séparation. L'intensité résiduelle persistante au niveau de l'embranchement provient de l'adsorption non spécifique de molécules après un long temps d'expérience.

tend à s'opposer à la force d'entraînement du fluide. L'amplitude de cette dernière, asservie à l'aide d'un générateur de tension, est telle qu'elle permet toujours une migration globale des molécules en direction du réservoir 4, vers la zone de détection. La figure 4.3 illustre le basculement entre les deux étapes avec des images de fluorescence obtenues à l'aide d'un grossissement 10X. Dans cette expérience, les champs actionnant les molécules sont de deux types, d'origine électrophorétiques et hydrodynamiques. Compte-tenu du fort rapport d'aspect largeur sur hauteur de la canalisation, nous avons pu justifier au chapitre précédent que le profil de vitesse de fluide suit une loi quadratique (profil Poiseuille). Le profil électrophorétique est quant à lui homogène dans le canal. La figure 4.4 met en évidence la géométrie considérée ainsi que les champs de force auxquels les molécules d'ADN sont soumises.

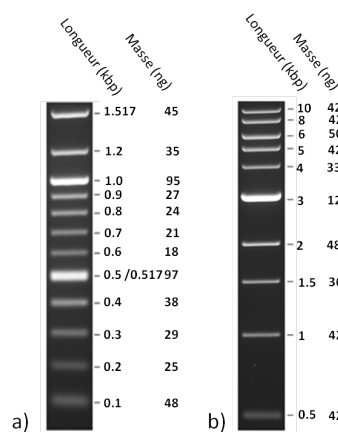
#### **Échantillon à séparer, marquage et fluide porteur**

Afin de valider les capacités de séparation de notre système microfluidique des échelles moléculaires ou *ladder* ont été utilisées comme échantillons modèles. Afin de couvrir une gamme couramment rencontrée en biologie pour la séparation sur gel, nous avons utilisé des brins de  $10^2$  à  $10^4$  paires de bases à l'aide de deux *ladder* types que sont le *100 bp* et le *kb ladder* (New England Biolabs). La figure 4.5 présente deux gels d'électrophorèse de chacune de ces échelles. Sont aussi représentées les longueurs des brins constitutifs de chacune des bandes en kilo paires de bases (kbp). La masse par





**FIGURE 4.4** – Illustration des différents modes d'actionnement des molécules d'ADN. En rouge et en bleu sont respectivement schématisés les modes d'actionnement d'origine électrophorétique et hydrodynamique



**FIGURE 4.5** – Gels d'électrophorèse des échelles moléculaires utilisées dans cette étude. a) 100 bp ladder. b) kb ladder

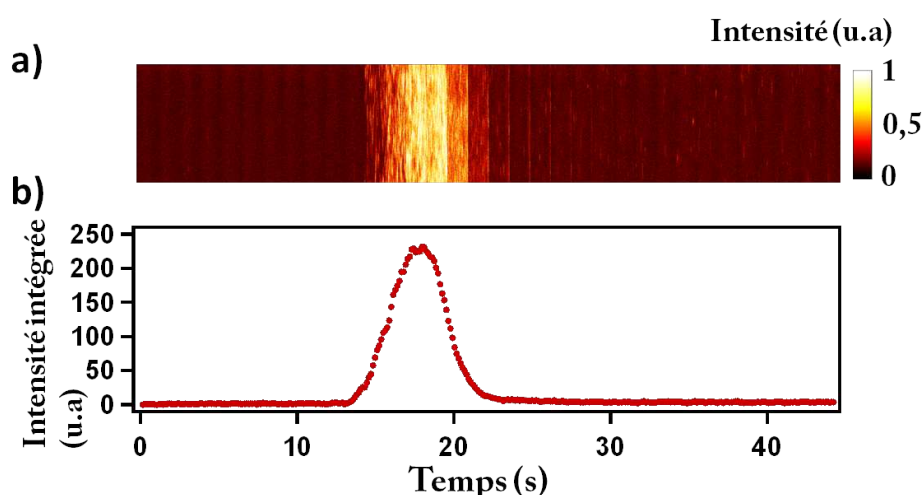
ligne est donnée pour 0.5 µg d'ADN par puits (données fournisseur).

Pour les expériences de séparation, 2 µg d'ADN ont été dilués dans 200 µl un buffer conventionnel d'électrophorèse TBE 2X (Tris-HCl 160 mM, acide borique 160 mM, acide éthylène diamine tétraacétique -EDTA- 5mM). A ce mélange ont été ajouté 5 % de dithiothréitol DTT comme agent réducteur afin de limiter les cassures induites lors du photoblanchiment des molécules de YOYO [Kanony et al., 2001]. Afin de limiter les interactions non spécifiques des ADN avec les surfaces ainsi que l'amplitude des flux electro-osmotiques [Milanova et al., 2012], 2 % de polyvinylpyrrolidone (PVP-360 kDa) ont aussi été ajoutés. Cette solution a été ensuite disposée dans le réservoir n°1. Avant utilisation de la puce, un tampon TBE 2X PVP 2 % a été injecté dans les canaux pour une durée de 20 min et ce afin de réaliser un revêtement.

Le marquage de l'ADN a été effectué à l'aide de l'intercalant YOYO-1 iodide (491/509 nm) à hauteur d'un fluorophore pour quatre paires de bases.

### Imagerie, construction des chromatogrammes

Avec le basculement vers l'étape 2 débute la séparation. Le mélange de molécules contenu dans la fine bande sélectionnée s'écoule selon le canal principal en direction du réservoir n°4. Nous étudions alors le procédé de séparation en intercalant sur la trajectoire des molécules un détecteur. Pour nos



**FIGURE 4.6** – Illustration de la procédure de construction des chromatogrammes. a) Montage des images de fluorescence, le temps croissant de gauche à droite. b) Chromatogramme obtenu par intégration des valeurs de pixels pour chaque image. Échantillon : 100 bp ladder.  $\Delta P = 600$  mbar.  $\Delta V = 0$  V.

expériences, les puces microfluidiques ont été montées sur un microscope de fluorescence. La zone centrale de la canalisation a ainsi été imagée à une distance connue du point d'intersection entre les canaux. La fréquence de la caméra a été ajustée (suivant les combinaisons de chutes de pression et de différence de tension le long de la canalisation principale) autour d'une valeur typique de 5 Hz. Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif de grossissement 100X à immersion (NA 1.4). La résolution optique n'étant pas déterminante pour ces expériences, nous avons opté pour un moyennage 4x4 des pixels de la caméra et ce afin d'augmenter le rapport signal sur bruit tout en minimisant le poids des fichiers pour les acquisitions de longue durée. Les films ont ensuite été analysés par sommation globale des intensités des pixels pour chaque image. Cette représentation nous permet de réduire à deux dimensions les données pour les présenter sous forme de chromatogrammes. L'illustration de cette procédure est donnée avec la figure 4.6 où sont superposés un montage des images du signal de fluorescence au graphe représentant l'intensité intégrée sur chacune des images en fonction du temps. Ces données ont été obtenues pour échantillon contenant du 100 bp ladder, pour une différence de pression ( $\Delta P$ ) entre les réservoirs 2 et 4 de 600 mbar, sans champ électrique ( $\Delta V = 0$  V), et une longueur de migration  $L_{mig}$  de 4,8 mm.

### 4.3 Résultats de la séparation

Dans cette section nous présenterons les résultats obtenus pour la séparation des deux échelles moléculaires contenant des fragments d'ADN de 500 à 10000 paires de bases (kb ladder) et de 100 à 1500 paires de bases (100 bp ladder). Nous débuterons par la présentation des résultats obtenus pour le kb ladder, décrirons brièvement le travail d'assignation des différentes tailles aux pics de fluorescence observés sur les chromatogrammes. Nous tâcherons par la suite d'énoncer les tendances se dégageant des résultats pour aborder la séparation des espèces moléculaires de taille inférieure (100 bp ladder). Nous terminerons enfin par un bilan global de ces expériences, en menant une étude de la mobilité en fonction de la taille moléculaire ainsi que le calcul des performances en termes de nombre de plateaux théoriques.

#### 4.3.1 Séparation du kb ladder

Ayant fixé la géométrie, le fluide porteur, l'influence des deux paramètres que sont la chute de pression le long du canal principal  $\Delta P$  et la différence de tension  $\Delta V$  reste à mener. Pour ce faire, des chromatogrammes ont été construits pour trois chutes de pression (200, 300, 700 mbar) correspondant à des vitesses de maximale de fluide au centre de la canalisation variant de 100 à 300  $\mu\text{m.s}^{-1}$  et des différences de tension variant de 0 à 40 V, correspondant à des amplitudes de champ électrique de 0 à 14,8  $\text{V.cm}^{-1}$ . Les chromatogrammes obtenus sur une puce unique sont présentés sous forme de tableau dans la figure 4.7.

À la lumière de ces mesures, nous pouvons d'emblée conclure sur l'impossibilité de séparer les espèces moléculaires par simple application d'un champ hydrodynamique tel que décrit par Liu *et al.* [Liu et al., 2011]. Considérant les conditions expérimentales décrites dans leur publication et la loi de Poiseuille reliant la vitesse maximale du fluide dans un capillaire de longueur L et de rayon R :

$$v_0 = 2v_{\text{moy}} = \frac{R^2 \Delta P}{4\mu L} \quad (4.1)$$

Nous obtenons une vitesse moyenne de fluide de l'ordre de 120  $\mu\text{m.s}^{-1}$  pour  $R = 1 \mu\text{m}$ ,  $\Delta P \sim 7\text{bar}$ ,  $L = 75 \text{ cm}$  et une viscosité égale à celle de l'eau à température ambiante. Cette valeur est comparable aux vitesses de fluide dans nos expériences. Nous confirmons ainsi, que sans autre mode d'actionnement que l'entraînement de fluide, des longueurs de migration de l'ordre du mètre sont nécessaires. Compte tenu de la longueur de migration millimétrique possible sur nos systèmes, ces expériences confirment la nécessité de l'emploi d'un mode d'actionnement alternatif. Les chromatogrammes obtenus par addition d'un champ électrique contraire démontre la possibilité de séparer les différentes espèces moléculaires en solution. L'apparition de pics d'intensité témoigne des arrivées séquentielles des espèces suivant le seul critère les différenciant à savoir leur taille.

Avant de mener plus loin nos conclusions il semble nécessaire ici de mettre plus en avant la procédure d'assignation des bandes. Les échelles moléculaires commerciales sont ainsi faites qu'elle permettent d'assigner à chaque bande son poids moléculaire correspondant (pourvu que le processus de séparation soit monotone avec les tailles moléculaires). Comme décrit dans la figure 4.5, le kb ladder est composé d'une espèce moléculaire (3000 bp) comptant pour une masse  $\sim 3$  fois supérieure aux autres. Autour de cette bande *centrale* sont présentes quatre espèces de tailles inférieures, et 5 espèces de tailles supérieures. Cette composition particulière donne un premier critère pour l'assignation des bandes par la simple observation des intensité relatives relevées sur les chromatogrammes. Le chromatogramme

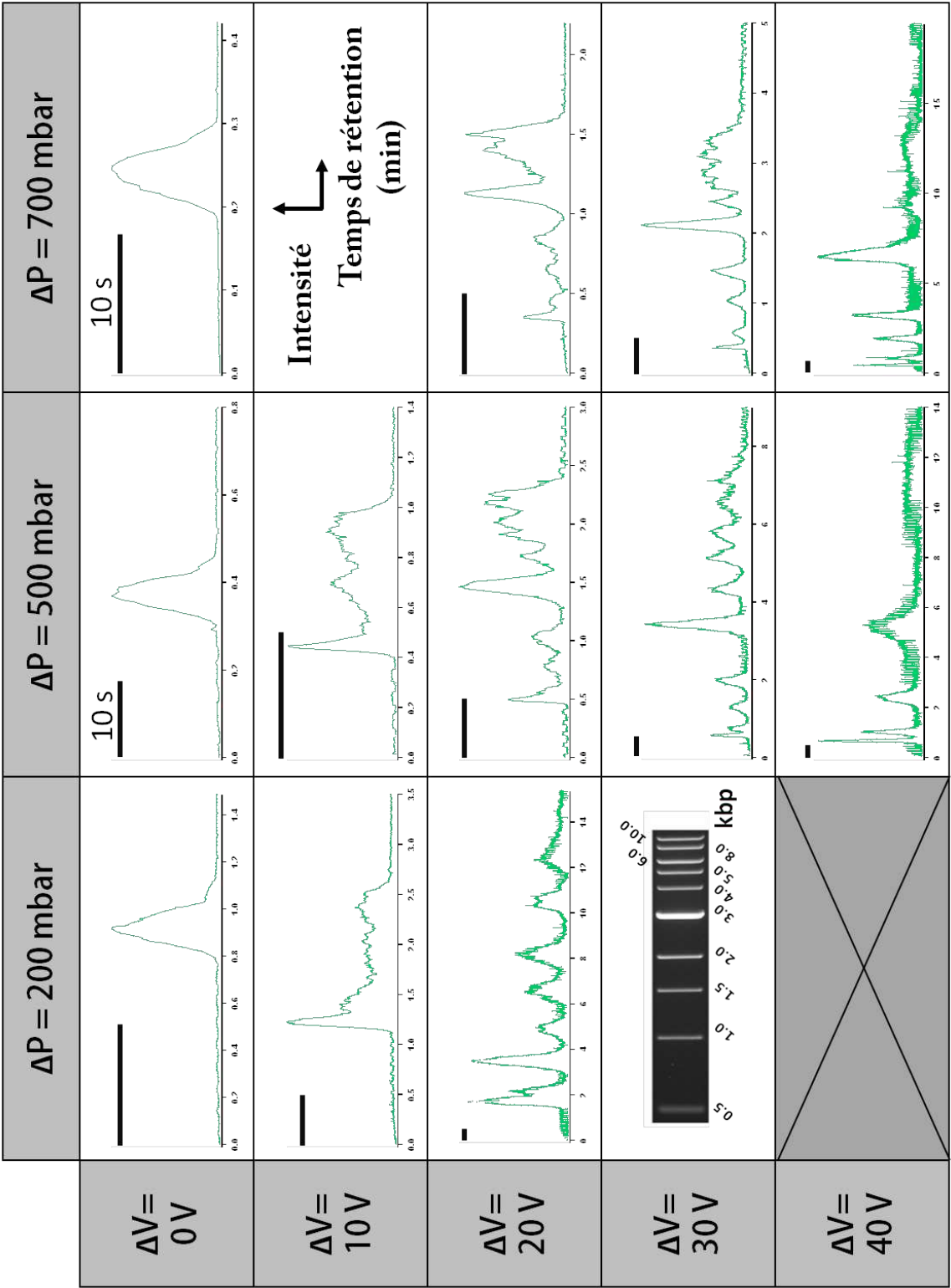
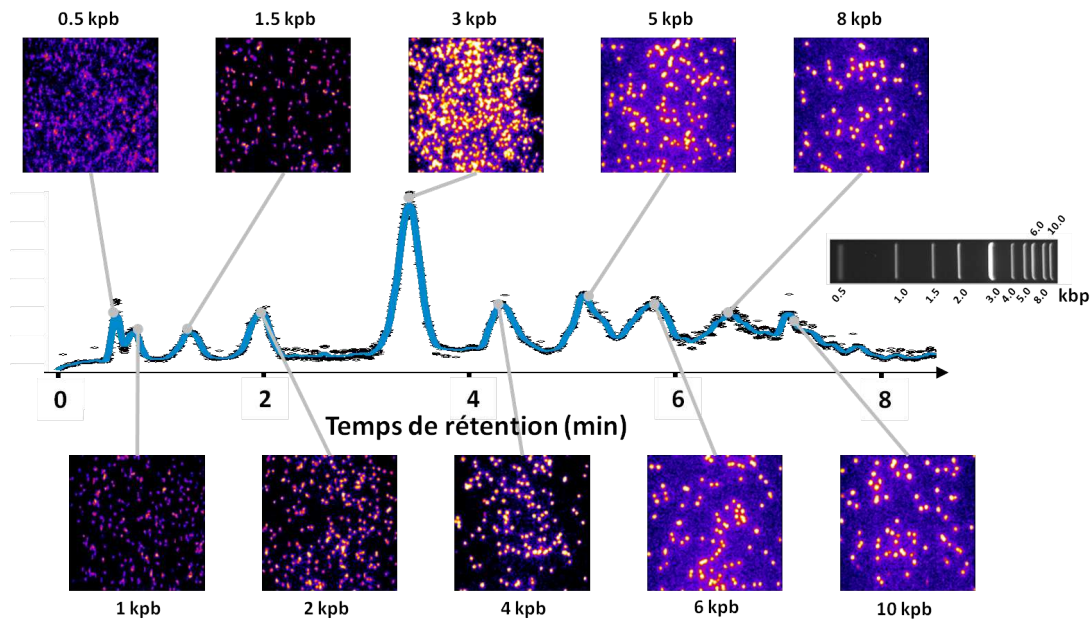


FIGURE 4.7 – Chromatogrammes obtenus pour la séparation du kb ladder pour des chutes de pression  $\Delta P = 200$  à  $700 \text{ mbar}$  et des différences de tension  $\Delta V = 0$  à  $40 \text{ V}$ . La longueur de migration étant égale à  $4.8 \text{ mm}$  pour une longueur totale du canal principal de  $7 \text{ mm}$ . La barre d'échelle, sauf clairement mentionné représente  $30 \text{ s}$ . Ces expériences ont été menées à la suite les unes des autres sur un dispositif unique.

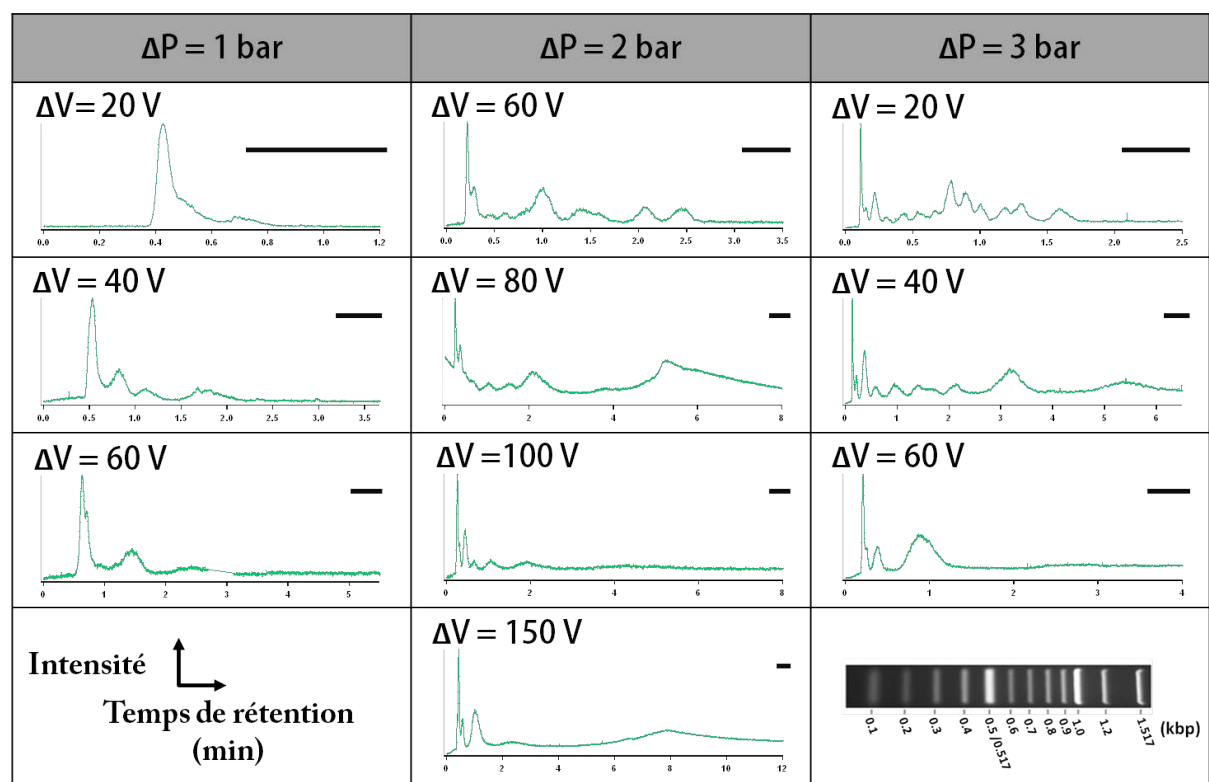


**FIGURE 4.8** – Chromatogramme obtenu pour la séparation du kb ladder pour  $\Delta P = 500 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 30 \text{ V}$ . À chaque pic d'intensité est associée l'image de fluorescence obtenue au même instant.

représenté dans la figure 4.8 correspond aux conditions  $\Delta P = 500 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 30 \text{ V}$ . Sur celui-ci apparaissent 10 maxima d'intensité relatives. Un pic central notable est observé pour  $t \sim 3,5 \text{ min}$ . Quatre pics sont observés pour des temps inférieurs et cinq pour des temps supérieurs. Le critère des masses relatives présentes dans l'échantillon nous permet d'avancer que les plus petits brins arrivent antérieurement aux espèces de longueur supérieures. Cette observation est confirmée à l'aide des images de fluorescence sur lesquelles on observe une diminution de la densité des objets avec le temps, diminution cohérente avec l'augmentation de la taille des molécules. Un autre critère pouvant être mis en avant correspond à l'intensité émise par molécule individuelle. Le nombre de fluorophores intercalés étant proportionnel à la taille des molécules, il en résulte une augmentation de l'intensité rayonnée par chacune d'entre elles. Constat encore possible à la vue des images de fluorescence associées à chaque pic du chromatogramme.

À la lumière de ces éléments, nous pouvons ainsi affirmer que notre méthode de séparation ne correspond pas à une méthode de chromatographie hydrodynamique associée à un effet d'exclusion stérique aux parois. En effet, dans le cas d'une chromatographie hydrodynamique, les objets de diamètre hydrodynamique supérieur sont élués antérieurement à ceux de diamètre plus faible. Notre système permet une élution plus rapide des espèces de bas poids moléculaire, comme dans une séparation classique par électrophorèse sur gel.

Les chromatogrammes de la figure 4.7 permettent de dessiner les tendances globales de la séparation. Sans champ électrique aucune séparation n'est observée. Pour des vitesses de fluide et des champs électriques modérés les bandes de plus hauts poids moléculaires sont bien résolues. Cette observation est manifeste sur le chromatogramme obtenu pour  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 20 \text{ V}$  présentant 8 pics discernables. On repère le pic d'intensité supérieure, correspondant à la bande des brins de 3000 bp, pour  $t \sim 3.5 \text{ min}$ . À droite de celui-ci les cinq bandes de poids supérieurs (4, 5, 6, 8, 10 kbp) sont résolues. Pour détecter toutes les bandes du kb ladder, un bon compromis pour les deux paramètres  $\Delta P$  et  $\Delta V$  semble avoir été trouvé pour  $\Delta P = 500 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 30 \text{ V}$  où sont visibles les 10 bandes correspondant aux 10 espèces contenues dans l'échantillon. La résolution des bandes de poids moléculaires inférieurs



**FIGURE 4.9** – Chromatogrammes obtenus pour la séparation du 100 bp ladder pour des chutes de pression  $\Delta P = 1$  à 3 bar et des différences de tension  $\Delta V = 20$  à 150 V. La longueur de migration étant égale à 5.3 mm pour une longueur totale du canal principal de 8 mm. La barre d’échelle représente 30 s.

requiert des vitesses de fluide et des amplitudes de champ électrique plus importantes. Les cinq bandes de poids moléculaire le plus bas sont clairement résolues pour  $\Delta P = 700 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 40 \text{ V}$ . Le pic d’intensité supérieure correspondant à la bande de 3000 bp.

Les observations précédentes nous permettent de dessiner une stratégie pour la résolution des espèces de poids moléculaires inférieurs. La partie qui suit a pour sujet la séparation du ladder 100bp.

### 4.3.2 Séparation du 100 bp ladder

Les résultats obtenus pour le kb ladder nous ont permis de mettre en avant la nécessité d’utiliser des fortes chutes de pression et différences de tension pour la résolution des espèces de bas poids moléculaires. Les résultats présentés dans cette section concernent la séparation d’un échantillon composé d’un 100 bp ladder dans pour une longueur de migration de 5,3 mm. Afin d’atteindre des vitesses moyennes de fluide supérieure, la chute de pression a été ajustée à 1, 2 et 3 bar, correspondant à des vitesses moyennes du fluide allant de 200 à 600  $\mu\text{m.s}^{-1}$ . La figure 4.9 présente les chromatogrammes ainsi obtenus. D’ordre général, les expériences à  $\Delta P = 1$  et 2 bar sont décevantes du point de vue de la séparation. Si des pics apparaissent, ceux-ci sont trop peu nombreux pour pouvoir assigner à chacun d’entre eux un poids moléculaire particulier. Les expériences pour 3 bar de chute de pression ( $v_{\text{moy}} = 600 \mu\text{m.s}^{-1}$ ) sont bien plus encourageantes puisque l’on discerne clairement sur les chromatogrammes l’apparition de maxima d’intensité.

Afin de mieux cerner les potentialités de séparation pour ce débit particulier, des chromatogrammes ont été acquis pour la même puce et pour des différences de tension plus finement distribuées (figure

4.10). Cette expérience permet de mieux cerner les potentialités de séparation de notre méthode pour les petites tailles de molécules. Dans cette échelle moléculaire, les espèces présentes en quantités supérieures correspondent aux tailles de 500 et 1000 paires de bases. Avec l'augmentation progressive de l'amplitude du champ électrique est accompagnée le détachement des espèces de poids moléculaire supérieur. On remarque ainsi, pour  $\Delta V = 40$  et  $80$  V l'apparition de trois pics sur la droite des chromatogrammes correspondant aux tailles 1000 bp, 1200 bp et 1500 bp. Le premier d'entre eux présentant une intensité supérieure. Plus précisément, pour  $\Delta V = 80$  V, 8 pics d'intensité apparaissent. Deux pics d'intensité supérieure notable apparaissent pour  $t \sim 0.2$  et  $0.7$  min. Ceux-ci correspondent aux tailles 500 et 1000 paires de bases présentes en quantités supérieures aux autres. Le chromatogramme obtenu pour  $\Delta V = 100$  V présente le meilleur compromis expérimental obtenu. On peut y voir figurer 10 pics d'intensité pour la résolution de 9 tailles moléculaires comprises entre 400 et 1500 paires de bases. Ce chromatogramme, accompagné des images de fluorescences correspondant aux maxima d'intensité relatifs sont présentés en figure 4.11.

Sur ce dernier, on repère les deux maxima locaux correspondant aux tailles de 500 et 1000 paires de bases. Entre ces deux, pour  $20 \text{ s} < t < 50 \text{ s}$  sont présents quatre pics correspondant aux tailles de 600, 700, 800, et 900 paires de bases.

#### 4.3.3 Analyse des performances : vitesse de migration et nombre de plateau théoriques

Les chromatogrammes obtenus et l'assignation des bandes permettent d'analyser les résultats en terme de vitesse moyenne en fonction du poids des espèces <sup>1</sup>. Les figures 4.12 et 4.13 présentent ces valeurs pour respectivement le kb ladder et le 100 bp ladder. Les calculs de dispersion sur la vitesse des molécules  $v = \frac{L_{mig}}{\tau}$  ont été menés considérant l'additivité des erreurs relatives sur le positionnement du détecteur et sur le temps d'arrivée :

$$\frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}} = \frac{\Delta L_{mig}}{L_{mig}} + \frac{\Delta \tau}{\tau} \quad (4.2)$$

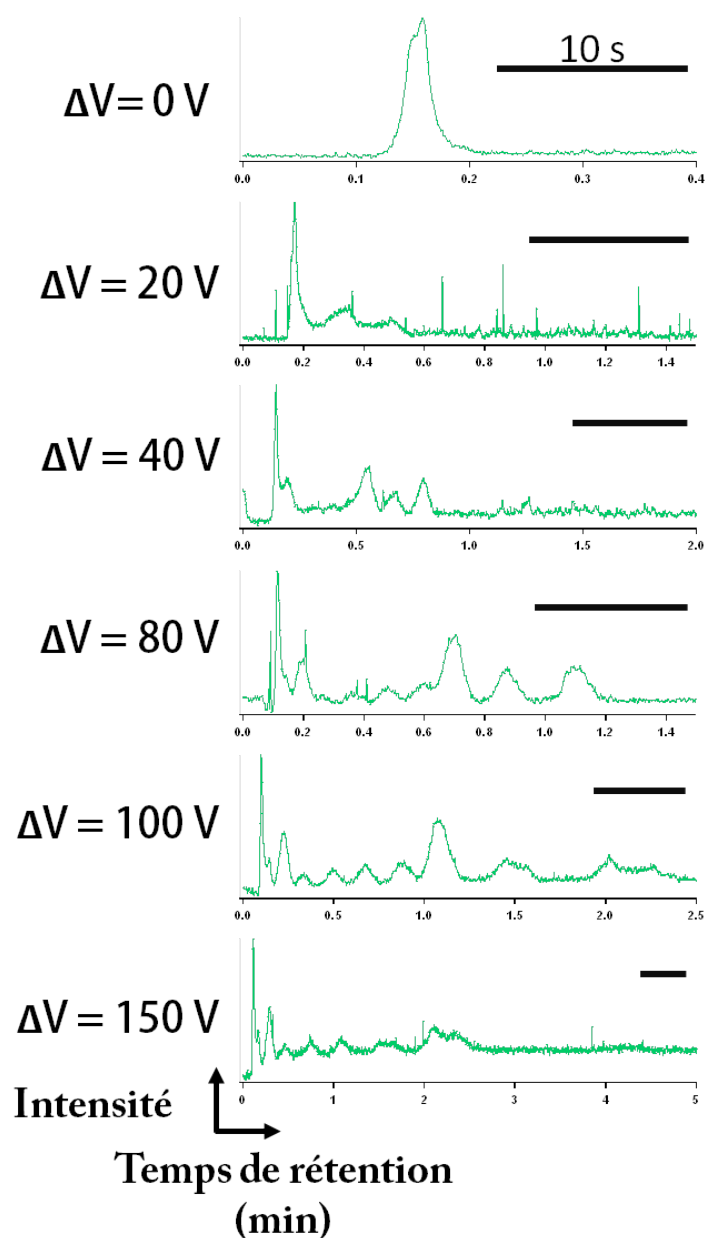
en prenant  $\Delta L_{mig} = 80 \mu m$  (champ de la caméra) et  $\Delta \tau$  égal à la largeur à mi hauteur des pics d'intensité observés.

Les vitesses moyennes mises en avant par ces graphiques suivent des lois de puissance en  $N^{-1.33}$  pour le kb ladder et  $N^{-2.75}$  pour le 100 bp ladder. Ces exposants dépassant les  $N^{-1}$  correspondant à l'électrophorèse sur gel comme dépeint en introduction. Un exposant supérieur se traduit par une meilleure résolution des espèces. En effet, prenons par exemple le cas des bandes de 500 et 1000 paires de bases. La loi en  $N^{-1}$  de la chromatographie sur gel prévoit une variation de la vitesse de migration d'un facteur 2. Pour une loi en  $N^{-2}$  on s'attend à une vitesse quatre fois plus rapide, ce qui explique en partie la possibilité de séparer ces deux espèces en des temps courts, sur une faible longueur de migration comme dans notre cas.

Dans le domaine de la chromatographie, deux grandeurs font référence afin de quantifier l'efficacité d'une méthode de séparation. La résolution  $R$  et le nombre de plateaux théoriques  $N_p$ .

1) Pour deux espèces 1 et 2 arrivant suivant des gaussiennes d'écart-types  $\sigma_{1,2}$  et centrées en des temps

<sup>1</sup> En électrophorèse, il est d'usage de mesurer la mobilité des molécules, définie comme la vitesse divisée par l'amplitude du champ électrique. Cette définition nous est ici interdite, car la superposition des actionnement ne se fait pas de manière linéaire, comme nous le démontrerons plus loin.



**FIGURE 4.10** – Chromatogrammes obtenus pour la séparation du 100 bp ladder pour  $\Delta P = 3 \text{ bar}$  et  $\Delta V = 0$  à  $150 \text{ V}$ . La longueur de migration étant égale à  $5.3 \text{ mm}$  pour une longueur totale du canal principal de  $8 \text{ mm}$ . La barre d'échelle, sauf clairement mentionné, représente  $30 \text{ s}$ .



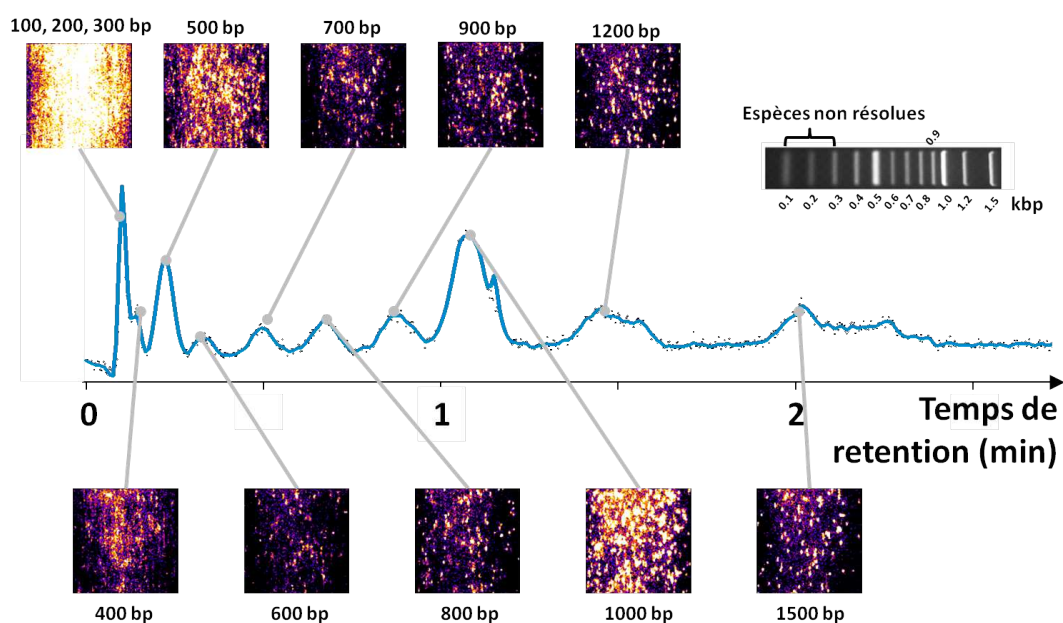


FIGURE 4.11 – Chromatogramme obtenu pour la séparation du ladder 100 bp pour  $\Delta P = 3 \text{ bar}$  et  $\Delta V = 100 \text{ V}$ . À chaque pic d'intensité est associée l'image de fluorescence obtenue au même instant.

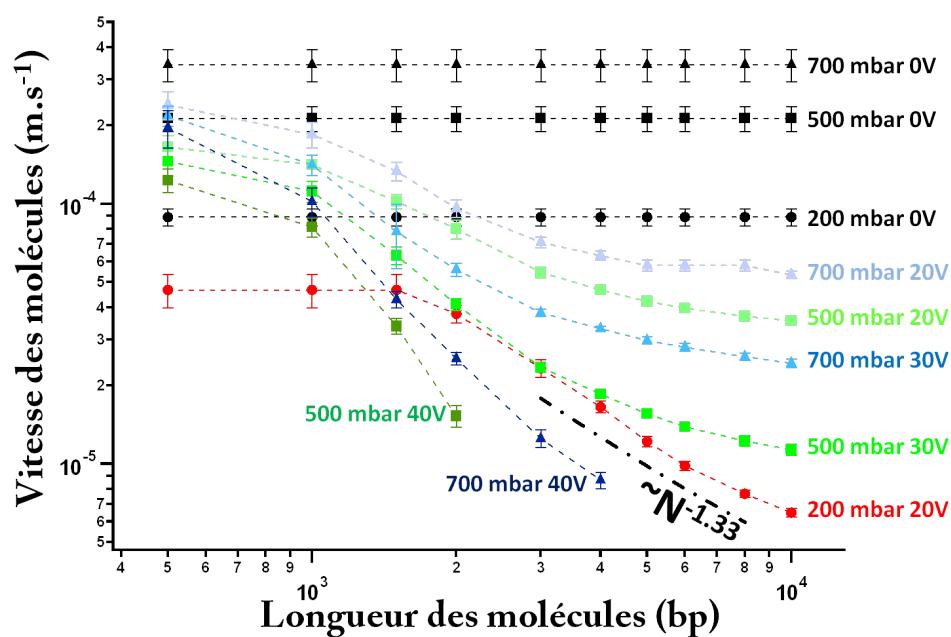


FIGURE 4.12 – Variation de la vitesse en fonction de la longueur des molécules contenues dans le kb ladder.

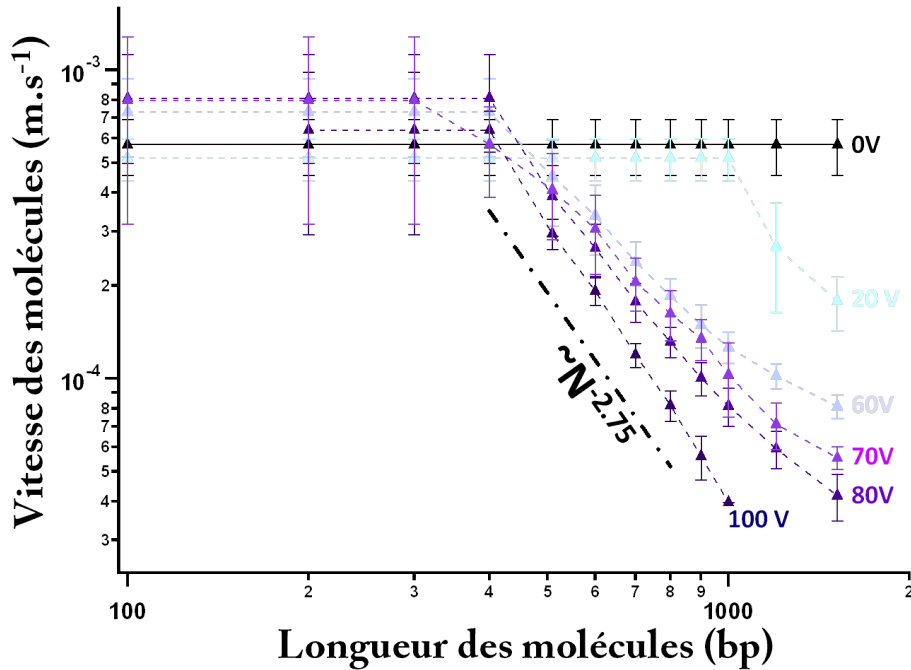


FIGURE 4.13 – Variation de la vitesse en fonction de la longueur des molécules contenues dans le 100 bp ladder pour  $\Delta P = 3$  bar.

$t_{1,2}$ , la nomenclature IUPAC [ETTRE, 1993] définit la résolution comme :

$$R_{1,2} = \frac{|t_2 - t_1|}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (4.3)$$

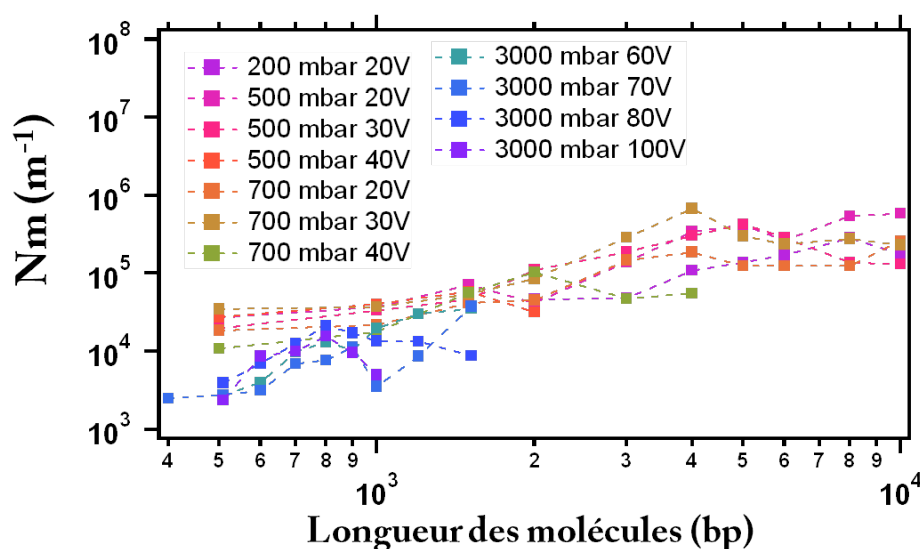
Deux espèces peuvent être considérées comme clairement séparées pour  $R > 1.5$ , séparées de manière incomplète pour  $R \sim 1$  et mal séparées pour  $R \sim 0.75$ . Cette expression est relative, aussi la donnée des chromatogrammes suffit souvent à exprimer si deux espèces sont correctement séparées ou non. Ainsi, pour le cas de la séparation kb ladder sous une différence de pression de 500 mbar et 30 V de chute de tension (figure 4.8), cette valeur est de 3.6 entre les bandes de 2000 et 3000 paires de bases mais tombe à 0.85 pour les bandes 500 et 1000 paires de bases.

2) La notion de nombre de plateaux théoriques est héritée de la séparation sur colonne à distiller. Cette notion consiste à considérer que le mouvement des espèces se fait par sauts successifs le long de la colonne, la longueur de ce saut définissant un plateau. Pour les deux espèces 1 et 2 précédentes,  $N_p$  se définit comme [ETTRE, 1993] :

$$N_p = 5.545 \frac{t_{1,2}}{4\sigma_{1,2}} \quad (4.4)$$

où 5.545 est pris comme approximation de la valeur  $8 \ln 2$ . Afin de rendre comparables les méthodes, on trouve dans la bibliographie la référence au nombre de plateaux théoriques par mètre de séparation  $Nm = \frac{N_p}{L_{mig}}$ . Cette valeur est présentée dans la figure 4.14 pour les différentes espèces résolues dans notre expérience.

Comme le montre ce graphique,  $Nm$  est compris entre  $10^4$  et  $10^6$  dans nos expériences pour des tailles de molécules comprises entre 600 et 10000 paires de bases. Ces valeurs sont tout à fait compatibles avec l'état de l'art des technologies de séparation sur puce [Kaji et al., 2010], supérieures à ce que l'on peut obtenir sur gel d'électrophorèse. De bien plus grandes valeurs de ce nombre de plateaux théoriques



**FIGURE 4.14** – Nombre de plateaux théoriques par mètre ( $Nm$ ) en fonction de la longueur des molécules pour différentes conditions expérimentales.

existent dans la littérature pour l'électrophorèse capillaire ( $Nm \sim 1 - 5 \cdot 10^7$ ) mais celles-ci sont souvent annoncées pour des petites molécules.

La donnée du nombre de plateaux théoriques par mètre peut apparaître comme discutable notamment dans le domaine de la séparation sur puce : les faibles dimensions sur lesquelles ont lieu les migrations ont pour effet de gonfler hypothétiquement les valeurs de  $Nm$ . Dans le cas des matériaux élaborés par structuration à l'échelle micro-nanométrique, la fabrication de telles matrices à l'échelle macroscopique s'apparente à une vision chimérique. La technique que nous avons mis au point, même si cela reste à mettre en œuvre, est dans ce domaine, bien moins impactée. Des capillaires de quelques microns de rayon sont des produits distribués dans le commerce, de même que les sources de tension et de pression adaptées pour des longueurs de migration plus importantes.

#### 4.3.4 Conclusions sur les expériences de séparation

Ainsi avons nous démontré la possibilité de séparer des molécules d'ADN par taille grâce à un actionnement hybride, combinaison de champs électrophorétique et hydrodynamique. Ce mode de séparation possède des avantages majeurs au rang desquels nous pouvons citer l'absence de matrice solide, un temps et une longueur de migration très faibles, une consommation faible d'échantillon. L'absence de gel solide a pour avantage premier de rendre la puce microfluidique réutilisable. On notera ici que les différents chromatogrammes présentés dans la figure 4.7 ont été obtenus sur une durée inférieure à 3h d'expérience, le tout sur une unique puce.

Le temps de séparation apparaît comme un critère important dans les expériences de tri de molécules : un temps court permet l'intensification des procédés mais surtout de limiter l'élargissement des pics par diffusion. Pour la séparation d'un kb ladder par électrophorèse sur gel, environ vingt minutes de migration sont nécessaires. Et ce temps ne comprend pas le temps de fabrication du gel, et son impact sur la reproductibilité de la séparation. Nos expériences ont démontré qu'une durée inférieure à dix minutes est nécessaire pour séparer la même gamme de taille, et de l'ordre de 3 minutes pour la séparation de molécules de taille inférieure.

Si ces performances rangent notre système au niveau de l'état de l'art pour la séparation sur puce

#### Chapitre 4. Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme

---

microfluidique, et augurent une intégration possible dans un laboratoire sur puce complexe, il reste du chemin pour garantir sa fiabilité<sup>2</sup>. De forts arguments nous permettent néanmoins d'affirmer que notre système est un bon candidat pour y arriver. La plupart des méthodes de séparation sur puce font appel à des techniques de fabrication onéreuses, et si celles-ci sont de formidables outils de laboratoire, leur distribution à plus large échelle est de fait, en l'état, vouée à être limitée. Certes, notre système est aussi issu de ces mêmes techniques, mais la simplicité du procédé (limité à une gravure et un scellement), augure un meilleur avenir. Deux routes peuvent ainsi être envisagées : une distribution des puces comme consommables de laboratoire ou un développement sur capillaire. Aujourd'hui, les contrôles en pression et tension sont déjà accessibles sur les systèmes d'électrophorèse capillaires : une transition vers un tel support nous paraît ainsi tout à fait envisageable. Cette transition aurait alors aussi pour intérêt qu'elle permettrait l'application de notre méthode à des fins de préparation. En l'état, la *troupe* faible quantité de matériel séparé interdit la réutilisation des espèces post-séparation. Un basculement pour une migration sur capillaire, augmentant les débits, permettrait de répondre à cette attente. En terme d'efficacité, les différents paramètres ajustables (hauteur du canal, chute de pression, différence de tension) font de cette méthode une méthode versatile : une étude plus en profondeur permettra d'élargir le spectre des molécules séparables.

Ainsi l'amélioration des performances peut passer par deux routes parallèles. La première consiste à multiplier les expérimentations de manière à cerner les paramètres essentiels à la séparation. La deuxième consiste à simplifier le problème et tenter de mettre en évidence les mécanismes physiques permettant ces performances. Dans le cadre de cette thèse, c'est cette dernière route que nous avons décidé de suivre. Les différentes expériences que nous avons pu mener dans ce but seront décrites dans la partie qui suit.

---

<sup>2</sup>Ce travail de *maturation* industrielle a été pris en charge par l'organisme Toulouse Tech Transfer

## 4.4 Migration transverse en microfluidique : pistes bibliographiques pour l'interprétation de la séparation

Compte tenu de la relative originalité du mode d'actionnement hybride mis en place, peu de précédents existent à notre connaissance dans la littérature, tant sur le plan expérimental que théorique. Le but de cette partie est de les introduire afin d'orienter et d'introduire les expériences de molécules uniques que nous avons par la suite mises en place pour comprendre le mécanisme physique à l'origine de la séparation. Cette partie a été condensée sous forme de tableau et est présentée en figure 4.21.

### 4.4.1 Migration transverse d'objets sous l'action de champs hydrodynamique et électrophorétique : cas du fluide Newtonien

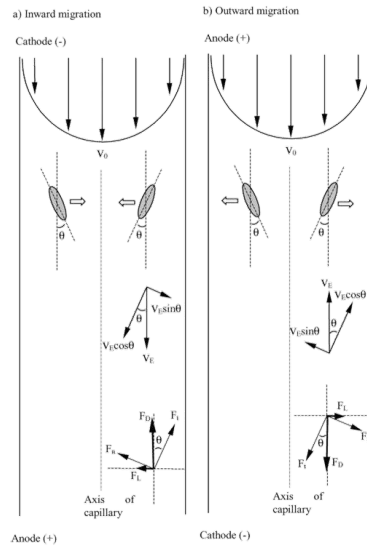
Considérant des particules sphériques solides, il a été théoriquement et expérimentalement démontré qu'il existe une focalisation des particules vers le centre de la canalisation dans le cas particulier où une force tend à s'opposer au mouvement de la bille dans un écoulement de Poiseuille [Jeffrey and Pearson, 1965]. Cet effet a récemment été mis en application pour la focalisation planaire de traceurs sphériques soumis à l'action conjuguée d'un champ électrophorétique et dans un capillaire [Kim and Yoo, 2009]. Comme discuté plus tôt, ces effets sont essentiellement d'origine inertielle, et les forces de cette origine sont négligeables devant l'agitation Brownienne de particules sub-micrométriques.

Sur le plan des expériences avec des molécules d'ADN, le précédent le plus ancien à notre connaissance correspond à des travaux de Zheng *et al.* [Zheng and Yeung, 2002]. Ceux-ci ont démontré qu'un phénomène de migration radiale des molécules d'ADN pouvait apparaître, en direction des parois ou du centre d'un capillaire, suivant le mode d'actionnement. Travaillant avec des molécules d'ADN  $\lambda$  ( $\sim 48$  kbp) migrant dans des capillaires de  $75 \mu\text{m}$  de diamètre interne sous l'action conjuguée d'un champ hydrodynamique et électrophorétique, ceux-ci ont mis en avant les résultats suivants :

- Lors de l'application conjuguée d'un flux hydrodynamique et électrophorétique, tels que ces deux tendent à actionner les molécules dans la même direction, ces dernières migrent vers le centre du capillaire.
- Lors de l'application de ces deux champs en opposition, les molécules migrent vers les parois du capillaire avec un temps de relaxation de l'ordre de 20 s.

Il est intéressant de noter que ces derniers ont mis en évidence ces phénomènes pour des valeurs de vitesses maximales au centre proches des nôtres ( $v_0 \sim 115 - 340 \mu\text{m.s}^{-1}$  et  $E \sim 40 - 60 \text{V.cm}^{-1}$ ). Toutefois, la force ionique de leur tampon est bien plus basse ( $\sim 5 \text{mM}$  NaCl contre  $180 \text{mM}$  TBE) et compte tenu du rayon du capillaire, le taux de cisaillement au bord est environ 40 fois plus faible que dans nos expériences. Cette expérience a amené les auteurs à tenter d'interpréter ce phénomène en modélisant les molécules d'ADN comme des bâtonnets rigides sous flux. Un schéma issu de leur publication est donné en figure 4.15 : La molécule migrant à une vitesse électrophorétique  $v_e$  dans la direction du fluide ou de manière opposée, il est possible de décomposer les composantes des forces suivant  $F_n$  et  $F_t$  telles que :

$$\begin{aligned} F_L &= \frac{1}{2} \mu v_e \sin 2\theta (c_n - c_t) \\ F_D &= \mu v_e (c_n \cos^2 \theta + -c_t \sin^2 \theta) \end{aligned} \quad (4.5)$$



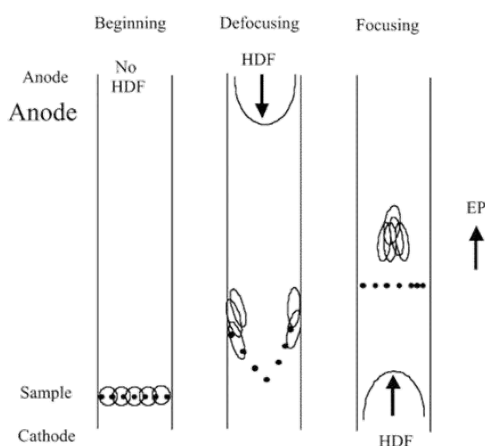
**FIGURE 4.15** – Schéma descriptif du phénomène de migration selon J. Zheng et S. Yeung tiré de [Zheng and Yeung, 2002].  $F_D$  : force de friction.  $F_L$  force de lift. Les directions  $F_n$  et  $F_t$  indiquent les composantes normales et tangentielles des forces suivant l'axe principal de la molécule assimilée à une ellipse. L'angle  $\theta$  décrit l'orientation de la molécule par rapport à la direction du fluide.

Les coefficients  $c_n$  et  $c_t$  correspondant aux coefficients de friction visqueuse pour un objet ellipsoïdal suivant les directions normale et tangentielle à l'axe principal. Dans le cas spécifique où force hydrodynamique et électrophorétique agissent conjointement, l'orientation de la molécule est telle que  $0 < \theta < \pi/2$  du fait de la déformation induite par le flux. De fait et faisant remarquer que  $c_n > c_t$  dans cette géométrie particulière, la force  $F_L$  tend à faire migrer les molécules vers le centre de la canalisation. Dans la situation où les deux modes d'actionnement sont opposés, la transformation  $v_e \rightarrow -v_e$  conduit à une force de lift vers les parois du tube. Cette explication, bien que critiquable, a le mérite de fixer une certaine idée du phénomène. Toutefois, poursuivant la même logique, on peut tout à fait se demander pourquoi cette force ne conduit pas à une simple rotation de la particule sur elle-même plutôt qu'une migration globale au sein du capillaire.

Il est intéressant de noter que les auteurs de cette étude ont eu l'idée d'appliquer ce phénomène à la séparation [Zheng and Yeung, 2003]. Remarquant le temps de relaxation des biomolécules vers le bord est dépendant de leurs tailles (une molécule plus grande migrant plus rapidement), il est *a priori* possible de séparer des entités chargées de tailles différentes. Toutefois, comme le font remarquer les auteurs, celle-ci est impossible en régime continu. Les positions axiales d'équilibre étant indépendantes de la taille, la séparation se fait au prix d'un protocole laborieux comme décrit dans la figure 4.16.

Les étapes composant la séparation vont successivement de la gauche vers la droite et peuvent se résumer ainsi. Débutant avec deux populations de molécules (les petits cercles pleins représentant les plus petites d'entre elles) réparties de façon homogène dans une canalisation, celles-ci sont amenées à migrer (vers le haut du schéma) suivant un actionnement électrophorétique. Un flux hydrodynamique est alors appliqué tendant à advecter les molécules du haut vers le bas du schéma. Compte tenu du mécanisme de migration décrit plus tôt, les objets les plus déformables (les grosses molécules) migrent plus rapidement vers le bord. Situées en moyenne plus proche du centre, les petites molécules se situent sur les lignes de fluide rapides de l'écoulement de Poiseuille. Elle se décalent donc vers la zone d'injection (Cathode sur le schéma). Puis le sens du flux hydrodynamique est inversé, tendant à rapprocher les molécules vers le centre de la canalisation. Encore une fois, cette migration étant plus

#### 4.4. Migration transverse en microfluidique : pistes bibliographiques pour l'interprétation de la séparation



**FIGURE 4.16** – Schéma descriptif du phénomène de l'expérience de séparation selon J. Zheng et S. Yeung tiré de [Zheng and Yeung, 2003]. HDF : flux hydrodynamique.  $E_p$  Flux électrophorétique.

rapide pour les grandes molécules, celles-ci se décalent vers le centre de la canalisation, où, migrant dans les lignes de fluide de vitesses supérieures, elles confortent leur avance sur les petites. Ainsi, alternant les champs le sens du champ hydrodynamique suivant des cycles répétés, les auteurs ont montré la possibilité de séparer deux ADN ( $\lambda$  - 48.5 kbp - et  $\Phi$ X174 -5.3 kbp-) en environ 20 minutes sur une distance de migration de 52 cm dans un capillaire de 75  $\mu$ m de diamètre interne.

Les auteurs mentionnent clairement qu'une séparation en continue est impossible. Aussi, depuis lors, on ne trouve plus trace dans la bibliographie de séparation de ce type. Si expérimentalement cet effet semble être tombé en désuétude, il n'a pas manqué d'éveiller l'intérêt de théoriciens. En effet, Butler *et al.* [Butler et al., 2007] ont ainsi mené des travaux numériques sur le transport de molécules confinées en présence d'un champ hydrodynamique (profil Poiseuille) et d'un champ externe, avec pour application particulière l'électrophorèse. Leurs conclusions s'énoncent comme suit :

- Lorsque seul un champ hydrodynamique est appliqué, les chaînes de polymères tendent à migrer vers le centre
- Lorsque seule une force externe est appliquée les molécules tendent à migrer vers le centre également
- Lorsque les deux champs sont appliqués simultanément, les molécules migrent tantôt vers les bords, tantôt vers le centre de la canalisation suivant l'intensité relative de ces deux forces.
- Dans le cas particulier où la force externe est une force électrophorétique, les polymères migrent suivant le mécanisme mis en avant par Zheng *et al.*.

La migration vers le centre des canalisations pour des polymères dans un écoulement de Poiseuille a fait l'objet de nombreux travaux, tant numériques qu'expérimentaux, récemment revus par Graham [Graham, 2011]. Cet effet est aujourd'hui suffisamment compris tel qu'il est possible de l'énoncer en quelques phrases. Proche d'une paroi, la forte variation spatiale de la vitesse de fluide implique une extension du polymère. Ce dernier se relaxant induit un écoulement secondaire qui par réflexion avec la paroi se transforme en une force normale à cette dernière. Aussi observe-t-on une déplétion proche des murs dans un écoulement. Le polymère subissant un cisaillement plus faible au centre de la canalisation, admet une conformation plus globulaire qui augmente sa diffusivité par rapport

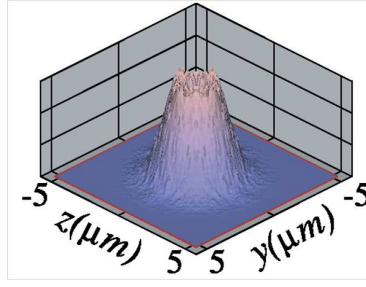


FIGURE 4.17 – Distribution de probabilité de présence du centre de masse d'un dimère de  $\lambda$  dans une canalisation carrée d'environ  $10\ \mu\text{m}$  de côté pour un taux de cisaillement au bord de  $301\ \text{s}^{-1}$ . Tiré de [Jendreck et al., 2003].

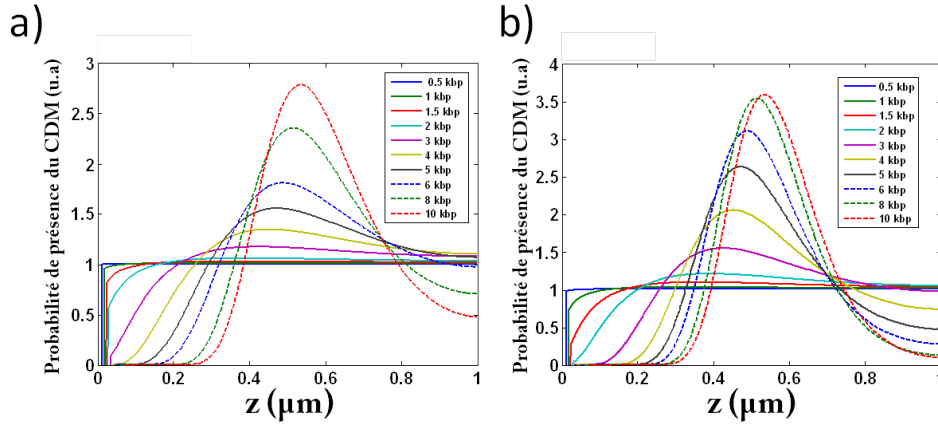


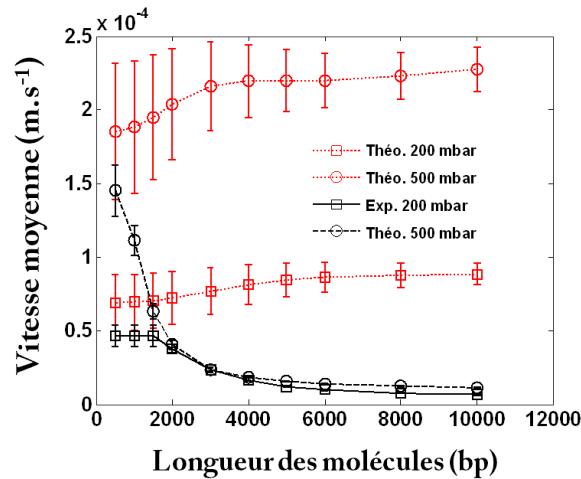
FIGURE 4.18 – Distribution de probabilité de présence du centre de masse (CDM) des molécules d'ADN contenues dans le kb ladder selon la résolution de l'équation (101) de [Butler et al., 2007] pour des conditions reproduisant a) l'expérience à  $\Delta P = 200\ \text{mbar}$  et  $\Delta V = 20\text{V}$  et b)  $\Delta P = 500\ \text{mbar}$  et  $\Delta V = 30\text{V}$  (Cf. 4.7). Ces valeurs sont données sur l'espace  $z \in [0.25R_g, \frac{H}{2}]$  celles-ci étant, de fait, symétriques. Les valeurs expérimentalement trouvées sont également représentées.

aux zones proches des parois où le polymère est déployé et admet un rayon hydrodynamique plus important. La zone centrale de la canalisation tend ainsi à être plus dépeuplée par augmentation de diffusivité. Aussi la combinaison de ces deux effets conduit-elle à des distributions d'équilibre dans la canalisation en forme de volcan tel qu'illustré dans la figure 4.17, issue de travaux de Jendreck *et al.* [Jendreck et al., 2003].

En ce qui concerne l'application d'un champ externe, sans champ hydrodynamique Butler *et al.* mettent en avant que l'orientation préférentielle des chaînes linéaires entre les parois crée une migration nette vers le centre de la canalisation. Dans les cas d'un actionnement mixte, il existe un couplage complexe que nous ne saurons décrire ici. Cet effet est essentiellement basé sur les valeurs relatives de deux nombres de Péclet, relatifs à l'actionnement hydrodynamique  $Pe_f = \frac{\dot{\gamma} R_g^2}{D_0}$  et électrophorétique  $Pe_e = \frac{v_e R_g}{D_0}$ . Avec  $R_g$  le rayon de gyration de la molécule dans un milieu infini,  $D_0$  son coefficient de diffusion,  $v_e$  sa vitesse électrophorétique et  $\dot{\gamma}$  la valeur moyenne du taux de cisaillement sur l'espace entre le centre de la canalisation et bord de cette dernière. Dans nos mains et compte tenu des valeurs de ces deux coefficients dans nos expériences ( $Pe_f \sim 500$ ,  $Pe_e \sim 10^3$ ), la résolution numérique de l'équation du premier ordre non linéaire (101) donnée dans leur publication conduit à des effets inverses à ceux expérimentalement observés, comme présenté en figure 4.18.

Le panneau a) représente la densité de présence  $n(z, bp)$  du centre de masse (CDM) de différentes





**FIGURE 4.19** – Vitesse moyenne des molécules en fonction de leur taille selon la résolution de l'équation (101) de [Butler et al., 2007] pour des conditions reproduisant les expériences à  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 20V$  et b)  $\Delta P = 500 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 30V$  (Cf. 4.7).

molécules (de  $bp$  paires de bases) contenues dans le kb ladder pour des conditions de champ électrique et de vitesse au centre de la canalisation correspondant à l'expérience pour  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 20V$  présentée en figure 4.7. Le panneau b) a quant à lui été obtenu pour des valeurs correspondantes à  $\Delta P = 500 \text{ mbar}$  et  $\Delta V = 30V$ . Il apparaît clairement sur ces courbes que le centre de masse des molécules de plus grandes tailles se déplace vers le centre de la canalisation (et les lignes de haute vitesse) alors que les plus petites restent distribuées de manière homogène selon la canalisation<sup>3</sup>. Il nous est alors possible de calculer la vitesse moyenne  $\bar{v}(bp)$  des molécules en fonction de leur taille via :

$$\bar{v}(bp) = \frac{\int_0^{H/2} (v_h(z) - v_e) n(z, bp) dz}{\int_0^{H/2} n(z, bp) dz} \quad (4.6)$$

L'évolution de cette vitesse moyenne superposée aux données expérimentales est donnée en figure 4.19. Il apparaît que, dans nos conditions et selon les travaux de Butler *et al.*, les molécules de plus grandes tailles migrent plus rapidement vers le détecteur que les plus petites, ce qui va à l'encontre des résultats expérimentaux. Notons toutefois que cette théorie sacrifie de son acuité à des fins louables qui sont de fournir à l'expérimentateur une équation analytique. Même si celle-ci donne des tendances correspondant à l'expérience de Zheng *et al.*, la modélisation consistant à modéliser le polymère par deux billes et un ressort atteint certainement sa limite dans nos géométries confinées.

Afin de cerner quantitativement les effets mis en avant dans les expériences de migration de Zheng *et al.*, la même équipe a eu recours à des dynamiques Browniennes (modèle gros grains) et ont réussi à reproduire les résultats de l'expérience de migration [Kekre et al., 2010]. Plus fort encore, ces résultats ont été obtenus sans paramètre ajustable en reprenant les données expérimentales décrites par Zheng *et al.*. Il s'avère que la migration anormale observée, pour les champs électrophorétique et hydrodynamique agissant conjointement ou non, est le résultat du champ de fluide généré par la distribution de charge le long de la molécule. Comme l'expliquent les auteurs, il est communément admis qu'en

<sup>3</sup>Notons que ce calcul contient une part d'arbitraire puisque la résolution de l'équation différentielle requiert la donnée du rayon  $a$  des billes reliées par un ressort linéaire simulant la chaîne de polymère. Nous avons ici choisi la valeur  $a = 0.125 R_g$  à l'instar des auteurs et vérifié que la tendance observée restait constante pour des valeurs plus hautes ou plus basses dans la limite  $a < R_g/2$ .

électrophorèse, le champ de vitesse de fluide induit autour des polyélectrolytes est de courte portée, cette propriété expliquant la faible ou inexistante dépendance de la mobilité électrophorétique avec la taille des particules [Viovy, 2000]. L'introduction d'interactions hydrodynamiques induites par le champ électrique entre chaque bille ou blob composant la molécules est selon les auteurs à l'origine des migration vers le centre ou les parois de la canalisation. Ce constat est d'autant plus affirmé dans cet article que le phénomène de migration est toujours observé et d'impact comparable que les interactions hydrodynamiques avec les parois soient incluses ou non. Ce dernier résultat tend à minimiser l'impact des parois sur la migration transverse (Cf. figure 4.17) devant ce couplage interne entre les segments de la chaîne de polymère.

**Conclusion et mise en perspective des discussions à suivre** La migration vers le bord des canalisation est un candidat parfait à l'explication des performances de séparation atteintes dans notre système. Dans de telles conditions, pourvu que la migration soit dépendante de la taille des molécule, nous pouvons tout à fait entrevoir la possibilité de séparer des molécules par taille. Toutefois, il reste ici encore des points d'ombre qu'il nous incombe de lever.

Si la migration radiale lors d'un actionnement hydride est un fait avéré [Zheng and Yeung, 2002] [Zheng and Yeung, 2003] [Zheng et al., 2004] (et plus récemment [Ren et al., 2012]) les auteurs de ces études ont toujours mis en avant l'impossibilité de séparer les molécules par taille lors d'un actionnement continu. De plus, à la lumière des différents travaux théoriques décrit plus tôt, rien n'indique que cet effet est aussi présent dans notre système compte tenu des taux de cisaillement un ordre de grandeur plus grand et le confinement accru des molécules (chez Zheng  $H/Rg \sim 100$  dans notre système  $H/Rg \sim 10$ ). La prévalence du couplage hydrodynamique intra-chaîne devant les interactions hydrodynamiques chaîne-paroi est loin d'être acquise dans nos conditions d'expérience. Ce constat est d'autant plus vrai que le tenseur de couplage bille-bille par interaction hydrodynamique lors d'actionnement par électrophorèse est proportionnel à un facteur  $f(a/\lambda_D)$  (avec  $\lambda_D$  longueur de Debye) tel que :

$$\begin{aligned} f(a/\lambda_D) &\rightarrow 0 & \lambda_D << a \\ f(a/\lambda_D) &\rightarrow 1 & \lambda_D >> a \end{aligned} \tag{4.7}$$

Ou  $a$  est une taille caractéristique du monomère d'ADN prise égale à 0.34 nm dans [Kekre et al., 2010]. En effet, autre point majeur différenciant nos expériences des expériences de Zheng *et al.* est que nous travaillons à très haute force ionique, telle que la longueur de Debye n'est que d'environ 2 nm contre 30 à 140 nm chez ces derniers.

Ainsi ne pouvons nous prendre pour acquis le phénomène de migration vers les bords de la canalisation dans nos expériences.

#### 4.4.2 Migration transverse en fluide viscoélastique

Comme nous avons pu le décrire, les spécificités du tampon peuvent avoir des conséquences drastiques sur la possible migration des objets dans un écoulement. Des simulations de Kekre *et al.* ressortent que la migration anormale vers les bords est en relation avec la force ionique du fluide. Travaillant dans un tampon TBE 2X, la longueur de Debye dans nos expériences est de l'ordre de 2 nm. Mais il est un autre composant que nous n'avons jusqu'alors pas remis en cause. En effet, nous travaillons dans un

#### 4.4. Migration transverse en microfluidique : pistes bibliographiques pour l'interprétation de la séparation

fluide constitué de chaînes de PVP diluées à 2% en masse soit une concentration  $c \sim 55 \mu\text{M}$ . Or, cette molécule est caractérisée par un rayon de gyration de l'ordre de 25 nm [McFarlane et al., 2010] ce qui équivaut à une concentration critique de recouvrement  $c^*$  donnée par  $c^* = \frac{1}{\frac{4}{3}\pi R_g^3 N_A} \sim 25 \mu\text{M}$ ! Nous sommes donc dans un régime où le fluide porteur a des propriétés viscoélastiques. Cette propriété est d'autant plus importante, qu'un effet de migration en régime non inertiel vers les zones de cisaillement nulle est connu et décrit pour de tels fluides [Ho and Leal, 1976].

Un fluide viscoélastique se caractérise par un comportement intermédiaire entre un solide *élastique* et un liquide visqueux. Il existe de nombreux modèles donnant l'équation caractéristique de ceux-ci. Dans le cas très général du fluide Oldroyd [Oldroyd, 1958], la description d'un fluide non-newtonien passe par l'introduction de 8 paramètres. Avec un seul paramètre, en plus de la viscosité, le modèle de Maxwell [Bird et al., 1960] est l'approximation viscoélastique la plus *simple*. Un fluide de Maxwell est représenté par un amortisseur visqueux mis en série avec un ressort linéaire. Si l'on s'intéresse au cas d'un cisaillement pur à une dimension (les notations sont bien sûr sous forme tensorielle dans le cas général), lorsqu'une contrainte axiale est appliquée, la contrainte totale  $\sigma_T$  et la déformation totale  $\gamma_T$  sont définies de la manière suivante :

$$\sigma_T = \sigma_A = \sigma_R \quad \gamma_T = \gamma_A + \gamma_R \quad (4.8)$$

où l'indice A désigne l'amortisseur et l'indice R le ressort. Ces deux contraintes sont respectivement données par :

$$\sigma_A = \mu \dot{\gamma}_A \quad \sigma_R = E \gamma_R \quad (4.9)$$

où E est le module élastique associé au ressort et  $\mu$  le coefficient de viscosité associé à l'amortisseur. Ces deux grandeurs sont isotropes. Si l'on dérive alors la déformation totale par rapport au temps :

$$\dot{\gamma}_T = \dot{\gamma}_R + \dot{\gamma}_A = \frac{1}{E} \dot{\sigma} + \frac{1}{\mu} \sigma \quad (4.10)$$

Cette équation est l'équation constitutive du liquide, c'est-à-dire reliant l'évolution de sa déformation en fonction de la contrainte. Un fluide newtonien prévoit une relation linéaire directe entre ces quantités. L'histoire de la déformation intervient donc dans l'équation constitutive d'un fluide de Maxwell. En définissant le temps caractéristique de relaxation du fluide :

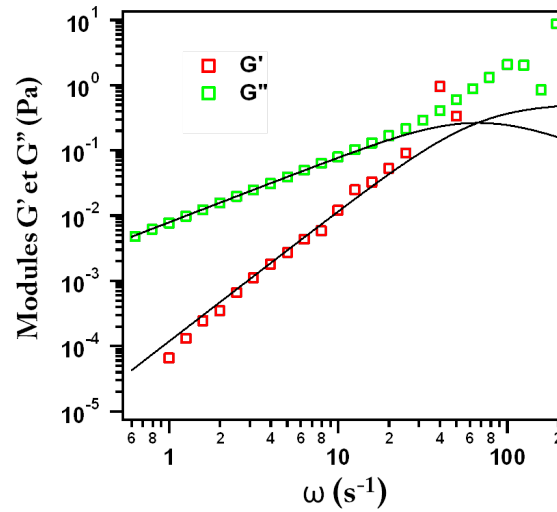
$$\lambda = \frac{\mu}{E} \quad (4.11)$$

On en déduit l'expression de la contrainte, qui dépend de l'histoire du taux de cisaillement imposé :

$$\sigma(t) = \frac{\mu}{\lambda} \int_{-\infty}^t \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda}\right) \dot{\gamma}(t') dt' \quad (4.12)$$

Cette dernière équation est d'importance car elle permet la caractérisation du fluide à l'aide d'un rhéomètre. Notamment, la mesure sous cisaillement oscillant de petite amplitude consiste à imposer une déformation à la fréquence  $\omega$  selon  $\underline{\gamma}(t) = \gamma_0(\omega) e^{i\omega t}$  et on mesure la contrainte associée  $\underline{\sigma}(t) = \sigma_0(\omega) e^{i\omega t + \phi}$ . On définit alors le module de cisaillement complexe  $G^* = G' + iG''$  où  $G'$  est le module de conservation et  $G''$  est le module de perte. Dans le cadre du modèle de Maxwell ceux-ci sont donnés par :

$$G' = \frac{E\omega^2\lambda^2}{1+\omega^2\lambda^2} \quad G'' = \frac{E\omega\lambda^2}{1+\omega^2\lambda^2} \quad (4.13)$$



**FIGURE 4.20** – Modules de conservation et de perte en fonction de la fréquence d'oscillation. Les lignes continues représentent l'ajustement à l'aide du modèle de Maxwell conduisant à  $\lambda = 15.10^{-3} s$  pour une viscosité égale à  $5.5 mPa.s$

Ces mesures ont été menées au laboratoires des IMRCP (Toulouse) avec l'aide de B. Lonetti. Les résultats des mesures en oscillation sont présentées dans la figure 4.20. L'ajustement à l'aide du modèle de Maxwell nous permet de remonter à la valeur du temps caractéristique du fluide  $\lambda \sim 15.10^{-3} s$  connaissant la valeur de la viscosité qui s'est révélée être constante sur toute la gamme de cisaillement imposé  $\mu \sim 5.5 mPa.s$ . L'ajustement semble valide pour des valeurs  $\omega < 100 s^{-1}$ . Le modèle de Maxwell n'est adapté que pour la description du fluide dans cette gamme. En effet, ce modèle prédit correctement le comportement de solutions micellaires, qui sont formées de longs tubes ressemblant à des polymères pour des cisaillements au temps long, et susceptible de se réorganiser dynamiquement dans le cas de contraintes rapides, ce qui lui confère une réponse élastique. Les solutions ou les fondus de polymères ne sont pas correctement décrites par le modèle de Maxwell, et on emploie le plus souvent le modèle de Oldroyd-B, de Giesekus, ou de Dumbbell, qui introduisent tous un paramètre supplémentaire attribué à différents mécanismes moléculaires. Giesekus propose par exemple une non linéarité de la réponse en contrainte, qui permet d'obtenir des comportements non linéaires en viscosité [Bird and Wiest, 1995].

Afin d'appréhender le possible impact de ces effets dans nos systèmes il est utile d'exprimer le nombre le nombre de Deborah  $De$ , le nombre de Reynolds  $Re$  et le ratio des deux défini comme *nombre d'élasticité*  $El$ . Des caractéristiques de nos expériences il vient  $De = \lambda \dot{\gamma}_W \sim 10^{-1}$  à 1,  $Re = 10^{-5}$  à  $10^{-4}$  soit encore  $El \sim 10^2 - 10^3$ . Il apparaît que les effets élastiques dominent clairement.

On dénomme par  $N_1$  et  $N_2$  les différences de contraintes normales de premier et deuxième ordre  $N_1 = \sigma_{xx} - \sigma_{yy}$  et  $N_2 = \sigma_{yy} - \sigma_{zz}$ . Ces différences sont nulles pour des fluides newtoniens, mais non nulles dans le cas d'un fluide non-Newtonien. Dans le cadre d'un fluide de Maxwell  $N_1 = \lambda \mu \dot{\gamma}^2$  et  $N_2 = 0$  dans le cas du cisaillement simple pris pour exemple plus tôt. Par un argument de loi d'échelle, Leshansky *et al.* [Leshansky et al., 2007] ont montré que l'on pouvait approximer par  $F_M \sim a^3 (\partial N_1 / \partial z) / \dot{\gamma}$  la force de migration exercée sur une bille de rayon  $a$  dans un fluide viscoélastique. Ces derniers ont ainsi interprété la focalisation de microparticules dans des capillaires de  $20 \mu m$  de diamètre interne. Le sujet a depuis *le vent en poupe*, et les applications pour la focalisation de particules et même de molécules d'ADN se multiplient [Young Kim et al., 2012] [Giudice et al., 2013]. Ces développements

#### 4.4. Migration transverse en microfluidique : pistes bibliographiques pour l'interprétation de la séparation

sont à notre sens très prometteurs, puisqu'ils augurent la diversification des applications de la microfluidique (historiquement royaume du laminaire Newtonien) et vont dans le sens des systèmes *à fois cool, simples et bon marché* selon les mots de G. Whitesides [Whitesides, 2012]. Dans ce domaine, il est une équipe de l'université de Naples très active [D'Avino et al., 2010] [Villone et al., 2011] [D'Avino et al., 2012] [Villone et al., 2013] [Giudice et al., 2013] qui a très récemment développé une loi d'échelle pour l'expression de la vitesse de migration perpendiculairement aux lignes de champ dans un capillaire [Romeo et al., 2013]. Étant donné le nombre de Deborah caractéristique du fluide (dans nos notations  $De = \lambda \dot{\gamma}_W$ ) les coefficients de contraintes normales  $N_1$  et  $N_2$ , le rayon  $R$  du capillaire le ratio de cette vitesse de migration  $v_M(r)$  sur la vitesse moyenne du fluide  $\bar{v}$  est donné par :

$$\frac{v_M(r)}{\bar{v}} = \left[ -De \left( 1 + C \frac{N_2}{N_1} \right) \left( \frac{a}{R} \right)^2 \frac{r}{R-a} \right] f(a/R) g\left(\frac{r}{R-a}\right) \quad (4.14)$$

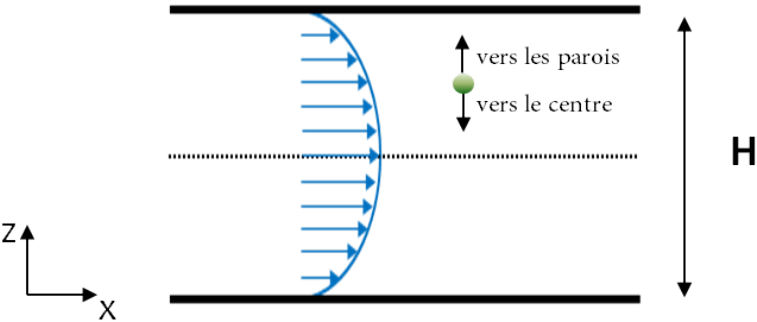
Où  $r$  est la position radiale de la particule,  $C$  une constante,  $f(u) = A + Bu^2$  avec  $A$  et  $B$  des constantes, et  $g\left(\frac{r}{R-a}\right)$  une fonction permettant de prendre en compte le ralentissement hydrodynamique de la particule aux bords.

Toutefois ces études dépeignent des situations dans lesquelles les particules sont libres. Nos conditions expérimentales font plus écho à des situations de particules fixes. Plus proche de notre situation, Dhahir et Walter [Dhahir and Walters, 1989] ont montré qu'un cylindre fixe dans un écoulement de Poiseuille subit une force vers les murs. Cette observation a été confirmée par Carew et Townsend [Carew and Townsend, 1991] par simulation dans un fluide d'Oldroyd-B et de Phan-Thien-Tanner. Plus récemment, Lee *et al.* [Lee et al., 2010] ont, par leurs simulation et méthode des perturbations, encore une fois confirmé l'effet de focalisation vers le centre pour une particule libre et de migration vers les bords pour une particule fixe. Selon leurs mots, dans ce type de fluide, les particules, fixes ou non, migrent toujours vers les zones où le cisaillement est le plus faible. Dans le cas d'une particule fixe, la condition de non glissement à la surface de la particule y impose une vitesse de fluide nulle. Ainsi le gradient de vitesse, dans le cas d'un écoulement Poiseuille, est donc plus fort sur la face la plus proche du centre : d'où une migration vers le bord.

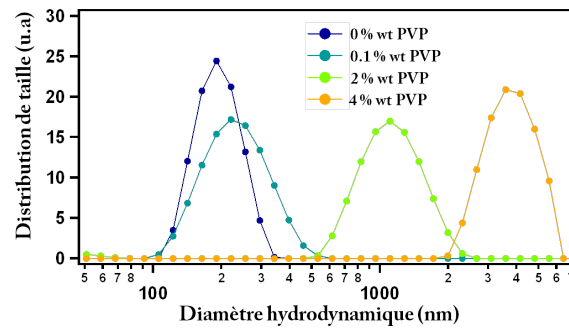
Ces points bibliographiques et sur la nature du fluide renforce un peu plus la nécessité de rechercher si oui ou non un phénomène de migration existe dans nos expériences et, dans le cas d'une réponse positive, de caractériser comment celui-ci se manifeste. La figure 4.21 résume les discussions qui précédent, ou libre et fixe correspondent aux situations où les particules se meuvent librement dans un profil Poiseuille ou une force tend à les ralentir. Les références bibliographiques sont volontairement non exhaustives, mais à notre sens, représentatives.

**Chapitre 4. Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme**

Fluide	Objet	Actionnement	Migration	Commentaires	Références
Fluide Newtonien	ADN	Libre	Vers le centre	Effets d'interactions hydro aux parois+ non homogénéité de la diffusion (effet volcan)	Jendrejack <i>et al.</i> 2003, Ma et Graham 2005, Graham 2011
		Fixe	Vers les parois	Effet d'interactions hydro. en champ électrique ( $\lambda_D$ grand)	Zheng & Yeung. 2002, 2003 Ren <i>et al.</i> 2012, Butler <i>et al.</i> 2007, Kekre <i>et al.</i> 2010
	Particules solides	Libre	Vers le centre	Effets inertiels	Ho & Leal 1974, Zhou & Papautsky 2013
		Fixe			
Fluide viscoélastique	ADN	Libre	Vers le centre	Effet de contrainte normale	Young Kim <i>et al.</i> 2012
		Fixe	?	?	?
	Particules solides	Libre	Vers le centre	Effet de contrainte normale	Leshansky <i>et al.</i> 2007 Romeo <i>et al.</i> 2013
		Fixe	Vers les parois	Effet de contrainte normale	Dhahir et Walter 1989 Lee <i>et al.</i> 2010



**FIGURE 4.21** – Évidences des phénomènes de migration transverse dans la bibliographie pour les fluide non-newtonien et viscoélastiques.



**FIGURE 4.22** – Évolution du diamètre hydrodynamique ( $d_h$ ) apparent de traceurs de  $d=200$  nm dans des solutions de diverses concentrations en PVP.

[PVP] (% wt)	0 %	0.1 %	2%	4 %
$d_h$ (nm)	196	240	1162	3834
$\mu$ (mPa.s)	0.93	1.14	5.5	18.15

**TABLE 4.1** – Évolution des diamètres hydrodynamiques apparents des traceurs et viscosités associées

## 4.5 Comprendre la séparation : expériences en molécules uniques

### 4.5.1 Effet de la concentration en PVP sur l'efficacité de la séparation

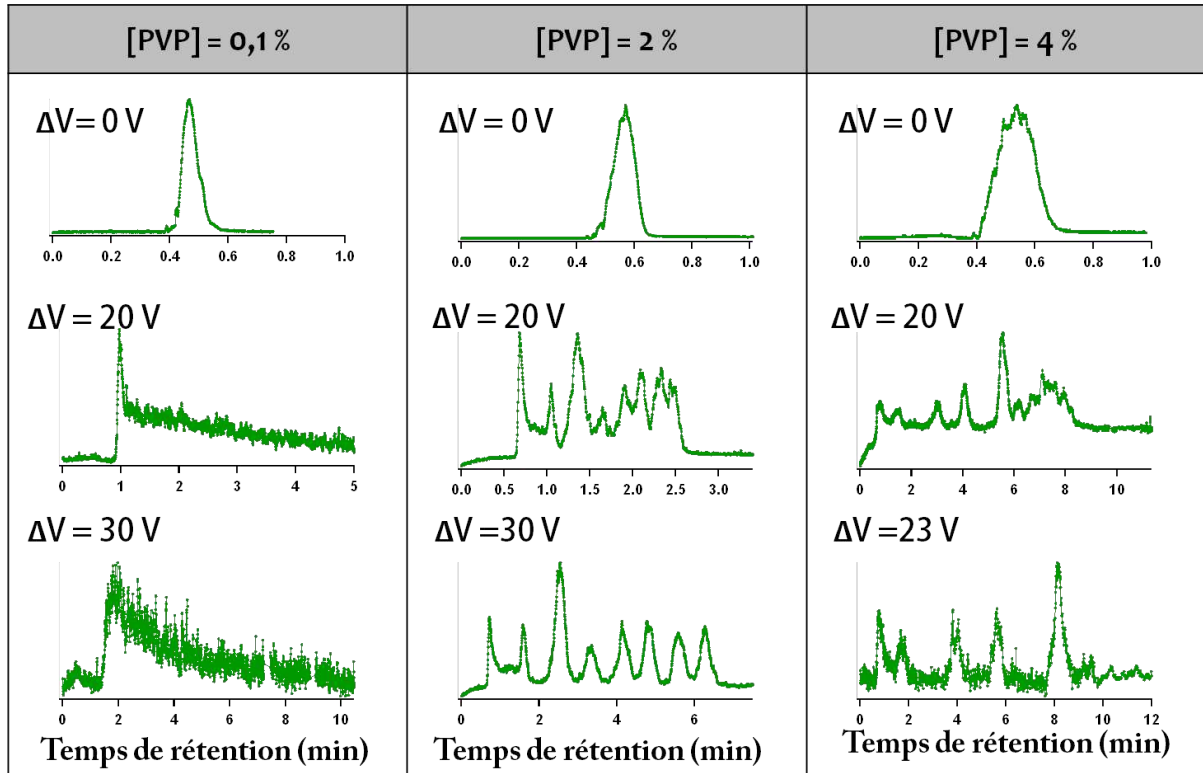
Comme discuté plus tôt, le caractère viscoélastique du fluide porteur utilisé dans nos expériences peut potentiellement impacter l'efficacité de séparation. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris des expériences de séparation d'un kb ladder pour différentes concentration en PVP (360 kDa) à force ionique constante (TBE 2X). Nous avons pour cela choisi de travailler à des concentrations en masse de 0.1, 2, et 4 % en PVP. Celles-ci équivalent respectivement à des concentrations 10 fois inférieures, 2 et 4 fois supérieures à la concentration de recouvrement critique en PVP. L'augmentation de la concentration en polymère amenant une augmentation de viscosité, nous avons caractérisé l'évolution de cette dernière à l'aide d'expériences de diffusion de lumière comme décrit dans la partie *méthodes* de ce manuscrit. Les distributions en taille *apparente* des particules sont présentées en figure 4.22. Cette caractérisation nous permet d'adapter les chutes de pression afin de travailler à vitesse d'écoulement comparable<sup>4</sup> (Les diamètres moyens apparents ainsi que les viscosités déduites sont présentées dans la table 4.1).

Les expériences de séparation pour différentes concentration en PVP ont été conduites dans des fentes de  $2\text{ }\mu\text{m}$  de hauteur, un canal principal de 7 mm de longueur totale et une longueur de migration de 4,8 mm. Les pressions ont été ajustées respectivement à 100, 500, 1600 mbar pour les tampons de concentration 0.1 %, 2%, 4% (wt %) en PVP.

Les chromatogrammes obtenus pour différentes différences de tension sont présentés en figure 4.23.

**Chromatogrammes correspondant à  $\Delta V = 0V$**  Ces chromatogrammes confirment l'impossibilité de séparer par taille les différentes espèces composant le ladder. Les courbes sont composées d'un seul pic, *approximativement* gaussien. En terme de temps d'arrivée moyen, notre stratégie d'ajustement

<sup>4</sup>La vitesse moyenne de l'écoulement varie selon l'inverse de la viscosité selon la loi de Poiseuille.



**FIGURE 4.23** – Évolution du diamètre hydrodynamique ( $d_h$ ) apparent de traceurs de  $d=200 \text{ nm}$  dans des solutions de diverses concentrations en PVP.

des chutes de pression semble avoir payé puisque ceux-ci sont sensiblement égaux. On remarque aussi, à viscosité croissante, l'augmentation de la dispersion des pics, point sur lequel nous souhaitons nous arrêter un instant. Notre expérience est quasiment réalisée dans le régime de la diffusion de Taylor-Aris [Taylor, 1953] [Aris, 1956] [Alizadeh et al., 1980]. Ce régime est établi lorsque le temps de diffusion transverse des molécules est très inférieur au temps d'advection longitudinal. Soit pour des molécules de coefficient de diffusion  $D$  migrant à une vitesse moyenne  $\bar{v}$  sur une longueur  $L_{mig}$  dans une canalisation de hauteur  $H$  :  $H^2/D \ll L_{mig}/\bar{v}$ . Or le temps de diffusion selon la hauteur de la plus grosse molécule (10 kbp) dans le tampon de viscosité maximale (4 % PVP) vaut environ 20 s soit une durée proche de la durée totale de la migration. Nous considérons ce modèle pour les ordres de grandeur. Dans une canalisation de hauteur  $H$  dans laquelle s'écoule une espèce de coefficient de diffusion  $D_0$ , le coefficient de diffusion augmentée de Taylor est donné par :

$$D_T = D_0 + \frac{\bar{v}^2 H^2}{210 D_0} \quad (4.15)$$

où  $\bar{v}$  est la vitesse moyenne du fluide. Si l'on néglige le premier terme devant le second (5 ordres de grandeur les séparent dans le cas le plus défavorable), on obtient que, pour deux valeurs de viscosité  $\mu_1$  et  $\mu_2$  et dans les mêmes conditions d'actionnement le rapport des coefficients de diffusion est donné par :

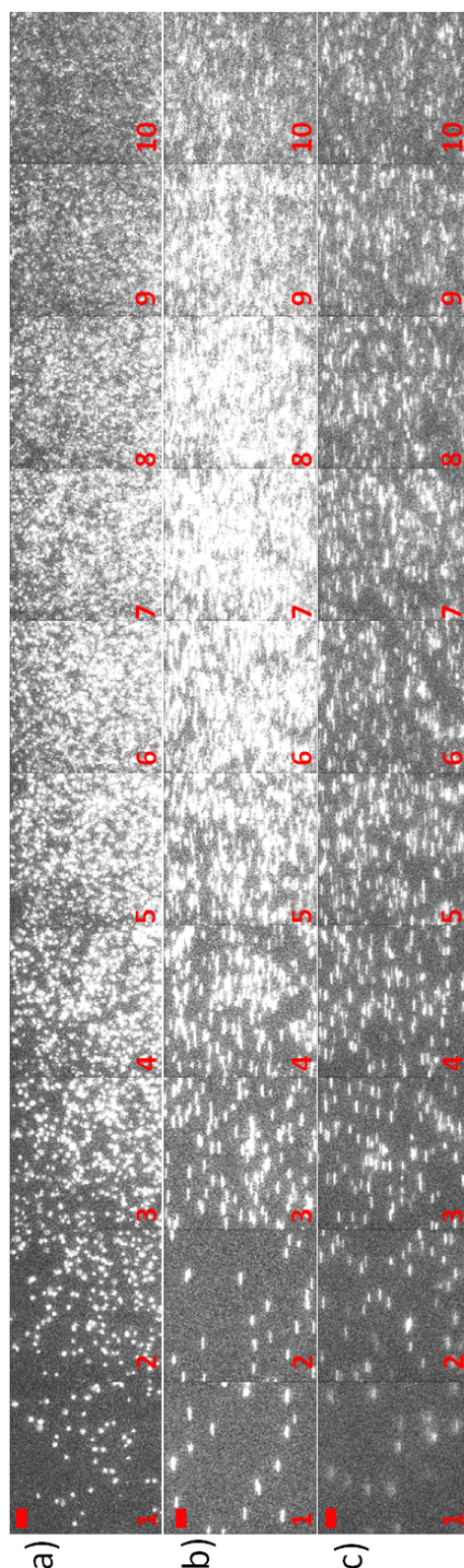
$$\frac{D_T^1}{D_T^2} \sim \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (4.16)$$

Ainsi observera-t-on une dispersion plus forte dans le cas d'un fluide plus visqueux ce qui est en accord avec les observations faites sur la largeur du pic composant les chromatogrammes. Ce fait tient



au temps d'équilibre par diffusion plus grand des espèces dans la canalisation, favorisant l'effet de diffusion augmentée sous cisaillement.

Notons enfin qu'un effet nous est impossible de quantifier avec les seuls chromatogrammes. Comme le montrent les montages effectués et présentés en figure 4.24, les espèces de plus haut poids moléculaire arrivent majoritairement en avance sur celles de plus petite taille. Cet effet est sensible si l'on s'intéresse à l'intensité individuelle des molécules, celle-ci étant proportionnelle à la taille (les points les plus brillants semblent arriver majoritairement en premier). Bien que difficilement quantifiable, cet effet va le sens d'une migration plus rapide des molécules les plus grosses due à une exclusion stérique plus importante aux bords [Liu et al., 2011], une migration préférentielle vers le centre dirigée par les interactions hydrodynamiques [Graham, 2011], ou encore, pour les solutions concentrées en PVP, une migration vers le centre dirigée par les contraintes normales [Romeo et al., 2013]. Cet effet est particulièrement visible sur les panneaux a) et b) ; la condition [PVP] = 4 % wt (panneau c)) ayant été menée ultérieurement aux autres, elle est entachée de plus de bruit.



**FIGURE 4.24** – Série temporelle d'images de fluorescence correspondant aux conditions a)  $[PVP] = 0.1 \text{ wt } \%$ ,  $[PVP] = 2 \text{ wt } \%$ ,  $[PVP] = 4 \text{ wt } \%$  pour des vitesses maximales de fluide équivalentes et  $\Delta V = 0V$ . L'intervalle entre les images est de a) 0.5 s b) 0.98 s c) 1.3 s

**Chromatogrammes correspondant à  $\Delta V > 0V$**  S'intéressant à la colonne [PVP] = 0.1 % il apparaît que l'intensité de fluorescence mesurée par le détecteur présente un pic décroissant lentement pour  $t \rightarrow \infty$ . A priori, cela semble consistant avec le fait qu'augmenter la vitesse électrophorétique  $v_e$  augmente la dispersion sur le temps d'arrivée. En effet, considérons des espèces infiniment petites devant la hauteur de la canalisation et animée d'une vitesse  $v = v_h(z) - v_e$ , où  $v(z)$  est la vitesse est la vitesse du fluide à une altitude  $z$ . Sans effet de migration, celles-ci ont une vitesse moyenne donnée par  $\bar{v} = \frac{2}{3} v_0 - v_e$  et l'on peut exprimer la dispersion par

$$\Delta v = \sqrt{\langle v^2 \rangle - \bar{v}^2} = \sqrt{\frac{4}{45}} v_0 \quad (4.17)$$

On remarquera que cette dernière ne dépend pas de  $v_e$  que l'on a supposée constante sur la hauteur de la canalisation. Ainsi peut-on estimer la dispersion sur le temps d'arrivée  $\bar{\tau}$  par

$$\frac{\Delta \bar{\tau}}{\bar{\tau}} = \frac{\Delta L_{mig}}{L_{mig}} + \frac{\Delta \bar{v}}{\bar{v}} \quad (4.18)$$

Si l'on néglige maintenant la dispersion sur la longueur de migration il vient :

$$\frac{\Delta \bar{\tau}}{\bar{\tau}} \sim \frac{1}{1 - \frac{v_e}{v_0}} \quad (4.19)$$

Soit une quantité qui diverge pour  $v_e \rightarrow v_0$ . Toutefois, considérant la mobilité électrophorétique de l'ADN  $\sim 2.510^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [Ou et al., 2009] [Randall and Doyle, 2006]<sup>5</sup>, il vient que dans nos conditions  $v_0 \sim 220 \mu\text{s}^{-1}$  et  $v_e \sim 20 \mu\text{s}^{-1}$  soit encore  $v_e/v_0 \sim 0.08$  qui implique une augmentation d'environ 10 % de la dispersion relativement à celle en champ nul. Il s'avère que cet argument d'échelle ne peut expliquer la dispersion des mesures expérimentales à [PVP] = 0.1 %. Ce constat est d'autant plus vrai que nous n'avons pris en compte pour le dériver l'exclusion stérique des molécules proches de la parois qui a pour effet d'exclure des zones de vitesse nette négative. Nous argumentons donc que cet effet ne peut être expliqué sans supposer une probabilité de présence accrue des molécules vers la parois et donc l'existence une force de migration transverse en fluide simple. Cette conclusion est obtenue par des mesures indirectes, et devrait être approfondie par des expériences complémentaires qui n'ont pas été menées dans cette thèse.

S'intéressant à la colonne [PVP] = 2 % nous retrouvons des résultats similaires à ceux observés précédemment. Les bandes de plus haut poids moléculaire migrent plus lentement et sont correctement définies pour sur le chromatogramme  $\Delta V = 30 \text{ V}$ . Le pic de plus haute intensité ( $t \sim 2.5 \text{ min}$ ) correspond à la bande N=3000 bp. Cinq bandes (4, 5, 6, 8, 10 kb) arrivent postérieurement à cette dernière, et deux antérieurement, ce qui témoigne du fait que les bandes 0.5, 1 et 1.5 kb sont mal résolues pour cette combinaison de chute de pression et différence de tension.

Les chromatogrammes obtenus pour [PVP] = 4 % apparaissent plus bruités que les précédents. Ceci est lié au fait qu'ils ont été obtenus ultérieurement à tous les autres, et à l'augmentation d'un signal de fluorescence parasite lié à l'adsorption non spécifique de molécules. Ces résultats permettent toutefois de dessiner les effets de l'augmentation PVP dans la solution. À différence de tension égale  $\Delta V = 20 \text{ V}$ , les bandes de bas poids moléculaires sont bien mieux résolues et migrent plus lentement qu'avec une

<sup>5</sup>Valeur que nous aurons par la suite l'occasion de vérifier.

## Chapitre 4. Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme

---

concentration en PVP égale à 2%. La bande  $N = 3000$  bp arrivant à  $t \sim 5.5 \text{ min}$  nous sert ici de repère. Les bandes de haut poids sont elles ramassées en une "patate" d'intensité si bien qu'il est impossible de les distinguer. Ce constat se confirme pour  $\Delta V = 23 \text{ V}$  où seules les bandes 0.5, 1, 1.5, 2 et 3 kb sont éluées avec une résolution jusqu'alors jamais atteinte si l'on met de côté la faiblesse du signal. La disparition des bandes  $N > 3000$  bp semblent aller dans le sens d'une force de lift vers les bords d'autant plus forte que le nombre de Deborah du fluide porteur est grand. La migration de concert des bandes  $N > 3000$  paires de bases observée sur le chromatogramme  $\Delta V = 20 \text{ V}$  peut s'interpréter par le fait que chacune de ces molécules, et indépendamment de leur taille, migrent en moyenne à une altitude très similaire dans la canalisation.

En conclusion ces expériences nous permettent de mettre en avant les points suivants :

- L'analyse des chromatogrammes à  $\Delta V = 0 \text{ V}$  ne permet pas, considérant la dispersion des pics, de conclure à une migration des espèces au sein de la canalisation et ce quelle que soit la concentration en PVP. Un regard plus poussé sur les films acquis semble indiquer que les espèces de plus haut poids moléculaire migrent plus rapidement. Cette dernière observation est cohérente avec les phénomènes de migration vers le centre décrit plus tôt pour des particules *libres*, dans un fluide Newtonien ou viscoélastique.
- Nous avons indiqué que l'allure des courbes d'intensité acquises pour  $[\text{PVP}] = 0.1 \%$  ne pouvait s'expliquer sans phénomène de migration vers les bords. Ce constat semble être en adéquation avec les résultats de Zheng et Yeung [Zheng and Yeung, 2003]. Ces expériences nous ont aussi confirmé l'impossibilité de séparer les espèces moléculaire par taille dans un régime d'application en continu des champs hydrodynamique et électrophorétique.
- Des expériences à plus haute concentration en PVP nous pouvons retirer qu'une plus haute concentration en polymère neutre dans le tampon conduit à une meilleure résolution des espèces de bas poids moléculaire.

Au demeurant, cette étude apporte à la versatilité de notre technique de séparation. Nous avons jusqu'alors mis en avant que vitesse moyenne du fluide et vitesse électrophorétique pouvaient être ajustées à souhait afin d'optimiser la résolution d'une certaine gamme du spectre des tailles contenues dans l'échantillon. À ces deux paramètres vient ainsi s'ajouter la concentration en polymère neutre contenu dans le tampon de migration. Cette adaptabilité est à mettre en balance avec la technique d'électrophorèse sur gel, où l'on ne dispose que de deux variables d'ajustement, à savoir l'amplitude du champ électrique et la concentration en polymère.

### 4.5.2 Une preuve directe de la migration vers les bords

#### Probabilité de présence des molécules selon $z$

Les conclusions tirées des chromatogrammes, bien que fort utiles, ne constituent pas une preuve *directe* de la migration vers les parois des molécules. Afin de remédier à ce constat nous avons imaginé un protocole expérimental inspiré des expériences de suivi de molécules individuelles. Travaillant avec des molécules d'ADN  $\lambda$  ( $N = 48502$  bp [Sanger et al., 1982]) dans des conditions (tampon et

mode d'actionnement) identiques à celles de la séparation, il nous est apparu qu'à chute de pression imposée, une différence de tension unique permettait de stopper les molécules. Tout comme l'ont observé et publié au cours de cette thèse Ren *et al.* [Ren et al., 2012] la molécule adopte alors une conformation globulaire, d'extension bien inférieure à celle présentée en écoulement hydrodynamique seul. L'illustration du piégeage d'une molécule d'ADN est donné avec la figure 4.25.

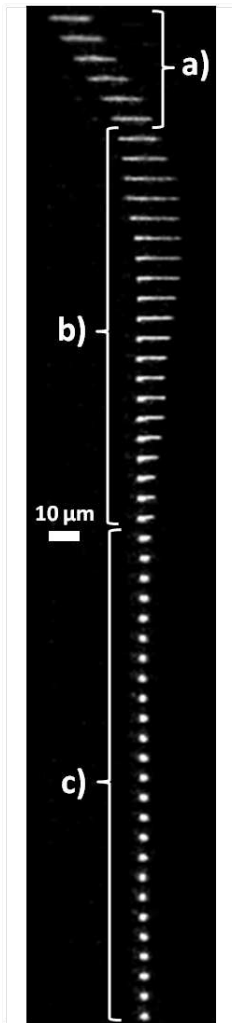


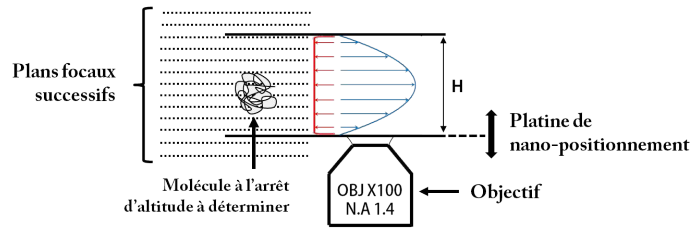
FIGURE 4.25 – Illustration du piégeage d'une molécule

Cette figure présente un montage d'images espacées de 16.7 ms et illustre les phases du piégeage. En phase a) la molécule est libre et se meut dans le fluide qui s'écoule ici de gauche à droite et est caractérisé par une vitesse maximale  $v_0 = 250 \mu m.s^{-1}$ . La molécule est alors partiellement étirée et présente une longueur bout à bout d'environ  $12 \mu m$ . b) Un champ électrique, d'amplitude  $E = 13.5 V.cm^{-1}$  est alors appliqué. Celui-ci crée une force d'origine électrophorétique sur la molécule s'opposant à son mouvement dans le fluide. Cette dernière commence alors à s'étirer pour atteindre une longueur maximale d'environ  $17 \mu m$ , soit près de 80 % de sa longueur de contour. Elle relaxe ensuite jusqu'à aboutir à une conformation globulaire stable, d'extension fixe c). L'étude de ces dynamiques de relaxation a été ébauchée par Ren *et al.* [Ren et al., 2012] et ne fera pas l'objet de ce manuscrit.

Pour l'heure, notre sujet portera sur la phase c). Nous avons évoqué plus tôt que la limite de résolution axiale de la microscopie en champ large était incompatible avec le repérage d'objets selon la direction parallèle à l'axe optique ( $z$ ). Cette assertion n'est vraie que pour des objets rapides, tel qu'il est impossible d'effectuer un balayage selon la direction  $z$ . En phase c) les molécules sont quasiment immobiles, si bien qu'il est possible de les garder dans le champ d'observation et de balayer l'épaisseur du canal. On peut ensuite déconvoluer les positions des molécules en  $z$  par repérage du maximum d'intensité.

Ayant disposé la puce microfluidique sur une platine de nano-positionnement, la procédure mise en place se résume par les étapes qui suivent et est schématisée en figure 4.26 :

1. Étant donnée une vitesse de fluide dans le canal imposée par la chute de pression, l'amplitude du champ électrique est ajustée de façon à stopper (au phénomène de diffusion près) le mouvement des molécules suivant la direction du flux, puis le générateur de tension et la source lumineuse sont éteints,
2. La platine est positionnée de manière à ce que le plan focal soit situé plus bas que la partie basse de la canalisation,
3. la source lumineuse toujours éteinte, le champ électrique (d'amplitude prédéfinie) est appliqué,
4. la source est allumée et l'axe  $z$  balayé sur une gamme et avec un incrément  $\delta z$  prédéfinis,
5. la synchronisation de la caméra sur les mouvements de la platine permet l'acquisition d'une image de fluorescence par altitude.



**FIGURE 4.26** – Illustration de la procédure d'acquisition d'images

Cette procédure permet de suivre l'intensité rayonnée par les molécules suivant la hauteur de la canalisation. Travailler en régime très dilué nous permet de suivre une et une seule molécule à la fois, mais surtout de repérer son centre de masse de manière précise. Les empilements d'images acquis ont été subdivisés afin d'isoler les molécules<sup>6</sup>. Un suivi du maximum d'intensité rayonnée a été conduit à l'aide du logiciel ImageJ pour  $\sim 80$  molécules par condition ( $\Delta P, \Delta V$ ). Cette étude a été menée pour deux fentes de hauteurs  $H = 2$  et  $12 \mu m$ . Un montage d'images acquises pour différentes altitudes dans cette dernière hauteur est présenté en figure 4.27. Il apparaît sur celle-ci que les molécules semblent préférentiellement focalisées sur deux plans distants d'environ  $H$ . Ceux-ci sont repérés par 1) et 2). Notons que la rupture d'indice optique aux interfaces verre/PDMS et PDMS/verre conduit à une *distorsion* de la mesure de la hauteur (effet poisson dans son bocal ou masque de plongée). Considérant les indices optiques de ces matériaux, la coordonnée  $z_{réél}$  peut être obtenue à partir de l'altitude  $z_p$  de la platine reliées dans l'approximation de Gauss par l'expression :

$$z_{réél} = \frac{n_{H_2O}}{n_{verre}} \left( z_p - e \frac{n_{verre}}{n_{PDMS}} \right) \quad (4.20)$$

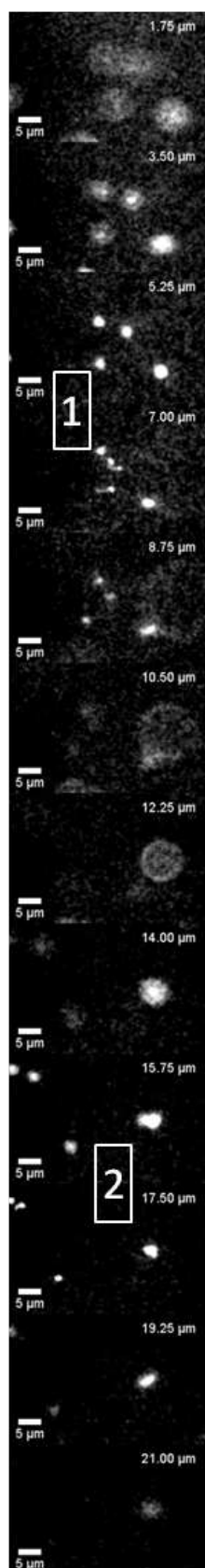
Où  $e$  est l'épaisseur de la couche de PDMS. Notons que pour éviter d'avoir à repérer la position exacte du bas de la canalisation<sup>7</sup>, nous avons raisonné en altitude relative, et invoqué la symétrie plane par rapport au centre de la canalisation que doivent satisfaire les distributions de densité en application du principe de Curie [Curie, 1894], cette procédure ayant aussi pour avantage de corriger la dérive temporelle inéluctable de la hauteur du système.

### Résultats obtenus dans des canalisations de hauteur $H = 2$ et $12 \mu m$

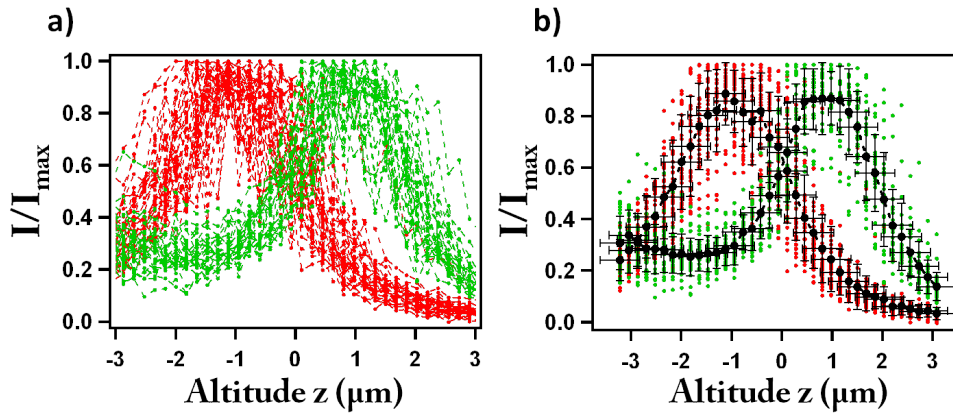
Cette procédure a été menée sur une canalisation de  $2 \mu m$  de hauteurs pour plusieurs débits et amplitudes de champ électrique. La figure 4.28 présente les résultats du suivi de l'intensité en fonction de l'altitude pour une vitesse maximale au centre de la canalisation de  $v_0 = 240 \mu m.s^{-1}$  et une amplitude du champ électrique  $E = 9.6 V.cm^{-1}$ . Afin de simplifier la lecture des graphiques, les courbes d'intensité ont été normées sur la valeur maximale atteinte. Aussi avons-nous mis en place un tri des trajectoires selon le critère  $\bar{z} < 0 \mu m$  et  $\bar{z} > 0 \mu m$  où  $\bar{z}$  est la valeur moyenne de l'altitude pondérée par l'intensité acquise au cours de la course de la platine. Ce simple critère permet ainsi de classer les molécules en deux groupes, celles majoritairement plus proches du haut ou du bas de la canalisation. Ces derniers correspondent respectivement aux couleurs verte et rouge sur les graphiques de la figure 4.28 a). Il apparaît à la lumière de ces données que la zone centrale de la canalisation est dépeuplée et que

<sup>6</sup>Notons qu'afin d'éviter la saturation des pixels autour du maximum d'intensité nous avons procédé à un filtrage passe-bande des empilements d'images.

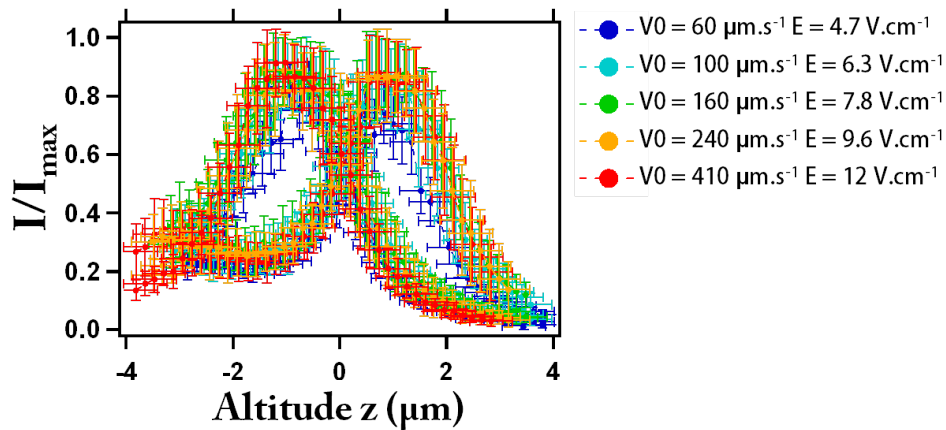
<sup>7</sup>Une procédure commune consiste à mettre à profit l'adsorption d'objets fluorescents sur la surface Cf. par exemple [Joseph and Tabeling, 2005]. Or cet événement n'est que très rarement observé pour des molécules d'ADN dans des canalisations traitées avec du PVP.



**FIGURE 4.27** – Images acquises pour différentes altitudes du plan focal dans une canalisation de hauteur  $H=12\text{ }\mu\text{m}$ . Les indices 1 et 2 indiquent approximativement les positions où les molécules sont "focalisées". Les altitudes indiquées sont relatives et corrigées pour l'effet de rupture d'indice optique. Conditions d'actionnement  $v_0 = 300\text{ }\mu\text{m.s}^{-1}$ ,  $E = 5.2\text{ V.cm}^{-1}$



**FIGURE 4.28** – Suivi de l'intensité maximale normée en fonction de l'altitude dans une canalisation de hauteur  $H = 2 \mu\text{m}$  pour  $v_0 = 240 \mu\text{m.s}^{-1}$  et  $E = 9.61 \text{ V.cm}^{-1}$ , [PVP] = 2% wt. a) Données brutes. b) Données superposées aux valeurs moyennes sur toutes les trajectoires.

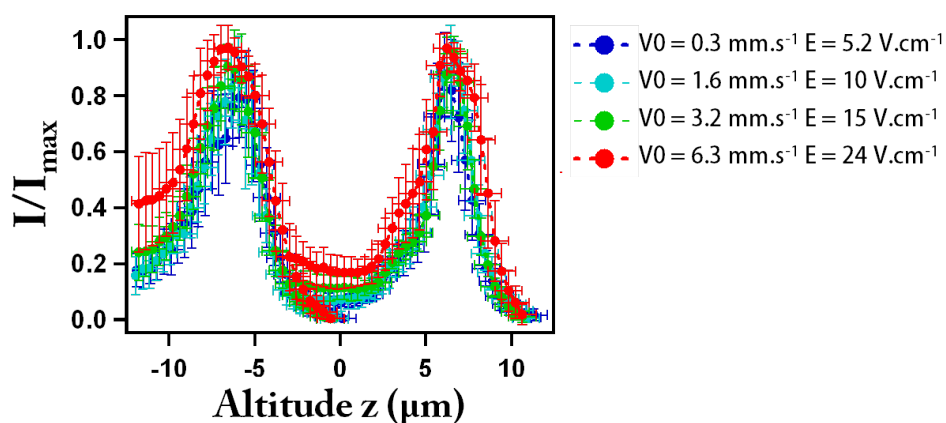


**FIGURE 4.29** – Évolution des intensités maximales moyennes pour différentes vitesses maximales du fluide et amplitudes de champ électrique associées.  $H = 2 \mu\text{m}$ , [PVP] = 2% wt

les molécules occupent préférentiellement les zones proches des parois. Le cadran b) présente la procédure de moyennage des molécules appartenant aux mêmes groupes ainsi que les barres d'erreurs associées. Les deux maxima d'intensité apparaissent séparés d'une distance de  $2 \mu\text{m}$  environ, soit la hauteur de la canalisation. La figure 4.29 présente les résultats, en terme d'intensité moyennées pour différentes chutes de pression et tensions telles que  $v_0 \in [60, 410] \mu\text{m.s}^{-1}$  et  $[4.7, 12] \text{ V.cm}^{-1}$ . Il apparaît sur ces figures que quel que soit le débit imposé, la probabilité de présence des molécules admet toujours deux maxima proches des parois. Toutefois, les barres d'erreurs nous empêchent de conclure sur l'évolution de la position des maxima en fonction du couple  $[v_0, E]$ .

Ce constat étant, nous avons ensuite mené le même type d'expérience dans une fente de hauteur plus importante  $H = 12 \mu\text{m}$ . La limite de résolution optique étant constante (pour un même indice de réfraction du milieu et une même ouverture numérique), aller vers un confinement moins important présage un suivi de l'évolution spatiale d'intensité mieux résolu. Les courbes ainsi obtenues sont présentées dans la figure 4.30. Notons qu'un temps d'équilibre plus important que pour la fente de hauteur  $H = 2 \mu\text{m}$  s'est révélé nécessaire après application du champ. Encore une fois les erreurs entachant les mesures ne permettent de déterminer si les couples  $[v_0, E]$  permettant l'arrêt des molécules impactent





**FIGURE 4.30** – Évolution des intensités maximales moyennes pour différentes vitesses maximales du fluide et amplitudes de champ électrique associées.  $H = 12 \mu\text{m}$ ,  $[\text{PVP}] = 2\% \text{ wt}$

la distribution d'équilibre. Toutefois, cette expérience nous permet d'entériner l'effet de migration vers les parois des molécules puisque les pics d'intensité sont encore éloignés d'une distance comparable à  $H$ .

Les mesures présentées ici ne sont valables que pour des combinaisons de vitesse de fluide et d'amplitude de champ électrique permettant l'arrêt des molécules. Or, dans les expériences de migration, cette situation n'est pas souhaitée puisque les espèces moléculaires contenues dans l'échantillon doivent avoir un mouvement global vers le détecteur. Afin de nous rapprocher de cette situation, des mesures de dynamiques de suivi de molécules ont été réalisés. Ceux-ci font l'objet de la prochaine sous-partie.

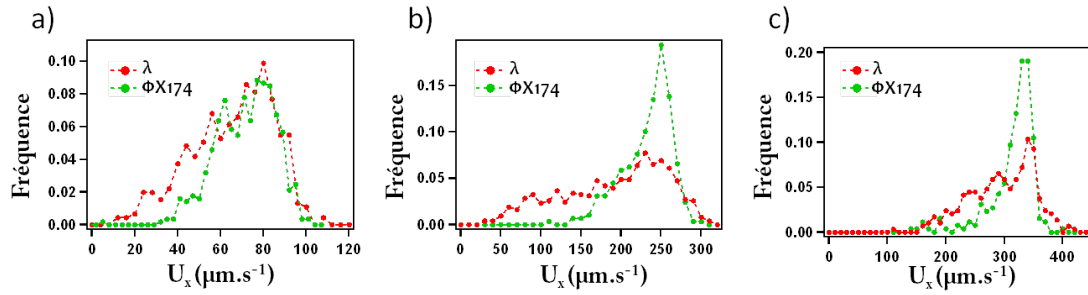
### 4.5.3 Étude en mouvement

La limite de résolution axiale en microscopie à champ large ne nous permet pas d'obtenir la position en  $z$  des molécules en mouvement. Dans la mesure où la migration transverse est avérée, une mesure des propriétés de transport des molécules peut apporter des éléments d'importance, telle que la conformation des molécules, la distribution des vitesses suivant les conditions d'actionnement. Nous avons donc mené une expérience pour trois débits différents dans une canalisation de  $2 \mu\text{m}$  de hauteur et nombreuses conditions d'amplitude de champ électrique. Deux espèces d'ADN ( $\lambda$  48502 bp et  $\Phi X174$  5386 bp) ont été diluées dans un tampon identique à celui de séparation (TBE 2X, PVP 2%) et étudiées dans une canalisation de hauteur  $H = 2 \mu\text{m}$ . En milieu infini ces molécules sont caractérisées par des rayons de gyration de l'ordre de 700 et 200 nm<sup>8</sup>. Lors du traitement des données, chaque espèce a pu être isolée suivant son intensité de fluorescence variant dans un rapport 9 :1 entre les deux molécules (proportionnel à la différence de taille).

#### Transport en champ hydrodynamique seul

la figure 4.31 présente les histogrammes de vitesses obtenus en champ nul pour les deux molécules. Les panneaux a) b) et c) correspondent aux résultats obtenus pour des chutes de pression  $\Delta P = 100$ , 200 et 300 mbar. Les distributions présentées font écho à celle que nous avons pu présenter dans le

<sup>8</sup>Calcul pour une chaîne gaussienne.



**FIGURE 4.31** – Histogrammes des vitesses sans champ électrique s’opposant au mouvement des molécules dans le fluide. a)  $\Delta P = 100 \text{ mbar}$ , b)  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$ , c)  $\Delta P = 300 \text{ mbar}$ .  $H = 2 \mu\text{m}$ ,  $[\text{PVP}] = 2\% \text{ wt}$ .

chapitre concernant la caractérisation d’écoulements à l’aide de traceurs sphériques solides. Celles-ci présentent un pic commun situé respectivement à 80, 250 et 330  $\mu\text{m.s}^{-1}$ . Une disparition plus importante des états de basse vitesse semble caractériser les distributions de  $\lambda$  par rapport à  $\Phi\text{X174}$ . Cet effet de dépeuplement peut être dû à la simple différence de taille des molécules ou à une migration plus importante vers le centre des molécules les plus grosses. La croissance du pic des distributions pour  $\lambda$  avec  $\Delta P$  semble aller dans le sens d’une migration plus importante vers le centre pour des débits plus importants et est cohérente avec les éléments de bibliographie décrits plus tôt.<sup>9</sup>

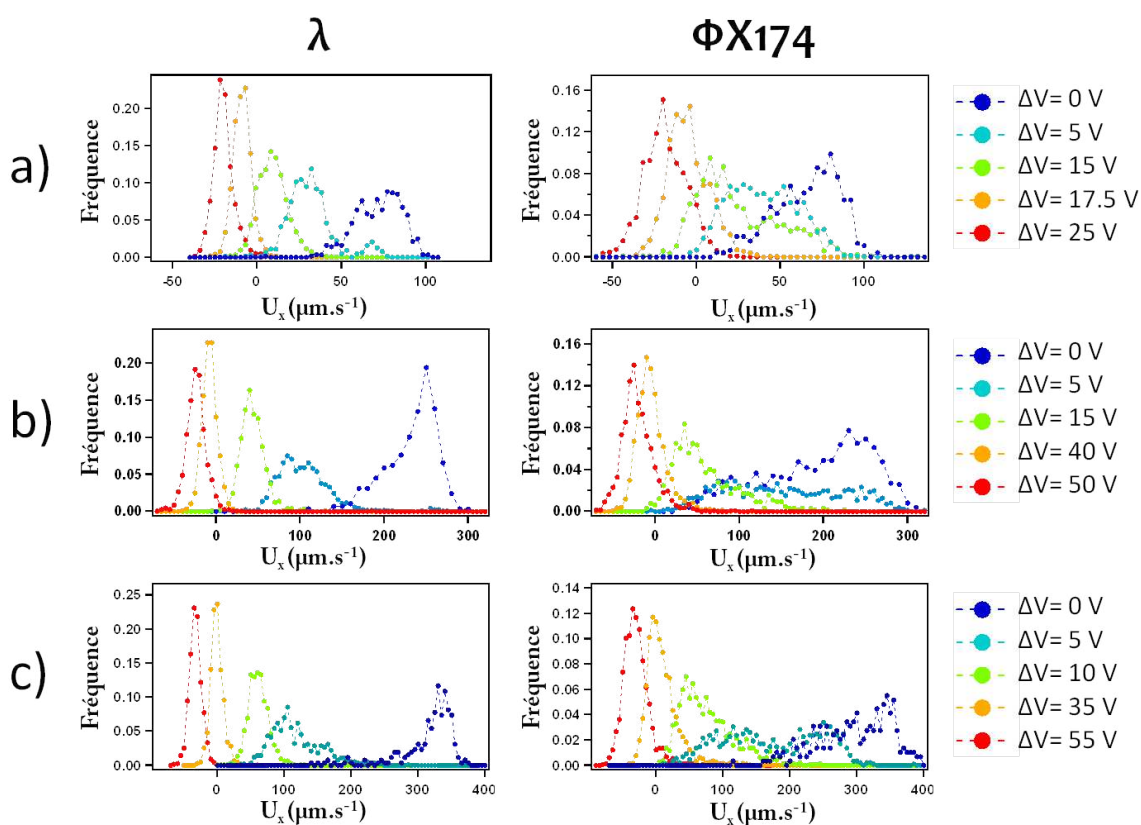
### Migration et localisation spatiale

La figure 4.32 correspond aux histogrammes des vitesses de chacune des molécules pour a)  $\Delta P = 100 \text{ mbar}$ , b)  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$ , c)  $\Delta P = 300 \text{ mbar}$  pour différentes valeurs de la différence de tension  $\Delta V$  appliquée aux extrémités du canal. La conversion de cette valeur en vitesse électrophorétique des molécules a été obtenue par suivi de molécule sans champ hydrodynamique et est donnée en figure 4.33. Sans champ électrique, les distributions sont piquées autour d’une valeur commune aux deux espèces et que l’on peut assimiler à la vitesse du fluide au centre de la canalisation. En effet, nous faisons ici l’hypothèse que, ces pics étant communs aux molécules, et devant la faible valeur du rayon de gyration de  $\Phi\text{X174}$ , ceux-ci doivent être peu ou prou localisés en  $v_0$ . Plus riche est l’évolution de ces distributions à champ électrique non-nul. À faible champ ( $\Delta V = 5 \text{ V}$ ) la distribution de vitesse de  $\Phi\text{X174}$  est très délocalisée et s’étend de 0 à 280  $\mu\text{m.s}^{-1}$  pour  $\Delta P = 200 \text{ mbar}$  soit la quasi totalité des états de vitesses disponibles. Les distributions de vitesses se rassemblent à champ électrique croissant et adoptent une dispersion minimale pour des vitesses moyennes nulles. Cet abaissement de la dispersion fait écho à la migration transverse décrite plus tôt. Le phénomène de migration est progressif et apparaît dès qu’un champ électrique s’oppose au mouvement des espèces dans la direction du fluide.

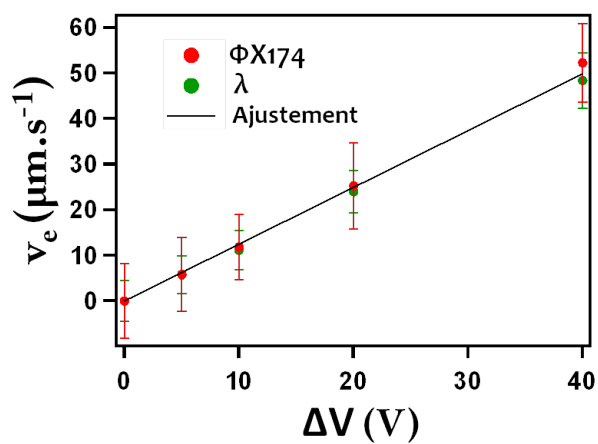
La figure 4.34 présente les vitesses moyennes des molécules pour différentes conditions d’actionnement. Ces vitesses sont tracées en fonction de la vitesse électrophorétique  $v_e$  des molécules sans écoulement, déduite de la courbe expérimentale de calibration 4.33.

Ces différents graphiques montrent une décroissance de la mobilité effective des molécules avec deux régimes différents : une décroissance rapide de la vitesse de migration des molécules avec la vitesse électrophorétique, suivie d’un régime de variation plus lent. Ce comportement est surtout visible pour les vitesses d’écoulement importantes, et la transition entre les deux régimes semble être d’autant plus

<sup>9</sup>Il est important de remarquer que la variation de la position du pic principal n’est pas linéaire en  $\Delta P$ , témoignant d’un bouchage partiel de l’entrée de la canalisation au cours du temps. Ce constat limitera nos conclusions par la suite.



**FIGURE 4.32** – Histogrammes des vitesses des molécules pour différentes conditions de différence de tension  $\Delta V$  et a)  $\Delta P$ )=100 mbar, b)  $\Delta P$ )=200 mbar, c)  $\Delta P$ )=300 mbar.



**FIGURE 4.33** – Vitesse électrophorétique des molécules en fonction de la chute de tension.

rapide que la vitesse d'écoulement est grande. A titre de comparaison, il est intéressant de présenter l'évolution de la mobilité électrophorétique (lignes pointillées sur la figure 4.32). On note que la vitesse de migration des molécules est essentiellement déterminée par le champ électrique pour de fortes valeurs de  $v_e$ , mais aussi que la réponse de la molécule est très différente d'une superposition linéaire d'électrophorèse et d'hydrodynamique même pour de faibles valeurs de  $v_e$ . Ce résultat est surprenant car il est souvent admis que l'actionnement par électrophorèse et hydrodynamique peuvent être découplés, et que leur superposition est linéaire [Long and Ajdari, 1996]. Cette hypothèse est liée au fait que électrophorèse et hydrodynamique n'interviennent pas sur les mêmes longueurs caractéristiques : l'électrophorèse implique du transport dans la couche de Debye, le reste du fluide étant "transparent" à l'actionnement électrique ; l'hydrodynamique se traduit par des couplages à longue portée peu influencés par les effets locaux le long de l'ADN. Le couplage fort entre hydrodynamique/électrophorèse nous semble plutôt être une indication de l'importance de la viscoélasticité du fluide puisque le ralentissement de la molécule se traduit par une modification du cisaillement autour de la molécule, et donc à un champ de force altérés.

Il est également intéressant de noter que la vitesse de migration des molécules est indépendante de la taille et déterminée par le champ électrophorétique lorsque la valeur de  $v_e$  est importante. Cet effet est lié à l'écrasement et la localisation de la molécule au voisinage de la paroi, que nous avons décrit dans la figure 4.25. L'extension de la molécule devient suffisamment faible pour que petites et grandes molécules moyennent un champ de vitesse comparable au voisinage de la paroi et leur vitesse effective est déterminée par l'électrophorèse.

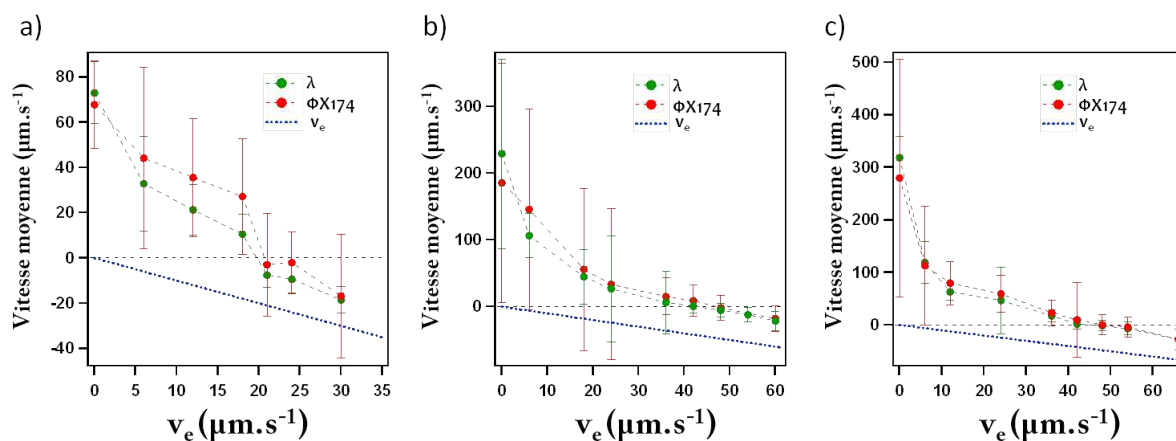
Pour finir, il est intéressant de se questionner sur la séparation des molécules vues à travers notre approche par suivi de trajectoires. La différence de vitesse de migration est surtout importante pour une faible vitesse de l'écoulement, de l'ordre d'un facteur 4 dans le panneau a) lorsque  $v_e \sim 15 - 20 \mu m.s^{-1}$ . On note aussi que les barres d'erreur associées à la mesure de la vitesse moyenne sont importantes. Ce résultat est lié à l'élargissement des distributions expérimentales, qui ne présentent plus la forme de gaussiennes. Les molécules explorent un vaste champ de vitesse, car la force de localisation à la paroi est comparable à la force d'agitation thermique. Dans ce régime, la signification de l'écart type n'est probablement alors pas très pertinente, mais la différence de vitesse de migration entre Lambda et PhiX174 n'en reste pas moins significative.

### Conformation et coefficient de diffusion des molécules

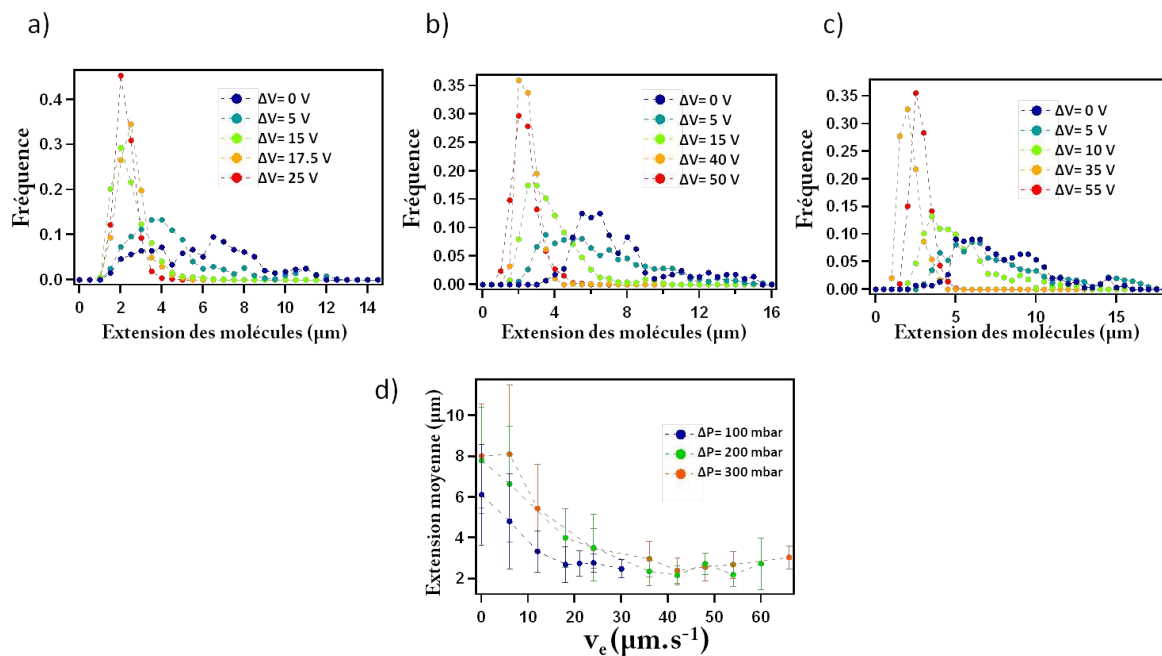
Au cours de sa migration, la molécule adopte une conformation globulaire dans la limite de notre résolution optique. Afin de quantifier cet effet, nous avons mené, dans les conditions expérimentales qui précèdent, une étude visant à mesurer l'extension des molécules. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel ImageJ afin d'ajuster une forme elliptique sur l'image de fluorescence des ADN [Bonhous et al., 2008]. Le rayon de gyration de  $\Phi X174$  étant sub-longueur d'onde, nous avons mené cette étude uniquement sur l'ADN  $\lambda$ . La figure 4.35 présente les histogrammes construits à partir de la longueur de l'axe majeur.

Comme qualitativement indiqué dans la figure 4.25, la convergence vers une conformation contrainte et globulaire est ici vérifiée. Tout comme nous avons pu le mettre en avant avec les histogrammes de vitesse, la dispersion sur les longueurs des molécules s'affaïsse avec l'augmentation de l'amplitude du champ électrique. Les valeurs moyennes semblent atteindre un plateau autour de  $2 \mu m$  de longueur. Notons ici que cette valeur correspond à la limite estimée de la méthode de détection. En effet,

## 4.5. Comprendre la séparation : expériences en molécules uniques



**FIGURE 4.34** – Vitesses moyennes des molécules pour différentes conditions expérimentales a)  $\Delta P = 100$  mbar, b)  $\Delta P = 200$  mbar, c)  $\Delta P = 300$  mbar. Celles-ci sont tracées en fonction de la vitesse électrophorétique des molécules sous une même différence de tension mais sans écoulement du fluide.



**FIGURE 4.35** – Statistique sur la longueur de l'axe majeur des molécules pour plusieurs différences de tension  $\Delta V$  et a)  $\Delta P = 100$  mbar, b)  $\Delta P = 200$  mbar, c)  $\Delta P = 300$  mbar. Celles-ci sont tracées en fonction de la vitesse électrophorétique des molécules sans écoulement du fluide. La sous-figure d) présente les valeurs moyennes de cette extension.

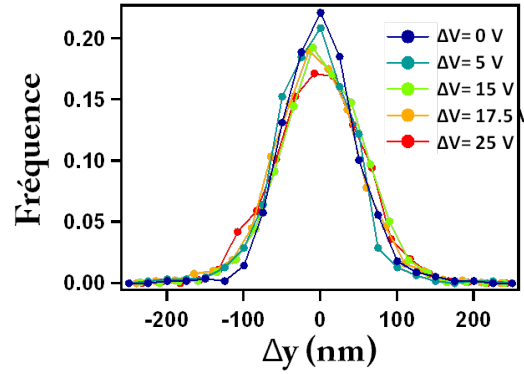


FIGURE 4.36 – Histogramme sur la distance parcourue selon  $y$  après un pas de temps  $\tau$  pour  $\Delta P = 100 \text{ mbar}$  et plusieurs amplitudes du champ électrique.

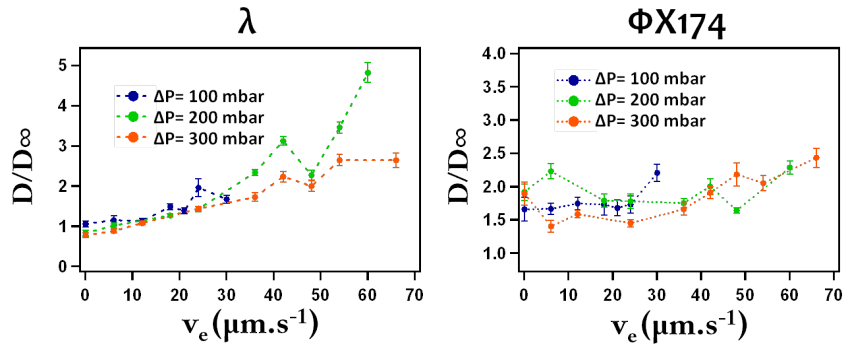


FIGURE 4.37 – Variation du coefficient effectif des molécules en fonction de la vitesse électrophorétique  $v_e$  pour différents débits dans la canalisation.

l'ajustement des formes nécessite l'emploi d'un seuillage des images et donc une part d'arbitraire. Les objets étudiés atteignent donc leur dimension minimale par microscopie optique de fluorescence pour  $v_e > 15 \mu\text{m.s}^{-1}$ .

Afin de quantifier la configuration des molécules de manière détournée, il nous est possible de nous intéresser au coefficient de diffusion selon la direction perpendiculaire à l'écoulement. À l'instar des travaux menés avec les billes, dans cette direction le mouvement des molécules peut être supposé indépendant de toute advection mais toutefois dépendant de leurs tailles. Pour ce faire, nous avons construit des histogrammes de distance parcourue par le centre de masse des molécules, durant l'intervalle de temps entre deux images, selon la direction  $y$  perpendiculaire à l'écoulement. Des exemples de distributions ainsi construites sont données dans la figure 4.36.

Ces données sont par la suite ajustées à l'aide d'une fonction de la forme :

$$P(\Delta y) = \frac{A}{\sqrt{4\pi D\tau}} \exp\left(-\frac{(\Delta y)^2}{4D\tau}\right) \quad (4.21)$$

où  $\tau$  correspond l'intervalle de temps entre deux images, et  $D$  est le coefficient de diffusion effectif caractérisant les molécules pour une condition d'actionnement donnée.

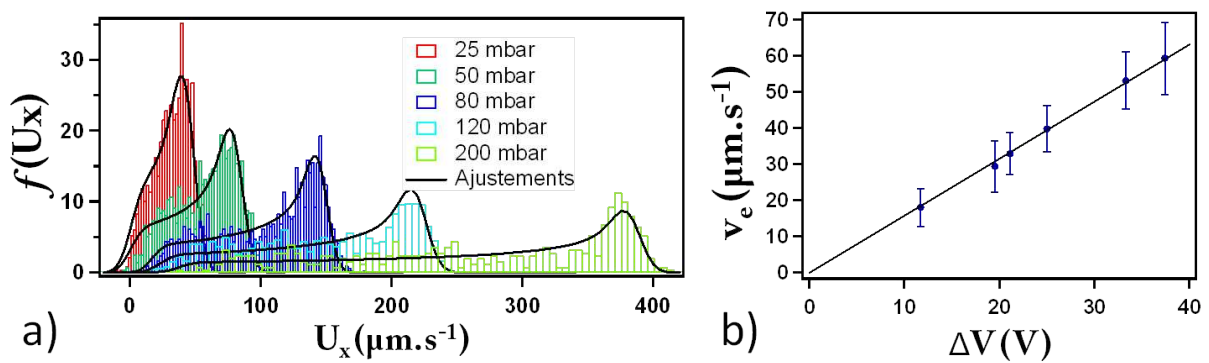
La figure 4.37 présente le coefficient de diffusion des molécules d'ADN  $\lambda$  et  $\Phi X174$  en fonction de la vitesse électrophorétique.

Notons que les barres d'erreurs associées sont sans doute sous-évaluées car obtenues à partir de l'erreur sur l'ajustement. Correctement les exprimer requerrait la construction de distributions pour chacune des molécules passant dans le champ de la caméra. Cette approche nous est apparue a semblé trop lourde à mettre en oeuvre, sachant notamment qu'à champ électrique nul les molécules ne restent que quelques images dans le champ d'observation. Les données présentées sont normées sur le coefficient de diffusion dans un milieu infini déduit à partir de leur rayon de gyration et de la viscosité du milieu. Les données acquises pour les molécules de  $\Phi X174$  présentent un coefficient de diffusion relativement constant bien qu'environ  $\sim 1.5$  fois supérieur à celui admis dans un milieu infini. Cette supériorité fait écho au plus faible rapport signal sur bruit observé dans le suivi de cette espèce. En effet, le niveau de fluorescence d'un objet déterminant la précision avec laquelle on peut suivre son centre de masse, un faible rapport signal sur bruit est connu pour gonfler hypothétiquement la valeur du coefficient de diffusion [Martin et al., 2002]. L'étude menée sur  $\lambda$  présente une tendance plus remarquable. Partant d'un coefficient de diffusion proche de celui observé en milieu infini, celui-ci croît de manière quasi linéaire avec amplitude du champ électrique imposée. Celui atteint ainsi une valeur jusqu'à environ 2.5 fois supérieure à celle admise en milieu infini. Ce résultat est associé au changement conformationnel de la molécule. Il est toutefois à noter que la localisation des molécules au bord se traduit par une augmentation des interactions hydrodynamiques, et également à un ralentissement de la diffusion. Or la variation du coefficient de diffusion de la molécule est le fruit de la combinaison d'un rapprochement du centre de masse de la molécule de la paroi avec une diminution de son rayon de gyration. Les deux effets étant antagonistes, le premier conduisant à un abaissement du coefficient de diffusion, le second à son augmentation, nous en déduisons que la conformation globulaire de l'ADN vu à travers son coefficient de diffusion est très importante.

### 4.5.4 Quelles limites de hauteur pour le phénomène de migration transverse ?

Nous avons décrit jusqu'alors l'effet de migration vers les bords dans une canalisation de  $2\text{ }\mu\text{m}$  de hauteur, soit un peu plus de deux fois le rayon de gyration de la plus grosse molécule étudiée. Cet effet s'accompagnant d'une compaction des polyélectrolytes, celui-ci ne peut sans doute pas persister au delà d'une certaine limite de hauteur de la canalisation. Nous avons pour cela étudié ce phénomène pour quatre fentes de hauteur  $H = 0.35, 0.68, 1.4$  et  $2\text{ }\mu\text{m}$  de hauteur. Afin que toutes les valeurs retirées de l'expérience soient utilisables et ce malgré les effets contingents de bouchage au cours du temps, nous avons opté pour des mesures entièrement *intégrées*, au sens où la vitesse de fluide a été déduite de l'étude du mouvement de billes fluorescentes, selon la méthode développée dans le chapitre précédent. Ainsi, pour chaque chute de pression, des films à amplitude du champ électrique nulle ont été acquis, permettant de construire les histogrammes de vitesses des traceurs sphériques solides, et donc la caractérisation de la vitesse maximale au sein de l'écoulement. Puis, pour cette même différence de pression, nous avons ajusté l'amplitude du champ électrique jusqu'à stopper le mouvement des molécules en valeur moyenne et acquis des films de la dynamiques des ADN sous cette combinaison d'actionnements spécifiques. Ces films acquis, la chute de pression entre les extrémités de la canalisation a été annulée, tout en gardant l'amplitude du champ électrique constante afin de caractériser la vitesse électrophorétique des molécules. La figure 4.38 donne une illustration de ces données auxiliaires ainsi acquises.

Afin de représenter les données acquises pour chacune des hauteurs de façon concise, nous nous sommes focalisées sur les cas permettant l'arrêt des molécules. La figure 4.39 présente l'évolution de la vitesse électrophorétique des molécules en fonction de la vitesse du fluide au centre de la canalisation



**FIGURE 4.38** – Illustration de l'acquisition des données auxiliaires pour la caractérisation de la vitesse du fluide au sein des fentes microfluidiques et de la mobilité des polyélectrolytes. a) Histogrammes des vitesses admises par les traceurs sphériques solides à champ électrique nul. Les lignes continues constituent les ajustements des données expérimentales. b) Vitesse électrophorétique des molécules pour différentes amplitudes du champ électrique.  $H = 2 \mu\text{m}$ .

dans les cas où la combinaison spécifique de ces deux modes d'actionnement permet l'arrêt des molécules.

Pour des hauteurs de canalisation supérieures au rayon de la molécule ( $H = 1.4$  et  $2 \mu\text{m}$ ), il apparaît clairement que la vitesse électrophorétique nécessaire à l'arrêt des molécules est bien inférieure à la vitesse moyenne du fluide. Ce constat est en cohérence avec le phénomène de migration. Les molécules étant délocalisées vers les bords de la canalisation, elles moyennent des lignes de fluide de basse vitesse. Conséquemment, une faible vitesse électrophorétique suffit à les stopper. Les molécules admettent alors une conformation globulaire comme jusqu'alors décrite.

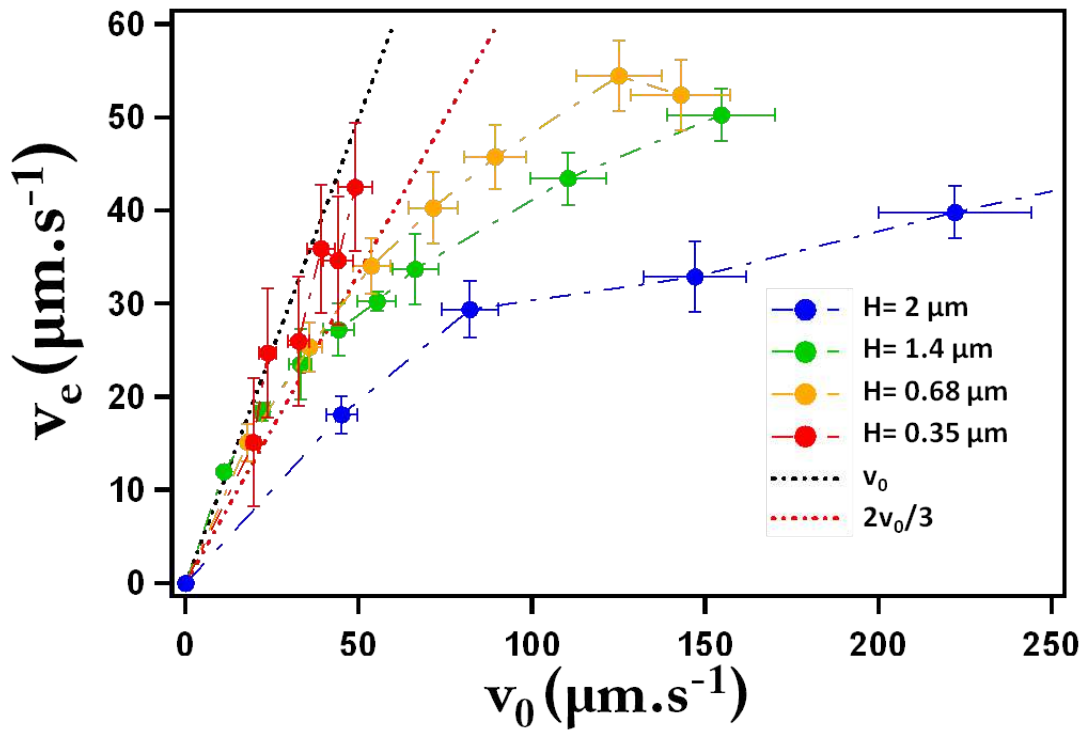
Ce constat est bien moins évident pour les fentes de 350 et 680 nm de hauteur. En effet, il apparaît qu'une vitesse électrophorétique bien supérieure est nécessaire à l'arrêt des molécules. Constat encore plus prononcé pour la fente de 350 nm de hauteur, où, dans la gamme de vitesse du fluide imposée, une vitesse électrophorétique toujours supérieure ou égale à la vitesse moyenne du fluide est nécessaire à arrêter les molécules<sup>10</sup>. Ce constat questionne sérieusement la potentialité d'une migration vers les bords de la molécule. En effet,  $v_e$  et  $2v_0/3$  étant quasi similaire, peut-on en conclure que les segments de la molécules sont totalement délocalisés sur la hauteur de la canalisation ? Cette proposition permettrait en effet de simplement expliquer les valeurs de vitesses électrophorétiques nécessaires à l'arrêt des molécules. Toutefois, comme nous allons le voir, cette délocalisation fait apparaître un état nouveau, qui s'ajoute à la conformation globulaire jusqu'ici rencontrée.

En effet, dans les canalisation de hauteur inférieure à  $\sim 700$  nm un effet particulier fait sont apparition. La molécule est essentiellement globulaire dans ces expériences, ce qui tendrait à démontrer que l'effet de migration peut aboutir à *comprimer* une chaîne de 700 nm de rayon de gyration dans un espace inférieur à la demie hauteur  $H$  testée soit 175 nm. Comment alors expliquer la quasi-similarité de  $v_e$  avec  $2v_0/3$  ? Nous argumentons, à la lumière des images acquises, que les molécules basculent d'une paroi à l'autre de la canalisation et passe par un état transitoire que nous dénommerons l'état *parachute*. Une illustration en est donnée avec le montage présenté en figure 4.40.

Le constat de quasi-similarité entre  $v_e$  et  $v_0$  impose que la molécule soit approximativement délocalisée

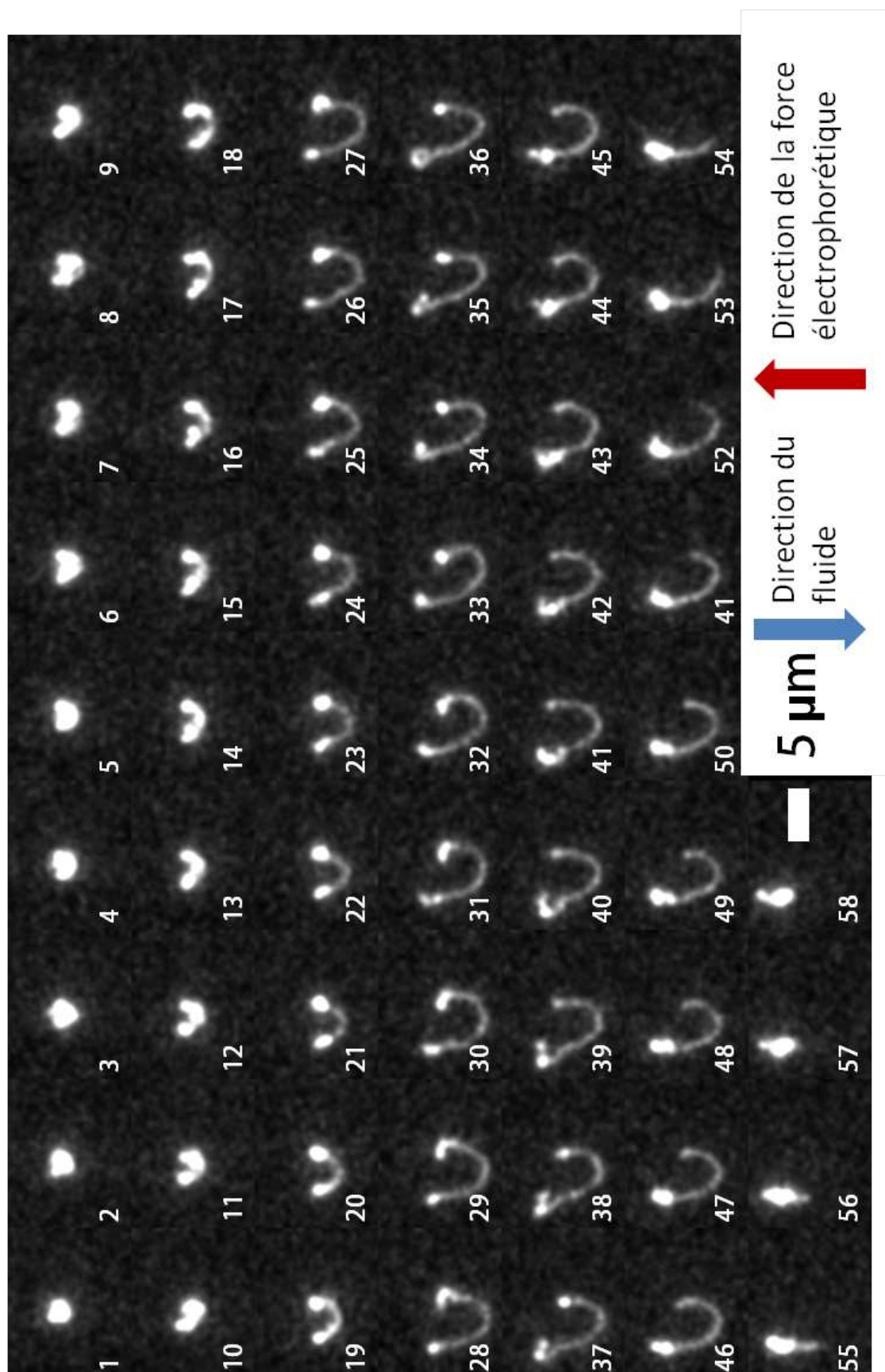
<sup>10</sup> Notons toutefois que l'augmentation de résistance hydrodynamique inhérente à la diminution de la section des canalisations nous a ici contraint à l'exploration de vitesse de fluide inférieure à  $70 \mu\text{m.s}^{-1}$  correspondant à une différence de pression de 3 bars entre l'entrée et la sortie de la canalisation. Pression au delà de laquelle la stratégie de connexion des tubes à l'aide d'un patch de PDMS s'est révélée inadaptée.





**FIGURE 4.39** – Évolution de la vitesse électrophorétique en fonction de la vitesse au centre de la canalisation telles que la combinaison des deux permet l’arrêt des molécules pour quatre hauteurs de canalisation. En traits pointillés noirs est représentée la droite de pente 1 ( $v_e = v_0$ ), et en rouge celle de pente 2/3, soit la vitesse moyenne du fluide dans la canalisation.

sur toute la hauteur  $H$ . Cette posture particulière tend à déformer la molécule en son centre et dans la direction du fluide. Sur la figure 4.40, aux images 1 à 7 correspond un état globulaire commun aux états rencontrés jusqu’ici. Sur les images 8 à 18 il apparaît que la molécule se scinde peu à peu en deux masses distinctes et d’intensité égale, puis, on observe des figures 19-36 que le segment de molécule reliant les deux masses tend à s’allonger dans le fluide, comme un parachute se gonfle lorsqu’il est ouvert. Puis, de la figure 36 à 42, le fragment de molécule le plus à droite de l’image, tend à baisser en intensité, témoignant que celui-ci perd de la masse. Il s’opère donc un transfert des segments vers le bulbe de gauche, pour finalement aboutir à une conformation globulaire, identique à celle décrite dans les premières images. Compte tenu du fort confinement, il est difficile de savoir si les deux masses d’ADN reliées par le fragment central sont dans le même plan. Toutefois, la forme caractéristique que prend le fragment central dans le flux semble indiquer que ses deux extrémités sont dans des plans différents. La délocalisation des segments de l’ADN sur toute la hauteur de la canalisation serait alors le fruit d’un transfert permanent d’une paroi à l’autre de la canalisation du centre de masse de la molécule, via l’état *parachute*.



**FIGURE 4.40** – Montage d’images de fluorescence illustrant l’effet *parachute*. Chaque image est espacée de 18 ms.  $v_0 = 50 \mu m.s^{-1}$ .  $v_e = 42 \mu m.s^{-1}$ .  $H = 350 \text{ nm}$ .

## 4.6 Conclusion du chapitre

Nous avons décrit dans ce chapitre une méthode innovante de séparation sans matrice de molécules d'ADN par taille. Ces performances ont été rendues possibles par l'emploi d'un mode d'actionnement hybride des molécules, migrant dans une canalisation microfluidique sous l'action conjuguée d'un champ hydrodynamique et électrique. Nous avons avec cette méthode démontré la possibilité de séparer des molécules de taille comprise entre  $10^2$  et  $10^4$  paires de base, en des durées inférieures à 10 min et avec des performances comparables à celle décrites dans la littérature de la séparation sur puce. Cette méthode comprenant de nombreux paramètres ajustables, elle apparaît comme très prometteuse pour la séparation d'un spectre plus large de molécules, tant sur le plan des tailles séparables, que sur le plan de la nature même des molécules, à la seule condition que celles-ci soient chargées en solution. Ces paramètres comprennent l'amplitude des champs hydrodynamique et électrique, la hauteur de la canalisation, sa géométrie et enfin la nature du fluide porteur.

Nous avons par la suite mené une étude du mécanisme physique permettant la séparation. Celle-ci est passée par la recherche de pistes dans la littérature, la caractérisation de la viscoélasticité du fluide utilisé, ainsi que des expériences de suivi de molécules individuelles. Nous pouvons affirmer à la suite de ce travail que la séparation est permise par un mécanisme de migration vers les parois, dont l'amplitude dépend de la taille des molécules. Compte tenu de l'anisotropie de l'actionnement fluidique (profil Poiseuille), cette localisation à proximité des parois se traduit alors par des vitesses moyennes variant selon les espèces contenues dans l'échantillon à analyser.

Si le mécanisme de migration transverse est établi, son origine microscopique n'est pas complètement élucidée. En effet, les effets de migration transverse sont décrits dans la littérature pour des fluides newtoniens et non newtoniens. Même si nos données indiquent que l'aspect viscoélastique du fluide est très important pour la séparation, nous ne pouvons pas affirmer que cette propriété est essentielle. Nous souhaitons donc donner des pistes d'expériences à mener afin de sceller nos conclusions.

**Affirmer l'importance de la viscoélasticité du fluide** Les expériences de séparation menées pour plusieurs concentrations en PVP nous ont renseignés sur l'importance de la présence de polymère neutre dans le milieu. La caractérisation de la rhéologie du fluide porteur nous a confirmé son caractère viscoélastique et nous a conduits à élargir les causes possibles responsables le phénomène de séparation. Mais il reste un point à éclaircir à propos de l'impact de la présence de ce polymère sur la viscosité du fluide. En d'autres termes, est-ce la viscosité pure ou la viscoélasticité du fluide qui engendre la migration des molécules? Cette question mériterait d'être tranchée par une simple expérience de séparation en ajustant la viscosité du fluide tout en prenant gare à ce que celui-ci conserve un caractère Newtonien, en utilisant par exemple un mélange eau-glycérol.

**Appliquer notre méthode de caractérisation des fluides à l'aide de traceurs sphériques** Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous avons étudié des écoulements microfluidiques à l'aide de traceurs sphériques solides, ce qui nous a amené à la caractérisation d'une force de migration transverse, sans doute d'origine électrovisqueuse. L'application de notre méthode pour la caractérisation des écoulements en présence de PVP serait une source d'information dans le cas d'un actionnement hybride hydrodynamique et électrophorétique.

En effet, il n'est pas clair de savoir à quel point la déformabilité et les forts changements conformationnels intrinsèques à une molécule d'ADN sont des mécanismes indispensables à la migration vers les parois. Cette assertion a pu être vérifiée quand, alors que le plaquage des molécules contre les

#### **Chapitre 4. Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme**

---

parois était avéré, nous avons montré que le coefficient de diffusion de ces dernières augmentait. Avec l'utilisation de traceurs sphérique, nous allègerions de fait le problème, en ôtant le facteur *déformabilité conformationnelle* du phénomène.

Quelles que soient les conclusions de cette expérience avec des billes, celles-ci constitueraient de précieuses informations pour la compréhension de nos expériences. Nous nous proposons de donner quelques pistes :

- Hypothèse 1) Aucune migration n'est observée  
Nous pourrions alors conclure sur la spécificité de la force à la l'origine de la migration aux objets déformables.
- Hypothèse 2) Une migration vers les bords et observée  
Cette conclusion faite, nous pourrions alors donner la variation spatiale de la force de lift. Aussi pourrions-nous faire varier les paramètres du problème afin de connaître l'importance des effets de la taille de la particule, de concentration en PVP... De plus, ces conclusions amèneraient à élargir les potentialités de l'utilisation d'un fluide viscoélastique et diversifierait de fait les applications vantées de la focalisation vers le centre des parois qui connaît aujourd'hui un grand essor.

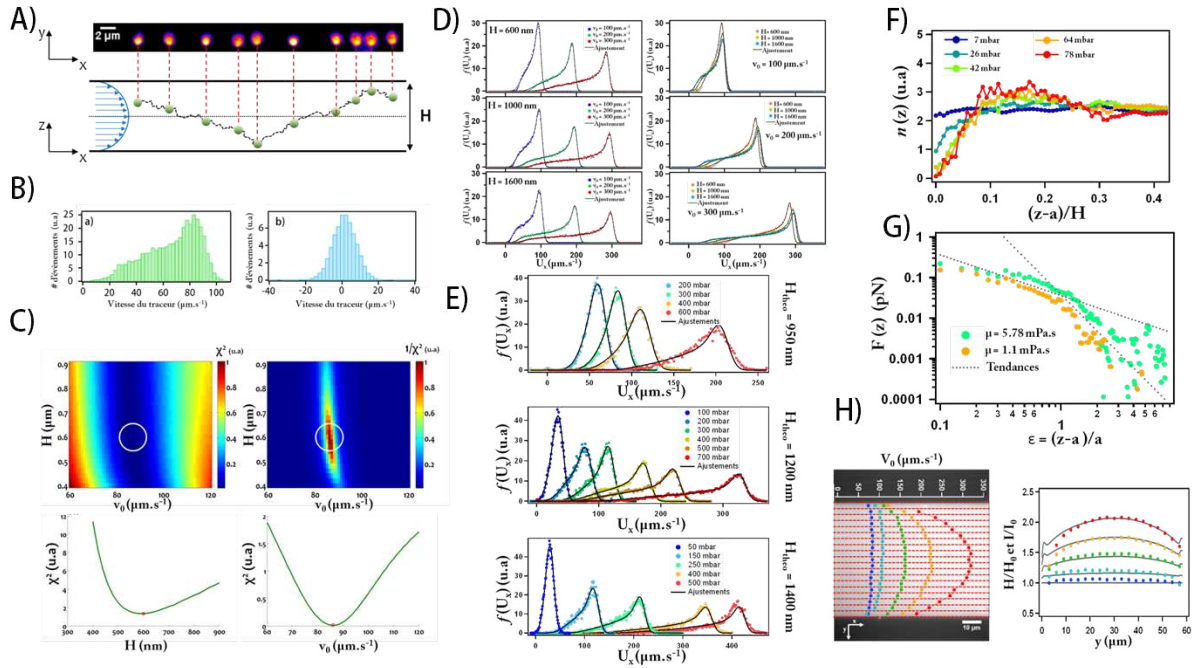
# Conclusions et perspectives

## 5.1 Conclusions

A l'heure où la nano-fluidique suscite un vif intérêt, notre travail conduit à une conclusion encourageante, à savoir que la physique des écoulements en milieu confiné tient un fort potentiel applicatif, mais un peu iconoclaste également, car la physique de ces écoulements est parfois mal décrite. Dans ce contexte, nous pouvons le reconnaître ici, notre vision des effets dominants dans le transport d'objets dissous a fortement évolué au fil des travaux présentés ici. Par deux fois nous avons dû remettre à plat nos certitudes. Concernant le transport de particules solides, nous avons revu un argument souvent admis que les forces transverses sont exclues pour des écoulements à faible nombre de Reynolds, ce qui s'est traduit par la remise en cause de l'hypothèse d'homogénéité de la probabilité de présence des traceurs suivant la hauteur de la canalisation. Concernant le transport de chaînes polymériques, nous sommes progressivement rendus à l'évidence que l'effet combiné des champs d'actionnement ne se faisait pas de manière linéaire. Au demeurant, nos résultats semblent donc être originaux par rapport à l'état de l'art du domaine, mais ils appellent aussi à des travaux de théorie pour mieux comprendre les écoulements confinés.

Nous souhaitons ici dresser un bref bilan des expériences et des résultats majeurs de ce travail. Pour les parties concernant la caractérisation des écoulements et la séparation d'ADN, on pourra trouver, dans les figures 5.1 et 5.2, les illustrations correspondantes. À défaut d'être lisibles, gageons qu'elle suffiront à rappeler le lecteur à ses souvenirs.

**Fabrication des puces microfluidiques, banc expérimental** Pour mener à bien ce projet nous nous sommes appuyés sur l'expertise technique du personnel de la salle blanche et les savoir-faire acquis dans le groupe microfluidique du laboratoire. Nous avons opté pour une technologie *Si* et avons structuré des canaux de hauteur variant entre 350 et 2000 nm. Pour plus de flexibilité, les choix d'un capotage via une couche d'accroche, et un système de connexion basé sur un timbre de PDMS ont été suivis. Ce projet nous a amené à optimiser la vitesse du système d'imagerie, en intégrant un photomasque sur le banc expérimental, pour une utilisation partielle du capteur de la caméra. Cette stratégie a permis d'atteindre des cadences d'acquisition de 130 Hz, quadruplant la cadence originellement suivie. Ce travail nous a amené à inclure et asservir une platine de nano-positionnement sur le banc expérimental. Le schéma de synchronisation externe de la caméra via contrôleur DAQ a permis de mener à bien les expériences de suivi, selon la direction axiale, des molécules à centre de masse fixe.



**FIGURE 5.1** – Illustrations représentatives du chapitre *Caractérisation d'écoulements micro-nano fluidiques à l'aide de traceurs sphériques*.

**Vers une métrologie micro- et nano-fluidique in situ -figure 5.1-** Émettant le constat qu'il existe un déficit en outils de caractérisation d'écoulements confinés, nous avons développé une méthode de suivi de particules fluorescentes. Après avoir mené un état des lieux des paramètres accessibles et compte tenu du rapport profondeur de champ / hauteur des canalisations (A), nous avons opté pour une méthode basée sur les statistiques des vitesses admises par les traceurs dans l'écoulement (B). L'homogénéité de la vitesse du fluide selon une des directions nous a permis de dériver un modèle nécessitant pour seul paramètre le rayon des traceurs, et permettant de déduire la vitesse maximale au centre de la canalisation, ainsi que sa hauteur. Afin de construire un modèle d'ajustement, nous avons pris en compte le ralentissement aux bords de la particule par l'inclusion des interactions hydrodynamiques bille-paroi. Une stratégie de minimisation des moindres carrés a été choisie pour conduire l'ajustement des données expérimentales et codée dans une routine Matlab (C). Afin de confirmer la validité de notre approche, des simulations de dynamiques Brownienne ont été menées, en incluant les interactions hydrodynamiques à la fois dans le transport des particules par diffusion, mais aussi par advection(D). L'application de cet outil nous a permis d'étudier l'influence de paramètres tels que la cadence d'acquisition et le nombre de traceurs analysés sur la précision des paramètres ajustés. Cette étude a mis en avant des erreurs relatives inférieures à 3 % et 7 % respectivement pour la vitesse au centre de la canalisation et sa hauteur au delà de 5000 vecteurs vitesses analysés (nous avons respecté cette condition dans chacune des expériences présentées dans ce manuscrit).

Des expériences de suivi de particules dans des fentes microfluidiques de hauteur variant de 950 à 1950 nm ont été menées (E). Celles-ci ont confirmé la validité de notre modèle pour l'ajustement de la vitesse de l'écoulement. Toutefois, le paramètre hauteur ajusté s'est révélé incohérent. Cette déviation a été corrélée avec la disparition des états de basse vitesse pour les particules. Aussi avons-nous remis en cause un par un les phénomènes d'effondrement de la canalisation, de glissement à l'interface ainsi que l'effet de la variation d'altitude des traceurs entre deux expositions. Cette dernière hypothèse a

été réfutée par l'observation d'une disparition moindre des états de basse vitesse pour un fluide de viscosité inférieure, en appui des résultats des simulations. Ce constat fait, nous avons cartographié les densités de probabilité de présence des traceurs suivant la hauteur de la canalisation. Mettant en place un protocole dérivé des expériences à l'origine de la découverte de la force de lift électrocinétique, nous avons corrélé la disparition des états de basse vitesse avec une exclusion importante des traceurs des zones proches de la paroi (F). Cette exclusion a été démontrée d'autant plus importante que la vitesse de l'écoulement au centre de la canalisation est grande. Aussi cette migration a-t-elle été montrée d'autant plus importante que le sont le confinement (mesuré comme le rapport taille de particule sur hauteur de la canalisation) et la viscosité du fluide. À partir de ces distributions, nous sommes remontés à la force mise en jeu par inversion de la distribution d'équilibre suivant une statistique de Boltzmann (G). Cette étude a ainsi révélé une variation spatiale de la force de lift en deux régimes, et décroissant avec la distance à la paroi.

Nous avons mis en application notre méthode pour le suivi du phénomène de déformation d'une canalisation (H). Bien que nous ayons statué l'impossibilité de mener une mesure directe de la hauteur via notre méthode, les données de vitesse acquises ont été transformées pour rendre compte du gonflement des murs d'une canalisation en PDMS. La comparaison avec des mesures en fluorescéine a démontré un très bon accord et ainsi confirmé que notre méthode est adaptée pour le contrôle dynamique et non invasif des propriétés d'un écoulement.

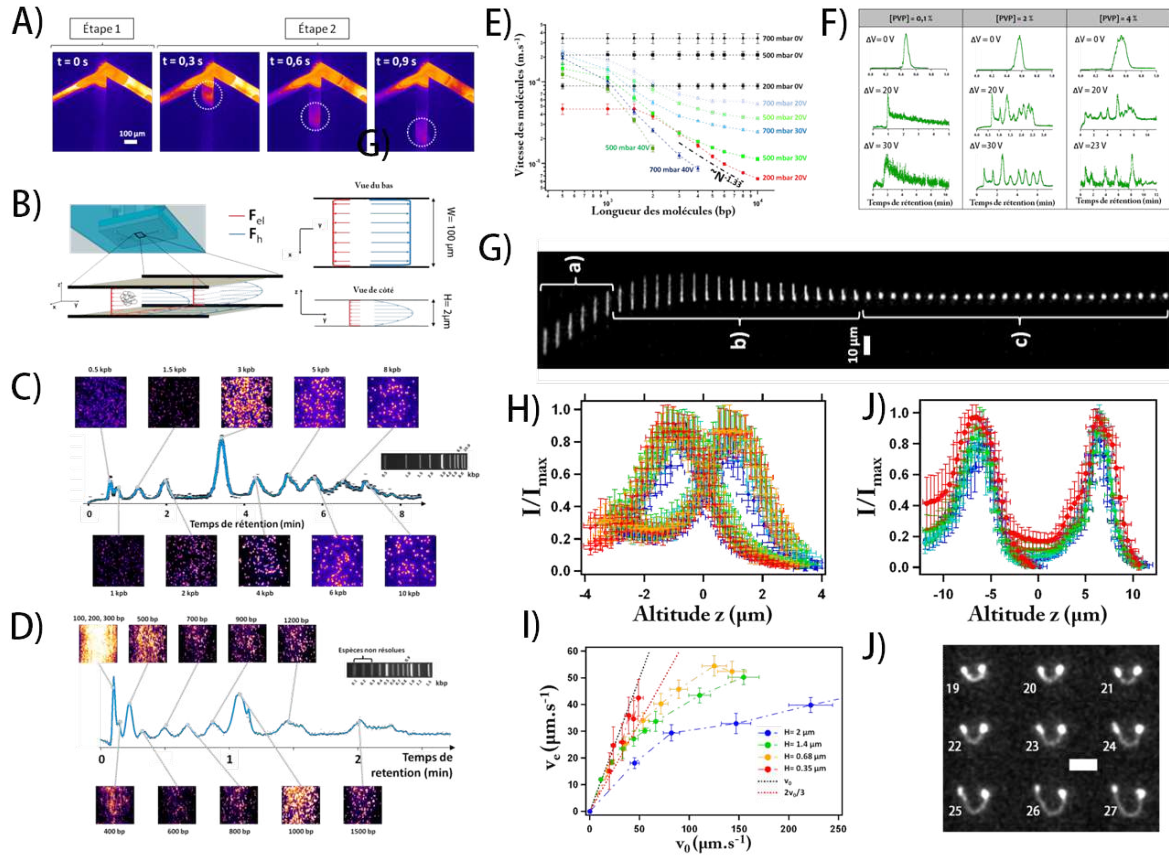
**Vers de nouvelles technologies de séparation sans matrice - figure 5.2** Suivant le renouveau de l'engouement pour les systèmes de séparation de biomolécules, nous avons mis au point une méthode originale de séparation de molécules d'ADN par taille. Utilisant des puces microfluidiques adaptées (A), nous avons révélé la possibilité de séparer ces entités à l'aide d'un mode d'actionnement hybride, combinaison d'électrophorèse et d'advection hydrodynamique (B). Cette méthode a semblé adaptée à la séparation d'échelles moléculaires contenant des brins d'ADN de taille variant de 400 à 10000 paires de bases (C-D) en des temps inférieurs à 8 minutes. L'ajustement des amplitudes relatives des champ d'actionnement a permis de démontrer une dépendance de la vitesse des molécules avec leur poids moléculaire ( $M$ ) comme  $\sim M^{-1}$  jusqu'à  $\sim M^{-2.7}$ , ce qui constitue une variation plus importante que les méthodes classiques de séparation (E).

Nous avons souhaité par la suite mieux cerner le mécanisme physique à l'origine de la séparation. L'analyse de la littérature nous a conduit à suspecter une migration transverse des molécules en direction des parois de la canalisation. Après avoir mis en évidence l'impact certain de la nature viscoélastique de la solution tampon utilisée (F), nous avons mené des études de suivi de molécules uniques. Plusieurs stratégies ont ainsi été suivies.

Ayant remarqué la possibilité de stopper les molécules par ajustement de l'amplitude du champ électrique pour un débit donné (G), nous avons cartographié la présence des molécules suivant la direction transverse de l'écoulement. L'analyse de l'intensité rayonnée par les molécules suivant la position du plan focal a permis de mettre en évidence deux pics de concentration proches des parois pour ces conditions d'actionnement particulières, et ce dans deux géométries de canalisation ( $H = 2$  et  $10 \mu\text{m}$ ). Ces pics étant indiscernables qu'elles que soient les conditions de chute de pression, nous avons pu conclure que dès lors que la molécule est stoppée, elle est dans une position proche de la paroi.

Des mesures dynamiques ont été menées, révélant par exemple la décroissance linéaire de la vitesse





**FIGURE 5.2** – Illustrations représentatives du chapitre *Séparation d'ADN sans matrice sur puce microfluidique : preuve de concept et mécanisme*

du centre de masse des molécules avec l'amplitude du champ pour des valeurs élevées de ce dernier. Aussi cette observation va-t-elle dans le sens d'une position d'attraction fixe dans la canalisation, qui constitue un piège pour la molécule d'autant plus fort que sont les amplitudes des champs électrique et hydrodynamique. Le suivi de particule individuelle a permis de mettre en évidence un changement conformationnel important des molécules sous actionnement hybride. L'application du champ tend à geler la molécule dans une conformation globulaire. La diffusivité croissante des molécules avec le champ électrique, de manière incohérente avec l'augmentation des interactions hydrodynamiques lors du rapprochement de la paroi, a été interprétée comme le fruit de cette compaction. La chaîne de polymère, sous l'action conjuguée des champs, est donc une chaîne frustrée, tendant à se compacter comme elle le ferait en mauvais solvant.

Afin de trouver une limite à ce phénomène, nous avons entrepris des études de suivi de molécules pour des combinaisons champ électrique/champ hydrodynamique permettant de stopper des chaînes de rayon de giration  $R_g \sim 700\text{nm}$  et ce pour des canalisations de hauteur 350, 680 1400 à 2000 nm (I). Lors de ces expériences, les mesures des amplitudes des champs ont été conduites *in situ* en mettant notamment à profit notre méthode de suivi de particules solides. Ces études ont permis de mettre en avant la dépendance au confinement de l'effet de migration vers les bords, qui tend à s'annuler pour des valeurs de confinement  $R_g/H < 1$ . Aussi avons nous qualitativement interprété la délocalisation de la chaîne par transfert selon l'état *parachute* (J) conduisant à une migration de paroi à paroi des molécules.



## 5.2 Perspectives

Au demeurant, avec pour objectif de construire un outil simple de caractérisation, permettant de remonter aux caractéristiques telles que la vitesse et l'extension d'un écoulement, nous avons abouti à la mise en relief d'une force de lift. À court terme, et considérant qu'aucun modèle théorique ne permet de prédire une migration de telle amplitude dans les conditions jusqu'alors étudiées, il convient de poursuivre nos expériences de suivi comme une étude paramétrique. La première piste consisterait à mettre plus en avant l'effet de la taille des particules en utilisant, dans des conditions d'actionnement identiques, plusieurs tailles de traceurs. Aussi apparaîtrait-il comme judicieux de faire varier la concentration et la nature des ions en solution. Enfin, il serait d'apport certain de faire varier les potentiels de surface des traceurs. Considérant qu'une force d'origine électrovisqueuse constitue la meilleure piste d'explication, tous les paramètres sus-cités sont susceptibles de moduler l'amplitude de l'effet, et permettraient alors de clarifier son origine physique. Dans une vision à plus long terme, nous avons engagé une collaboration avec des théoriciens physico-chimistes (Laboratoire PESCSA -Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques- Jussieu Paris). Ces derniers développent des outils dédiés à la modélisation multi-échelles d'écoulements de particules (avec un solvant explicite) qui permettront peut-être de comprendre le phénomène observé ici.

Concernant la séparation d'ADN dans des fentes microfluidiques, nous avons préféré mettre l'accent sur la compréhension du phénomène dans ce projet : les conditions de séparation sont largement sous-optimisées. Considérant les nombreux paramètres ajustables que possède notre technique (amplitudes des champs, caractéristiques géométriques de la canalisation, concentration et nature du polymère neutre), nous n'avons à coup sûr pas épuisé toutes ses potentialités. Ce projet a fait l'objet d'un dépôt de brevet soutenu par le CNRS et pris en charge par la structure de transfert technologique Toulouse-Tech-Transfert. Le début du plan de maturation, et la prise en charge du projet par un ingénieur dédié devrait commencer courant Novembre 2013.



# Bibliographie

- [Abbe, 1873] Abbe, E. (1873). Beitrage zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1) :413–418.
- [Abgrall and Gué, 2007] Abgrall, P. and Gué, A.-M. (2007). Lab-on-chip technologies : making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(5) :R15.
- [Adrian, 1991] Adrian, R. J. (1991). Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 23(1) :261–304.
- [Alexander and Prieve, 1987] Alexander, B. M. and Prieve, D. C. (1987). A hydrodynamic technique for measurement of colloidal forces. *Langmuir*, 3(5) :788–795.
- [Alizadeh et al., 1980] Alizadeh, A., Castro, C. A. N. d., and Wakeham, W. A. (1980). The theory of the taylor dispersion technique for liquid diffusivity measurements. *International Journal of Thermophysics*, 1(3) :243–284.
- [Aris, 1956] Aris, R. (1956). On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 235(1200) :67–77.
- [Asmolov, 1999] Asmolov, E. S. (1999). The inertial lift on a spherical particle in a plane poiseuille flow at large channel reynolds number. *Journal of Fluid Mechanics*, 381 :63–87.
- [Banerjee and Kihm, 2005] Banerjee, A. and Kihm, K. D. (2005). Experimental verification of near-wall hindered diffusion for the brownian motion of nanoparticles using evanescent wave microscopy. *Physical Review E*, 72(4) :042101.
- [Baumann et al., 1997] Baumann, C. G., Smith, S. B., Bloomfield, V. A., and Bustamante, C. (1997). Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12) :6185–6190.
- [Benesch et al., 2003] Benesch, T., Yiacoumi, S., and Tsouris, C. (2003). Brownian motion in confinement. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 68(2) :021401.1–021401.5.
- [Betzig et al., 2006] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645.
- [Bhattacharya et al., 2013] Bhattacharya, S., Gurung, D. K., and Navardi, S. (2013). Radial distribution and axial dispersion of suspended particles inside a narrow cylinder due to mildly inertial flow. *Physics of Fluids*, 25(3) :033304.
- [Bike et al., 1995] Bike, S., Lazarro, L., and Prieve, D. (1995). Electrokinetic lift of a sphere moving in slow shear flow parallel to a wall : I. experiment. *Journal of Colloid and Interface Science*, 175(2) :411–421.
- [Bike and Prieve, 1995] Bike, S. and Prieve, D. (1995). Electrokinetic lift of a sphere moving in slow shear flow parallel to a wall : II. theory. *Journal of Colloid and Interface Science*, 175(2) :422–434.
- [Bike and Prieve, 1990] Bike, S. G. and Prieve, D. C. (1990). Electrohydrodynamic lubrication with thin double layers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 136(1) :95–112.

- [Bird et al., 1960] Bird, R. B., Stewart, W. E., and Lightfoot, E. N. (1960). *Transport phenomena*, volume 2. Wiley New York.
- [Bird and Wiest, 1995] Bird, R. B. and Wiest, J. M. (1995). Constitutive equations for polymeric liquids. *Annual review of fluid mechanics*, 27(1) :169–193.
- [Blair and Dufresne, ] Blair, D. and Dufresne, E. Particle tracking package for matlab disponible à l'adresse. <http://physics.georgetown.edu/matlab/index.html>.
- [Bonhuis et al., 2008] Bonhuis, D. J., Meyer, C., Stein, D., and Dekker, C. (2008). Conformation and dynamics of DNA confined in slitlike nanofluidic channels. *Physical review letters*, 101(10) :108303.
- [Bourdon et al., 2005] Bourdon, C. J., Olsen, M. G., and Gorby, A. D. (2005). The depth of correlation in micro-PIV for high numerical aperture and immersion objectives. *Journal of Fluids Engineering*, 128(4) :883–886.
- [Brenner and Gaydos, 1977] Brenner, H. and Gaydos, L. J. (1977). The constrained brownian movement of spherical particles in cylindrical pores of comparable radius : Models of the diffusive and convective transport of solute molecules in membranes and porous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 58(2) :312–356.
- [Bretherton, 1962] Bretherton, F. P. (1962). The motion of rigid particles in a shear flow at low reynolds number. *J. Fluid Mech*, 14(2) :284–304.
- [Brown, 1828] Brown, R. (1828). XXVII. a brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants ; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series 2*, 4(21) :161–173.
- [Brown, 1829] Brown, R. (1829). XXIV. additional remarks on active molecules. *Philosophical Magazine Series 2*, 6(33) :161–166.
- [Büttiker, 1987] Büttiker, M. (1987). Transport as a consequence of state-dependent diffusion. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, 68(2-3) :161–167.
- [Butler et al., 2007] Butler, J. E., Usta, O. B., Kekre, R., and Ladd, A. J. (2007). Kinetic theory of a confined polymer driven by an external force and pressure-driven flow. *Physics of Fluids*, 19 :113101.
- [Caldwell et al., 1979] Caldwell, K. D., Nguyen, T. T., Myers, M. N., and Giddings, J. C. (1979). Observations on anomalous retention in steric field-flow fractionation. *Separation Science and Technology*, 14(10) :935–946.
- [Cantor et al., 1988] Cantor, C. R., Smith, C. L., and Mathew, M. K. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 17(1) :287–304.
- [Carbajal-Tinoco et al., 2007] Carbajal-Tinoco, M. D., Lopez-Fernandez, R., and Arauz-Lara, J. L. (2007). Asymmetry in colloidal diffusion near a rigid wall. *Physical review letters*, 99(13) :138303. PMID : 17930646.
- [Carew and Townsend, 1991] Carew, E. O. A. and Townsend, P. (1991). Slow visco-elastic flow past a cylinder in a rectangular channel. *Rheologica Acta*, 30(1) :58–64.
- [Carrilho, 2000] Carrilho, E. (2000). DNA sequencing by capillary array electrophoresis and microfabricated array systems. *ELECTROPHORESIS*, 21(1) :55–65.
- [Carter et al., 2005] Carter, B. C., Shubeita, G. T., and Gross, S. P. (2005). Tracking single particles : a user-friendly quantitative evaluation. *Physical Biology*, 2(1) :60.
- [Cevheri and Yoda, 2013] Cevheri, N. and Yoda, M. (2013). Evanescent-wave particle velocimetry studies of combined electroosmotic and poiseuille flow. Delft, The Netherlands.
- [Chamarthy et al., 2009] Chamarthy, P., Garimella, S. V., and Wereley, S. T. (2009). Non-intrusive temperature measurement using microscale visualization techniques. *Experiments in Fluids*, 47(1) :159–170.
- [Chaoui and Feuillebois, 2003] Chaoui, M. and Feuillebois, F. (2003). Creeping flow around a sphere in a shear flow close to a wall. *The Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics*, 56(3) :381–410.
- [Chen et al., 2007] Chen, L., Manz, A., and Day, P. J. R. (2007). Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 7(11) :1413.

- [Choi et al., 2007] Choi, C. K., Margraves, C. H., and Kihm, K. D. (2007). Examination of near-wall hindered brownian diffusion of nanoparticles : Experimental comparison to theories by brenner (1961) and goldman (1967). *Physics of Fluids*, 19(10) :103305.
- [Choi and Rogers, 2003] Choi, K. M. and Rogers, J. A. (2003). A photocurable poly(dimethylsiloxane) chemistry designed for soft lithographic molding and printing in the nanometer regime. *Journal of the American Chemical Society*, 125(14) :4060–4061.
- [Choi and Lee, 2010] Choi, Y.-S. and Lee, S.-J. (2010). Holographic analysis of three-dimensional inertial migration of spherical particles in micro-scale pipe flow. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(4-5) :819–829.
- [Chou et al., 1999] Chou, H.-P., Spence, C., Scherer, A., and Quake, S. (1999). A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1) :11–13. PMID : 9874762.
- [Chun and Ladd, 2004] Chun, B. and Ladd, A. (2004). The electroviscous force between charged particles : beyond the thin-double-layer approximation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 274(2) :687–694.
- [Chung et al., 2009] Chung, K., Cho, J. K., Park, E. S., Breedveld, V., and Lu, H. (2009). Three-dimensional in situ temperature measurement in microsystems using brownian motion of nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 81(3) :991–999.
- [Coffey et al., 1996] Coffey, W. T., Kalmykov, Y. P., and Waldron, J. T. (1996). *The Langevin equation : with applications in physics, chemistry, and electrical engineering*, volume 10. World Scientific.
- [Cox, 1997] Cox, R. G. (1997). Electroviscous forces on a charged particle suspended in a flowing liquid. *Journal of Fluid Mechanics*, 338 :1–34.
- [Curie, 1894] Curie, P. (1894). Sur la symétrie dans les phénomènes physiques, symétrie d'un champ électrique et d'un champ magnétique. *Journal de Physique Théorique et Appliquée*, 3(1) :393–415.
- [Danker et al., 2009] Danker, G., Vlahovska, P. M., and Misbah, C. (2009). Vesicles in poiseuille flow. *Physical Review Letters*, 102(14) :148102.
- [D'Avino et al., 2010] D'Avino, G., Maffettone, P., Greco, F., and Hulsen, M. (2010). Viscoelasticity-induced migration of a rigid sphere in confined shear flow. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 165(9–10) :466–474.
- [D'Avino et al., 2012] D'Avino, G., Romeo, G., Villone, M. M., Greco, F., Netti, P. A., and Maffettone, P. L. (2012). Single line particle focusing induced by viscoelasticity of the suspending liquid : theory, experiments and simulations to design a micropipe flow-focuser. *Lab on a Chip*, 12(9) :1638.
- [De Gennes, 1979] De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell university press.
- [Desruisseaux et al., 2001] Desruisseaux, C., Long, D., Drouin, G., and Slater, G. W. (2001). Electrophoresis of composite molecular objects. 1. relation between friction, charge, and ionic strength in free solution. *Macromolecules*, 34(1) :44–52.
- [Devasenathipathy et al., 2002] Devasenathipathy, S., Santiago, J. G., and Takehara, K. (2002). Particle tracking techniques for electrokinetic microchannel flows. *Analytical Chemistry*, 74(15) :3704–3713.
- [Devasenathipathy et al., 2003] Devasenathipathy, S., Santiago, J. G., Wereley, S. T., Meinhart, C. D., and Takehara, K. (2003). Particle imaging techniques for microfabricated fluidic systems. *Experiments in Fluids*, 34(4) :504–514.
- [Dhahir and Walters, 1989] Dhahir, S. A. and Walters, K. (1989). On non-newtonian flow past a cylinder in a confined flow. *Journal of Rheology*, 33(6) :781–804.
- [Di Carlo, 2009] Di Carlo, D. (2009). Inertial microfluidics. *Lab on a Chip*, 9(21) :3038–3046.
- [Di Carlo et al., 2009] Di Carlo, D., Edd, J. F., Humphry, K. J., Stone, H. A., and Toner, M. (2009). Particle segregation and dynamics in confined flows. *Physical Review Letters*, 102(9) :094503.

- [Dimarzio and Guttman, 1971] Dimarzio, E. A. and Guttman, C. M. (1971). Separation by flow and its application to gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 55(1) :83–97.
- [Dobrynin, 2006] Dobrynin, A. V. (2006). Effect of counterion condensation on rigidity of semiflexible polyelectrolytes. *Macromolecules*, 39(26) :9519–9527.
- [Doi, 1988] Doi, M. (1988). *The theory of polymer dynamics.*, volume 73. oxford university press.
- [Dorfman, 2006] Dorfman, K. D. (2006). DNA electrophoresis in microfluidic post arrays under moderate electric fields. *Physical Review E*, 73(6) :061922.
- [Dorfman, 2010] Dorfman, K. D. (2010). DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Reviews of Modern Physics*, 82(4) :2903–2947.
- [Dorfman et al., 2013] Dorfman, K. D., King, S. B., Olson, D. W., Thomas, J. D. P., and Tree, D. R. (2013). Beyond gel electrophoresis : Microfluidic separations, fluorescence burst analysis, and DNA stretching. *Chemical Reviews*, 113(4) :2584–2667.
- [Dou et al., 2013] Dou, H., Lee, Y.-J., Jung, E. C., Lee, B.-C., and Lee, S. (2013). Study on steric transition in asymmetrical flow field-flow fractionation and application to characterization of high-energy material. *Journal of Chromatography A*, 1304 :211–219.
- [Easley et al., 2006] Easley, C. J., Karlinsey, J. M., and Landers, J. P. (2006). On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. *Lab on a Chip*, 6(5) :601.
- [Einstein, 1905] Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8) :549–560.
- [Ekiel-Jezewska and Wajnryb, 2006] Ekiel-Jezewska, M. L. and Wajnryb, E. (2006). Accuracy of the multipole expansion applied to a sphere in a creeping flow parallel to a wall. *The Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics*, 59(4) :563–585.
- [Emrich et al., 2002] Emrich, C. A., Tian, H., Medintz, I. L., and Mathies, R. A. (2002). Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 74(19) :5076–5083.
- [Ermak and McCammon, 1978] Ermak, D. L. and McCammon, J. A. (1978). Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *The Journal of Chemical Physics*, 69(4) :1352–1360.
- [ETTRE, 1993] ETTRE, L. (1993). Nomenclature for chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 65(4).
- [Fang et al., 1996] Fang, Y., Zhang, J. Z., Hou, J. Y., Lu, H., and Dovichi, N. J. (1996). Activation energy of the separation of DNA sequencing fragments in denaturing noncross-linked polyacrylamide by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 17(9) :1436–1442.
- [Faucheux and Libchaber, 1994] Faucheux, L. and Libchaber, A. (1994). Confined brownian motion. *Physical Review E*, 49(6) :5158–5163.
- [Feitosa and Mesquita, 1991] Feitosa, M. I. M. and Mesquita, O. N. (1991). Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces : A photon correlation study. *Physical Review A*, 44(10) :6677–6685.
- [Fåhræus and Lindqvist, 1931] Fåhræus, R. and Lindqvist, T. (1931). The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology – Legacy Content*, 96(3) :562–568.
- [Flory, 1953] Flory, P. J. (1953). *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press, Ithaca.
- [Fokker, 1914] Fokker, A. D. (1914). Die mittlere energie rotierender elektrischer dipole im strahlungsfeld. *Annalen der Physik*, 348(5) :810–820.
- [Frigault et al., 2009] Frigault, M. M., Lacoste, J., Swift, J. L., and Brown, C. M. (2009). Live-cell microscopy – tips and tools. *Journal of Cell Science*, 122(6) :753–767. PMID : 19261845.

- [Frissen Gibson and Lanni, 1992] Frissen Gibson, S. and Lanni, F. (1992). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 9(1) :154–166.
- [Fütterer et al., 2004] Fütterer, C., Minc, N., Bormuth, V., Codarbox, J.-H., Laval, P., Rossier, J., and Viovy, J.-L. (2004). Injection and flow control system for microchannels. *Lab on a Chip*, 4(4) :351–356.
- [Fu et al., 2006] Fu, J., Yoo, J., and Han, J. (2006). Molecular sieving in periodic free-energy landscapes created by patterned nanofilter arrays. *Physical Review Letters*, 97(1) :018103.
- [Gai et al., 2004] Gai, H., Yu, L., Dai, Z., Ma, Y., and Lin, B. (2004). Injection by hydrostatic pressure in conjunction with electrokinetic force on a microfluidic chip. *ELECTROPHORESIS*, 25(12) :1888–1894.
- [Gardiner, 1991] Gardiner, K. (1991). Pulsed field gel electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63(7) :658–665.
- [Gervais et al., 2006] Gervais, T., El-Ali, J., Günther, A., and Jensen, K. F. (2006). Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 6(4) :500.
- [Ghalya, 2012] Ghalya, N. (2012). *Interactions hydrodynamiques entre une particule solide et une paroi plane avec condition de glissement de Navier*. PhD thesis, Ecole Polytechnique X.
- [Ghosh and Webb, 1994] Ghosh, R. and Webb, W. (1994). Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical Journal*, 66(5) :1301–1318.
- [Giddings, 1966] Giddings, J. C. (1966). A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. *Separation Science*, 1(1) :123–125.
- [Giddings, 1983] Giddings, J. C. (1983). Hyperlayer field-flow fractionation. *Separation Science and Technology*, 18(8) :765–773.
- [Gimbert et al., 2003] Gimbert, L. J., Andrew, K. N., Haygarth, P. M., and Worsfold, P. J. (2003). Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(9) :615–633.
- [Giudice et al., 2013] Giudice, F. D., Romeo, G., D’Avino, G., Greco, E., Netti, P. A., and Maffettone, P. L. (2013). Particle alignment in a viscoelastic liquid flowing in a square-shaped microchannel. *Lab on a Chip*.
- [Goldman et al., 1967] Goldman, A. J., Cox, R. G., and Brenner, H. (1967). Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall—I motion through a quiescent fluid. *Chemical Engineering Science*, 22(4) :637–651.
- [Graham, 2011] Graham, M. D. (2011). Fluid dynamics of dissolved polymer molecules in confined geometries. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 43 :273–298.
- [Guasto and Breuer, 2008] Guasto, J. S. and Breuer, K. S. (2008). Simultaneous, ensemble-averaged measurement of near-wall temperature and velocity in steady micro-flows using single quantum dot tracking. *Experiments in Fluids*, 45(1) :157–166.
- [Gunther et al., 2010] Gunther, K., Mertig, M., and Seidel, R. (2010). Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA. *Nucleic Acids Research*, 38(19) :6526–6532. PMID : 20511588.
- [Guyon et al., 2001] Guyon, E., Hulin, J. P., and Petit, L. (2001). *Hydrodynamique physique*. EDP Sciences.
- [Hajjoul et al., 2009] Hajjoul, H., Kocanova, S., Lassadi, I., Bystricky, K., and Bancaud, A. (2009). Lab-on-chip for fast 3D particle tracking in living cells. *Lab on a chip*, 9(21) :3054–3058. PMID : 19823719.
- [Hajjoul et al., 2013] Hajjoul, H., Mathon, J., Ranchon, H., Goiffon, I., Mozziconacci, J., Albert, B., Carrivain, P., Victor, J.-M., Gadal, O., Bystricky, K., and Bancaud, A. (2013). High-throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome. *Genome Research*. PMID : 24077391.
- [Hajjoul et al., 2011] Hajjoul, H., Mathon, J., Viero, Y., and Bancaud, A. (2011). Optimized micromirrors for three-dimensional single-particle tracking in living cells. *Applied Physics Letters*, 98(24) :243701.
- [Han and Craighead, 2000] Han, J. and Craighead, H. G. (2000). Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array. *Science*, 288(5468) :1026–1029. PMID : 10807568.

## Bibliographie

---

- [Han et al., 1999] Han, J., Turner, S. W., and Craighead, H. G. (1999). Entropic trapping and escape of long DNA molecules at submicron size constriction. *Physical Review Letters*, 83(8) :1688–1691.
- [Happel and Brenner, 1983] Happel, J. and Brenner, H. (1983). *Low Reynolds Number Hydrodynamics : With Special Applications to Particulate Media*. Springer.
- [Hardy et al., 2009] Hardy, B. S., Uechi, K., Zhen, J., and Pirouz Kavehpour, H. (2009). The deformation of flexible PDMS microchannels under a pressure driven flow. *Lab on a Chip*, 9(7) :935.
- [He et al., 2013] He, Q., Ranchon, H., Carrivain, P., Viero, Y., Lacroix, J., Blatche, C., Daran, E., Victor, J.-M., and Bancaud, A. (2013). Conformational manipulation of DNA in nanochannels using hydrodynamics. *Macromolecules*, 46(15) :6195–6202.
- [Hell, 2007] Hell, S. W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828) :1153–1158. PMID : 17525330.
- [Heller, 2001] Heller, C. (2001). Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 22(4) :629–643.
- [Heller et al., 1998] Heller, C., Slater, G. W., Mayer, P., Dovichi, N., Pinto, D., Viovy, J.-L., and Drouin, G. (1998). Free-solution electrophoresis of DNA. *Journal of Chromatography A*, 806(1) :113–121.
- [Hess et al., 2006] Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., and Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11) :4258–4272. PMID : 16980368 PMCID : PMC1635685.
- [Hillborg et al., 2000] Hillborg, H., Ankner, J., Gedde, U., Smith, G., Yasuda, H., and Wikström, K. (2000). Cross-linked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques. *Polymer*, 41(18) :6851–6863.
- [Ho and Leal, 1974] Ho, B. P. and Leal, L. G. (1974). Inertial migration of rigid spheres in two-dimensional unidirectional flows. *Journal of fluid mechanics*, 65(02) :365–400.
- [Ho and Leal, 1976] Ho, B. P. and Leal, L. G. (1976). Migration of rigid spheres in a two-dimensional unidirectional shear flow of a second-order fluid. *J. Fluid Mech*, 76(04) :783.
- [Hohreiter et al., 2002] Hohreiter, V., Wereley, S. T., Olsen, M. G., and Chung, J. N. (2002). Cross-correlation analysis for temperature measurement. *Measurement Science and Technology*, 13(7) :1072.
- [Holden et al., 2003] Holden, M. A., Kumar, S., Beskok, A., and Cremer, P. S. (2003). Microfluidic diffusion diluter : bulging of PDMS microchannels under pressure-driven flow. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13(3) :412.
- [Hsieh et al., 2008] Hsieh, C.-C., Balducci, A., and Doyle, P. S. (2008). Ionic effects on the equilibrium dynamics of DNA confined in nanoslits. *Nano Letters*, 8(6) :1683–1688.
- [Huang et al., 2006a] Huang, F.-C., Liao, C.-S., and Lee, G.-B. (2006a). An integrated microfluidic chip for DNA/RNA amplification, electrophoresis separation and on-line optical detection. *ELECTROPHORESIS*, 27(16) :3297–3305.
- [Huang and Breuer, 2007] Huang, P. and Breuer, K. S. (2007). Direct measurement of anisotropic near-wall hindered diffusion using total internal reflection velocimetry. *Physical Review E*, 76(4) :046307.
- [Huang et al., 2006b] Huang, P., Guasto, J. S., and Breuer, K. S. (2006b). Direct measurement of slip velocities using three-dimensional total internal reflection velocimetry. *Journal of Fluid Mechanics*, 566(447-464) :5.
- [Huang et al., 2009] Huang, P., Guasto, J. S., and Breuer, K. S. (2009). The effects of hindered mobility and depletion of particles in near-wall shear flows and the implications for nanovelocimetry. *J Fluid Mech*, 637 :241–265.
- [Iliescu et al., 2012] Iliescu, C., Taylor, H., Avram, M., Miao, J., and Franssila, S. (2012). A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. *Biomicrofluidics*, 6(1) :016505–016505–16. PMID : 22662101 PMCID : PMC3365353.



- [Israelachvili, 2011] Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces : Revised Third Edition*. Academic Press.
- [Israelachvili and Adams, 1978] Israelachvili, J. N. and Adams, G. E. (1978). Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0–100 nm. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1 : Physical Chemistry in Condensed Phases*, 74(0) :975–1001.
- [Janca and Stejskal, 2009] Janca, J. and Stejskal, J. (2009). On the retention mechanisms and secondary effects in microthermal field-flow fractionation of particles. *Journal of Chromatography A*, 1216(52) :9071–9080.
- [Jeffrey and Pearson, 1965] Jeffrey, R. C. and Pearson, J. R. A. (1965). Particle motion in laminar vertical tube flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 22(04) :721–735.
- [Jendrejack et al., 2003] Jendrejack, R. M., Dimalanta, E. T., Schwartz, D. C., Graham, M. D., and de Pablo, J. J. (2003). DNA dynamics in a microchannel. *Physical Review Letters*, 91(3) :038102.
- [Jones, 2004] Jones, R. B. (2004). Spherical particle in poiseuille flow between planar walls. *The Journal of chemical physics*, 121 :483.
- [Joseph et al., 2006] Joseph, P., Cottin-Bizonne, C., Benoit, J.-M., Ybert, C., Journet, C., Tabeling, P., and Bocquet, L. (2006). Slippage of water past superhydrophobic carbon nanotube forests in microchannels. *Physical review letters*, 97(15) :156104.
- [Joseph and Tabeling, 2005] Joseph, P. and Tabeling, P. (2005). Direct measurement of the apparent slip length. *Physical Review E*, 71(3) :035303.
- [Kaji et al., 2010] Kaji, N., Okamoto, Y., Tokeshi, M., and Baba, Y. (2010). Nanopillar, nanoball, and nanofibers for highly efficient analysis of biomolecules. *Chemical Society Reviews*, 39(3) :948.
- [Kang et al., 2013] Kang, C., Overfelt, R. A., and Roh, C. (2013). Deformation properties between fluid and periodic circular obstacles in polydimethylsiloxane microchannels : Experimental and numerical investigations under various conditions. *Biomicrofluidics*, 7(5) :054102–054102–15.
- [Kanony et al., 2001] Kanony, C., Åkerman, B., and Tuite, E. (2001). Photobleaching of asymmetric cyanines used for fluorescence imaging of single DNA molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 123(33) :7985–7995.
- [Kazoe and Yoda, 2011] Kazoe, Y. and Yoda, M. (2011). Experimental study of the effect of external electric fields on interfacial dynamics of colloidal particles. *Langmuir*, 27(18) :11481–11488.
- [Kekre et al., 2010] Kekre, R., Butler, J. E., and Ladd, A. J. (2010). Role of hydrodynamic interactions in the migration of polyelectrolytes driven by a pressure gradient and an electric field. *Physical Review E*, 82(5) :050803.
- [Kenward and Slater, 2006] Kenward, M. and Slater, G. W. (2006). Molecular-dynamics simulations with explicit hydrodynamics II : on the collision of polymers with molecular obstacles. *The European Physical Journal E*, 20(2) :125–141.
- [Kihm et al., 2004] Kihm, K. D., Banerjee, A., Choi, C. K., and Takagi, T. (2004). Near-wall hindered brownian diffusion of nanoparticles examined by three-dimensional ratiometric total internal reflection fluorescence microscopy (3-d r-TIRFM). *Experiments in Fluids*, 37(6) :811–824.
- [Kim and Yoo, 2009] Kim, Y. W. and Yoo, J. Y. (2009). Axisymmetric flow focusing of particles in a single microchannel. *Lab on a Chip*, 9(8) :1043.
- [Kinoshita et al., 2007] Kinoshita, H., Kaneda, S., Fujii, T., and Oshima, M. (2007). Three-dimensional measurement and visualization of internal flow of a moving droplet using confocal micro-PIV. *Lab on a Chip*, 7(3) :338.
- [Kirshner et al., 2013] Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D., and Unser, M. (2013). 3-d PSF fitting for fluorescence microscopy : implementation and localization application. *Journal of Microscopy*, 249(1) :13–25.
- [Kopp et al., 1998] Kopp, M. U., Mello, A. J. d., and Manz, A. (1998). Chemical amplification : Continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 280(5366) :1046–1048. PMID : 9582111.

- [Langevin, ] Langevin, P. Sur la théorie du mouvement brownien. *Comptes rendus de l'Académie des sciences (Paris)*, 146 :530–533.
- [Lançon et al., 2001] Lançon, P., Batrouni, G., Lobry, L., and Ostrowsky, N. (2001). Drift without flux : Brownian walker with a space-dependent diffusion coefficient. *EPL (Europhysics Letters)*, 54(1) :28.
- [Lee et al., 2010] Lee, E. F., Koch, D. L., and Joo, Y. L. (2010). Cross-stream forces and velocities of fixed and freely suspended particles in viscoelastic poiseuille flow : Perturbation and numerical analyses. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 165(19–20) :1309–1327.
- [Lerman and Frisch, 1982] Lerman, L. S. and Frisch, H. L. (1982). Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers*, 21(5) :995–997.
- [Leshansky et al., 2007] Leshansky, A. M., Bransky, A., Korin, N., and Dinnar, U. (2007). Tunable nonlinear viscoelastic “Focusing” in a microfluidic device. *Physical Review Letters*, 98(23) :234501.
- [Levi and Gratton, 2007] Levi, V. and Gratton, E. (2007). Exploring dynamics in living cells by tracking single particles. *Cell biochemistry and biophysics*, 48(1) :1–15. PMID : 17703064.
- [Levi and Gratton, 2009] Levi, V. and Gratton, E. (2009). Three-dimensional particle tracking in a laser scanning fluorescence microscope. In Bräuchle, C., Lamb, D. C., and Michaelis, J., editors, *Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer*, page 1–24. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [Li et al., 2006] Li, H., Sadr, R., and Yoda, M. (2006). Multilayer nano-particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 41(2) :185–194.
- [Li and Yoda, 2010] Li, H. and Yoda, M. (2010). An experimental study of slip considering the effects of non-uniform colloidal tracer distributions. *Journal of Fluid Mechanics*, 662 :269–287.
- [Li and Yoda, 2008] Li, H. F. and Yoda, M. (2008). Multilayer nano-particle image velocimetry (MnPIV) in micro-scale poiseuille flows. *Measurement Science and Technology*, 19(7) :075402.
- [Lim et al., 2006] Lim, C., Zhou, E., and Quek, S. (2006). Mechanical models for living cells—a review. *Journal of Biomechanics*, 39(2) :195–216.
- [Lin et al., 2000] Lin, B., Yu, J., and Rice, S. A. (2000). Direct measurements of constrained brownian motion of an isolated sphere between two walls. *Physical Review E*, 62(3) :3909–3919.
- [Lindken et al., 2009] Lindken, R., Rossi, M., Große, S., and Westerweel, J. (2009). Micro-particle image velocimetry ( $\mu$ PIV) : recent developments, applications, and guidelines. *Lab on a Chip*, 9(17) :2551–2567.
- [Liu et al., 2011] Liu, K. J., Rane, T. D., Zhang, Y., and Wang, T.-H. (2011). Single-molecule analysis enables free solution hydrodynamic separation using yoctomole levels of DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 133(18) :6898–6901.
- [Lobry and Ostrowsky, 1996] Lobry, L. and Ostrowsky, N. (1996). Diffusion of brownian particles trapped between two walls : Theory and dynamic-light-scattering measurements. *Physical Review B*, 53(18) :12050–12056.
- [Long and Ajdari, 1996] Long, D. and Ajdari, A. (1996). Electrophoretic mobility of composite objects in free solution : Application to DNA separation. *ELECTROPHORESIS*, 17(6) :1161–1166.
- [Long et al., 1996] Long, D., Viovy, J.-L., and Ajdari, A. (1996). Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte : Motion and deformation. *Physical review letters*, 76(20) :3858.
- [Lorentz, 1897] Lorentz, H. A. (1897). A general theorem concerning the motion of a viscous fluid and a few consequences derived from it. *Koninklijke Akademie van Wetenschappen*, 5 :168.
- [Lumma et al., 2003] Lumma, D., Best, A., Gansen, A., Feuillebois, F., Rädler, J. O., and Vinogradova, O. I. (2003). Flow profile near a wall measured by double-focus fluorescence cross-correlation. *Physical review E*, 67(5) :056313.
- [Lumpkin and Zimm, 1982] Lumpkin, O. J. and Zimm, B. H. (1982). Mobility of DNA in gel electrophoresis. *Biopolymers*, 21(11) :2315–2316.

- [Luo et al., 2006] Luo, Y., Wu, D., Zeng, S., Gai, H., Long, Z., Shen, Z., Dai, Z., Qin, J., and Lin, B. (2006). Double-cross hydrostatic pressure sample injection for chip ce variable sample plug volume and minimum number of electrodes. *Analytical Chemistry*, 78(17) :6074–6080.
- [Martin et al., 2002] Martin, D. S., Forstner, M. B., and Käs, J. A. (2002). Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking. *Biophysical Journal*, 83(4) :2109–2117.
- [Martin and Beckett, 2012] Martin, M. and Beckett, R. (2012). Size selectivity in field-flow fractionation : Lift mode of retention with near-wall lift force. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(25) :6540–6551.
- [Mason, 2000] Mason, T. G. (2000). Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes–Einstein equation. *Rheologica Acta*, 39(4) :371–378.
- [Mason et al., 1997] Mason, T. G., Ganesan, K., van Zanten, J. H., Wirtz, D., and Kuo, S. C. (1997). Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, 79(17) :3282–3285.
- [Mason and Weitz, 1995] Mason, T. G. and Weitz, D. A. (1995). Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical Review Letters*, 74(7) :1250–1253.
- [Matas et al., 2004a] Matas, J., Morris, J., and Guazzelli, E. (2004a). Lateral forces on a sphere. *Oil & Gas Science and Technology*, 59(1) :59–70.
- [Matas et al., 2004b] Matas, J.-P., Morris, J. F., and Guazzelli, I. (2004b). Inertial migration of rigid spherical particles in poiseuille flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 515 :171–195.
- [Mathon, 2013] Mathon, J. (2013). *Développement de nouveaux outils algorithmiques et technologiques pour l'étude du mouvement des chromosomes dans la levure S. Cerevisiae*. PhD thesis, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, LAAS-CNRS.
- [Maxam and Gilbert, 1977] Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2) :560–564.
- [Mayer et al., 1994] Mayer, P., Slater, G. W., and Drouin, G. (1994). Theory of DNA sequencing using free-solution electrophoresis of protein-DNA complexes. *Analytical Chemistry*, 66(10) :1777–1780.
- [McDonald et al., 2000] McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J. A., and Whitesides, G. M. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS*, 21(1) :27–40.
- [McFarlane et al., 2010] McFarlane, N. L., Wagner, N. J., Kaler, E. W., and Lynch, M. L. (2010). Poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) induce different changes in the colloid stability of nanoparticles. *Langmuir*, 26(17) :13823–13830.
- [Meagher et al., 2005] Meagher, R. J., Won, J.-I., McCormick, L. C., Nedelcu, S., Bertrand, M. M., Bertram, J. L., Drouin, G., Barron, A. E., and Slater, G. W. (2005). End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. *ELECTROPHORESIS*, 26(2) :331–350.
- [Meinhart and Wereley, 2003] Meinhart, C. D. and Wereley, S. T. (2003). The theory of diffraction-limited resolution in microparticle image velocimetry. *Measurement science and technology*, 14(7) :1047.
- [Meinhart et al., 2000] Meinhart, C. D., Wereley, S. T., and Santiago, J. G. (2000). A PIV algorithm for estimating time-averaged velocity fields. *Journal of Fluids Engineering*, 122(2) :285–289.
- [Messaud et al., 2009] Messaud, F. A., Sanderson, R. D., Runyon, J. R., Otte, T., Pasch, H., and Williams, S. K. R. (2009). An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science*, 34(4) :351–368.
- [Milanova et al., 2012] Milanova, D., Chambers, R. D., Bahga, S. S., and Santiago, J. G. (2012). Effect of PVP on the electroosmotic mobility of wet-etched glass microchannels. *ELECTROPHORESIS*, 33(21) :3259–3262.
- [Moschakis et al., 2006] Moschakis, T., Murray, B. S., and Dickinson, E. (2006). Particle tracking using confocal microscopy to probe the microrheology in a phase-separating emulsion containing nonadsorbing polysaccharide. *Langmuir*, 22(10) :4710–4719.

- [Navier, 1827] Navier, M. (1827). Sur les lois de l'équilibre et du mouvement des corps solides élastiques. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences de l'Institut de France*, 6 :375.
- [Nemet et al., 2002] Nemet, B. A., Shabtai, Y., and Cronin-Golomb, M. (2002). Imaging microscopic viscosity with confocal scanning optical tweezers. *Optics Letters*, 27(4) :264–266.
- [Neto et al., 2005] Neto, C., Evans, D. R., Bonaccorso, E., Butt, H.-J., and Craig, V. S. J. (2005). Boundary slip in newtonian liquids : a review of experimental studies. *Reports on Progress in Physics*, 68(12) :2859.
- [Nge et al., 2013] Nge, P. N., Rogers, C. I., and Woolley, A. T. (2013). Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chemical Reviews*, 113(4) :2550–2583.
- [Noel et al., 1978] Noel, R. J., Gooding, K. M., Regnier, F. E., Orr, C., and Mullins, M. (1978). Capillary hydrodynamic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 166(2) :373–382.
- [Noolandi, 1992] Noolandi, J. (1992). A new concept for sequencing DNA by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 13(1) :394–395.
- [Oberholzer et al., 1997] Oberholzer, M. R., Wagner, N. J., and Lenhoff, A. M. (1997). Grand canonical brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. *The Journal of Chemical Physics*, 107(21) :9157.
- [Oblath et al., 2013] Oblath, E. A., Henley, W. H., Alarie, J. P., and Ramsey, J. M. (2013). A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva. *Lab on a Chip*, 13(7) :1325.
- [Odijk, 1977] Odijk, T. (1977). Polyelectrolytes near the rod limit. *Journal of Polymer Science : Polymer Physics Edition*, 15(3) :477–483.
- [Odom et al., 2002] Odom, T. W., Love, J. C., Wolfe, D. B., Paul, K. E., and Whitesides, G. M. (2002). Improved pattern transfer in soft lithography using composite stamps. *Langmuir*, 18(13) :5314–5320.
- [Ogston, 1958] Ogston, A. G. (1958). The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Transactions of the Faraday Society*, 54(0) :1754–1757.
- [Oldroyd, 1958] Oldroyd, J. G. (1958). Non-newtonian effects in steady motion of some idealized elastico-viscous liquids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 245(1241) :278–297.
- [Olsen and Adrian, 2000] Olsen, M. G. and Adrian, R. J. (2000). Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 29(1) :S166–S174.
- [Ou et al., 2009] Ou, J., Cho, J., Olson, D. W., and Dorfman, K. D. (2009). DNA electrophoresis in a sparse ordered post array. *Physical Review E*, 79(6) :061904.
- [Pal et al., 2011] Pal, S., Gupta, R., Kim, H., Wickramasinghe, P., Baubet, V., Showe, L. C., Dahmane, N., and Davuluri, R. V. (2011). Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development. *Genome Research*. PMID : 21712398.
- [Park et al., 2004] Park, J. S., Choi, C. K., and Kihm, K. D. (2004). Optically sliced micro-PIV using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Experiments in Fluids*, 37(1) :105–119.
- [Park et al., 2005] Park, J. S., Choi, C. K., and Kihm, K. D. (2005). Temperature measurement for a nanoparticle suspension by detecting the brownian motion using optical serial sectioning microscopy (OSSM). *Measurement Science and Technology*, 16(7) :1418.
- [Pasol et al., 2011] Pasol, L., Martin, M., Ekiel-Jezewska, M. L., Wajnryb, E., Bławdziewicz, J., and Feuillebois, F. (2011). Motion of a sphere parallel to plane walls in a poiseuille flow. application to field-flow fractionation and hydrodynamic chromatography. *Chemical engineering science*, 66(18) :4078–4089.
- [Pasol et al., 2006] Pasol, L., Sellier, A., and Feuillebois, F. (2006). A sphere in a second degree polynomial creeping flow parallel to a wall. *The Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics*, 59(4) :587–614.
- [Perrin, 1908a] Perrin, J. (1908a). La loi de stokes et le mouvement brownien. *Comptes rendus*, 147 :475–476.

- [Perrin, 1908b] Perrin, J. (1908b). L'agitation moléculaire et le mouvement brownien. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences*, 146 :967–970.
- [Perrin, 1909] Perrin, J. (1909). Comptes rendus (paris) 146, 967 (1908). *Ann. Chim. Phys*, 18(5).
- [Picot, 2012] Picot, V. (2012). *Outils microfluidiques pour la maladie d'Alzheimer : étude de l'agrégation de l'amyloïde-bêta*. phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- [Pouya et al., 2005] Pouya, S., Koochesfahani, M., Snee, P., Bawendi, M., and Nocera, D. (2005). Single quantum dot (QD) imaging of fluid flow near surfaces. *Experiments in Fluids*, 39(4) :784–786.
- [Pouya et al., 2008] Pouya, S., Koochesfahani, M. M., Greytak, A. B., Bawendi, M. G., and Nocera, D. G. (2008). Experimental evidence of diffusion-induced bias in near-wall velocimetry using quantum dot measurements. *Experiments in Fluids*, 44(6) :1035–1038.
- [Prieve and Alexander, 1986] Prieve, D. C. and Alexander, B. M. (1986). Hydrodynamic measurement of double-layer repulsion between colloidal particle and flat plate. *Science*, 231(4743) :1269–1270. PMID : 17839562.
- [Randall and Doyle, 2006] Randall, G. C. and Doyle, P. S. (2006). Collision of a DNA polymer with a small obstacle. *Macromolecules*, 39(22) :7734–7745.
- [Rayleigh, 1896] Rayleigh (1896). XV. on the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine Series 5*, 42(255) :167–195.
- [Reisner et al., 2012] Reisner, W., Pedersen, J. N., and Austin, R. H. (2012). DNA confinement in nanochannels : physics and biological applications. *Reports on Progress in Physics*, 75(10) :106601.
- [Ren et al., 2012] Ren, F., Zu, Y., Kumar Rajagopalan, K., and Wang, S. (2012). Regulation of DNA conformations and dynamics in flows with hybrid field microfluidics. *Biomicrofluidics*, 6(4) :044103.
- [Ren et al., 1999] Ren, H., Karger, A. E., Oaks, F., Menchen, S., Slater, G. W., and Drouin, G. (1999). Separating DNA sequencing fragments without a sieving matrix. *ELECTROPHORESIS*, 20(12) :2501–2509.
- [Romeo et al., 2013] Romeo, G., D'Avino, G., Greco, F., Netti, P. A., and Maffettone, P. L. (2013). Viscoelastic flow-focusing in microchannels : scaling properties of the particle radial distributions. *Lab Chip*.
- [Rossi et al., 2009] Rossi, M., Lindken, R., Hierck, B. P., and Westerweel, J. (2009). Tapered microfluidic chip for the study of biochemical and mechanical response at subcellular level of endothelial cells to shear flow. *Lab on a Chip*, 9(10) :1403–1411.
- [Rouse, 1953] Rouse, P. E. (1953). A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers. *The Journal of Chemical Physics*, 21(7) :1272.
- [Rubinow and Keller, 1961] Rubinow, S. I. and Keller, J. B. (1961). The transverse force on a spinning sphere moving in a viscous fluid. *Journal of Fluid Mechanics*, 11(03) :447–459.
- [Sadr et al., 2007] Sadr, R., Hohenegger, C., Li, H., Mucha, P. J., and Yoda, M. (2007). Diffusion-induced bias in near-wall velocimetry. *Journal of Fluid Mechanics*, 577 :443.
- [Sadr et al., 2005] Sadr, R., Li, H., and Yoda, M. (2005). Impact of hindered brownian diffusion on the accuracy of particle-image velocimetry using evanescent-wave illumination. *Experiments in Fluids*, 38(1) :90–98.
- [Sadr et al., 2006] Sadr, R., Yoda, M., Gnanaprakasam, P., and Conlisk, A. T. (2006). Velocity measurements inside the diffuse electric double layer in electro-osmotic flow. *Applied Physics Letters*, 89(4) :044103.
- [Sadr et al., 2004] Sadr, R., Yoda, M., Zheng, Z., and Conlisk, A. T. (2004). An experimental study of electro-osmotic flow in rectangular microchannels. *Journal of Fluid Mechanics*, 506 :357–367.
- [Saffman, 1962] Saffman, P. G. (1962). The effect of wind shear on horizontal spread from an instantaneous ground source. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 88(378) :382–393.
- [Salieb-Beugelaar et al., 2009] Salieb-Beugelaar, G. B., Dorfman, K. D., Berg, A. v. d., and Eijkel, J. C. T. (2009). Electrophoretic separation of DNA in gels and nanostructures. *Lab on a Chip*, 9(17) :2508–2523.

- [Sanger et al., 1982] Sanger, F., Coulson, A., Hong, G., Hill, D., and Petersen, G. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162(4) :729–773.
- [Sanger et al., 1977] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12) :5463–5467.
- [Santiago et al., 1998] Santiago, J. G., Wereley, S. T., Meinhart, C. D., Beebe, D. J., and Adrian, R. J. (1998). A particle image velocimetry system for microfluidics. *Experiments in Fluids*, 25(4) :316–319.
- [Sartori et al., 2003] Sartori, A., Barbier, V., and Viovy, J.-L. (2003). Sieving mechanisms in polymeric matrices. *ELECTROPHORESIS*, 24(3) :421–440.
- [Saxton and Jacobson, 1997] Saxton, M. J. and Jacobson, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING :Applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1) :373–399. PMID : 9241424.
- [Schermelleh et al., 2010] Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 190(2) :165–175. PMID : 20643879.
- [Schmid and Michel, 2000] Schmid, H. and Michel, B. (2000). Siloxane polymers for high-resolution, high-accuracy soft lithography. *Macromolecules*, 33(8) :3042–3049.
- [Schneider et al., 2012] Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7) :671–675.
- [Schnitzer et al., 2012] Schnitzer, O., Frankel, I., and Yariv, E. (2012). Streaming-potential phenomena in the thin-debye-layer limit. part 2. moderate péclet numbers. *Journal of Fluid Mechanics*, 704 :109–136.
- [Schonberg and Hinch, 1989] Schonberg, J. A. and Hinch, E. J. (1989). Inertial migration of a sphere in poiseuille flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 203 :517–524.
- [Schrodinger, 1992] Schrodinger, E. (1992). *What is life? : the physical aspect of the living cell*. Univ. Press, Cambridge.
- [Schwartz and Cantor, 1984] Schwartz, D. C. and Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1) :67–75.
- [Segre and Silberberg, 1962] Segre, G. and Silberberg, A. (1962). Behaviour of macroscopic rigid spheres in poiseuille flow part 2. experimental results and interpretation. *Journal of Fluid Mechanics*, 14(01) :136–157.
- [Shendruk et al., 2012] Shendruk, T., Hickey, O., Slater, G., and Harden, J. (2012). Electrophoresis : When hydrodynamics matter. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(2) :74–82.
- [Sinton, 2004] Sinton, D. (2004). Microscale flow visualization. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(1) :2–21.
- [Skolnick and Fixman, 1977] Skolnick, J. and Fixman, M. (1977). Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*, 10(5) :944–948.
- [Slater and Noolandi, 1985] Slater, G. W. and Noolandi, J. (1985). New biased-reptation model for charged polymers. *Physical Review Letters*, 55(15) :1579–1582.
- [Small, 1974] Small, H. (1974). Hydrodynamic chromatography a technique for size analysis of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 48(1) :147–161.
- [Small and Langhorst, 1982] Small, H. and Langhorst, M. A. (1982). Hydrodynamic chromatography. *Analytical Chemistry*, 54(8) :892A–898A.
- [Smith et al., 1996] Smith, D. E., Perkins, T. T., and Chu, S. (1996). Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients. *Macromolecules*, 29(4) :1372–1373.
- [Smoluchowski, 1916] Smoluchowski, M. V. (1916). Über brownsche molekularbewegung unter einwirkung äußerer kräfte und deren zusammenhang mit der verallgemeinerten diffusionsgleichung. *Annalen der Physik*, 353(24) :1103–1112.

- [Squires and Mason, 2010] Squires, T. M. and Mason, T. G. (2010). Fluid mechanics of microrheology. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 42(1) :413–438.
- [Staben et al., 2003] Staben, M. E., Zinchenko, A. Z., and Davis, R. H. (2003). Motion of a particle between two parallel plane walls in low-reynolds-number poiseuille flow. *physics of fluids*, 15 :1711.
- [Stellwagen et al., 2003] Stellwagen, E., Lu, Y., and Stellwagen, N. C. (2003). Unified description of electrophoresis and diffusion for DNA and other polyions. *Biochemistry*, 42(40) :11745–11750.
- [Stellwagen et al., 1997] Stellwagen, N. C., Gelfi, C., and Righetti, P. G. (1997). The free solution mobility of DNA. *Biopolymers*, 42(6) :687–703.
- [Stelzer, 1998] Stelzer, E. H. K. (1998). Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio : fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *Journal of Microscopy*, 189(1) :15–24.
- [Stokes, 1851] Stokes, G. G. (1851). On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 9 :8–106.
- [Striegel, 2011] Striegel, A. M. (2011). Hydrodynamic chromatography : packed columns, multiple detectors, and microcapillaries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1) :77–81.
- [Striegel and Brewer, 2012] Striegel, A. M. and Brewer, A. K. (2012). Hydrodynamic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5(1) :15–34. PMID : 22708902.
- [Sugii et al., 2002] Sugii, Y., Nishio, S., and Okamoto, K. (2002). In vivo PIV measurement of red blood cell velocity field in microvessels considering mesentery motion. *Physiological Measurement*, 23(2) :403.
- [Tabatabaei et al., 2006] Tabatabaei, S., van de Ven, T., and Rey, A. (2006). Electroviscous cylinder–wall interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 295(2) :504–519.
- [Tabeling, 2009] Tabeling, P. (2009). A brief introduction to slippage, droplets and mixing in microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 9(17) :2428–2436.
- [Taylor, 1953] Taylor, G. (1953). Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 219(1137) :186–203.
- [Teclemariam et al., 2007] Teclemariam, N. P., Beck, V. A., Shaqfeh, E. S. G., and Muller, S. J. (2007). Dynamics of DNA polymers in post arrays : Comparison of single molecule experiments and simulations. *Macromolecules*, 40(10) :3848–3859.
- [Thompson et al., 2002] Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(5) :2775–2783.
- [Tijssen et al., 1986] Tijssen, R., Bos, J., and Van Krevelde, M. E. (1986). Hydrodynamic chromatography of macromolecules in open microcapillary tubes. *Analytical Chemistry*, 58(14) :3036–3044.
- [Toprak et al., 2007] Toprak, E., Balci, H., Blehm, B. H., and Selvin, P. R. (2007). Three-dimensional particle tracking via bifocal imaging. *Nano Letters*, 7(7) :2043–2045.
- [Ługowski et al., 2002] Ługowski, R., Kołodziejczyk, B., and Kawata, Y. (2002). Application of laser-trapping technique for measuring the three-dimensional distribution of viscosity. *Optics Communications*, 202(1–3) :1–8.
- [Unger et al., 2000] Unger, M. A., Chou, H.-P., Thorsen, T., Scherer, A., and Quake, S. R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288(5463) :113–116. PMID : 10753110.
- [Vasseur and Cox, 1976] Vasseur, P. and Cox, R. G. (1976). The lateral migration of a spherical particle in two-dimensional shear flows. *Journal of Fluid Mechanics*, 78(02) :385–413.
- [Viero et al., 2011a] Viero, Y., He, Q., and Bancaud, A. (2011a). Hydrodynamic manipulation of DNA in nanopost arrays : Unhooking dynamics and size separation. *Small*, 7(24) :3508–3518.

- [Viero et al., 2011b] Viero, Y., He, Q., and Bancaud, A. (2011b). Hydrodynamic manipulation of DNA in nanopost arrays : Unhooking dynamics and size separation. *Small*, 7(24) :3508–3518.
- [Viero et al., 2013] Viero, Y., He, Q., Fouet, M., and Bancaud, A. (2013). Single molecule study of DNA collision with elliptical nanoposts conveyed by hydrodynamics. *ELECTROPHORESIS*, page n/a–n/a.
- [Viero et al., 2012] Viero, Y., He, Q., Mazenq, L., Ranchon, H., Fourniols, J. Y., and Bancaud, A. (2012). Efficient prototyping of large-scale pdms and silicon nanofluidic devices using pdms-based phase-shift lithography. *Microfluidics and nanofluidics*, 12(1-4) :465–473.
- [Villone et al., 2011] Villone, M., D’Avino, G., Hulsen, M., Greco, F., and Maffettone, P. (2011). Simulations of viscoelasticity-induced focusing of particles in pressure-driven micro-slit flow. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 166(23–24) :1396–1405.
- [Villone et al., 2013] Villone, M., D’Avino, G., Hulsen, M., Greco, F., and Maffettone, P. (2013). Particle motion in square channel flow of a viscoelastic liquid : Migration vs. secondary flows. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 195 :1–8.
- [Viovy, 2000] Viovy, J.-L. (2000). Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes : Physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics*, 72(3) :813–872.
- [Volkmuth and Austin, 1992] Volkmuth, W. D. and Austin, R. H. (1992). DNA electrophoresis in microlithographic arrays. *Nature*, 358(6387) :600–602.
- [Wang et al., 2012a] Wang, X., Albrecht, J. C., Lin, J. S., and Barron, A. E. (2012a). Monodisperse, “Highly” positively charged protein polymer drag-tags generated in an intein-mediated purification system used in free-solution electrophoretic separations of DNA. *Biomacromolecules*, 13(1) :117–123.
- [Wang et al., 2012b] Wang, X., Liu, L., Guo, G., Wang, W., Liu, S., Pu, Q., and Dasgupta, P. K. (2012b). Resolving DNA in free solution. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35 :122–134.
- [Wang et al., 2012c] Wang, X., Liu, L., Pu, Q., Zhu, Z., Guo, G., Zhong, H., and Liu, S. (2012c). Pressure-induced transport of DNA confined in narrow capillary channels. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17) :7400–7405.
- [Wang et al., 2010] Wang, X., Veerappan, V., Cheng, C., Jiang, X., Allen, R. D., Dasgupta, P. K., and Liu, S. (2010). Free solution hydrodynamic separation of DNA fragments from 75 to 106000 base pairs in a single run. *Journal of the American Chemical Society*, 132(1) :40–41.
- [Warszyński and van de Ven, 2000] Warszyński, P. and van de Ven, T. (2000). Electroviscous forces on a charged cylinder moving near a charged wall. *Journal of Colloid and Interface Science*, 223(1) :1–15.
- [Warszyński et al., 1998] Warszyński, P., Wu, X., and van de Ven, T. (1998). Electrokinetic lift force for a charged particle moving near a charged wall — a modified theory and experiment. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 140(1–3) :183–198.
- [Watson and Crick, 1953] Watson, J. D. and Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356) :737–738.
- [Wereley and Meinhart, 2010] Wereley, S. T. and Meinhart, C. D. (2010). Recent advances in micro-particle image velocimetry. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 42(1) :557–576.
- [Whitesides, 2006] Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101) :368–373.
- [Whitesides, 2012] Whitesides, G. M. (2012). Cool, or simple and cheap? why not both? *Lab on a Chip*, 13(1) :11–13.
- [Whitesides et al., 2001] Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X., and Ingber, D. E. (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3(1) :335–373. PMID : 11447067.



- [Williams et al., 1994] Williams, P., Lee, S., and Giddings, J. C. (1994). Characterization of hydrodynamic lift forces by field-flow fractionation. inertial and near-wall lift forces. *Chemical Engineering Communications*, 130(1) :143–166.
- [Williams et al., 1996] Williams, P., Moon, M. H., and Giddings, J. (1996). Influence of accumulation wall and carrier solution composition on lift force in sedimentation/steric field-flow fractionation. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 113(3) :215–228.
- [Williams et al., 1992] Williams, P. S., Koch, T., and Giddings, J. (1992). Characterization of near-wall hydrodynamic lift forces using sedimentation field-flow fractionation. *Chemical Engineering Communications*, 111(1) :121–147.
- [Williams et al., 2010] Williams, S. J., Park, C., and Wereley, S. T. (2010). Advances and applications on microfluidic velocimetry techniques. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(6) :709–726.
- [Wirtz, 2009] Wirtz, D. (2009). Particle-tracking microrheology of living cells : Principles and applications. *Annual Review of Biophysics*, 38(1) :301–326. PMID : 19416071.
- [Won, 2006] Won, J.-I. (2006). Recent advances in DNA sequencing by end-labeled free-solution electrophoresis (ELFSE). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(3) :179–186.
- [Work and Warshaw, 1992] Work, S. S. and Warshaw, D. M. (1992). Computer-assisted tracking of actin filament motility. *Analytical Biochemistry*, 202(2) :275–285.
- [Wu et al., 2008] Wu, D., Qin, J., and Lin, B. (2008). Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*, 1184(1–2) :542–559.
- [Wu et al., 2005] Wu, M., Roberts, J. W., and Buckley, M. (2005). Three-dimensional fluorescent particle tracking at micron-scale using a single camera. *Experiments in Fluids*, 38(4) :461–465.
- [Wu et al., 1996] Wu, X., Warszynski, P., and van de Ven, T. (1996). Electrokinetic lift : Observations and comparisons with theories. *Journal of Colloid and Interface Science*, 180(1) :61–69.
- [Yariv, 2006] Yariv, E. (2006). “Force-free” electrophoresis? *Physics of Fluids*, 18(3) :031702.
- [Yariv et al., 2011] Yariv, E., Schnitzer, O., and Frankel, I. (2011). Streaming-potential phenomena in the thin-debye-layer limit. part I. general theory. *Journal of Fluid Mechanics*, 685 :306–334.
- [Yildiz et al., 2003] Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003). Myosin v walks hand-over-hand : Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628) :2061–2065. PMID : 12791999.
- [Young Kim et al., 2012] Young Kim, J., Won Ahn, S., Sik Lee, S., and Min Kim, J. (2012). Lateral migration and focusing of colloidal particles and DNA molecules under viscoelastic flow. *Lab on a Chip*, 12(16) :2807.
- [Zettner and Yoda, 2003] Zettner, C. and Yoda, M. (2003). Particle velocity field measurements in a near-wall flow using evanescent wave illumination. *Experiments in Fluids*, 34(1) :115–121.
- [Zhang and Xing, 2007] Zhang, C. and Xing, D. (2007). Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis : latest advances and future trends. *Nucleic Acids Research*, 35(13) :4223–4237. PMID : 17576684.
- [Zheng et al., 2004] Zheng, J., Li, H.-W., and Yeung, E. S. (2004). Manipulation of single DNA molecules via lateral focusing in a PDMS/Glass microchannel†. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(29) :10357–10362.
- [Zheng and Yeung, 2002] Zheng, J. and Yeung, E. S. (2002). Anomalous radial migration of single DNA molecules in capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 74(17) :4536–4547.
- [Zheng and Yeung, 2003] Zheng, J. and Yeung, E. S. (2003). Mechanism for the separation of large molecules based on radial migration in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 75(15) :3675–3680.
- [Zhou and Papautsky, 2013] Zhou, J. and Papautsky, I. (2013). Fundamentals of inertial focusing in microchannels. *Lab on a Chip*, 13(6) :1121.

## Bibliographie

---

- [Zhu et al., 2013] Zhu, Z., Chen, H., Wang, W., Morgan, A., Gu, C., He, C., Lu, J. J., and Liu, S. (2013). Integrated bare narrow Capillary–Hydrodynamic chromatographic system for free-solution DNA separation at the single-molecule level. *Angewandte Chemie*, 125(21) :5722–5726.
- [Zimm, 1956] Zimm, B. H. (1956). Dynamics of polymer molecules in dilute solution : Viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss. *The Journal of Chemical Physics*, 24(2) :269.



# **Annexes**

## **.1 Programme de dynamique Brownienne**

---

```

clear all
close all

save=1; %Sauvegarde ?
if save
path='H:\Data Champ + flux\';
end

coeffdiffanisotrope=1; %1 = Interactions hydro pour
                        % le coefficient de diffusion
a=100e-9; %Rayon des traceurs
dt=0.5e-4; %Intervalle de temps pour la simulation

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Géométrie et paramètres du fluide%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
dz=0.1e-9; %Pas de la grille en z
h=1000e-9; % h=H/2 demie hauteur de la canalisation
v0=200e-6; % Vitesse maximale du fluide
zreel=a+dz:dz:2*h-a-dz; %Grille en z pour la création de D

kB=1.3806488e-23; %Constante de Boltzmann
T=21+273.15; %Température
eta=5.8e-3; %Viscosité du fluide
D0=kB*T/(6*pi*eta*a); %Coefficient de diffusion libre
Nw=50000; %Nombre de Marcheurs
t_exp=8.67*1e-3; %Temps d'exposition caméra
t_lap=0.0091833-8.67*1e-3; %Temps de Transfert caméra

vy=-40e-6:2e-6:v0+40e-6; %Vecteur pour la création histogramme
                        %de vitesse en y
vx=-40e-6:1e-6:40e-6; %Vecteur pour la création histogramme
                        %de vitesse en x

if coeffdiffanisotrope
%Coefficient de diffusion anisotrope !! Nécessite la fonction Dperp_Benesch
[Dperp dDperp Dpara dDpara]=Dperp_Benesch(zreel,a,h,D0);
else
Dperp=D0*ones(1,length(zreel)); %Coefficient de diffusion isotrope
Dpara=D0*ones(1,length(zreel));
dDperp=0*ones(1,length(zreel));
dDpara=0*ones(1,length(zreel));
end

v=Ubille(2*h,a,zreel,v0); %Vitesse de la bille sur la grille
                        %!! Nécessite la fonction Ubille

Nl=round(t_exp/dt); %Nombre de pas de temps nécessaires
                    %pour couvrir le temps d'exposition
z0=2*(h-a-2*dz)*rand(1,Nw)+a+dz; %Distribution homogène initiale

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Conditions initiales %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
z=z0;
x=0*ones(1,Nw);

```

---

---

```

y=0*ones(1,Nw);
ymean1=y;
xmean1=x;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%evolution durant le premier temps d'exposition%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for j=1:N1
    %Mouvement selon z
    z=z+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dperp,z,'cubic')*dt)+...
        interp1(zreel,dDperp,z,'cubic')*dt;
    %Conditions aux bords
    z=z.*(z>=(a+dz))+(2*(a+dz)-z).*(z<a+dz);
    z=z.*(z<=2*h-a-dz)+(2*(2*h-a-dz)-z).*(z>2*h-a-dz);

    %Mouvement selon la direction du fluide
    y=y+interp1(zreel,v,z,'cubic')*dt+ sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);

    %Mouvement selon la direction perpendiculaire au fluide
    x=x+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);
    %Accumulation pour calcul des positions moyennes
    ymean1=ymean1+y;
    xmean1=xmean1+x;

end

%Positions moyennes, 1er temps d'exposition
ymean1=ymean1/(N1+1);
xmean1=xmean1/(N1+1);
%Initialisation des positions initiales : étape temps de transfert
ymean2=y;
xmean2=x;

N2=round(t_lap/dt); %Nombre de pas de temps nécessaires
                    %pour couvrir le temps de transfert
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%évolution durant le temps de transfert%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for j=1:N2
    %Mouvement selon z
    z=z+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dperp,z,'cubic')*dt)+...
        interp1(zreel,dDperp,z,'cubic')*dt;
    %Conditions aux bords
    z=z.*(z>=(a+dz))+(2*(a+dz)-z).*(z<a+dz);
    z=z.*(z<=2*h-a-dz)+(2*(2*h-a-dz)-z).*(z>2*h-a-dz);
    %Mouvement selon la direction du fluide
    y=y+interp1(zreel,v,z,'cubic')*dt+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);
    %Mouvement selon la direction perpendiculaire au fluide
    x=x+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
        sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);

    %Accumulation pour calcul des positions moyennes
    ymean2=ymean2+y;

```

---

---

```

xmean2=xmean2+x;

end
%Positions moyennes, temps de transfert
ymean2=ymean2/(N2+1);
xmean2=xmean2/(N2+1);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%evolution durant le 2e temps d'exposition%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Initialisation des positions initiales : 2e exposition
ymean3=y;
xmean3=x;

for j=1:N1
%Mouvement selon z
z=z+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
    sqrt(2*interp1(zreel,Dperp,z,'cubic')*dt)+...
    interp1(zreel,dDperp,z,'cubic')*dt;
%Conditions aux bords
z=z.*(z>=(a+dz))+(2*(a+dz)-z).*(z<a+dz);
z=z.*(z<=2*h-a-dz)+(2*(2*h-a-dz)-z).*(z>2*h-a-dz);
%Mouvement selon la direction du fluide
y=y+interp1(zreel,v,z,'cubic')*dt+...
    sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
    sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);
%Mouvement selon la direction perpendiculaire au fluide
x=x+sqrt(3)*(2*rand(1,Nw)-1).*...
    sqrt(2*interp1(zreel,Dpara,z,'cubic')*dt);

%Accumulation pour calcul des positions moyennes
ymean3=ymean3+y;
xmean3=xmean3+x;

end

%Positions moyennes, 2e temps d'exposition
ymean3=ymean3/(N1+1);
xmean3=xmean3/(N1+1);

%Calcul des histogrammes
countvymean=hist((ymean3-ymean1)/(t_exp+t_lap),vy); %selon y
countvxmean=hist((xmean3-xmean1)/(t_exp+t_lap),vx); %selon x
%Tracés
figure(2)
hold all
plot(vy,countvymean/trapz(vy,countvymean))
legend('Moyenne durant t_expo')
figure(3)
hold all
plot(vx,countvxmean/trapz(vx,countvxmean))
legend('Moyenne durant t_expo')

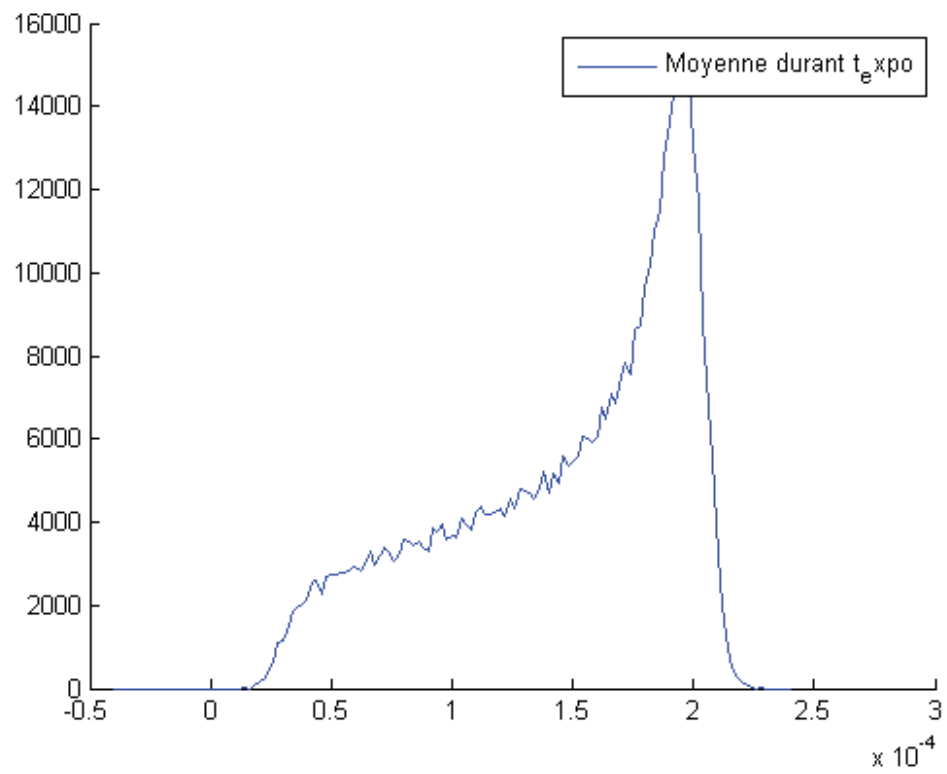
if save %Sauvegarde des données sous fichier excel

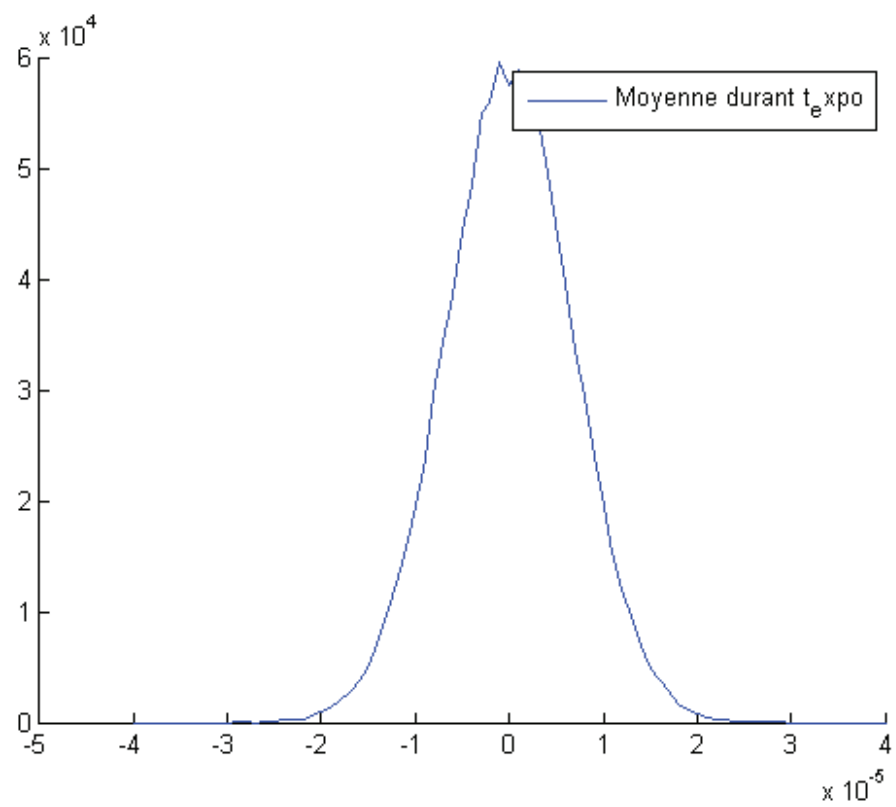
```

---

---

```
mat1=[vy' countvymean'];  
xlswrite([path 'results.xls'],mat1,1)  
mat2=[vx' countvxmean'];  
xlswrite([path 'results.xls'],mat2,2)  
end
```





*Published with MATLAB® 7.13*



**.2 Calcul du coefficient de diffusion**

```
function [Dperp dDperp Dpara dDpara] = Dperp_Benesch(z,a,h,D0)
%Calcul du coefficient de diffusion perpendiculaire suivant l'approximation
%de Benesch et al. PRE 68 2003. Approximation MCSA
%Fonction prenant en entrées le vecteur position z, le rayon de la
%particule a, la demie hauteur de la canalisation h, le coefficient de
%diffusion libre de la particule

% !! Nécessite les fonctions Lambda_para et Lambda
temp=0;
temp2=0;
for n=1:20
temp=temp...
    +(-1)^n*( (2*n*h-z-a)./(2*n*h-z) ) .* (Lambda(2*n*h+z,a) ^-1)...
    +(-1)^n*((n-1)*2*h+z-a)./((n-1)*2*h+z)).*(Lambda(2*(n+1)*h-z,a)^-1);

temp2=temp2...
    +(-1)^n*( (2*n*h-z-a)./(2*n*h-z) ) .* (Lambda_para(2*n*h+z,a) ^-1)...
    +(-1)^n*((n-1)*2*h+z-a)./((n-1)*2*h+z)).*(Lambda_para(2*(n+1)*h-z,a)^-1);

end
%coefficient de Diffusion perpendiculaire
Dperp=D0*(1+(Lambda(z,a) ^-1)+(Lambda(2*h-z,a) ^-1)+temp).^(-1);
%coefficient de Diffusion parallèle
Dpara=D0*(1+(Lambda_para(z,a) ^-1)+(Lambda_para(2*h-z,a) ^-1) +temp2).^(-1);

%Dérivée du coefficient de Diffusion perpendiculaire
dDperp=diff(Dperp)/mean(diff(z));
%Dérivée du coefficient de Diffusion parallèle
dDpara=diff(Dpara)/mean(diff(z));
dDperp=[-dDperp(end) dDperp];
dDpara=[-dDpara(end) dDpara];
```

```
function [Dperp dDperp Dpara dDpara] = Dperp_Benesch(z,a,h,D0)
%Calcul du coefficient de diffusion perpendiculaire suivant l'approximation
%de Benesch et al. PRE 68 2003. Approximation MCSA
%Fonction prenant en entrées le vecteur position z, le rayon de la
%particule a, la demie hauteur de la canalisation h, le coefficient de
%diffusion libre de la particule

% !! Nécessite les fonctions Lambda_para et Lambda
temp=0;
temp2=0;
for n=1:20
temp=temp...
    +(-1)^n*( (2*n*h-z-a)./(2*n*h-z) ) .* (Lambda(2*n*h+z,a) ^-1)...
    +(-1)^n*((n-1)*2*h+z-a)./((n-1)*2*h+z)).*(Lambda(2*(n+1)*h-z,a)^-1);

temp2=temp2...
    +(-1)^n*( (2*n*h-z-a)./(2*n*h-z) ) .* (Lambda_para(2*n*h+z,a) ^-1)...
    +(-1)^n*((n-1)*2*h+z-a)./((n-1)*2*h+z)).*(Lambda_para(2*(n+1)*h-z,a)^-1);

end
%coefficient de Diffusion perpendiculaire
Dperp=D0*(1+(Lambda(z,a) ^-1)+(Lambda(2*h-z,a) ^-1)+temp).^(-1);
%coefficient de Diffusion parallèle
Dpara=D0*(1+(Lambda_para(z,a) ^-1)+(Lambda_para(2*h-z,a) ^-1) +temp2).^(-1);

%Dérivée du coefficient de Diffusion perpendiculaire
dDperp=diff(Dperp)/mean(diff(z));
%Dérivée du coefficient de Diffusion parallèle
dDpara=diff(Dpara)/mean(diff(z));
dDperp=[-dDperp(end) dDperp];
dDpara=[-dDpara(end) dDpara];
```

```
function [lamb] = Lambda(z,a)
%Fonction Lambda pour le calcul du coefficient de diffusion perpendiculaire
%Faucheux PRE 49 1994
temp=0;
alpha=acosh(z/a);%
for n=1:40
temp=temp+(n*(n+1)/((2*n-1)*(2*n+3)))*((2*sinh((2*n+1)*alpha)+(2*n+1)*...
sinh(2*alpha))./(4*(sinh((n+0.5)*alpha)).^2-...
(2*n+1)^2*(sinh(alpha)).^2)-1);
end
temp=4*temp.*sinh(alpha)/3;
lamb=temp;

function [lamb] = Lambda_para(z,a)
%Fonction Lambda_para pour le calcul du coefficient de diffusion parallèle
%Lin_Colloids and surfaces A _174_2000
%Expression 5 du papier.

lamb=(1-(9/16)*(a./z)+(1/8)*(a./z).^3-(45/256)*(a./z).^4-(1/16)*(a./z).^5).^(-1);
```

### **.3 Vitesse de traceurs confinés**

```

function [ U_bille ] = Ubille(H,a,Z,v0)
%Ubille(H,a,Z,v0 )
%Vitesse d'une bille dans un Poiseuille. D'après Pasol Chem. Eng. 66 (2011)
%4078-4089. Attention Z part du bas de la canalisation. H = profondeur
%totale de la canalisation
%Fonction prenant pour entrées H la hauteur totale de la canalisation, a le
%rayon de la bille, Z E [a, H-a], v0 vitesse max du fluide.

alpha=a/H;
s=Z/H;

e1=s/alpha-1;
e2=(1-s)/alpha-1;
E1=1-alpha./s;
E2=1-alpha./(1-s);
L1=log(E1);
L2=log(E2);
%Calcul des coefficients de friction

ft_xx = 0.954-8*(L1+L2)/15-64*(E1.*L1+E2.*L2)/375+0.0511+0.0190*(s-0.5).^2-...
    0.613*(s-0.5).^4+alpha*(-0.961-4.75*(s-0.5).^2+0.881*(s-0.5).^4)+...
    alpha^2*(3.59+2.77*(s-0.5).^2+84.4*(s-0.5).^4);

ct_yx=-(L1-L2)/10-43*(e1.*L1-e2.*L2)/250+0.0209*(E1-E2)-...
    0.007*(s-0.5)+0.037*(s-0.5).^3+alpha*(0.097*(s-0.5)-0.310*(s-0.5).^3)+...
    alpha^2*(2.71*(s-0.5)-7.21*(s-0.5).^3);

cr_yy = -2*(L1+L2)/5-66*(e1.*L1+e2.*L2)/125+0.1579*(E1+E2-1)-...
    0.206-0.0992*(s-0.5).^2+0.323*(s-0.5).^4+...
    alpha*(-0.101-1.70*(s-0.5).^2+16.83*(s-0.5).^4)+...
    alpha^2*(0.307+15.4*(s-0.5).^2+28.7*(s-0.5).^4);

fr_xy=4*ct_yx/3;

fp=1.014-4.0454*(s-0.5).^2+0.1580*(s-0.5).^4+alpha*(1.939+0.456*(s-0.5).^2+...
    11.07*(s-0.5).^4)+alpha^2*(3.53-14.34*(s-0.5).^2+62.88*(s-0.5).^4)+...
    alpha^3*(-1.40+24.28*(s-0.5).^2-212.38*(s-0.5).^4);

cp=0.0095*(s-0.5)-0.0645*(s-0.5).^3+alpha*(-4.382*(s-0.5)+...
    2.631*(s-0.5).^3)+alpha^2*(-0.328*(s-0.5)+11.323*(s-0.5).^3);

U_bille=v0*((cr_yy.*fp+fr_xy.*cp)./(cr_yy.*ft_xx-fr_xy.*ct_yx));
end

```

## **.4 Programme d'ajustement des données**

---

```

clear all
close all
%Programme d'ajustement des distributions expérimentales.
folder='H:\Data Champ + flux\MANIPS BILLES\BSA Glycerol\BSA b2x2 1p50Nente 1200nm
file=[folder '\Test_300mbar_gly_1200nm_redaction.xlsx'];
%Colonne 1 valeurs de vitesse
%Colonne 2 histogrammes
save=1; %Sauvegarde ?
m=xlsread(file,1); %lecture du fichier
v=m(:,1); %Vecteur vitesse (expérimental)
countv=m(:,2); %Histogramme (expérimental)
figure(1) %Tracé des données
plot(v,countv')
clear m
binsize=mean(diff(v));
pas=binsize/30; %Paramètre pour l'intégration numérique
dub=1e-8;
%Paramètres
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
a=100e-9; %rayon de la particule
w=1.0623e-05; %Largeur de la distribution gaussienne selon
%la direction transverse au fluide

v0=90e-6:2e-6:160e-6; %Valeurs de v0 à sonder
h=150e-9:10e-9:400e-9; %Valeurs de h =H/2 à sonder

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Modèle de Faxen%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

ff1=zeros(length(v0),length(h),length(v)); %Initialisation de la matrice de fit
hh = waitbar(0,'Please wait---Matrix of fit creation---'); %Waitbar
for i=1:length(v0) %Boucle sur le paramètre v0
    for j=1:length(h) %Boucle sur le paramètre h
        for k=1:length(v) %Boucle sur v (expérimental)
            %Vitesse minimale (Faxen)
            Umin=v0(i)*(2*a/h(j)-4*a.^2/(3*h(j)^2));
            %Vitesse maximale (Faxen)
            Umax=v0(i)*(1-a.^2/(3*h(j)^2));

            ub=0:dub:Umax-dub;
            %Création de la matrice de fit
            ff1(i,j,k)=sum(exp(-(v(k)-ub)/w).^2*dub.*(ub>=Umin).*(ub<=Umax)./...
                (v0(i).*(1-a.^2/(3*h(j)^2)-ub/v0(i)).^5)));
        end
    end
    waitbar(i/length(v0),hh)
end
close(hh) %Waitbar

%Normalization
N=zeros(length(v0),length(h));
for l=1:length(v0)
    for m=1:length(h)

```

---



---

```

        N(1,m)=trapz(v,reshape(ff1(1,m,:),[1 length(v)]));
    end
end

N=repmat(N,[1 1 length(v)]);
ffn1=ff1./N;
clear ff N

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

## Prise en compte des interactions hydrodynamique bille-paroi

```

%% !! Attention nécessite Ubille

ffn2=zeros(length(v0),length(h),length(v)); %Initialisation de la matrice de fit
hh = waitbar(0,'Please wait---Matrix of fit creation---'); %Waitbar

for j=1:length(v0) %Boucle sur v0
    for k=1:length(h) %Boucle sur h
        d=2*h(k); %Hauteur totale 2h
        dzb1=0.5e-9; %Pas du vecteur en z
        zb1=a+0.1e-9:dzb1:h(k); %Vecteur en z
        vb1=Ubille(d,a,zb1,v0(j)); %Vitesse théorique de la bille
        %Dérivée dz/dv
        dzb_dv=1./(diff(vb1)./diff(zb1));
        dzb_dv=[dzb_dv(1) dzb_dv];
        %%%Calcul de la distribution sans effet de diffusion
        fb=dzb_dv./(2*(h(k)-a));
        fbn=fb./trapz(vb1,fb); %Normalisation
        %%%Extension de la distribution (aux endroits où elle vaut 0)
        vb1moins=min(v)-3*w:pas:min(vb1)-pas;
        vb1plus=max(vb1)+pas:pas:max(v)+3*w;
        vb1etendu=[vb1moins vb1 vb1plus];
        fbnnetendue=[zeros(1,length(vb1moins)) fbn zeros(1,length(vb1plus))];
        dvvv=diff(vb1);
        %%%Convolution
        for i=1:length(vb1etendu)
            fbbruite(i)=sum(exp(-(vb1etendu(i)-vb1).^2/w^2).*fbn.*[dvvv(1) dvvv]);
        end
        %%%Norme
        fbbruite=fbbruite./trapz(vb1etendu,fbbruite);
        %%%Interpolation pour s'adapter aux valeurs de v expérimentales
        ffn2(j,k,:)=interp1(vb1etendu,fbbruite,v,'line');
        %%%Norme
        ffn2(j,k,:)=ffn2(j,k,:)/trapz(v,ffn2(j,k,:));
    end
    clear fbbruite
end
waitbar(j/length(v0),hh) %Waitbar
end
close(hh) %Waitbar

```

---

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Moindre carrés%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
countv=countv./trapz(v,countv); %Normalisation des données expérimentales
%Initialisation des matrices Chi²
chi21=zeros(length(v0(:)),length(h)); %Modèle Faxen
chi22=zeros(length(v0(:)),length(h)); %Modèle Pasol
hh = waitbar(0,'Please wait---Performing fit---'); %Waitbar
for l=1:length(v0)
    for m=1:length(h)
        chi21(l,m)=sum((countv(:,1) '-reshape(ffn1(l,m,:),[1 length(v(:))])).^2);
        chi22(l,m)=sum((countv(:,1) '-reshape(ffn2(l,m,:),[1 length(v(:))])).^2);
    end
    waitbar(l/length(v0),hh)
end

close(hh)
%Minimisation des matrices
[i11 i21]=find(chi21==min(min((chi21))));
[i12 i22]=find(chi22==min(min((chi22))));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Tracés ---Moindre Carrés---
figure(1)
hold all
subplot(1,2,1)
imagesc(h(length(h):-1:1),v0(length(v0):-1:1),1./chi21)
title('\chi^2 Modèle Faxen')
ylabel('u_0 (m/s)')
xlabel('h (m)')
colorbar
axis square
subplot(1,2,2)
imagesc(h(length(h):-1:1),v0(length(v0):-1:1),1./chi22)
title('\chi^2 IH On')
ylabel('u_0 (m/s)')
xlabel('h (m)')
colorbar
axis square
figure(2)
hold all
plot(h/1e-9,chi21(i11,:),h/1e-9,chi22(i12,:))
title('Evolution de \chi^2 vs h pour v_0 ajusté')
xlabel('h (nm)')
ylabel('\chi^2')
legend('Chi² Faxen','Chi² IH On')
figure(3)
hold all
plot(v0/1e-6,chi21(:,i21),v0/1e-6,chi22(:,i22))
title('Evolution of \chi^2 vs u_0 pour le h ajusté')
xlabel('u_0 (µm/s)')
ylabel('\chi^2')

%%%Résultats
figure(4)
hold all

```

---

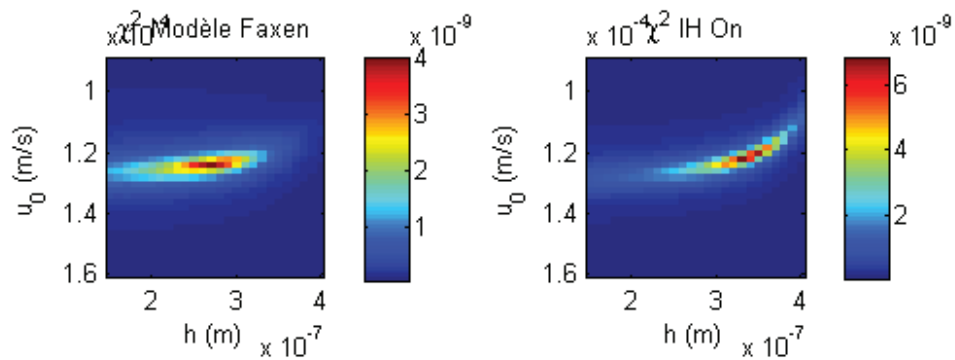
---

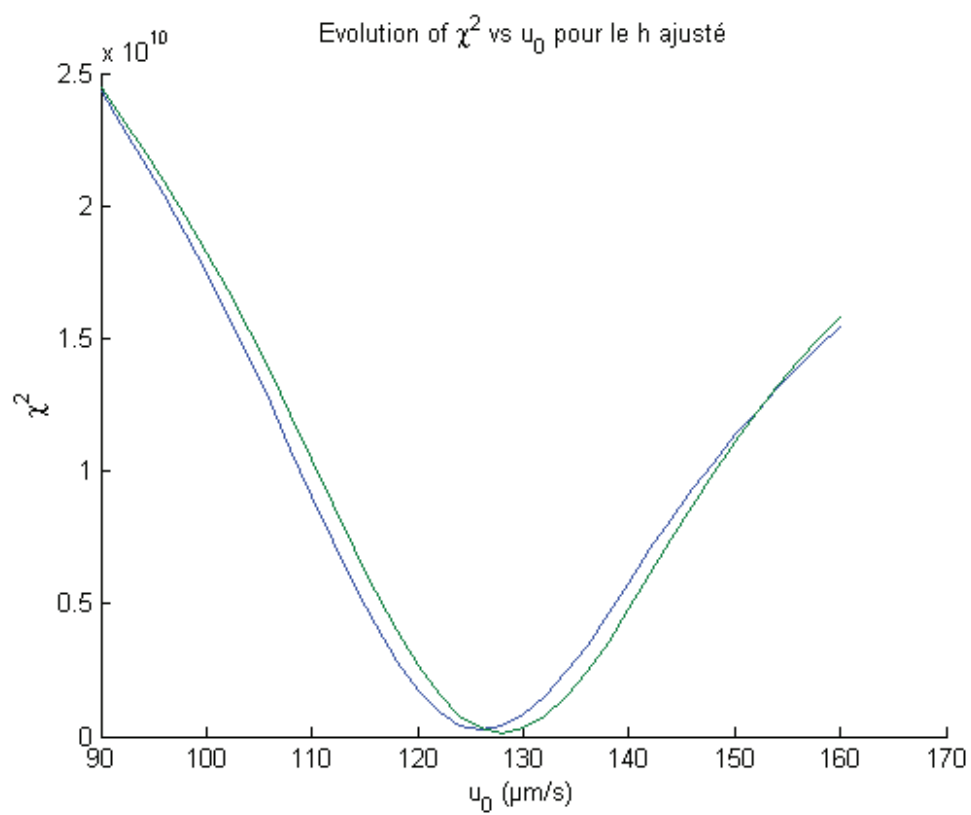
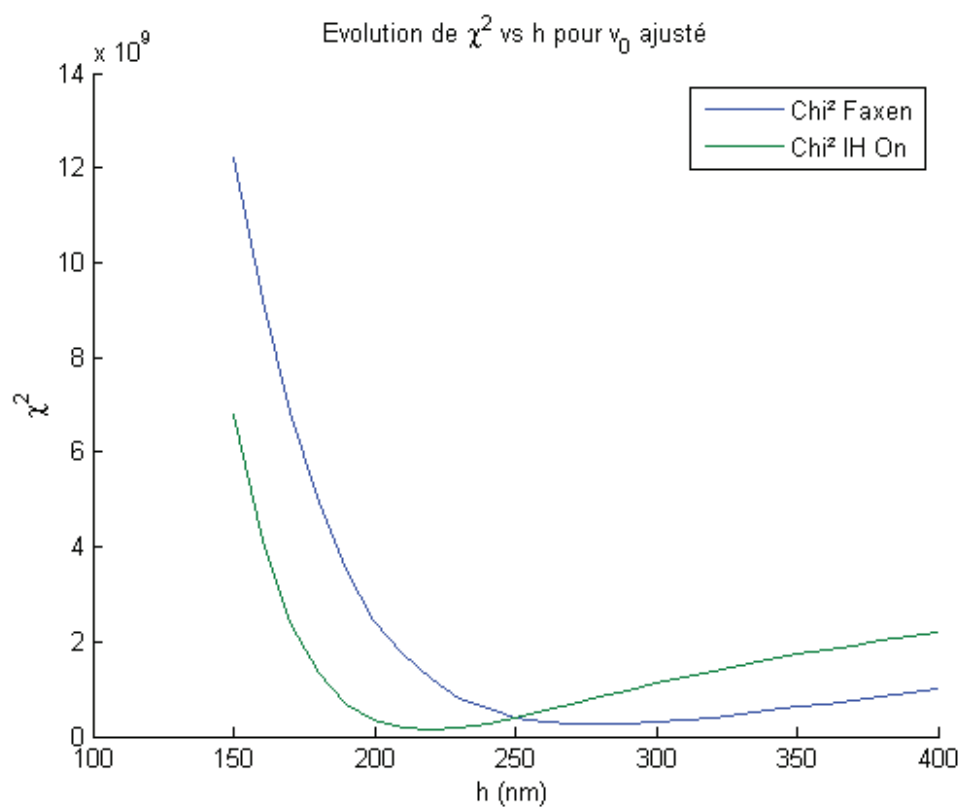
```

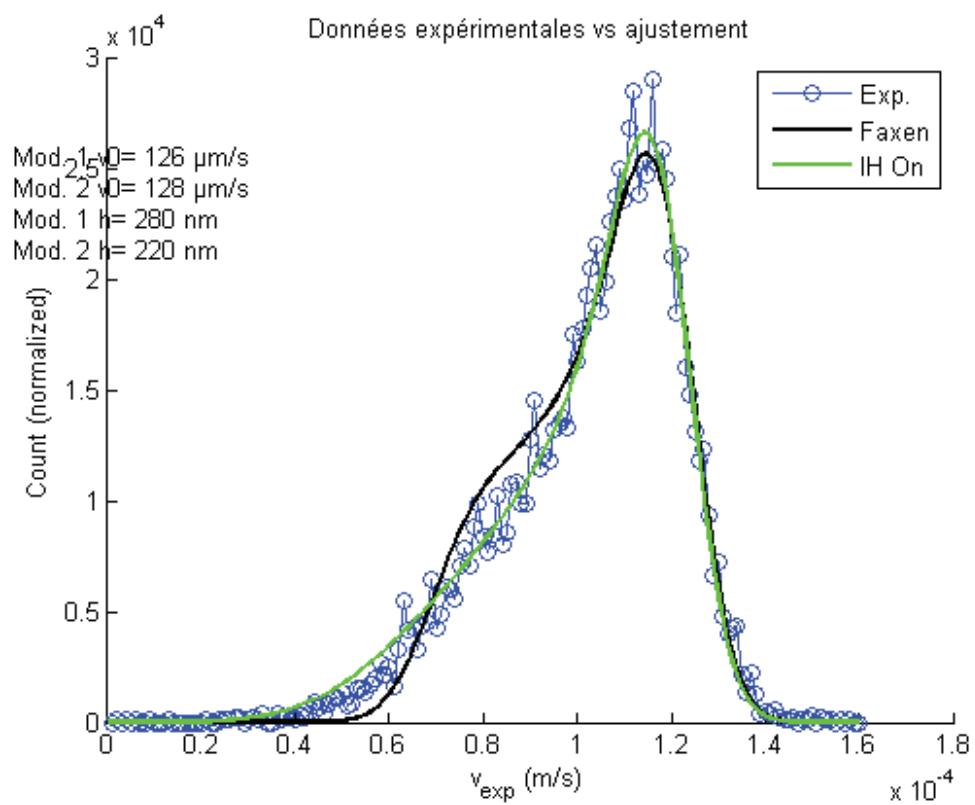
plot(v,countv,'-o') %Données expérimentales
plot(v,reshape(ffn1(i11,i21,:),[1 length(v)]),'k'...
      ,v,reshape(ffn2(i12,i22,:),[1 length(v)]),'g','LineWidth',2)
legend('Exp.','Faxen','IH On')
str2(2) = {'Mod. 1 v0= ', num2str(v0(i11)/1e-6),'  $\mu\text{m/s}$ '};
str2(3) = {'Mod. 2 v0= ', num2str(v0(i12)/1e-6),'  $\mu\text{m/s}$ '};
str2(4) = {'Mod. 1 h= ',num2str(h(i21)/1e-9),' nm'};
str2(5) = {'Mod. 2 h= ',num2str(h(i22)/1e-9),' nm'};
text(-20e-6,max(reshape(ffn2(i11,i21,:),[1 length(v)])),str2)
title('Données expérimentales vs ajustement')
ylabel('Count (normalized)')
xlabel('v_{exp} (m/s)')

%Sauvegarde sur la page 2 du fichier de données
if save
Mm=[v,countv,reshape(ffn1(i11,i21,:),[1 length(v)]),reshape(ffn2(i12,i22,:),[1 le
xlswrite(file,Mm,2)
end

```







*Published with MATLAB® 7.13*