

# Table des matières

<b>1</b>	<b>La microfluidique</b>	<b>3</b>
1.1	Introduction . . . . .	3
1.2	La mise en œuvre : la lithographie "douce" . . . . .	5
1.3	Les écoulements microfluidiques . . . . .	8
1.4	Les applications aux analyses biologiques . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Les modifications de surfaces pour la microfluidique</b>	<b>23</b>
2.1	Introduction . . . . .	23
2.2	Etat de l'art . . . . .	24
2.2.1	Nécessité d'un traitement de surface . . . . .	24
2.2.2	Les traitements de surfaces . . . . .	25
2.3	Greffage covalent de polyacrylamide dans des microcanaux en PDMS	28
2.3.1	Principes de la modification de surface . . . . .	28
2.3.2	Méthode expérimentale . . . . .	30
2.4	Transposition au cyclo olefin copolymère (COC) . . . . .	36
2.5	Conclusion . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Implémentations de MEMS par photopolymérisation <i>in situ</i></b>	<b>41</b>
3.1	Introduction . . . . .	41
3.1.1	Capteur de flux : État de l'art . . . . .	41
3.1.2	Les mesures indirectes . . . . .	42
3.1.3	Les mesures directes . . . . .	44
3.1.4	Résumé . . . . .	47
3.1.5	Les MEMS : vers une haute intégration . . . . .	48
3.2	Capteur de flux basé sur l'élongation d'une microstructure . . . . .	53
3.2.1	Soft Flow Sensors . . . . .	53
3.2.2	Conclusions . . . . .	68
3.3	Capteur de flux indépendant de la viscosité . . . . .	68
3.3.1	Améliorations techniques . . . . .	69
3.3.2	Résultats . . . . .	70
3.3.3	Interprétations . . . . .	72
3.3.4	Conclusions et perspectives . . . . .	76
3.4	Conclusion générale sur les capteurs de flux . . . . .	77

<b>4</b>	<b>Incorporation de protéines dans un réseau de colonnes</b>	<b>79</b>
4.1	Introduction . . . . .	79
4.2	Fabrication et caractérisation du réseau de colonnes . . . . .	80
4.3	Incorporation de protéines : application à l'adhésion cellulaire . . . .	86
4.4	Conclusion . . . . .	92
<b>5</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>93</b>
	<b>Annexes</b>	<b>95</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>112</b>



# Chapitre 1

## La microfluidique

### 1.1 Introduction

La microfluidique est une science encore très jeune, et peut être définie de différentes manières. Selon P. Tabeling [Tabeling, 2003], *"on peut définir la microfluidique comme [une discipline] portant sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels, c'est-à-dire fabriqués à l'aide des nouvelles technologies"*<sup>1</sup>. Georges M. Whitesides, dans son article intitulé *"les origines et le futur de la microfluidique"* [Whitesides, 2006], définit la microfluidique comme *"la science et la technologie des systèmes qui manipulent des petites quantités de fluides ( $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  litres) dans des canaux ayant des dimensions de plusieurs dizaines de microns."* Cette définition fait bien apparaître la dualité de la microfluidique qui, en tant que science, englobe la physique des fluides et l'étude des phénomènes à l'échelle micrométrique et qui, en tant que technologie, contient également une dimension applicative. Tabeling donne quant à lui une définition d'ingénieur qui, comme il le souligne lui-même, exclut l'ensemble des systèmes microfluidiques naturels, tels que les capillaires sanguins ou le transport de sève dans les plantes. On peut définir plus largement la microfluidique comme la science et la technologie des systèmes manipulant des fluides et dont au moins l'une des dimensions caractéristiques est de l'ordre du micromètre. C'est une science interdisciplinaire où l'ingénierie, la physique, la chimie et les biotechnologies cohabitent pour fournir de nombreuses applications dans les domaines de l'analyse biologique et chimique.

Les premières études expérimentales datent d'il y a plus de 150 ans, dans lesquelles le médecin Jean-Louis Marie Poiseuille, s'intéressant à la circulation sanguine, réussit l'exploit de mesurer des débits de fluides visqueux dans des capillaires en verre d'environ  $10\mu\text{m}$  de diamètre [Poiseuille, 1846]. Il est ainsi considéré comme le pionnier de la microfluidique.

---

1. P. Tabeling précise que les technologies qu'il considère ici sont toutes les technologies permettant la fabrication des systèmes miniaturisés (photolithographie, gravure, dépôt, moulage etc.). Elles sont dites *nouvelles* car elles sont apparues dans les années 70.

Puis la manipulation de fluides à l'échelle microfluidique a connu un essor certain avec l'apparition de la microélectronique puis des MEMS (Micro Electro Mechanical System) dans les années 1950-60. De nombreux dispositifs fluidiques réalisant les actions élémentaires de leurs homologues électriques virent le jour. Le but était de concevoir des ordinateurs alimentés pneumatiquement, sans électricité.

Mais le véritable engouement que connaît la microfluidique date de la fin des années 90, avec l'apparition de la première puce microfluidique fabriquée en creusant les canaux dans un élastomère de façon très peu coûteuse [Manz et al., 1990] et réalisant la miniaturisation d'une technique classique d'analyse : la chromatographie en phase liquide. Le haut pouvoir d'intégration de toutes les étapes élémentaires réalisées dans un laboratoire (séparation, ménage, synthèse, détection..) rendent possible le concept de laboratoire sur puce et l'application de la microfluidique dans le domaine biomédical et l'analyse chimique. C'est un domaine actuellement en pleine expansion, autant sur le plan académique qu'industriel, et qui commence à tenir ses promesses de miniaturisation, de haut débit et de meilleur rendement.

Les laboratoires sur puces sont plus attractifs que leur homologues macroscopiques pour plusieurs raisons. En réduisant les volumes de réactifs, ils rendent l'analyse moins chère, plus rapide, et meilleure pour l'environnement.

La microfluidique dans le domaine de la recherche est particulièrement dynamique. Plusieurs ouvrages traitant de ce sujet ont vu le jour : entre autres [Heller and Guttman, 2001], [Tabeling, 2003] et [Colin, 2004]. Des conférences (MicroTAS, IEEE, MSB) se sont positionnées en spécialistes de la microfluidique, ainsi que plusieurs journaux, comme Lab on Chip, journal de référence des laboratoires sur puces, Sensors and Actuators, dont la vocation a toujours été de traiter des capteurs et actuateurs, et qui depuis la miniaturisation de ces systèmes s'est aussi spécialisé dans les Micro Electro Mechanical Systems (ou MEMS), et enfin Analytical Chemistry et Electrophoresis qui sont des portails offrant une grande visibilité à la miniaturisation des mesures analytiques et des méthodes de séparation. Notons aussi que les articles de review, qui se comptaient sur les doigts de la main au début de ma thèse [Auroux et al., 2002], [Reyes et al., 2002] se comptent aujourd'hui par centaines [Dittrich and Manz, 2006].

Ce mémoire est composé de trois parties donnant chacune des réponses à des besoins différents de la microfluidique. La première partie décrit l'importance des traitements de surfaces dans les systèmes microfluidiques et fera l'objet du développement de modifications de surfaces pour les puces microfluidiques pour deux matériaux plastiques différents. Dans un premier temps c'est le matériau le plus couramment utilisé pour les puces microfluidiques (le PDMS) qui sera traité. L'enjeu de la modification de surface du PDMS est d'obtenir un revêtement stable dans le temps. Puis nous verrons un polymère qui commence depuis peu à être utilisé en microfluidique, le COC, et qui a la particularité d'être chimiquement assez inerte.



La deuxième partie du mémoire consiste en l'application d'une technique qui permet d'implémenter des structures en polymère *in situ* dans un microcanal. Ces structures peuvent être souples ou rigides, mobiles ou statiques, et leur forme peut avoir une grande variabilité. Les multiples possibilités qu'offre cette technique seront exploitées pour l'incorporation de deux types de capteurs de flux *in situ* d'une part, et d'autre part, dans une troisième partie, pour la fabrication de réseaux de colonnes modifiées avec des protéines d'intérêt.

L'introduction décrira les bases de la microfluidique. Nous verrons les techniques utilisées et comment se développe cette nouvelle technologie. Puis nous verrons les avantages qu'apporte la réduction des dimensions des écoulements. Ces avantages seront illustrés par plusieurs exemples.

## 1.2 La mise en œuvre : la lithographie "douce"

### Les matériaux

Les matériaux de la microélectronique, comme le silicium, furent les premiers support de la microfluidique. Mais ces matériaux, très coûteux et difficiles d'usinage, rendaient la microfabrication longue et à un prix qui la confinait à quelques laboratoires.

L'apparition des puces fabriquées en polymère [Duffy et al., 1998] a pour ainsi dire démocratisé la microfluidique. Ainsi la lithographie "douce" s'est substituée aux techniques dites "dures". Au delà de la diminution du prix de la puce, les polymères ont l'avantage de ne pas nécessiter des traitements chimiques lourds (comme la gravure au HF), et sont adaptés aux techniques de production de masse. Un grand nombre de polymères est utilisé, laissant le choix à une vaste gamme de propriétés physico-chimiques. Le choix du polymère se fait selon ses propriétés mécaniques, ses caractéristiques optiques, sa stabilité vis-à-vis des solvants et espèces chimiques comme les acides ou les bases. Il existe une température de transition vitreuse, la  $T_g$ , en dessous de laquelle les polymères passent à l'état solide. Cette propriété est utilisée dans les procédés de fabrication : le polymère est chauffé au dessus de sa  $T_g$ , moulé, et garde la forme imposée après son refroidissement.

On peut classer les polymères en 3 catégories, suivant leurs propriétés thermomécaniques, qui sont déterminées par le taux d'interconnexions entre les monomères, et la longueur des chaînes de monomères entre ces points d'interconnexion. Les interconnexions peuvent être créées par réticulation, par des enchevêtrements et par des liaisons polaires

Les *thermoplastiques*, dont les chaînes de monomères ne sont pas liées entre elles, deviennent malléables au dessus de leur  $T_g$  et gardent la forme moulée quand ils sont refroidis.

Les *élastomères* sont peu interconnectés, et supportent des très grandes déformations. Ces déformations dépendent du taux d'interconnexion entre les chaînes d'élastomère et peuvent atteindre plusieurs centaines de pourcents. Les élastomères se

déforment de manière réversible, sans subir de déformation plastique.

Les *thermodurcisseurs* ont par contre beaucoup de liaisons entre leurs chaînes. Ils prennent la forme au premier passage en dessous de la  $T_g$  de manière irréversible.

### La photolithographie

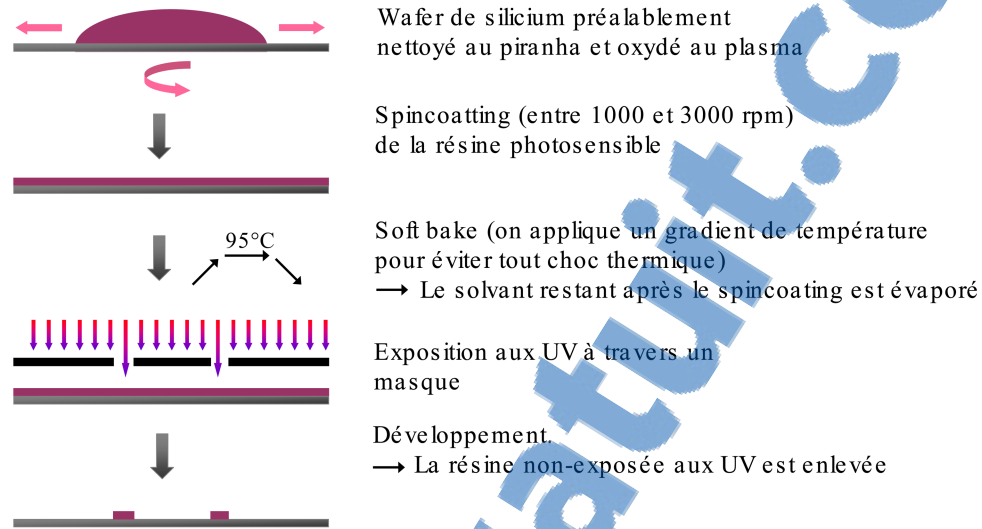
Le moule qui va déterminer le motif imprimé sur le polymère est obtenu par lithographie. Elle consiste à reproduire un dessin original sur la surface d'un matériau solide, comme un wafer de silicium ou une lame de verre. Cette lithographie se fait le plus généralement par photolithographie. Les étapes de cette technique sont schématisées figure 1.1. Cette technique consiste à étaler une couche d'épaisseur contrôlée, typiquement de 1 à  $100\mu\text{m}$ , d'une résine photosensible sur le wafer ou la lame de verre. Cette fine couche de résine est illuminée aux UV à travers un masque représentant le motif. La résine réticule aux endroits éclairés et une étape de développement enlève la partie non réticulée, laissant apparaître le motif des microcanaux en surface sur le wafer (résine négative) ou gravé dans la surface de résine (photolithographie positive). On obtient ce qu'on appelle un master. La méthode d'étalement de la résine est le "spincoating", ou étalement par centrifugation, mais elle peut aussi se faire par lamination. Dans le cas de la lamination, la résine est mise au contact du substrat grâce à un laminateur qui presse un film d'épaisseur donnée et constante sur le substrat [Paul et al., 2007]. Cette technique présente l'avantage d'être plus facile à mettre en œuvre que le "spincoating", mais l'épaisseur de la résine est fixée par le fabricant. Dans le cas du "spincoating", l'épaisseur des motifs sur le wafer varie de manière continue entre 1 et  $100\mu\text{m}$ . La viscosité de la résine et la vitesse de "spincoating" (typiquement 1000 à 3000 tours par minutes) sont les facteurs qui déterminent l'épaisseur de la résine. La résine en excès est placée sur le wafer, lui-même placé sur un support rotatif. La rotation du support entraîne l'étalement de la goutte, et l'évaporation d'une partie du solvant de la résine. Pendant la rotation du support, l'épaisseur diminue jusqu'à l'établissement d'un équilibre entre les forces visqueuses de la résine et l'évaporation de son solvant. L'excès de solvant est enlevé avant l'exposition aux UV par chauffage du wafer à haute température ( $90^\circ\text{C}$ )

### La réplique du master

Il existe plusieurs méthodes de réplique du master : le hot embossing [Qi et al., 2002], le moulage par injection [Dang et al., 2005] et le moulage simple [Duffy et al., 1998].

Le *hot embossing* consiste à chauffer le master et la plaque de polymère juste au dessus de sa température de transition vitreuse qui est typiquement comprise entre  $50^\circ\text{C}$  et  $150^\circ\text{C}$  sous vide, pour éviter la formation de bulles d'air et de les mettre en contact avec une force contrôlée (typiquement de l'ordre de  $0.5\text{--}2\text{kN/cm}^2$ ). Toujours en appliquant cette force la température est ramenée en dessous de la  $T_g$ . La séparation du master et du substrat constitue une phase critique. Cette technique convient tout particulièrement aux thermodurcisseurs et aux thermoplastiques qui

## Photolithographie « dure »



## Moulage du PDMS

PDMS Sylgard ou RTV 10:1 reticulant  
Coulé directement sur le master

Réticulation  
(minimum 2heures à 65°C)

Démoulage

Perçage des trous de  
connections avec un poinçon

Irradiation avec un plasma UV/Ozone  
Mise en place des tubes de connection

Vue de coté

Vue de face

FIG 1.1 – Schéma descriptif des différentes étapes de la lithographie "dure" et de la fabrication d'une puce en PDMS.

garderont l’empreinte du motif sur leur surface.

*Le moulage par injection* est la technique la plus répandue dans le monde macroscopique pour l’usinage des plastiques. Il consiste à faire fondre des granulés de polymères en les portant à une température plus haute que la  $T_g$ , et qui est typiquement comprise entre  $150^\circ C$  et  $400^\circ C$ , à les injecter à l’aide d’une haute pression contre le master, puis à refroidir le système en dessous de la  $T_g$ . Tout comme le hot embossing cette technique peut être appliquée aux thermoplastiques et aux thermodurcisseurs. Mais si son temps de cycle est plus court (0.3 à 3 min contre 3 à 10 min) et son automatisation plus facile à mettre en œuvre, les motifs créés ont une taille qui ne descend pas en dessous de  $10\mu m$ , contre quelques nanomètres pour le hot embossing. Dans les deux cas, les microstructures ainsi obtenues sont renfermées sur une surface plate de polymère par lamination [Paul et al., 2007] dans le même principe que ce que nous avons présenté pour la fabrication des masters, par application d’une force, de chaleur ou par collage avec une colle [Ekström et al., 1991].

La technique la plus utilisée dans le monde académique et que j’ai utilisé pendant ma thèse est le *moulage*, qui consiste à couler directement sur le moule un élastomère avec une portion de réticulant. Le réticulant va faire réticuler l’élastomère et donc le faire durcir, cette réaction étant souvent accélérée par une augmentation de température. Après réticulation, l’élastomère est facilement décollé du moule et peut être simplement mis en contact avec une surface plane, qui peut être en verre ou en élastomère "spincoaté". Une activation préalable avec un plasma permet de rendre la fermeture du canal irréversible. Les connections sont créées en perçant des trous à l’aide d’un poinçon et en y insérant des tubes de diamètre calibré. Le faible module élastique de l’élastomère permet de créer ainsi un joint étanche.

En particulier, le PDMS convient tout particulièrement aux microtechnologies, de par sa facilité de mise en œuvre et ses très bonnes qualités optiques. Il est en effet transparent aux longueurs d’ondes supérieures à 230 nm et peu autofluorescent [Effenhauser et al., 1997]. De plus, le PDMS est très poreux aux gaz ce qui rend possible le contrôle de la composition gazeuse à l’intérieur de la puce, très important dans certaines applications comme la culture cellulaire [Folch et al., 2000]. Notons aussi que son faible module d’élasticité fait qu’il se déforme aux hautes pressions [Gervais et al., 2006].

## 1.3 Les écoulements microfluidiques

### Écoulements laminaires et nombre de Reynolds

Les régimes de fonctionnement des lois hydrodynamiques dans les systèmes microfluidiques sont différents de ceux dans les échelles macroscopiques. Ils se caractérisent par des vitesses faibles (de l’ordre de 1 à  $100\mu m/sec$ ) dans des canaux de dimensions micrométriques sur des faibles volumes (du femtolitre au microlitre). A ces échelles, la gravité est négligeable, et les effets visqueux prennent le pas sur les effets inertiels.

Le nombre de Reynolds illustre cet état de fait. C'est un nombre adimensionnel défini par le rapport du flux convectif de la quantité de mouvement sur le flux diffusif associé aux forces visqueuses.

$$Re = \frac{\rho U l}{\mu} \quad (1.1)$$

Ce nombre varie de  $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  dans la majorité des systèmes microfluidiques. Il peut atteindre des valeurs supérieures à l'unité, comme cela a été le cas pendant ma thèse, ce que nous verrons dans ce manuscrit. On se trouve alors en régime laminaire, le régime transitoire n'apparaissant qu'à  $Re=50$ . Le régime turbulent n'est jamais atteint dans les microsystèmes, il n'apparaît qu'au nombre de Reynolds  $Re=2000$ .

L'équilibre entre les forces de frottement visqueux et le gradient de pression va déterminer le profil d'écoulement. Un écoulement généré par une différence de pression entre l'amont et l'aval du microcanal pour un fluide laminaire incompressible est décrit par l'écoulement de Poiseuille. Son profil de vitesse est parabolique, avec une vitesse nulle aux parois et une vitesse maximale  $V_{max}$  au centre du canal

$$V_{max} = \Delta P R^2 / 4\mu \quad (1.2)$$

Le débit  $Q$  du fluide dans un cylindre est directement relié à la différence de pression  $\Delta P$  :

$$Q = \frac{\pi R^4}{8\mu} \frac{\Delta P}{L} \quad (1.3)$$

où  $R$  est le rayon du tube,  $L$  sa longueur,  $\mu$  la viscosité dynamique du fluide (en  $\text{Pa.s}^{-1}$ )

### Le nombre de Péclet

Le deuxième nombre sans dimension est le nombre de Péclet. Dans les systèmes microfluidiques, le coefficient de diffusion est très faible (dans les liquides simples, il est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$ ).

$$D = \frac{kT}{6\pi R\mu} \quad (1.4)$$

Le nombre de Péclet rend compte de l'importance des termes d'advection sur les termes de diffusion qui sont les deux formes de transport présentes dans un écoulement.

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (1.5)$$

où  $U$  est une vitesse caractéristique de l'écoulement,  $l$  est la taille du système et  $D$  le coefficient de diffusion.

En d'autres termes le nombre de Péclet rend compte de l'influence de l'écoulement par rapport à la diffusion moléculaire.

L'étalement  $\delta$  d'un front de concentration est proportionnel à la racine carré du temps  $t$  :

$$\delta = \sqrt{Dt} \quad (1.6)$$

Ainsi que la taille  $l$  d'une tâche de traceur :

$$l = 2\sqrt{Dt} \quad (1.7)$$

Dans les microsystèmes on peut se trouver en écoulement diffusif comme en écoulement convectif. Dans des conditions typiques des systèmes microfluidiques (où la viscosité de l'eau est égale à  $1\text{ kg/m}^3$  et le coefficient de diffusion à  $10^5\text{ cm}^2/\text{s}$ ), il peut varier de  $10^2$  (pour un nombre de Reynolds de  $10^{-8}$ ) à  $10^{-2}$  (pour un nombre de Reynolds de  $10^4$ ). Le mélange peut donc se faire par convection ou par diffusion. Mais dans le cas des flux laminaires, le mélange entre deux espèces est perpendiculaire aux lignes de flux, il est donc dominé par la diffusion. Ce mélange est alors dépendant du temps, et la distance nécessaire pour qu'un composé diffuse perpendiculairement au flux sur une distance  $d$  est donnée par  $Pe.d$ . La zone où les fluides se mélangent en diffusant l'un vers l'autre est nommée "zone d'interdiffusion".

Le senseur en T (T-sensor) prend parti de l'existence de cette longueur d'interdiffusion  $Pe.d$  pour, entre autres, accéder aux propriétés physico-chimiques d'un soluté (sa concentration, son coefficient de diffusion, sa viscosité)[Kamholz et al., 1999], ou encore déterminer des constantes de réaction [Salmon et al., 2005], comme le montre la figure 3.4.

Le contrôle du mélange par diffusion a aussi permis de générer des gradients contrôlés d'espèces chimiques [Li Jeon et al., 2000] [Dertinger et al., 2001] ou biologiques [Pihl et al., 2005] en amenant différentes espèces à différentes concentrations dans un même canal.

Inversement, il est possible de filtrer des espèces par leur taille, car le coefficient de diffusion est directement lié à la taille des particules<sup>2</sup>. Des filtres "sans membrane", appelés "filtre H" de par leur forme (un canal contenant les particules de différentes taille et un canal contenant un liquide de dilution en entrée, un canal récupérant les particules d'intérêt et un canal pour les résidus en sortie) ont ainsi été développés [Schilling et al., 2002].

### Le mélange contrôlé

Il n'est pas rare que l'on veuille accélérer le mélange et optimiser son rendement. C'est le cas dans les applications mettant en jeu des réactions chimiques ou biologiques, ou encore l'étude de cinétiques. Pour que la cinétique de ces systèmes soit

---

2. d'après la formule d'Einstein :  $D = \frac{RT}{6\pi\eta\mathcal{N}_A}$  où  $r$  est le rayon de la particule diffusante dans le fluide.



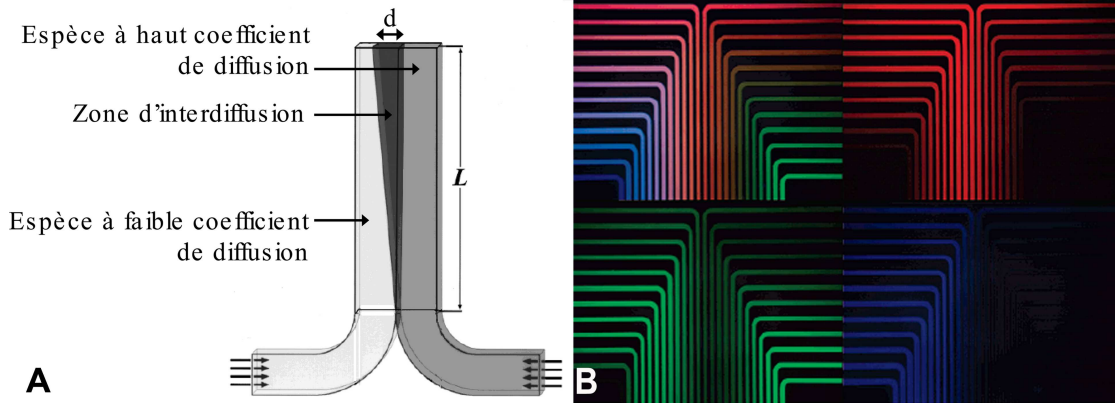


FIG 1.2 – Applications du contrôle du mouvement diffusif perpendiculaire à la direction du flux laminaire. **A** Schéma du capteur en T avec 2 fluides entrants contenant deux espèces de différents coefficients de diffusion. La zone d'interdiffusion est due à la différence des coefficients de diffusion des deux espèces. La mesure de  $d$  permet d'accéder aux propriétés physico-chimiques des espèces (coefficient de diffusion, viscosité, concentrations) et à leur cinétique de réaction, si interaction. Extrait de [Kamholz et al., 1999]. **B** Exemple d'une puce microfluidique générant un gradient. Le gradient (en haut à gauche) est généré à partir de 3 fluorophores [Pihl et al., 2005]

limitée par la réaction et non par la diffusion, un mélange rapide des réactifs est essentiel. Il est alors nécessaire de forcer le mélange. De nombreuses techniques ont été proposées pour induire un mélange, qui est dit chaotique car il crée des étirements et repliements des interfaces, qui, leur nombre augmentant, amènent au mélange. Outre le mélange mécanique par des MEMS intégrés, qui sera décrit plus loin, des mélangeurs passifs ont été développés. Stroock *et al.* [Stroock et al., 2002] ont développé un mélangeur *passif* grâce à des chevrons gravés de manière asymétrique et qui induisent des écoulements secondaires en hélice. L'alternance des orientations des chevrons par rapport à l'axe de symétrie du canal engendre un mélange chaotique (figure 1.3).

Une technique très élégante est le *flow focusing*. Elle consiste à confiner le fluide à diluer grâce à un canal de faible rayon  $d$ , dans le canal contenant le fluide de dilution. La pénétration par diffusion du fluide de dilution dans le fluide intérieur est alors très rapide sur la petite distance  $d$ . Son temps caractéristique est  $t = d^2/D$  [Pabit and Hagen, 2002].

Des mélangeurs actifs ont été développés. Des perturbations de pressions produites par des vannes intégrées ont été utilisées pour produire un mélange rapide [Tabeling et al., 2004], l'application d'un champ électrique oscillant permet de créer des instabilités électocinétiques conduisant à un mélange [Oddy et al., 2001] ou encore des chaînes de particules magnétiques mises en rotation grâce à un champ magnétique rotatif induisent des trajectoires chaotiques dans le fluide [Biswal and Gast, 2004].

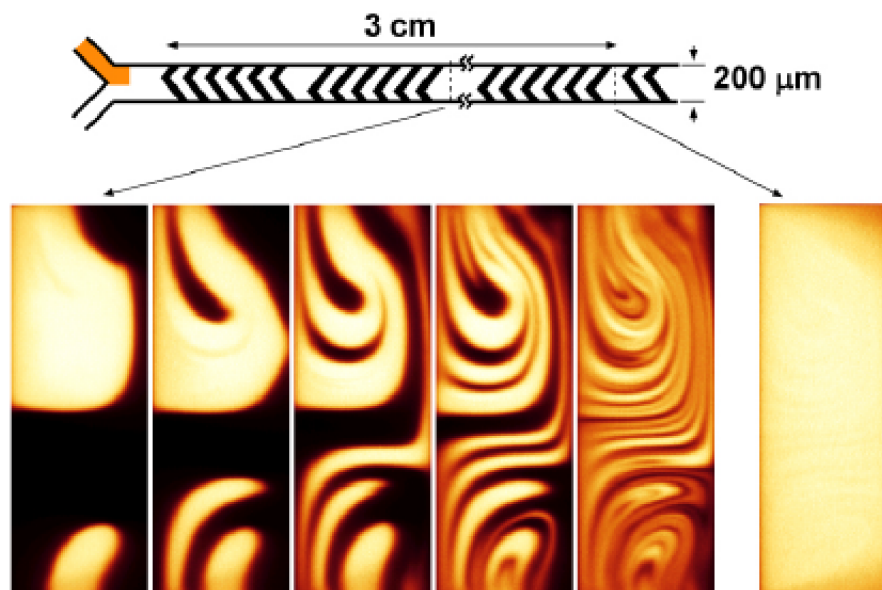


FIG 1.3 – Principe du mélangeur à chevrons. Les motifs en chevron gravés dissymétriquement à la surface du canal créent des écoulements secondaires transverses. Le changement d'orientation des chevrons par rapport à l'axe de symétrie du canal engendre un mélange. Tiré de [Stroock et al., 2002]

### Les phénomènes électrocinétiques

Un pan entier de la microfluidique s'adresse aux phénomènes électrocinétiques, qui sont les phénomènes de couplage entre un courant électrique et le mouvement d'un fluide contenant des électrolytes.

Il existe quatre phénomènes électrocinétiques principaux :

- i) l'électro-osmose*, lorsqu'un champ électrique appliqué le long d'un canal engendre un flux. Nous verrons que ce phénomène peut être utilisé pour la manipulation de fluides, et pour augmenter l'efficacité des réactions de séparation,
- ii) le potentiel d'écoulement* ou *le courant d'écoulement* associé, plus connus en anglais sous le nom de *streaming potential* ou *streaming current*, lorsqu'un flux d'électrolytes contrôlé par pression dans un canal chargé génère un courant électrique ou un potentiel électrique.

Ces deux phénomènes sont liés à l'existence de la double couche électrique à la surface du canal.

- iii) Ces couplages ont lieu de même lorsque le fluide est chargé d'objets colloïdaux chargés : un champ électrique appliqué le long du canal génère le mouvement de ces objets dans le fluide, c'est l'électrophorèse.*

- iiii) La diélectrophorèse* est un phénomène qui apparait pour des particules ne possé-



dant pas de charge nette mais des propriétés diélectriques. Lorsqu'elles sont soumises à un gradient de champ électrique, elles se polarisent et se déplacent vers les champs faibles ou forts selon que leur permittivité est respectivement plus faible ou plus importante que la permittivité du milieu environnant.

Dans la plupart des applications microfluidiques, la surface du canal est en contact avec une solution aqueuse, et donc avec des électrolytes. Si la surface contient des groupements ionisables, elle acquiert alors spontanément une charge de surface. Par exemple, dans le cas typique d'un capillaire en verre, les groupements  $\text{SiOH}$  s'ionisent au contact de l'eau pour former une charge de surface  $\text{SiO}^-$  et relarguent un proton. En réponse à cette charge de surface, les ions se réarrangent et un excès de contre-ions est confiné dans une couche que l'on appelle la double couche électrique (DCE) ou couche de Debye-Huckel, porteuse d'une charge nette opposée à la charge de surface. Elle est composée de deux couches : la plus proche de la surface, où les ions sont immobiles, est appelée couche de Stern. La deuxième couche est appelée couche de Gouy-Chapman ou couche diffuse car les ions y sont mobiles mais toujours en excès par rapport au reste du fluide. La longueur caractéristique des effets électrocinétiques est l'épaisseur de la couche de Stern, appelée longueur de Debye  $\lambda_D$ . Elle est inversement proportionnelle à la racine carrée de la concentration en ions, et est typiquement de l'ordre de 1 à 10nm dans des solutions aqueuses de concentrations usuelles en sel (10-100mM).

Le *flux électroosmotique* apparaît lorsqu'un champ électrique est appliqué le long du canal. La double couche se meut vers l'électrode opposée, entraînant tout le fluide par viscosité. Dans l'eau, la charge nette du fluide est nulle, donc aucun flux électrophorétique dû à la charge du fluide n'est présent. Si l'épaisseur de la double couche est négligeable par rapport à la section du canal, ce qui est le cas dans des canaux de taille micrométrique, il se forme un flux dont le profil est plat, dit profil "bouchon", dont la vitesse ne dépend pas de la géométrie du canal, mais seulement de la charge de surface et de la valeur du champ appliqué. Cette vitesse est définie comme  $v_{EOF} = -\mu_{EOF}E$ , où  $\mu_{EOF}$  est la mobilité électrophorétique, qui est directement liée au potentiel zêta  $\zeta$ , potentiel à la longueur de Debye :  $\mu_{EOF} = \zeta_{surface} \epsilon \epsilon_o / \mu$ . Le potentiel zêta est intrinsèquement très dépendant de l'état de charge de surface, et une inhomogénéité de la densité de charge de surface, due par exemple à l'adsorption de biomolécules présentes dans le fluide ou à des défauts de la surface, entraîne inévitablement une inhomogénéité du flux électroosmotique et des recirculations ou flux transversaux dans le fluide [Ajdari, 1995], comme schématisé dans la figure 1.4.

Nous verrons par la suite qu'il est donc très important de contrôler l'état de surface pour éviter ces inhomogénéités pour un flux électroosmotique homogène. De plus nous verrons que dans certaines applications le flux électroosmotique n'est pas désiré. Un traitement de surface approprié est alors nécessaire pour annuler la charge de surface, et de fait le flux électroosmotique.

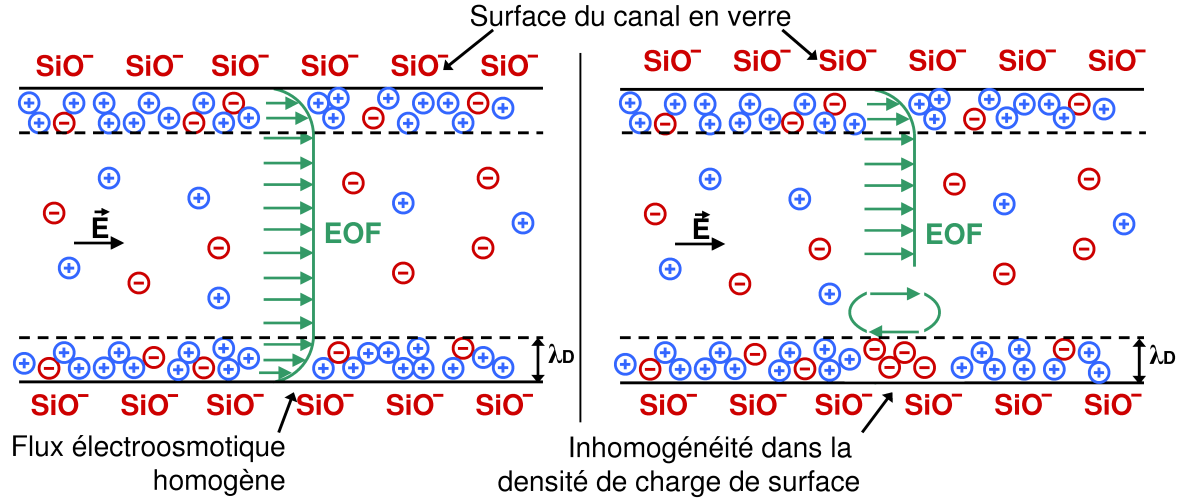


FIG 1.4 – Schéma explicatif du flux électroosmotique. **A** Lorsqu'un champ électrique est appliqué le long d'un canal dont la surface a une densité de charge homogène, celui-ci génère un flux électroosmotique homogène avec un profil "bouchon". **B** Lorsque la densité de charge n'est plus homogène (adsorption de biomolécules chargées, défauts de surface), il se crée des recirculations dans le flux.

Lorsque le fluide contient des objets colloïdaux chargés, ceux-ci sont attirés vers l'électrode de signe opposé avec une mobilité électrophorétique  $\mu_e = \zeta_{particule} \epsilon \epsilon_o \setminus \mu$  dépendant cette fois-ci de la charge de surface. C'est le phénomène d'électrophorèse. On peut donc séparer des objets par leur charge ou par leur taille en les plaçant dans un réseau poreux. Le flux électroosmotique se superpose au flux électrophorétique et on peut, en le contrôlant, améliorer l'efficacité de la séparation [Nagata et al., 2005].

Le courant d'écoulement apparaît lorsqu'un flux généré par différence de pression fait se mouvoir les contre-ions contenus dans la couche diffuse (celle qui est mobile) de la double couche électrique, résultant en un courant électrique dans la direction du flux. Un potentiel électrocinétique est alors généré le long du canal. C'est le potentiel d'écoulement. Il pousse les contre-ions de la couche diffuse de l'EDL dans le sens opposé au potentiel d'écoulement. Ceci va résulter en un courant de conduction qui va générer un flux opposé au flux de gradient de pression. Celui-ci a comme effet d'augmenter la perte de charge, agissant comme si on était en présence d'un fluide de plus grande viscosité. C'est l'effet *visco-élastique* [Hunter, 1981]. Ren *et al.* [Ren et al., 2001] ont montré que ces effets visco-élastiques peuvent contribuer de l'ordre de 15% de la résistance hydrodynamique dans des canaux, dans certaines conditions de taille de canaux, de concentrations en électrolytes et en charge de surface.

La mesure de courants ou potentiels d'écoulement constitue une méthode standard de caractérisation des propriétés électriques des surfaces.

### Contrôle des écoulements

Le contrôle des écoulements joue un rôle crucial en microfluidique. On veut en effet pouvoir contrôler le temps de résidence d'un fluide dans le système, l'injection séquentielle de plusieurs fluides, et bien sûr la vitesse et le profil des flux. De nombreux efforts ont été réalisés dans ce sens.

#### *Contrôle en débit ou en pression*

La manière la plus classique et la plus simple pour injecter un fluide dans un microcanal est le contrôle en débit, avec un pousse-seringue. La limitation de ce type d'injection est que le profil de vitesse du fluide est un profil de Poiseuille. Ce profil étant parabolique, il existe un gradient de concentration du soluté entre le centre et les parois du canal. Aux temps longs, ce gradient crée un étalement du fluide dans la direction du flux, avec un coefficient de diffusion effectif  $D_{eff}$  beaucoup plus grand que si seule la dispersion était en jeu :  $D_{eff} \sim Pe^2/D$ . C'est la dispersion de Taylor [Taylor, 1953]. L'étalement des espèces qu'il induit peut entraîner des contaminations entre des flux successifs et être très gênant dans les techniques de séparation, comme la chromatographie. De plus, le frottement visqueux au sein du canal engendre une importante chute de pression. Cette perte de charge étant inversement proportionnelle au carré de sa section, elle devient vite très importante dans les microcanaux. On définit alors la résistance hydrodynamique  $R_h$  du canal, comme  $\Delta P = R_h Q_m$  (où  $\Delta P$  est la perte de charge le long du canal et  $Q_m$  le débit massique). Elle est inversement proportionnelle à la section du canal et est donc élevée pour des microcanaux.

En dernier lieu, le temps de mise à l'équilibre, c'est à dire le temps que met le système à atteindre la perte de charge, lui est directement proportionnelle [Tabeling, 2001]. Ce temps est de l'ordre de quelques minutes pour des canaux de quelques centaines de microns de section.

Par contre, lorsque que l'on contrôle le flux par différence de pression imposée, on est dans un système de résistances en parallèle, et le temps de réponse est proportionnel à la résistance du contrôleur de flux, dont la résistance est faible. Les temps d'équilibre sont alors inférieurs à la seconde. Un contrôleur de flux, le MFCS, a été développé sur ce principe au sein de notre laboratoire [Futterer et al., 2004].

#### *Effets électrocinétiques*

Les effets électrocinétiques étant naturellement localisés au niveau des parois via la DCE, ils permettent de manipuler de manière très efficace les liquides dans les dispositifs microfluidiques pour lesquels, précisément, les effets de surface deviennent prépondérants [Bazant and Squires, 2004].

A ce titre, l'électroosmose est couramment utilisée pour déplacer des liquides dans

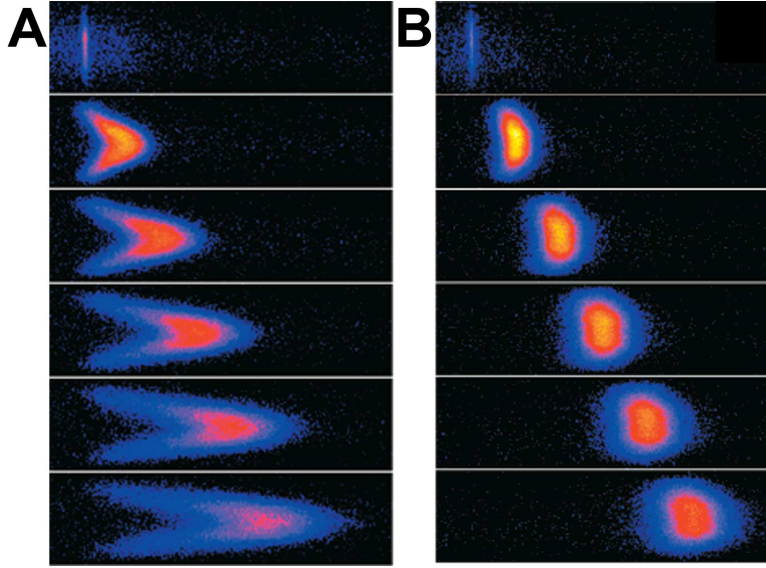


FIG 1.5 – **A** Profil de Poiseuille d'un flux généré par gradient de pression dans un canal en poly(méthyl méthacrylate) **B** Profil du flux électroosmotique de type bouchon. Les images sont prises à intervalle régulier (50ms) et la taille des images est  $300\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$ . Tiré de [Ross et al., 2001]

des micro-canaux. Le profil du flux électroosmotique étant alors de type bouchon, il n'y a par conséquent pas de dispersion des analytes, comme montré dans la figure 1.5. Ceci n'est vrai que si les pressions d'entrée et de sortie du canal sont égales et que le fluide est libre d'entrer et de sortir du canal. Une différence de pression entraînerait un flux recirculant de type Poiseuille, qui se superposerait au flux électroosmotique [Long et al., 1999].

La charge typique d'une surface de verre est d'une dizaine de millivolts, ce qui donne des mobilités électroosmotiques en milieu aqueux d'environ  $\mu_{EOF} \approx 10^{-4} \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ . Par conséquent il faut appliquer des tensions de l'ordre du kV pour générer un flux électroosmotique de quelques centaines de  $\mu\text{m}/\text{sec}$  dans un canal, ce qui demande une infrastructure autour de la puce problématique pour la portabilité de la puce. Armand Ajdari [Ajdari, 2000] a démontré la possibilité d'augmenter drastiquement le rendement en utilisant des surfaces hétérogènes. Les hétérogénéités des surfaces génèrent des mobilités électroosmotiques différentes. Les différentes vitesses au sein du canal vont créer des différences de pressions et donc des recirculations dans le fluide. Ainsi, des surfaces hétérogènes patternées (par exemple un réseau d'électrodes à la surface du canal) induisent des flux recirculants patternés dont la portée est plus grande que la périodicité du pattern, produisant ainsi un flux net de fluide [Ajdari, 1995]. De nombreuses pompes électrocinétiques ont été développées sur ce principe et produisent des flux de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{m}/\text{sec}$  avec des tensions de seulement 1 volt ([Studer et al., 2004] et [Brown et al., 2000]).

La limitation du contrôle d'écoulement électrocinétique est la grande dépendance à la composition du milieu aqueux et la formation de bulles électrolytiques qui s'opposent à une haute intégration dans les laboratoires sur puces.

#### *Activation de valves monolithiques*

La dernière approche pour faire circuler des fluides dans un microcanal consiste à activer des vannes pour bloquer ou faire passer le fluide. L'activation en cycle de ces vannes va engendrer un pompage du fluide. Le principe utilise la propriété de déformabilité du PDMS. Ces valves sont appelées monolithiques car elles sont composées d'un seul matériau : le PDMS, dont le faible module d'élasticité permet sa déformation.

Le plus souvent les vannes utilisées sont celles développées au sein du laboratoire de Stephen Quake Unger et al. [2000]. Grâce à une lithographie à deux couches, un canal d'activation est placé perpendiculairement au canal d'intérêt. Les deux canaux sont séparés d'une couche de PDMS n'excédant pas quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Le canal d'activation est rempli d'une solution aqueuse. Une surpression a pour effet de le dilater et il vient ainsi écraser le canal d'intérêt (figure 1.6A et B). Les canaux sont de forme mi-cylindrique pour que la surpression ferme totalement le canal d'intérêt. Les vannes sont activées suivant un cycle péristaltique ce qui permet de générer un flux. Ces pompes péristaltiques sont très efficaces et bien adaptées à la haute intégration.

D'autres vannes ont été proposées. C'est le cas des vannes flip/flap développées par Jeon *et al.* [Li Jeon et al., 2002] toujours basées sur les propriétés de déformabilité du PDMS et une lithographie à deux couches. Une fine membrane de PDMS (de  $25\mu\text{m}$  à  $100\mu\text{m}$ ) séparant deux canaux ne peut se déformer que dans un sens, ne

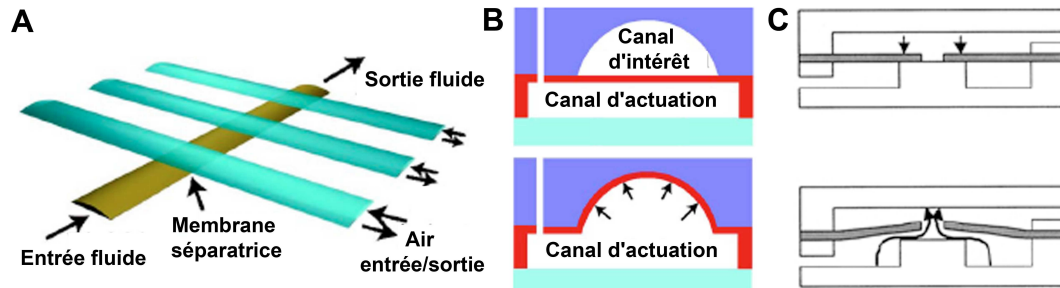


FIG 1.6 – Schémas explicatifs des différentes valves et pompes développées sur la propriété de déformabilité du PDMS : **A** Pompe péristaltique avec 3 valves à la Quake : les 3 canaux activateurs sont activés selon un cycle péristaltique pour créer un pompage. Tiré de [Unger et al., 2000]. **B** Une surpression dans le canal d'activation va le déformer jusqu'à ce qu'il écrase le canal d'intérêt. Tiré de [Studer et al., 2004]. **C** Dans les valves *flip/flap* les membranes séparatrices ne peuvent se déformer et laisser passer le fluide que dans une seule direction. Tiré de [Li Jeon et al., 2002].

laissant passer le fluide que dans ce sens. Une pompe a été développée en intégrant les vannes autour d'un réservoir : les vannes en aval du réservoir amenant le fluide vers le réservoir et les vannes en amont emmenant le fluide hors du réservoir (figure 1.6C).

## 1.4 Les applications aux analyses biologiques

### Les laboratoires sur puce : des systèmes hautement intégrés.

A l'heure actuelle, de nombreuses technologies permettant de fabriquer les micro-systèmes et d'y intégrer divers composés fonctionnels (ces dernières seront détaillées dans le chapitre 3) sont disponibles. Par ailleurs les écoulements microfluidiques sont compris et maîtrisés. Cela a permis à la microfluidique d'être développée pour apporter des solutions aux thématiques biologiques. De plus la miniaturisation a entraîné la réduction des volumes et des quantités de matériel biologique, ainsi que les temps d'analyse et les coûts, en comparaison avec les méthodes conventionnelles à l'échelle des laboratoires. C'est ce qui a rendu très intéressant le développement d'analogues microfluidiques pour de nombreux outils de la biologie moléculaire, comme la PCR [Zhang and Xing, 2007], l'électrophorèse de protéines et d'ADN [Kohlheyer et al., 2008], la concentration de protéines [Sueyoshi et al., 2008], le tri cellulaire [Chen et al., 2008] et les analyses immunologiques [Lam et al., 2008]. Le lecteur pourra trouver en références des récentes revues des dernières avancées pour chaque sujet.

Ces outils étant communément utilisés pour le diagnostic médical, c'est avec succès que la microfluidique a été appliquée au diagnostic de plusieurs maladies comme la maladie du Prion [Le Nel et al., 2008], la prédisposition au cancer du sein héréditaire [Weber et al., 2007] et le HIV [Wang et al., 2008b]

Un très grand nombre d'applications a vu le jour, et nous allons en voir ici certaines à titre non exhaustif.

La possibilité d'obtenir un très haut niveau d'intégration a beaucoup contribué au succès des microtechnologies dans les thématiques de biologie ou de chimie. Les systèmes hautement intégrés pour les analyse biologiques ou chimiques sont alors désignées comme des "laboratoires sur puce", appelés aussi  $\mu$ TAS, pour *Micro Total analysis Systems*. L'intégration, ou multiplexage, prend deux formes : il s'agit soit de mettre en parallèle un très grand nombre d'opérations identiques afin de parvenir à un très haut débit d'analyse d'un très grand nombre d'échantillons, soit d'intégrer sur un même laboratoire sur puce toutes les fonctionnalités que nécessite l'analyse d'un échantillons brut.

La première haute intégration a été réalisée dans le groupe de Stephen Quake [Thorsen et al., 2002] : sur une puce d'environ 5cm de côté ont été intégrées 256 chambres indépendantes, contrôlées par 2056 valves (du type "Quake"), elles-mêmes actionnées par seulement 18 canaux. Les chambres délimitées par les valves ont un volume de 750pL. Ce très faible volume permet un mélange très rapide par diffu-



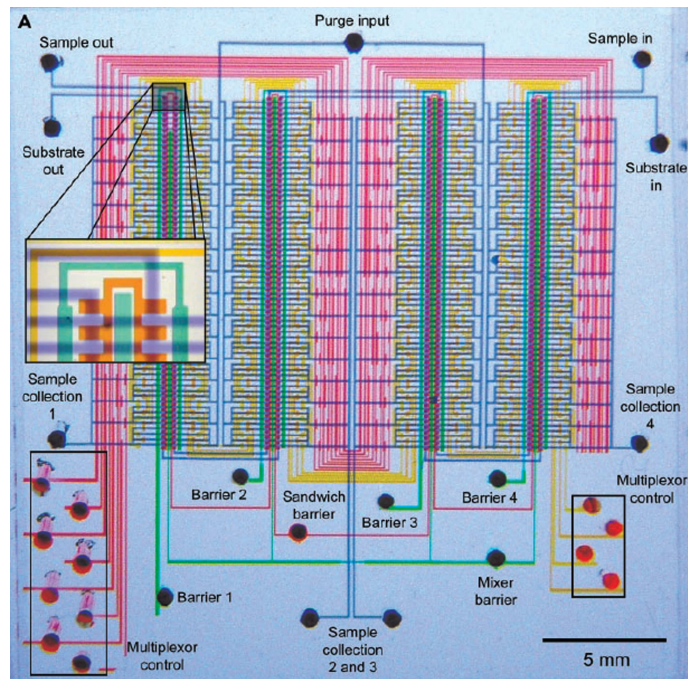


FIG 1.7 – Image du "comparateur microfluidique". Les 2056 valves permettent aux 256 chambres d'être individuellement compartimentées, avec seulement 18 canaux d'actuation. Tiré de [Thorsen et al., 2002].

sion des différents liquides d'intérêt qui sont guidés dans les différentes chambres par l'actionnement des valves. Ce dispositif a permis de tester l'expression d'une enzyme (le cytochrome c peroxydase) dans une population de bactéries *Escherichia coli*. Dans la même équipe, ce "comparateur microfluidique" a été développé pour la culture cellulaire [Gomez-Sjoberg et al., 2007] : 96 différents milieux de culture sont générés indépendamment dans des chambres de culture de 60nl. Ce dispositif a permis l'étude de la différenciation ostogénique et l'adipogénese des cellules hMSCs

Delamarche *et al.* ont proposé une autre voie pour le multiplexage. Ils ont mis en place un double "micro contact printing" ( $\mu$ CP) pour réaliser un réseau de protéines sur une lame de verre [Renault et al., 2002]. La technique de  $\mu$ CP consiste à déposer sur un tampon de PDMS des protéines puis à imprimer ce tampon sur la surface. Les étapes de fabrication du tampon sont détaillées figure 1.8 a-f. Ici, le tampon est décoré de 2 antigènes différents suivant une alternance de lignes parallèles de  $3\mu\text{m}$  de large. Ce motif est transféré sur une lame de verre par tamponnage (un simple contact entre le tampon et la surface suffit). Un autre tampon similaire, décoré avec 2 anticorps complémentaires des antigènes, est tamponné perpendiculairement au premier. On a ainsi accès à l'information sur l'affinité des couples antigènes/anticorps au croisement des lignes d'antigènes et d'anticorps (voire la figure 1.8 g). Si on répète

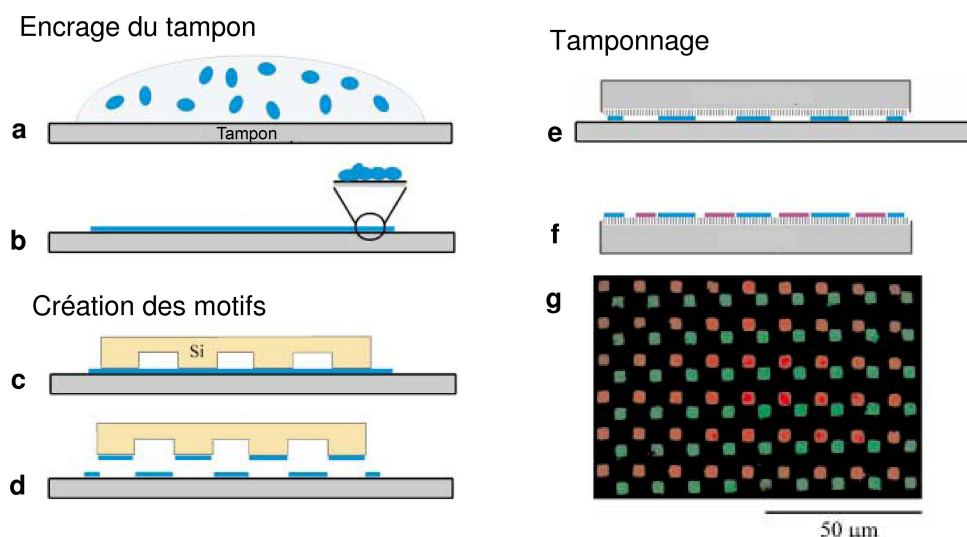


FIG 1.8 – Préparation du tampon. (a) : une solution d'antigènes de capture est déposée sur la surface de PDMS, et s'organise en une fine couche (b), sur laquelle est créé un motif grâce à un substrat de silicium (c) qui enlève les protéines suivant ce motif (d). Les antigènes restants sont transférés sur le tampon (e). Après répétition des étapes a à e, plusieurs antigènes de capture sont immobilisés sur le tampon (f). (g) Image en fluorescence du réseau d'anticorps dirigés contre les antigènes de poulet et de chèvre réalisé par  $\mu$ CP. Il y a  $10^4$  sites d'immobilisations d'antigènes de poulet et de chèvre par  $\text{mm}^2$ . Tiré de [Renault et al., 2002].

les étapes a-e, on multiplie le nombre de protéines, et on crée de véritables tests comparateurs.

Le multiplexage a permis le criblage des conditions. Cela a trouvé un grand succès pour la cristallisation de protéines, qui est une discipline où les conditions à cribler (pH, force ionique, composition, concentrations) sont en très grand nombre. De plus il a été possible de séparer le germe du cristal et de faire pousser le cristal sans l'endommager [Galder Cristobal et al., 2007].

La deuxième forme d'intégration, c'est à dire l'intégration de diverses fonctionnalités sur une puce microfluidique, a permis d'avènement des dispositifs portatifs, dont la taille ne dépasse pas celle d'une carte de crédit. Une revue très complète à ce sujet est disponible [Liu et al., 2007]. A titre d'exemple, citons ce dispositif qui, à partir d'une goutte de sang, accomplit l'analyse génétique de bactéries qui y sont présentes. Les bactéries d'*E. Coli* présentes dans l'échantillon sanguin sont reconnues par un anticorps spécifique biotinylé, puis sont capturées par des billes magnétiques recouvertes de streptavidine (la biotine et la streptavidine forment un complexe très fort, couramment employée en biologie moléculaire). Les billes sont alors retenues par un



aimant et les bactéries sont lysées thermiquement. Puis leur ADN est amplifié par PCR (polymérase chain reaction), puis analysé : l'hybridation avec des séquences complémentaires (les sondes) immobilisées dans le dispositif est détecté par un signal électrochimique dû à la réaction redox d'un ferrocène dont est marquée la sonde.



# Chapitre 2

## Les modifications de surfaces pour la microfluidique

### 2.1 Introduction

Les modifications de surfaces ont été beaucoup étudiées dans le but d'améliorer les performances de l'électrophorèse capillaire (EC). Cette technique, durant les 20 dernières années a été une référence pour les méthodes de séparation, et en particulier de séquençage de l'ADN. Les modifications de surface ont été essentielles pour l'accomplissement de cette méthode. En effet les capillaires étant en verre, ils sont très chargés négativement, et donc sujets à l'adsorption des biomolécules (*e.g.* protéines possédant des domaines chargés positivement) à séparer à cause d'interactions électrostatiques. Le flux électroosmotique en résultant est non homogène ce qui nuit très fortement à la différenciation des pics de séparation.

Les laboratoires sur puce, bien que de plus en plus présents dans le monde académique, sont encore peu rencontrés dans la vie courante dans des applications de routine. Seules deux sociétés, Agilent et Biorad, commercialisent des laboratoires sur puce pour la séparation d'ADN, de protéines, et de cellules. Une des raisons pour cela est que des efforts doivent être faits dans le contrôle des états de surface et des interactions des analytes avec la surface. Ces deux paramètres doivent être maîtrisés pour que des solutions pratiques et robustes voient le jour. Une des clés pour y arriver est, à l'instar de l'EC, de mettre en place des traitements de surface. Il a fallu une dizaine d'années pour atteindre l'état de l'art que connaît la modification de surface pour l'électrophorèse capillaire et qui permet d'utiliser cette technique comme une technique de routine pour la séparation. Les modifications de surface pour les laboratoires sur puce sont encore peu explorées. Une des difficultés que connaît ce champ de recherche est qu'à la différence de l'EC qui n'emploie que des capillaires en silice fondue, les laboratoires sur puce mettent en jeu beaucoup de matériaux différents. Pour ne citer que les principaux, on trouve le PDMS, le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA), le poly(styrène) (PS), le poly(carbonate) (PC) le poly(éthylène téréphthalate) (PET/PETG) poly(imide) (PI) et le cyclo oléfin copolymère(COC). De plus,

tout comme l'EC, les méthodes de caractérisation qui peuvent sonder *in situ* les états de surface sont limitées. Pourtant, avec plus ou moins d'efforts, les chercheurs se sont attachés à reproduire les solutions physico-chimiques qui ont été développées durant les 20 dernières années dans le domaine des traitements de surface.

C'est dans ce cadre que j'ai développé, au début de ma thèse, un traitement de surface pour le PDMS, puis pour le cyclo oléfine copolymère (COC), qui seront présentés dans ce chapitre après un état de l'art.

## 2.2 Etat de l'art

### 2.2.1 Nécessité d'un traitement de surface

Comme nous l'avons vu précédemment, leur facilité de mise en œuvre et leur faible coût font que les puces en plastique sont prépondérantes dans les laboratoires sur puce. En particulier le PDMS est très largement employé car il reste le plus facile à mettre en œuvre. Mais la surface de ce polymère présente quelques désavantages. Il est hydrophobe, ce qui en plus de rendre peu aisé le remplissage du microcanal avec des solutions aqueuses, engendre des interactions hydrophobes. Ces interactions, qui sont particulièrement fortes en milieu aqueux ont lieu avec des analytes non polaires ou partiellement non-polaires entraînant la diffusion de ceux-ci dans le polymère [Baltussen et al., 1999], mais aussi avec des macromolécules présentant des domaines hydrophobes comme des protéines, entraînant leur adsorption non-spécifique à la surface du canal. Cela cause une perte du matériel à analyser et une diminution de la résolution de l'analyse. De plus quoique moins chargées que les surfaces en verre, les surfaces de polymères présentent une charge de surface qui est mal caractérisée. Par exemple, pour le PDMS, Duffy *et al.* [Duffy et al., 1998] ont reporté qu'il n'y avait pas de charge de surface quand le PDMS est natif, alors qu'il y en a si le PDMS est oxydé par un traitement plasma. Ocvirk *et al.* [Ocvirk et al., 2000], les ont contredit plus tard reportant une charge de surface négative que le PDMS soit oxydé ou non. Quoi qu'il en soit, cette charge est beaucoup plus faible que celle présente à la surface des capillaires en verre.

Ren *et al.* [Ren et al., 2001] ont apporté la preuve spectroscopique de la présence de groupements OH à la surface du PDMS oxydé laissant suggérer la présence de groupements silanol, alors que ce pic est très faible à la surface du PDMS natif. Ockvik *et al.* [Ocvirk et al., 2000] ont rapporté que la charge de surface ne peut être due à l'adsorption hydrophobe d'ions présents à des concentrations usuelles. Cette charge est peut être due à l'adsorption d'ions présents dans le milieu aqueux, comme le  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{OH}^-$  [Van Wagenen et al., 1981], mais cette question est encore sous investigation. Comme nous l'avons vu précédemment, une charge de surface entraîne des effets électrocinétiques qui ne sont pas voulus dans les séparations électrophorétiques, d'autant plus si cette charge n'est ni contrôlée ni homogène, car cela entraîne des flux parasites nuisant à la résolution de la séparation.

Le but du traitement de surface est de la rendre hydrophile, d'une part, et d'autre part, neutre. La biocompatibilité est une autre caractéristique importante de la modification de surface.

Ce but est atteint en greffant des matériaux à la surface du canal, en général des polymères à base de monomères neutres, hydrophiles et biocompatibles. Les plus utilisés sont l'acrylamide et l'éthylène oxyde (désigné par polyéthylène oxyde (PEO) ou polyéthylène glycol (PEG) selon sa taille) et leurs dérivés. La couche de revêtement doit être plus épaisse que la longueur de Debye, c'est à dire supérieure à quelques nanomètres pour des molarités de 10-100mM, afin d'écranter la charge de surface.

### 2.2.2 Les traitements de surfaces

Nous allons voir ici une revue des traitements de surfaces qui ont été développés pour les laboratoires sur puces. Il existe plusieurs stratégies différentes, qui ont été adaptées de la chimie de surface classique. Les traitements de surfaces sont classés en deux catégories : les traitements non permanents, qui mettent en jeu des liaisons faibles, comme la physisorption, et les traitements permanents, dans lesquels les modifications de surface se font au travers de liaisons covalentes avec la surface.

#### 2.2.2.a Les traitements non permanents

##### Adsorption de polymères

Ces types de traitements mettent en jeu un copolymère synthétisé en solution. Un des monomères possède une très forte affinité avec la surface, souvent de par son caractère hydrophobe ou des liaisons hydrogène, alors que le rôle de l'autre monomère qui a moins d'affinité avec la surface et donc se trouve loin d'elle, est de conférer à la surface son caractère hydrophile. Ces types de traitements sont très développés pour l'électrophorèse capillaire, car ils sont très aisés à réaliser, mais peu d'entre eux ont été appliqués dans les laboratoires sur puce. Chiari *et al.* [Chiari et al., 2000] ont développé un copolymère statistique, le poly(diméthylacrylamide-co-allyl glycidyl éther), par copolymérisation radicalaire pour l'EC. Le cycle oxirane du monomère glycidyl éther présente une forte interaction (qui n'est *a priori* pas de nature covalente) avec les groupements silanol du capillaire. Ce revêtement a été adapté à une séparation d'ADN dans une puce en PDMS et a prouvé son efficacité en rendant négligeable le flux électroosmotique et en réduisant les adsorptions de protéines et d'analytes.

Les copolymères blocks offrent un revêtement de surface intéressant, un block du copolymère étant hydrophobe et en interaction avec la surface, alors que l'autre block est exposé et donne son caractère hydrophile à la surface. Des copolymères blocks de poly(oxide d'éthylène) (PEO) et poly(oxide de propylène) (PPO)(commercialisés sous le nom de Pluronic) ont ainsi été adaptés avec succès dans une puce de COC pour une séparation diélectrophorétique de particules [Davalos et al., 2008].

Un autre copolymère a été développé pour obtenir une PEG-ylation de la surface :

le poly(L-lysine)-graft-poly(éthylène glycol)(PLL-g-PEG). Les chaînes pendantes de PLL chargées positivement créent de fortes interactions électrostatiques avec les charges négatives générées par le plasma à la surface du PDMS. Une surface à haute densité en PEG est ainsi obtenue [Mohamadi et al., 2007].

De nombreuses recherches se sont portées sur le poly(vinyl alcool) (PVA). Ce polymère très hydrophile est très particulier, car bien qu'atactique, il présente pourtant un caractère semi-cristallin. Il se cristallise à l'interface liquide/surface hydrophobe. Le PVA est partiellement hydrolysé et ses sites plus hydrophobes s'adsorbent à la surface. De fait il faut une grande concentration de PVA en présence de la surface pour que le recouvrement soit total (supérieure à 10% w/w [Barrett et al., 2001]). Le dépôt successif de deux couches de PVA permet de réduire cette concentration à 0.1% w/w<sup>1</sup> ([Wu et al., 2005] et [Xiao et al., 2007]) et d'obtenir un revêtement très stable. Les polysaccharides ont aussi été développés dans les laboratoires sur puces : Mohamadi *et al.* [Mohamadi et al., 2007] ont développé très simplement un revêtement de méthyl cellulose et de surfactant qui a empêché l'adsorption de protéines dans une puce de PMMA pour la séparation de protéines.

### Multicouches de polyélectrolytes

Les multicouches de polyélectrolytes sont réalisées en mettant successivement en présence la surface avec des polyélectrolytes positivement puis négativement chargés. Cette technique, mise au point par Decher [Decher, 1997] a beaucoup attiré l'attention car elle est très facile de mise en œuvre et s'adapte à n'importe quelle surface. Les polyélectrolytes s'adsorbent facilement par interaction électrostatique et les compensations de charge après les successives adsorptions font que ce revêtement est très stable. De plus, plusieurs groupes ont montré qu'en présence de puces hybrides (par exemple PET/PDMS et PS/PSMS dans [Barker et al., 2000]) le revêtement obtenu était homogène et apte à repousser les adsorptions non spécifiques dues aux interactions hydrophobes. Mais si ce type de revêtement améliore la résolution de la séparation de protéines ce n'est pas grâce au contrôle du flux électroosmotique, mais parce qu'il augmente l'hydrophilie de la surface [Boonsong et al., 2008]. De plus, ce type de revêtement est chargé et donc n'empêche pas les adsorptions dues aux interactions électrostatiques d'analytes ou de macromolécules de même charge.

#### 2.2.2.b Les traitements permanents

##### La silanisation

La silanisation est une réaction chimique entre un groupement silanol (Si-OH) de la surface et un silane *e.g.* une molécule  $R_1\text{-Si-R}_2\text{R}_3$ . Les électrons libres du groupement silanol attaquent le silicium du silane, créant ainsi une nouvelle liaison et le départ du groupe partant  $R_1$  (le plus souvent  $R_1=\text{Cl}$ ). Le résultat est la créa-

---

1. La notation % w/w qui est utilisée dans ce manuscrit signifie le pourcentage massique.

tion d'une liaison covalente Si-O-Si-R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>. Cette réaction est utilisée pour obtenir des monocouches moléculaires à la surface du PDMS qui présente des groupements silanols après un traitement plasma.

Dans [Delamarche et al., 2003] des PEO de 70 monomères ont été greffés sur une surface de PDMS. Le caractère hydrophobe du PDMS a été réduit pour une durée de 7 jours. Les amino silanes ont montré leur aptitude à inverser le flux électroosmotique pendant la même durée [Wang et al., 2003], ce qui est désirable dans certaines séparations de matériel biologique [Nagata et al., 2005]. Nous verrons qu'avec d'épaisses brosses de polymère cette durée peut être beaucoup plus longue.

### **Le grafting to**

Cette méthode est basée sur la polymérisation en solution de polymères fonctionnalisés avec un groupement terminal capable de réagir avec la surface aboutissant à des "brosses" de polymères à la surface. Le caractère covalent de leur liaison à la surface leur confère une grande résistance à un grand nombre de conditions expérimentales (résistance aux solvants, aux grandes températures, à une grande force ionique de la solution). Ces polymères peuvent être synthétisés par différentes voies de polymérisation en chaîne : ionique, radicalaire, ou ouverture de cycles epoxy.

Cette technique consiste à lier de manière covalente des chaînes de polymère sur une surface de verre silanisée. Dans les puces polymériques une liaison covalente est obtenue grâce à des groupements silanols obtenus avec une oxydation. Dans certains cas cette technique a été appliquée dans les puces polymériques en greffant les polymères sur une surface réactive adsorbée à la surface de la puce. Ce n'est donc pas à proprement dit un greffage *covalent*.

Par exemple, dans Wang et al. [2007], un PEG de haut poids moléculaire (Mw=5000) modifié avec un groupement succinimide a été greffé sur une surface de PDMS. Le groupement succinimide réagit de manière covalente avec une couche de polysaccharide (le chitosan) pré-adsorbée sur le PDMS par interaction hydrophobe et liaisons hydrogène.

Makamba *et al.* [Makamba et al., 2005] ont réalisé un *grafting to* de PEG sur du PDMS via une multicouche de polyelectrolytiques. Bien que le *grafting to* soit relativement aisé à mettre en place, les couches obtenues ne sont pas très denses. En effet, les chaînes de polymères doivent diffuser à travers celles déjà greffées à la surface, avant d'atteindre les sites réactifs. Les couches plus denses et épaisses sont obtenues avec le *grafting from*.

### **Le grafting from**

Initialement développée dans des capillaires en verre pour l'EC par Hjerten [1985], cette technique consiste à immobiliser un initiateur sur la surface. La propagation de la réaction aboutit à une chaîne de polymère, ou brosse, qui est plus longue que dans le cas du *grafting to* car les radicaux se trouvent à la fin de la chaîne et sont donc plus accessibles aux monomères. Cette technique a très peu été

approfondie dans les laboratoires sur puce. Hu *et al.* [Hu et al., 2004] ont développé un protocole dans lequel un photoinitiateur (la benzophénone) est adsorbé dans le microcanal préalablement à la polymérisation. Ainsi le polymère est localisé à la surface du microcanal. Or cette technique ne permet pas d'obtenir un revêtement durable, car l'adsorption de la benzophénone ne résiste que quelques heures. Nous verrons dans ce chapitre comment, en activant le canal et en optimisant le protocole, nous avons obtenu un revêtement bien plus stable.

## 2.3 Greffage covalent de polyacrylamide dans des microcanaux en PDMS

Le but de la polymérisation est de modifier *in situ* une puce de PDMS avec du polyacrylamide. Les modifications de surface de PDMS ont été développées sur des surfaces planes et restent difficilement applicables à la modification d'une puce microfluidique. En effet une modification de surface effectuée avant la fermeture de la puce empêche une fermeture robuste de celle-ci qui ne résistera pas à des flux et des pressions élevés. La difficulté principale, quand on adapte la modification d'une surface plane à la modification *in situ* d'un microcanal, est de trouver des alternatives à certaines étapes qui sont difficilement transposables à une puce fermée. C'est le cas de toutes les étapes effectuées en phase gazeuse, et en particulier le traitement plasma. Un autre déficit de cette modification de surface est d'obtenir une modification localisée à la surface du microcanal et non en volume. Le fait que le microcanal soit fermé crée une configuration où si une polymérisation en volume est initiée, la puce se retrouve rapidement bouchée. Il est alors quasiment impossible d'enlever les chaînes de polymère du volume qui sont enchevêtrées avec les chaînes de la surface. En immobilisant un photoinitiateur à la surface du microcanal, on peut y initier la polymérisation et par conséquent obtenir des chaînes de polymère localisées à la surface. Une autre qualité requise pour la modification de surface est sa simplicité et sa rapidité de mise en œuvre. La chimie employée et les étapes doivent être simplifiées et limitées dans le temps au maximum pour que le protocole soit facilement applicable dans le développement d'un laboratoire sur puce.

### 2.3.1 Principes de la modification de surface

La photopolymérisation offre plusieurs avantages : elle est très facile à mettre en œuvre, et elle permet de créer des motifs en appliquant un masque entre la source lumineuse et la surface. Toutes les étapes de la photopolymérisation radicalaire initiée à partir de la surface sont schématisées figure 2.1. La première étape consiste à emprisonner un photoinitiateur dans les chaînes du PDMS. Pour cela le photoinitiateur est dilué dans un solvant adapté qui diffuse dans le PDMS. Les chaînes de



PDMS gonflées vont interagir avec le photoinitiateur par interaction hydrophobe. Après évaporation du solvant, le photoinitiateur est emprisonné dans les chaînes de PDMS sur une épaisseur contrôlée par le taux de diffusion du solvant dans le PDMS. Le photoinitiateur doit être suffisamment soluble dans le solvant pour pouvoir y être dissous en grande concentration, afin d'être présent en quantité suffisante à la surface du PDMS. De plus le photoinitiateur doit avoir un caractère assez hydrophobe pour interagir fortement avec le PDMS afin d'obtenir un revêtement stable. Le couple solvant/photoinitiateur qui a été retenu est l'acétone et la benzophénone (BP). La benzophénone forme un radical anion très stable (voir figure 2.1). Il est stabilisé par les deux cycles aromatiques qui permettent sa délocalisation et par la charge négative portée par l'hétéroatome d'oxygène.

Puis le photoinitiateur est mis en présence avec la solution de monomères d'acrylamide. Les UV vont créer des radicaux à partir du photoinitiateur qui vont réagir avec la double liaison du monomère acrylate. La propagation de la réaction va conduire à une chaîne de polymère.

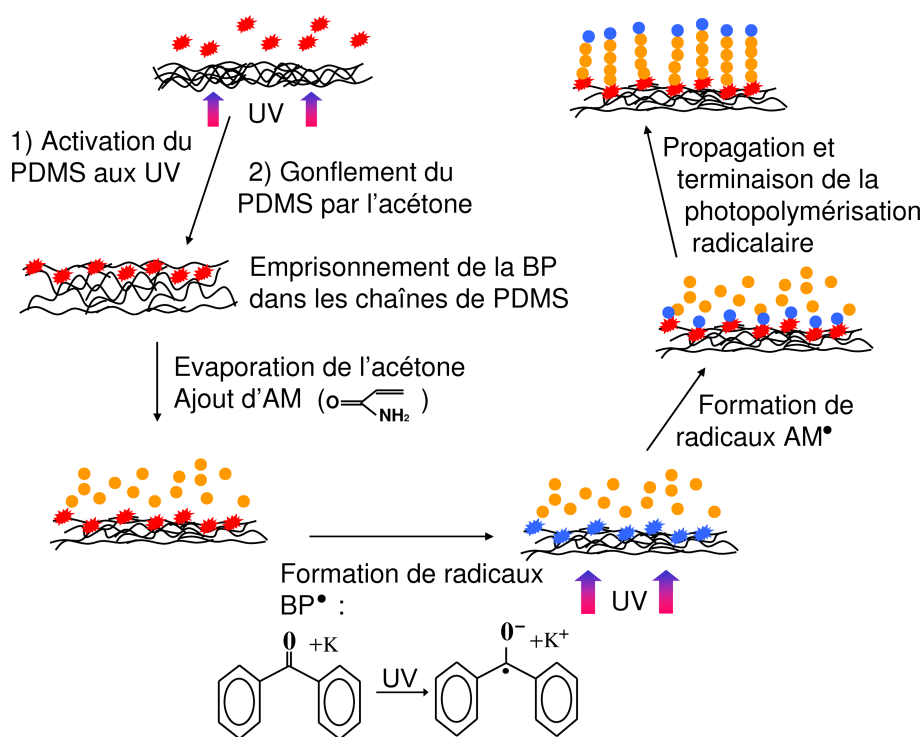


FIG 2.1 – Schéma du principe de la photopolymérisation radicalaire sur une surface de PDMS à partir d'un photoinitiateur immobilisé à la surface.

### 2.3.2 Méthode expérimentale

#### Matériel

Sauf si cela est précisé, tous les produits ont été achetés chez Sigma Aldrich avec une pureté  $\geq 97\%$ . Les puces microfluidiques sont fabriquées en moulant du PDMS sur un moule en SU8 2100 (Microchem) représentant un canal simple de  $100\mu\text{m}$  de haut et  $200\mu\text{m}$  de large. Les puces sont refermées avec une lame de verre recouverte de PDMS après un traitement plasma ( $\text{O}_2$ ). Pour un meilleur collage, les puces assemblées sont mises à l'étuve à  $60^\circ\text{C}$  pendant 2 heures minimum. Les connections sont réalisées exclusivement avec des tubes en polytétrafluoroéthylène (PTFE, diamètre interne  $300\mu\text{m}$  diamètre externe  $760\mu\text{m}$ , Bioblock) car ils ne sont pas solubles dans l'acétone.

#### Angle de contact

Une caractérisation de l'angle de contact statique a été mise en place pour vérifier l'état d'hydrophobie de la surface. Brièvement, une plateforme, sur laquelle est montée une seringue délivrant  $10\mu\text{l}$  d'eau déionisée sur une surface plane, est placée entre une caméra et une source diffuse de lumière. Une image de la goutte délivrée sur la surface est prise après cinq minutes de stabilisation. Chaque valeur donnée dans ce manuscrit résulte de la moyenne de 8 gouttes minimum. Cette caractérisation a été réalisée sur des lamelles de verre recouvertes par "spincoating" de PDMS. Les lames sont traitées comme les canaux, à l'exception faite du flux qui n'a pu être appliqué. La mesure de l'angle de contact du PDMS brut est de  $110^\circ \pm 2^\circ$ . Celui du PDMS modifié à la BP est de  $40^\circ \pm 3^\circ$ . Après photopolymérisation, il est de  $50^\circ \pm 5^\circ$ . Plusieurs tests ont été réalisés pour vérifier le mécanisme de polymérisation et seront détaillés par la suite. Ils sont résumés table 2.1.

	Sans plasma		Avec plasma	
	Avant polymérisation	Après polymérisation	Avant polymérisation	Après polymérisation
<b>Sans benzophénone</b>	$110^\circ \pm 2^\circ$	$110^\circ \pm 2^\circ$	$\leq 5^\circ$	$\leq 5^\circ$
<b>Avec benzophénone</b>	$110^\circ \pm 2^\circ$	$110^\circ \pm 2^\circ$	$40^\circ \pm 3^\circ$	$50^\circ \pm 5^\circ$

TABLE 2.1 – Angles de contact de la surface de PDMS après différents traitements de surface

#### Oxydation de la surface

Les mesures d'angles de contact montrent que la surface de PDMS doit être oxydée avant d'être mise en contact avec le mélange d'acétone/benzophénone. Dans le cas contraire, l'angle de contact de la surface après la mise en contact avec la solution de BP reste à  $110^\circ$ , alors que l'angle typique d'une surface où la BP a été emprisonnée

est de  $40^\circ$  : la BP n'est pas présente dans le PDMS. La nécessité d'une oxydation préalable n'est pas clairement expliquée mais peut être soit due à la rupture de chaînes de PDMS, ce qui le rendrait plus perméable aux solvants, soit due au fait que l'oxygène de la benzophénone lui confère une certaine polarité. La présence de groupements silanols à la surface du PDMS créés par l'oxydation augmenterait l'affinité de la benzophénone avec le PDMS.

Sur une surface plane cette oxydation est réalisée grâce au traitement plasma, qui ne dure que quelques secondes. Ce traitement ne pouvant pas se faire en canal fermé, il a fallu trouver une alternative. Les oxydations chimiques avec l'eau oxygénée  $H_2O_2$  et l'eau de javel  $NaClO$  permettent d'obtenir un emprisonnement de la BP, mais seulement au bout de plusieurs jours de traitement (il faut 5 jours pour voir l'angle de contact diminuer jusqu'à  $20^\circ$ ). En plus d'être longue, cette étape n'est pas adaptée aux puces microfluidiques car cela nécessite un flux continu de solution oxydante, sous peine de voir le canal sécher. De plus les puces ont tendance à fuir après ce traitement.

Finalement, le rayonnement UV a montré que sa capacité d'oxydation physique était suffisante pour piéger la BP. Cela peut s'expliquer de deux manières : soit les UV, par un mécanisme d'insolation, cassent les chaînes de PDMS, le rendant plus perméable à l'acétone, soit les UV créent des radicaux oxygène qui sont de puissants oxydants. Ce mécanisme est plausible car il se passe à 185 nm (création des radicaux à partir de  $O_2$ ) et à 254nm (création des radicaux à partir de  $O_3$ ), qui se trouvent dans le spectre d'émission de la table UV. L'angle de contact a montré que vingt minutes d'illumination avec une simple lampe UV à 314nm (table UV 15 watt Villier Lourmat) suffisaient à piéger la BP. Lorsqu'il n'y a pas de BP dans l'acétone, le PDMS garde l'angle de contact de son état oxydé au plasma ( $\leq 5^\circ$ ).

### Photopolymérisation

Une solution de 10% de BP dans l'acétone est introduite dans le canal et un flux de  $10\mu\text{l}/\text{min}$  est maintenu grâce à un pousse seringue pendant une heure. Puis le canal est rincé avec de l'acétone pour enlever la BP qui n'est pas emprisonnée dans le PDMS, puis à l'eau ( $1\text{ minute à }100\mu\text{l}/\text{min}$ ).

La puce est placée sur la table UV. Une solution de 10% d'acrylamide dans l'eau est introduite dans le canal et est maintenue à  $50\mu\text{l}/\text{min}$  pendant 15 minutes, alors que les UV illuminent le canal. Le flux d'acrylamide et le temps d'illumination sont deux paramètres critiques qu'il a fallu optimiser. Sans flux, la polymérisation se déplace vers le volume du canal qui se bouche. En effet la polymérisation peut se déclencher en volume avec la température dégagée par les UV. Les chaînes créées en volumes sont alors enchevêtrées avec celles de la surface et il est alors très fastidieux, voire impossible de déboucher le canal. Un flux permet le renouvellement rapide des monomères qui n'ont pas le temps de polymériser en volume à cause de la haute température et/ou des radicaux qui y ont diffusé. Mais ce flux ne doit pas être trop élevé car il faut que les monomères aient le temps de réagir avec les radicaux.

50 $\mu$ l/min est alors un bon compromis dans notre configuration de canal (100X200 $\mu$  de section). Puis le canal est rincé pendant une heure avec de 1000 fois son volume d'eau afin d'enlever les monomères qui n'ont pas réagi. Les puces sont stockées à 4°C.

### Détermination de l'épaisseur des brosses de PAM

Les méthodes optiques permettant de déterminer l'épaisseur d'une couche organique sont basées sur l'étude de l'interaction d'un rayon incident et de la matière par l'analyse du rayon réfléchi par une surface réfléchissante. Malheureusement, aucune méthode optique n'a de gamme de mesures combinée à une sensibilité suffisamment grande pour détecter avec précision l'épaisseur du revêtement de PAM de quelques dizaines de nanomètres, qui est très faible devant l'épaisseur de la couche transparente de PDMS "spincoattée" de plusieurs dizaines, voire centaines de microns. La stratégie adoptée a donc été de reproduire le revêtement de surface sur une surface réfléchissante (ici un wafer, c'est à dire une monocouche de silicium) pour obtenir une estimation de son épaisseur par ellipsométrie, qui est une technique qui peut mesurer des couches entre 0 et un multiple d'une période caractéristique  $P=330,8\text{nm}^2$ , puis avec une période de 330,8nm. On aurait donc pu en principe mesurer une très faible épaisseur de PAM sur une grande épaisseur de PDMS si on avait eu une idée sur l'ordre de grandeur de l'épaisseur de ces couches, ce qui n'était pas le cas.

Pour reproduire le traitement de surface du PDMS, le wafer est oxydé par traitement plasma, puis la BP (toujours à 10 % dans l'acétone) est adsorbée (pendant 30 minutes). Le wafer est rincé à l'acétone avec parcimonie pour éviter d'enlever la BP, puis à l'eau, et est séché sous azote. Il est placé dans une solution d'acrylamide à 10% dans l'eau et éclairé aux UV pendant 10 minutes. Les épaisseurs à chaque étape de la modification de surface sont reportées dans la colonne de droite de la table 2.2. Chaque valeur est une moyenne de 100 mesures prises sur 2 wafers différents. L'épaisseur de la couche après adsorption de la benzophénone montre qu'il y a plus d'une monocouche moléculaire. L'épaisseur après photopolymérisation est assez élevée (90nm) pour des brosses de polymères, ce qui est très satisfaisant car cette valeur est supérieure à la longueur de Debye usuelle (1-10nm) dans les microcanaux.

Afin de vérifier ces valeurs, elles ont été comparées avec un protocole usuel de polymérisation pour lequel le wafer est fonctionnalisé avec une double liaison grâce à une silanisation, et la polymérisation est initiée par un initiateur radicalaire thermique présent en solution. Les détails du protocole sont résumés dans l'annexe 4. Le mécanisme de polymérisation n'est pas exactement le même car ici l'initiateur n'est pas immobilisé à la surface. L'initiation se fait donc en volume et les chaînes de polymère formées copolymérisent avec les doubles liaisons présentes à la surface. On estime cependant que les épaisseurs obtenues devraient être similaires. En effet, bien que le mécanisme soit sensiblement différent, les conditions expérimentales (concentrations d'initiateur et de monomère) sont similaires. Cette polymérisation

---

2. Voir l'annexe 3 pour l'explication de cette valeur et plus de précisions sur l'ellipsométrie.

	<b>Polymérisation thermique (APS)</b>	<b>Photopolymérisation radicalaire (benzophénone)</b>
Oxyde de silicium	2,5± 0,2 nm	2,5± 0,2 nm
Fonctionnalisation de la surface	4,5± 0,3 nm	16,5± 0,9 nm
Polyacrylamide	96,8 ± 3 nm	88,8± 0,6 nm

TABLE 2.2 – Épaisseurs des couches organiques obtenues en ellipsométrie après les modifications successives de surface. Le protocole de photopolymérisation radicalaire a été comparé avec un protocole classique de polymérisation radicalaire thermique.

radicalaire thermique a pu être caractérisée en microscopie à force atomique (AFM, voir annexe 5) à l'état sec (après une nuit à l'étuve à 60°C) et à l'état mouillé, c'est à dire en immersion dans l'eau (figure 2.2). L'épaisseur observée à l'état sec est de 22nm, avec une rugosité (différence d'amplitude de l'épaisseur) de 5nm. L'épaisseur à l'état mouillé est de 100nm avec une rugosité de 10nm. Les épaisseurs obtenues en ellipsométrie avant et après la silanisation confirment que l'on est en présence d'une monocouche moléculaire. L'épaisseur de la couche de PAM obtenue en ellipsométrie est similaire à celle obtenue avec l'AFM à l'état mouillé. Cela s'explique simplement par le fait que la mesure en ellipsométrie est faite juste après un simple séchage à l'azote et que le polyacrylamide est encore gonflé d'eau.

Cette valeur est similaire à celle obtenue grâce à la photopolymérisation. Cela confirme que l'épaisseur obtenue pour la photopolymérisation, malgré le fait que la benzophénone est simplement adsorbée, reflète la réalité.

### Durée de vie

La durée de vie du revêtement a été caractérisée sur des lames de PDMS. Trois types de surfaces ont été caractérisées :

- le PDMS natif,
- le PAM greffé comme décrit précédemment.
- le P(AM-PDMA) adsorbé<sup>3</sup>. Ce copolymère a été choisi pour comparer la durée de vie d'une adsorption à un greffage covalent. Il possède en effet la capacité de s'adsorber grâce à ses chaînes pendantes relativement hydrophobes, tout en conférant à la surface un caractère hydrophile de par son squelette de PAM. Le P(AM-PDMA) est dissous à 1.5 % dans du TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA amené à pH 7.5 avec HCL). Il est mis en présence du PDMS pendant une heure, puis rincé avec du TE. Les lames ont été caractérisées toutes les semaines de deux manières : d'une part avec une mesure d'angle de contact, et d'autre part avec l'adsorption de billes magnétiques modifiées avec de la streptavidine (Dynabeads, 2.8µm de diamètre, à 1mg/ml

3. Le P(AM-PDMA) a été synthétisé initialement pour le revêtement des capillaires de verre d'électrophorèse capillaire. Pour sa structure et sa synthèse, se reporter à l'annexe 6

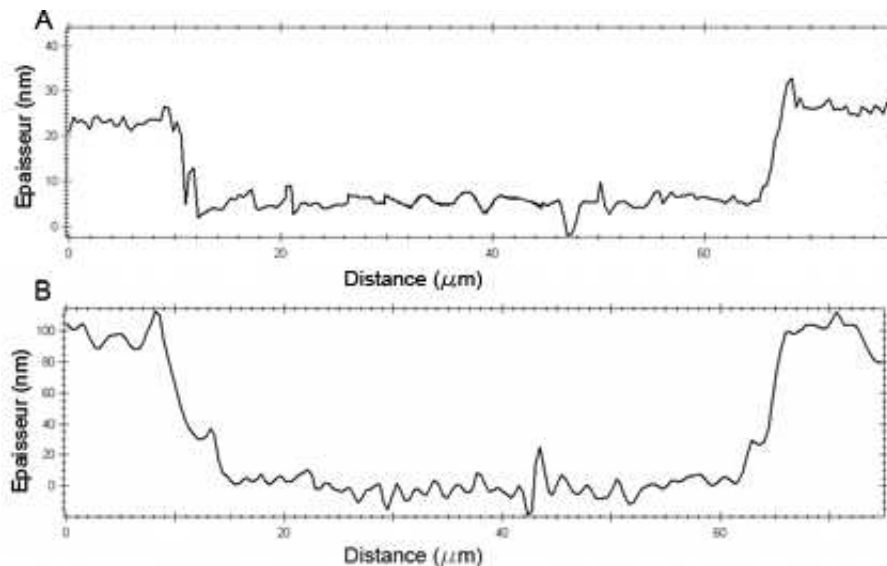


FIG 2.2 – Profils des surfaces de polyacrylamide obtenues par AFM à l'état sec (A) et à l'état mouillé (B). Ce profil a été obtenu en enlevant une bande de  $30\mu\text{m}$  avec un scalpel pour obtenir le niveau de référence.

dans TE pH 7.5) : une goutte de  $16\mu\text{l}$  est déposée sur la surface pendant 30 minutes, et est rincée au TE. La streptavidine est une protéine de 53 kDa qui est beaucoup utilisée en biologie moléculaire car elle forme un complexe très énergétique avec la biotine. Les résultats sont résumés sur la figure 4.6. On voit que le P(AM-PDMA) n'est plus efficace contre l'adsorption et le recouvrement de l'hydrophobie du PDMS, alors que le greffage covalent de PAM a été efficace pendant 2 mois. Le mécanisme par lequel le PDMS recouvre son hydrophobie est généralement lié à la diffusion des chaînes courtes de PDMS à la surface. Dans notre cas, la durée de vie de la modification du PDMS est particulièrement longue. Elle est vraisemblablement due à la grande épaisseur du revêtement qui forme une bonne barrière à la réorganisation des chaînes du PDMS.

### Adsorption de paranitroaniline en microcanal

Pour caractériser la suppression de l'adsorption non spécifique du traitement de surface dans un microcanal, l'adsorption de la paranitroaniline (pNA) a été étudiée dans notre équipe [Le Nel et al., 2008]. La paranitroaniline est une petite molécule ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ ). Son cycle aromatique lui confère une nature hydrophobe et une couleur jaune, ce qui permet de déterminer sa concentration par spectrophotométrie<sup>4</sup> à 405nm. Les microcanaux sont soit laissés à l'état PDMS natif, soit modifiés au

4. Technique qui consiste à déterminer la concentration d'un composé à partir de son absorbance grâce à la courbe d'étalonnage absorbance/concentration. L'appareil utilisé ici est le spectrophotomètre Nanodrop ND 1000 de Labtech, France

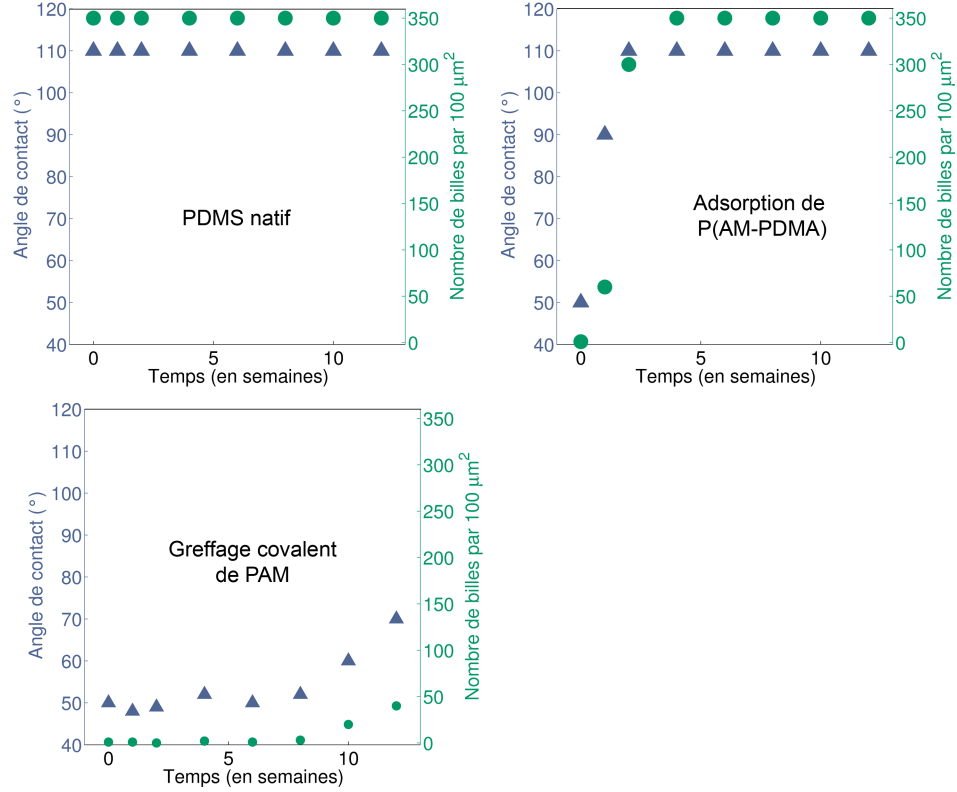


FIG 2.3 – Angles de contact et nombres de billes adsorbées par  $100\mu\text{m}^2$  en fonction du nombre de semaines pour les différents états de surface.

polyacrylamide. Une solution de pNA à 0.35mM dans un tampon Tris-HCl(0.05 M, pH 7.8) avec 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  est introduite dans les microcanaux à différents débits pour faire varier le temps de résidence des molécules de pNA dans les microcanaux. L'absorbance de la pNA est mesurée en entrée et en sortie de canal. Les résultats présentés figure 2.4 montrent que les canaux de PDMS adsorbent jusqu'à 80% de pNA (pour les faibles débits) et que cette adsorption augmente avec le temps de résidence dans le microcanal. A l'opposé l'adsorption de pNA est reproductible avec le temps de résidence dans les canaux modifiés au polyacrylamide. Cette adsorption a été diminuée jusqu'à environ 20% d'adsorption. L'erreur obtenue sur les mesures sur deux puces est faible : environ 10%. Le revêtement de surface s'est donc montré efficace contre l'adsorption non spécifique d'une petite molécule hydrophobe.



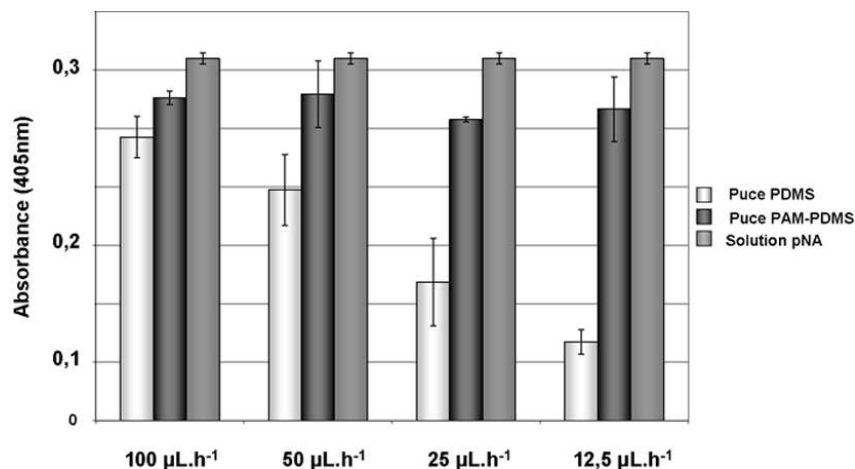


FIG 2.4 – Absorbances d’une solution de pNA comparées avec l’absorbance en sortie de canal de PDMS natif et modifié, pour différents flux. Les barres d’erreur reflètent 2 expériences, et pour chaque valeur de débit 3 mesures de l’absorbance. Travail réalisé par Anne Le Nel au sein de notre équipe.

## 2.4 Transposition au cyclo olefin copolymère (COC)

Le COC est un polymère relativement jeune (comparé au polyéthylène par exemple), et il est employé pour les laboratoires sur puces depuis peu d’années ([Gustafsson et al., 2008],[Pu et al., 2008]). C’est un copolymère d’éthylène et de norbornene (figure 2.5). En plus de ses bonnes propriétés thermiques et optiques (sa température de transition vitreuse peut atteindre la valeur de 180°C et il transmet la lumière visible à 91%), il offre plusieurs avantages par rapport au PDMS : il est très peu poreux aux gaz, en particulier au dioxygène et à la vapeur d’eau. Il résiste à un très grand nombre de solvants organiques, ainsi qu’aux acides et aux bases ([Nielsen and Hansen, 2005],[de Mello, 2002]). De plus, son module élastique est plus grand que celui du PDMS, ce qui confère au microcanaux en COC une plus grande résistance mécanique leur permettant de ne pas se déformer aux grands flux.

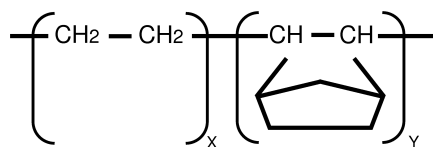


FIG 2.5 – Formule chimique du COC



Malgré cela, l'inertie chimique du COC fait qu'il est très difficile de modifier sa surface. Pourtant, le COC est hydrophobe et est chargé négativement en solution<sup>5</sup> et son utilisation dans les laboratoires sur puce nécessite de le modifier pour le rendre hydrophile et neutre. Le traitement de surface réalisé dans les canaux de PDMS a été adapté pour greffer des brosses de polyacrylamide sur une surface de COC (COC Topas 8007, Ticona GmbH, films de 130 $\mu$ m d'épaisseur, avec une température de transition vitreuse de 85°C).

L'acétone étant inerte vis-à-vis du COC, il a fallu trouver un autre solvant qui soit capable de dissoudre faiblement le COC et de dissoudre la benzophénone. Les solvants testés et leur comportement vis-à-vis du COC sont résumés dans la table 2.3.

Solvant	Solubilité du COC
Diméthylsulfoxyde	-
Dioxanne, acétone	-
Éthyle acétate	-
Diméthyl formamide	-
Pentane	+
Heptane	+
Diéthyl éther	+
Hexadécane	+
Diméthylchloride	+
Toluène	++
Cyclohexane	++

TABLE 2.3 – Résumé qualitatif du comportement du COC dans différents solvants organiques.

Or la benzophénone n'est soluble dans aucun des solvants qui dissolvent le COC. La stratégie adoptée a donc été de mélanger deux solvants : le premier qui gonfle le COC, et un deuxième qui dissout la benzophénone. Une troisième contrainte est la miscibilité des deux solvants. Deux mélanges se sont révélés remplir toutes les contraintes :

- Dichlorométhane 75%w/w + Éthyle acétate 25%w/w
- Oxyde de diéthyl 75%w/w + Éthyle acétate 25%w/w

Afin de caractériser rapidement les protocoles pendant leur optimisation, une méthode visuelle a été mise au point. Il s'agit de remplacer l'acrylamide par un monomère négatif : l'acide acrylique (avec la même concentration de 10% dans l'eau).

---

5. Sa mobilité électroosmotique est de 4,2.10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> à pH 8.0 dans 10mM Tris [Gustafsson et al., 2008] alors que celle du verre et celle du PDMS oxydé au plasma valent respectivement 5,7.10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [Sikanen et al., 2007] et 8.2.10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [Duffy et al., 1998] dans 20 mM sodium borate à pH 9.0.

Après la polymérisation, la surface est mise en présence avec du bleu de toluidine (1% w/w dans l'eau pendant 5 minutes) qui est un colorant portant une charge positive. Une partie de la feuille de COC est cachée des UV pour que l'on puisse apprécier la différence de couleur, car bien que le COC soit moins chargé que l'acide acrylique, il adsorbe une petite quantité de colorant. Une image d'un tel traitement est présentée figure 2.6. La limite n'est pas bien définie car la feuille de COC a tendance à se déplacer par rapport au masque pendant la polymérisation. Il s'agit d'une analyse qualitative.

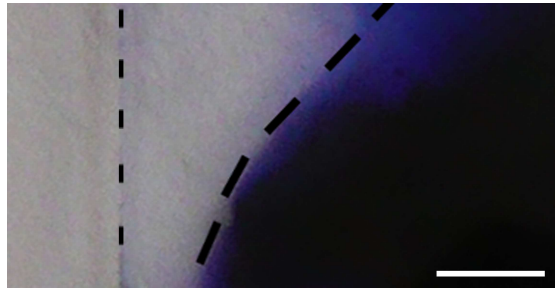


FIG 2.6 – Photographie d'une feuille de COC (limitée par les petits pointillés) dont une partie a été cachée des UV (limitée par les grands pointillés). La zone qui a été insolée se colore en bleu après de traitement au bleu de toluidine, signature de la présence de poly(acide acrylique). Échelle : 100 $\mu$ m.

Comme pour le PDMS, si le COC n'est pas préalablement oxydé, la polymérisation n'a pas lieu (aucune couleur bleue due à la présence de polymère n'apparaît). Nous n'avons pas pu expliquer ce phénomène, mais on peut imaginer qu'une oxydation augmente l'affinité du COC avec la benzophénone, qui, étant un peu polaire, diffusera plus facilement à travers une surface oxydée. Or le COC n'a pas pu être activé aux UV (l'angle de contact après 2 heures aux UV et immersion dans la BP reste le même). Par contre l'activation a pu être réalisée avec seulement 30 minutes d'immersion dans l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). C'est donc cette voie qui a été choisie en vue d'une transposition en microcanal.

Le protocole de photopolymérisation du PDMS a été reproduit sur le COC avec quelques aménagements. Les temps ont du être optimisés pour une meilleur efficacité :

- activation 30 minutes avec une solution d' $H_2O_2$
- modification avec la benzophénone à 10 % dans le mélange de solvants (45 minutes)
- photopolymérisation : 10% de monomère (acide acrylique ou acrylamide) dans l'eau, illuminé aux UV pendant 15 minutes.

Le greffage de polyacrylamide a été caractérisé par mesure d'angle de contact. Les

résultats sont résumés dans la table 2.4. Les angles obtenus pour le revêtement de PAM sont similaires à ceux obtenus sur PDMS. Les angles avant et après polymérisation ne dépendent pas du mélange de solvants, ce qui confirme que le seul rôle du mélange est de gonfler le COC afin d’y piéger la benzophénone.

<b>COC état natif</b>	$95 \pm 3^\circ$	
<b>10%w/w benzophénone</b> dans :	<b>Dichlorométhane 75%w/w</b>	<b>Oxyde de diéthyl 75 %w/w</b>
	<b>Éthyle acétate 25%w/w</b>	<b>Éthyle acétate 25%w/w</b>
	$67 \pm 10^\circ$	$66 \pm 8^\circ$
<b>Polymérisation de PAM</b>	$55 \pm 4^\circ$	$56 \pm 6^\circ$

TABLE 2.4 – Angles de contact de la surface de COC après différents traitements de surface.

## 2.5 Conclusion

Un traitement de surface de PDMS, basé sur la photopolymérisation de polyacrylamide avec un photoinitiateur classique, la benzophénone, a été transposé avec succès dans les microcanaux de PDMS et sur une surface de COC. La difficulté à activer un microcanal faute de pouvoir le faire grâce au plasma a été résolue grâce aux UV pour le PDMS et à l’eau oxygénée pour le COC. L’inertie chimique du COC qui est un de ses avantages, a rendu difficile sa modification de surface, mais un mélange de solvants s’est montré efficace pour y incorporer le photoinitiateur. La modification de surface a été caractérisée par plusieurs méthodes. Dans le cas du PDMS, les mesures d’angle de contact ont montré son caractère hydrophile, l’ellipsométrie a permis d’estimer son épaisseur à  $\simeq 90$  nm, et l’adsorption de billes modifiées à la streptavidine, ainsi que l’adsorption d’une petite molécule hydrophobe a montré sa capacité à éviter les adsorptions non spécifiques. Sur le PDMS, la durée de vie du revêtement est de 2 mois lorsqu’il est conservé à sec, ce qui n’a *a priori* jamais été réalisé sur ce matériau qui est en constante réorganisation.

L’avantage de ce traitement de surface est, en plus de sa capacité à rendre durablement la surface hydrophile, neutre et avec des adsorptions non spécifiques largement diminuées, son extrême facilité de mise en œuvre, son temps de réalisation qui n’excède par un couple d’heures, et son bas coût. Cela a permis à plusieurs membres de l’équipe de le mettre en œuvre pour améliorer leurs analyses : Anne Le Nel l’a mis en place dans sa puce où des colonnes auto-assemblées de billes magnétiques effectuent une digestion enzymatique. Le revêtement a permis d’éviter l’adsorption du produit de réaction (la paranitroallinine [Le Nel et al., 2008]) et donc d’augmenter la résolution de l’analyse. Dans une puce où les bulles d’air jouent le rôle de mélangeur, le revêtement de surface a permis de créer et de garder les dites bulles d’air, ce qui était

empêché par l'hydrophobie du PDMS [Pedinotti et al., 2006]. Enfin, Judith Miné a appliqué ce revêtement de surface dans les puces en PDMS où une molécule unique de chromatine était piégée dans une pince magnétique à l'aide de billes décorées avec de la streptavidine. Le revêtement lui a permis de réduire grandement l'adsorption non spécifique des billes et ainsi d'améliorer la visualisation de la molécule de chromatine.

Il serait très intéressant d'appliquer ce revêtement de surface dans le cadre d'une électrophorèse sur puce, par exemple. Cela permettrait de caractériser l'état de charge de surface du revêtement. De plus, en diminuant le flux électroosmotique et en le rendant homogène, la résolution de l'analyse devrait en être grandement améliorée.

# Chapitre 3

## Implémentations de capteurs de flux par photopolymérisation *in situ*

Ce chapitre traite de l'implémentation de capteurs de flux *in situ* par photopolymérisation. Deux types de capteurs seront développés. Le premier, basé sur l'élongation d'un objet photopolymérisé sera présenté sous forme d'un article publié dans le journal *Lab on a Chip* [Attia et al., 2009]. Puis nous exposerons le deuxième capteur dont le principe est la rotation d'un objet autour d'un axe pour la mesure du flux. Après une introduction sur les capteurs de flux et l'implémentation de Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) dans les laboratoires sur puces, nous présenterons la technique qui nous a permis de réaliser ces capteurs.

### 3.1 Introduction

#### 3.1.1 Capteur de flux : État de l'art

Mesurer la vitesse d'un fluide est un vieux défi en microfluidique. Déjà en 1997 paraissait une revue dédiée à la mesure de vitesse de flux dans les systèmes microfluidiques [Nguyen, 1997]. C'est une mesure très importante pour la manipulation des faibles quantités de fluide dans les laboratoires sur puce, à des flux de l'ordre du nL/min. De nombreuses stratégies, plus ou moins complexes et plus ou moins performantes, ont été proposées mais aucune n'a semblé faire l'unanimité.

Une même quantité physique pouvant être mesurée par un large choix de capteurs, plusieurs paramètres entrent en jeu dans le choix ou la conception d'un capteur. La gamme de mesures, sa précision, sa fiabilité ainsi que sa stabilité au cours du temps sont bien sûr à prendre en compte. On veut aussi que la mesure n'affecte pas le système. Ceci est un paramètre essentiel dans les laboratoires sur puce, car les analyses qu'ils produisent ne doivent pas être modifiées par le capteur de flux. D'autres paramètres très importants sont la facilité de mise en œuvre, et le coût du capteur. Enfin, la calibration et l'universalité de la mesure seront déterminants. On peut classer ici les capteurs en deux catégories. Les premiers, qui fournissent

une mesure *indirecte*, influencent peu le système qu'ils sondent, mais fournissent une mesure moyenne et peu sensible. Les mesures indirectes que nous présenterons ici pour la mesure de flux sont basées sur la détection de la différence de pression engendrée par un flux, et la dispersion d'un pic de chaleur causée par la diffusion. Les deuxièmes fournissent une mesure *directe* qui est résolue spatialement et qui possède une meilleure résolution que la mesure indirecte. Mais ces capteurs sont invasifs pour le système et imposent à celui-ci des conditions qui ne sont pas désirées dans les laboratoires sur puce.

### 3.1.2 Les mesures indirectes : capteurs thermiques et de pression différentielle

Historiquement, les capteurs de flux thermiques ont été les premiers développés et les plus largement utilisés. Il s'agit de produire de la chaleur dans le microcanal. La convection forcée due au flux va produire une distorsion du champ de température dans le sens du flux. La mesure de l'asymétrie du profil du champs de température permet de connaître la vitesse du flux. Les capteurs thermiques sont donc essentiellement des structures thermiquement isolées comportant un point de chauffage et un thermomètre. Plusieurs stratégies sont proposées pour mesurer l'asymétrie du profil de température et sont schématisées dans la figure 3.1). On peut mesurer l'énergie nécessaire pour maintenir une membrane à une certaine température (anémomètre) [Lammerink et al., 1993]. Le principe de thermotransfert (ou calorimètre) consiste à chauffer le fluide à un endroit et à mesurer sa température de part et d'autre de ce point ([Nguyen et al., 2001] et [Ashauer et al., 1999]). En dernier lieu, on peut mesurer le temps de parcours d'une impulsion de chaleur ([Kikutani et al., 2008] et [Ashauer et al., 1999]).

Les capteurs de flux thermiques nécessitent une connaissance préalable de la capacité calorifique du fluide. De plus, l'implémentation des résistances et des membranes thermiques, malgré la grande maîtrise des techniques dans ce domaines, reste fastidieuse [Becker and Gartner, 2008]. La grande diffusion thermique des fluides limite la sensibilité de la mesure. En effet les fluides sont en contact thermique avec le substrat et une grande partie du fluide ne participe pas au signal.

Dans le but de résoudre ce problème de diffusion, plusieurs équipes ont proposé des canaux suspendus, en totale isolation thermique avec le substrat. De nombreux capteurs de type MEMS ont été proposés ([Dijkstra et al., 2008], [Wu et al., 2001] et [Oosterbroek et al., 1999]). Une couche sacrificielle permet aux canaux d'être suspendus et donc isolés thermiquement. Ces capteurs thermiques de type MEMS ont amélioré la sensibilité jusqu'à 0.4nL/min, et couvrent presque 3 ordres de grandeur de flux, ce qui est un résultat exceptionnel. Malgré tout la microtechnologie "dure" reste impressionnante par sa complexité et son temps de mise en œuvre.

La deuxième méthode indirecte est la mesure de pression ([Oosterbroek et al., 1999]

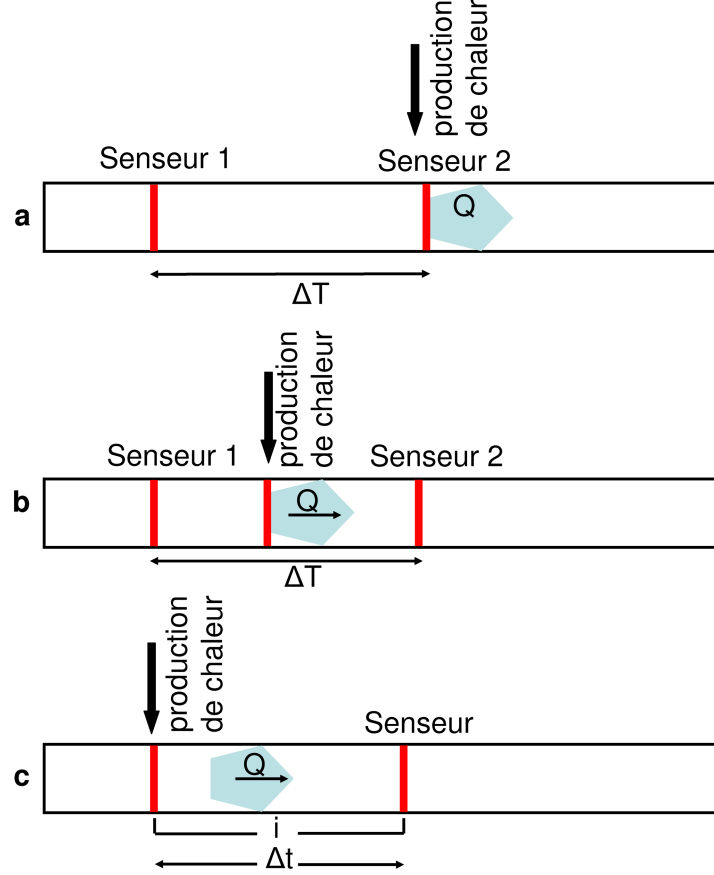


FIG 3.1 – Schéma explicatif des différents capteurs de flux thermiques. **a** Anémomètre : l'asymétrie du profil de températures du fluide chauffé par une membrane est mesurée. **b** Calorimètre : 2 capteurs de part et d'autre d'une membrane produisant de la chaleur mesurent la différence de température due au flux. **c** Temps de vol : le temps que met un pulse de chaleur à parcourir la distance entre le chauffage et le capteur est mesuré.

et [Nath et al., 2005]). La différence de pression  $\Delta P$  le long d'un canal est directement liée à la vitesse du fluide selon la loi de Bernoulli [Gravesen et al., 1993] :

$$\Delta P = f \frac{L\eta}{2D_h^2} v \quad (3.1)$$

avec  $v$  la vitesse effective,  $f$  le coefficient de friction, qui peut être déterminé empiriquement ou tiré des tables,  $D_h$  le diamètre hydraulique qui dépend de la géométrie du canal,  $\rho$  la densité du fluide.

Mais l'interprétation de la différence de pression dépend beaucoup de la géométrie des canaux. De petites variations de la géométrie influent sur la résistance hydraulique, qui dépend du diamètre hydraulique au carré. De plus, la viscosité des liquides

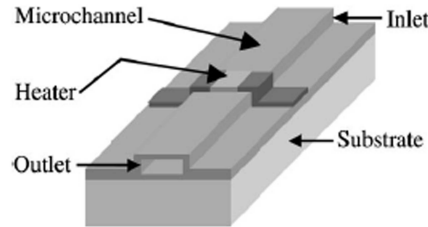


Fig. 1. A microchannel-based flow sensing approach.

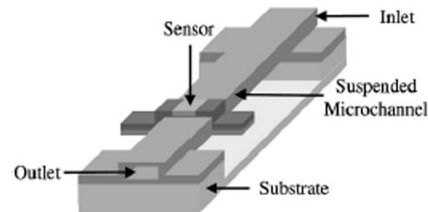


FIG 3.2 – Canal suspendu où le fluide est isolé thermiquement et participe totalement au signal. Tiré de [Wu et al., 2001]

est très sensible aux changements de température. De fait, les mesures qui ont été reportées varient de 10% de la mesure attendue [Oosterbroek et al., 1999].

### 3.1.3 Les mesures directes

#### Les méthodes électrochimiques

Les techniques de microfabrication d'électrodes en vis-à-vis des surfaces des systèmes microfluidiques sont bien connues et maîtrisées et permettent les mesures électrochimiques dans les microcanaux. Pour plus d'information sur les techniques électrochimiques pour des applications microfluidique, on peut se reporter à une revue très complète traitant de ce sujet [Becker and Gartner, 2008]. Ces techniques ont été largement appliquées à la mesure de la vitesse des fluides.

Le capteur à temps de vol [Wu and Sansen, 2002] consiste en deux cellules électrochimiques : la première produit un pulse d'oxygène, la deuxième le détecte. Le temps de parcours et la géométrie du canal donnent accès à la vitesse du fluide. Contrairement à un pulse de chaleur, le pulse d'oxygène diffuse peu dans les parois du canal mais les pulses peuvent former des bulles et boucher le canal. Wu *et al.* [Wu et al., 2005] ont pallié à cette restriction en changeant la fonction de la première électrode : elle consomme une partie de l'oxygène dissous. La réponse de la deuxième électrode est donc diminuée et la différence de réponse est due au transport convectif. Les électrodes sont peu distantes ( $5\mu\text{m}$ ) pour rendre la diffusion négligeable. Cette technique peut mesurer plus de 2 ordres de grandeur de vitesse de flux avec un minimum



de  $600\mu\text{l}/\text{min}$ .

Mais une concentration minimum d'oxygène est nécessaire pour la détection d'un courant. Les solutions doivent donc être gazées avant d'être introduites dans le canal. Par contre la concentration en oxygène n'a pas besoin d'être connue, puisque c'est la différence de concentrations qui va être mesurée. Une autre méthode électrochimique consiste en la mesure de la variation d'admittance électrochimique. Collins *et al.* [Collins and Lee, 2004] ont ainsi déterminé la vitesse du flux en mesurant l'admittance d'un courant alternatif d'une paire d'électrodes en or. La variation d'intensité du courant, qui est une mesure de l'admittance, est proportionnelle à  $\sqrt[3]{Q}$ . Il faut donc mesurer le courant au repos et avec le flux. La mesure n'est donc pas immédiate. De plus l'admittance électrochimique dépend des concentrations des composants électrochimiques qui doivent être connues à l'avance. Cette technique permet de mesurer des gammes de  $10$  à  $35\mu\text{l}/\text{min}$ .

Amatore *et al.* [Amatore et al., 2004] ont exploité le cycle électrochimique d'un couple redox entre deux bandes d'électrodes proches pour mesurer la vitesse du flux et pour estimer la libre diffusion des espèces en absence de flux. Le produit d'un couple électrochimiquement réversible est formé à une électrode (génératrice) et devient le réactif à l'autre électrode (collectrice). La vitesse du flux est proportionnelle à l'intensité détectée aux électrodes génératrices et collectrices.

Kim *et al.* [Kim et al., 2007] utilisent l'existence de la double couche électrique lorsque la surface est chargée, qui, à l'application d'un gradient de pression va générer un courant électrocinétique. La mesure du courant électrocinétique permet de déterminer la valeur de la vitesse du fluide généré par différence de pression. Là encore, la concentration ionique doit être connue. L'état de charge de surface doit être contrôlé, ce type d'expérience est appliqué dans des capillaires de silice fondue qui sont chargés négativement. La gamme des flux mesurés dépend très fortement de la taille des canaux et reste inférieure à un ordre de grandeur (par exemple avec une concentration en potassium de et une géométrie du capillaire de  $30 \times 300\mu\text{m}$  les débits mesurés vont de  $10\mu\text{l}/\text{min}$  à  $60\mu\text{l}/\text{min}$ )

### Les méthodes de visualisation du fluide

Une autre méthode directe consiste à ensemencer le fluide avec des particules browniennes n'influençant pas la dynamique du fluide. La vitesse du fluide est alors directement déduite de l'observation du mouvement des traceurs.

Plusieurs techniques permettant de déduire la vitesse du fluide de la visualisation des particules ont été développées. La plus courante est la Micro Particle Image Velocimetry ( $\mu\text{PIV}$ ), développée par Santiago *et al.* dans les microcanaux ([Santiago et al., 1998] et [Meinhart et al., 1999]). Un microscope à épifluorescence et une camera CCD permettent d'imager les traceurs fluorescents. Les images obtenues sont divisées en fenêtres d'interrogation dans le but d'augmenter la résolution de la mesure (cf. figure 3.3). Un algorithme opérant une *cross-corrélation* entre les fenêtre

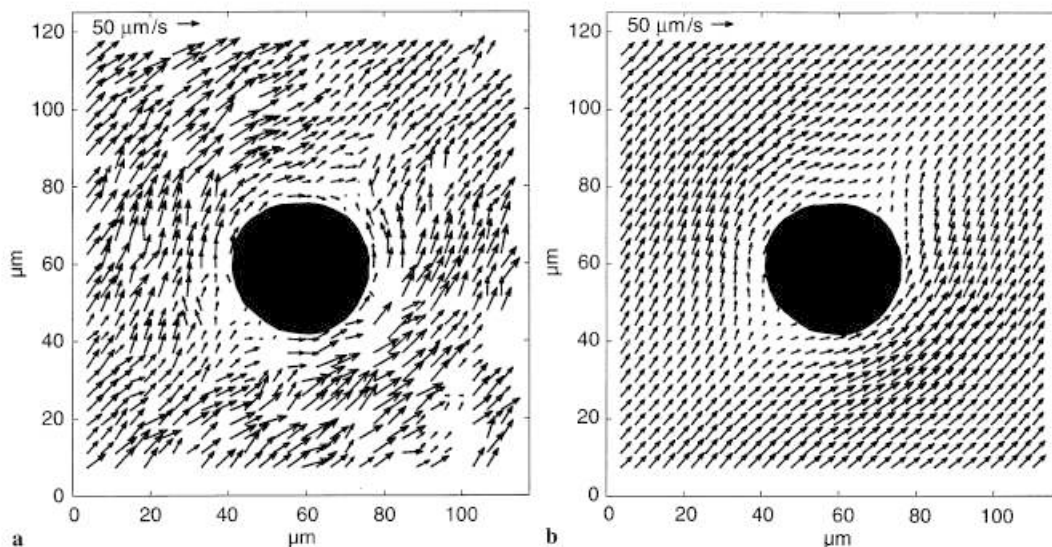


FIG 3.3 – **a,b** Champs de vecteur d'un fluide animé par tension de surface dans une cellule de Hele-Shaw de section cubique  $120\ \mu\text{m}$  de côté autour d'un obstacle de  $30\ \mu\text{m}$  de diamètre [Santiago et al., 1998]. Le champ de vitesse contient 900 vecteurs correspondant à un volume de  $6.9\ \mu\text{m} \times 6.9\ \mu\text{m} \times 1.5\ \mu\text{m}$ . Les particules de polystyrène sont de  $300\ \text{nm}$  de diamètre. **a** Champ de vecteurs de vitesses instantanées. **b** Champs de vecteurs de vitesses moyennées sur 8 images.

d'images successives permet d'obtenir le champ de vitesse sur l'ensemble de l'image. La puissance de cette méthode réside dans le fait que la vitesse est mesurée localement sur des régions de quelques microns.

En scannant la hauteur du canal et en interpolant des particules se trouvant hors du champ, Meinhardt *et al.* ont obtenu des profils 3D [Pommer et al.]. D'autres techniques, comme la microscopie confocale ([Kinoshita et al., 2007] et [Lima et al., 2007]), ou l'holographie [Yang and Chuang, 2005] ont permis d'obtenir des profils de flux dans les trois dimensions.

Ces techniques qui utilisent des traceurs pour imager le fluide sont très puissantes de par leur résolution temporelle et spatiale. Malheureusement elles sont peu ou pas compatibles avec les applications biologiques dont traitent les  $\mu\text{TAS}$ , les traceurs pouvant interagir avec le matériel d'origine d'intérêt et l'endommager. De plus, le matériel biologique absorbe une partie du signal détecté : Lima *et al.* [Lima et al., 2007] ont reporté une perte de signal de 17%, due aux globules rouges présents dans le plasma sanguin.

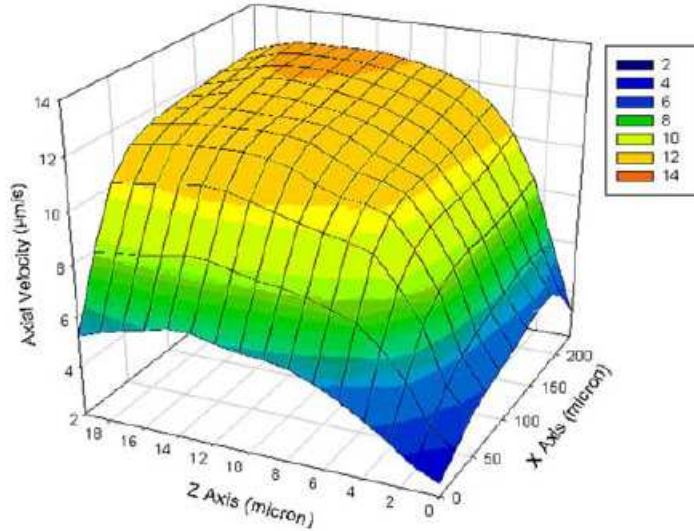


FIG 3.4 – Profil 3D d'un quart de canal droit obtenu par  $\mu$ PIV [Yang and Chuang, 2005]. La vitesse au centre du canal est de  $12.2 \mu\text{m/s}$  (c'est à dire  $723 \mu\text{l/min}$ )

### 3.1.4 Résumé

Chaque capteur présente ses avantages et ses inconvénients, que l'utilisateur doit prendre en compte avant de faire son choix. Pour le moment, aucun ne combine la facilité de mise en œuvre, la polyvalence pour des fluides de différents propriétés physico-chimiques et à différentes géométries de canaux, et à la mesure reproductible et précise de plusieurs ordres de grandeurs de vitesses de fluide. Le capteur de flux que j'ai développé pendant ma thèse remplit toutes ces caractéristiques, comme nous le verrons dans l'article.

### 3.1.5 Les MEMS : vers une haute intégration

Les laboratoires sur puces, après la miniaturisation et la diminution des volumes, nécessitent l'intégration de composés fonctionnels dans le but de réunir toutes les fonctionnalités de l'analyse sur une seule puce. L'avantage de cette intégration est de supprimer toute une robotique extérieure à la puce, qui, en plus d'être encombrante, coûte très cher. Ces composés fonctionnels se présentent sous la forme de MEMS. En plus de la fonction première de la puce, c'est à dire l'analyse chimique ou biologique, les composés fonctionnels à intégrer sur la puce sont de plusieurs sortes. En effet l'analyse totale d'un échantillon brut nécessite tout un panel de fonctionnalités, en partant de la détection de la molécule d'intérêt jusqu'à la caractérisation du produit de réaction. Par exemple un laboratoire sur puce nécessite le contrôle précis du déplacement des écoulements et le mélange des fluides qui vont successivement interagir avec le substrat. Le contrôle des écoulements, qui se fait simplement avec un contrôle en débit à l'aide d'un pousse-seringue ou un contrôle des pressions d'entrée et sortie, a trouvé une amélioration conséquente avec l'apparition des vannes et pompes intégrées [Thorsen et al., 2002]. En effet, la mise en mouvement des fluides se révèle d'une importante capitale, lorsqu'il s'agit de complexifier une expérience, par exemple lorsque l'on veut automatiser le passage successif de plusieurs analytes.

#### Photolithographie "dure"

Les MEMS sont le plus communément fabriqués par photolithographie "dure" du silicium. En enlevant successivement des couches sacrificielles suivant des motifs différents, on obtient des structures mobiles définies dans les 3 dimensions (figure 3.6). Les structures sont obtenues avec un très haut contrôle de la forme et une très haute résolution, de l'ordre du micron.

Les MEMS trouvent une application dans les capteurs de flux. La déflexion de micropiliers [Krijnen et al., 2006] (figure 3.5) ou d'une fibre optique [Lien and Vollmer, 2007] a permis la mesure de débits. Mais cette application reste anecdotique car aucune amélioration des performances (2 à 3 ordres de grandeurs de flux mesurables dans [Lien and Vollmer, 2007] ) ne justifie la lourde mise en œuvre que nécessitent la micro-fabrication et la détection. Une des applications majeures des MEMS est la détection sans marquage de biomolécules. Une stratégie est la microfabrication des réseaux de cantilevers fonctionnalisés avec des biomolécules. L'hybridation spécifique d'oligonucléotides complémentaires [Fritz et al., 2000] ou d'un complexe ligant/recepteur [Shekhawat et al., 2006] induit un stress de surface qui entraîne une déflexion du cantilever de quelques dizaines de nanomètres (figure 3.6). L'intégration de plusieurs milliers de cantilevers sur une même puce permet la réalisation de puces pour la protéomique et la génomique.

Les réseaux de transistors à effet de champ, appelés nanowires de par leur caractère unidirectionnel, ont permis la détection électrochimique de biomolécules et de molécules chimiques uniques [Cui et al., 2001] grâce à des mesures de changement

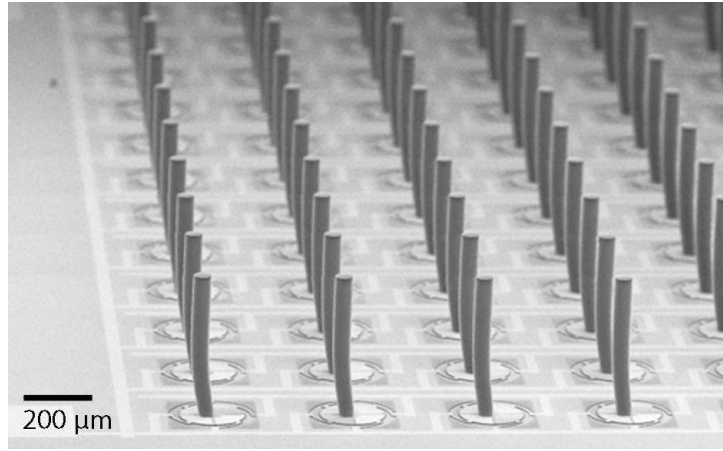


FIG 3.5 – Réseau de micro-piliers en SU8 de 470  $\mu\text{m}$ . Tiré de [Krijnen et al., 2006]

de conductance. Ce changement de conductance apparaît lors de la formation d'un complexe antigène/anticorps par exemple. Ils ont aussi pu détecter, stimuler et/ou inhiber la propagation du signal neuronal d'un neurone unique [Patolsky et al., 2006] (figure 3.6C).

Une deuxième application majeure des MEMS concerne les échanges actifs de fluides. De nombreux MEMS ont été développés dans ce sens : un réseau 3D de canaux courbes permet un mélange chaotique [Therriault et al., 2003], l'implémentation d'un micro-barreau magnétique dans le microcanal permet le mélange et le pompage [Ryu et al., 2004]. Hayamizu *et al.* ont microfabriqué un réseau 3D permettant la perfusion de nutriments pour la culture active de neurones [Hayamizu et al., 2003]. D'autres applications sont à noter, comme un capteur de pression par Ge *et al.* [Ge et al., 2008] basé sur la déflexion d'une fibre optique, ou un capteur de viscosité par résonance d'un cantilever [Quist et al., 2006].

Les matériaux utilisés dans la réalisation de cette lithographie "dure", *e.g.* le silicium et l'oxyde de silicium, ont un module élastique élevé, ce qui interdit la production d'objets flexibles. La succession d'étapes critiques demandant à l'utilisateur une grande maîtrise de la technique rend cette stratégie ardue et longue à réaliser, en plus d'être coûteuse. D'autant plus que la modification des surfaces mises en jeu est nécessaire pour les rendre biocompatibles et/ou les fonctionnaliser avec des molécules d'intérêt, ce qui rajoute à la complexité de la mise en œuvre.

### Photolithographie "douce"

Récemment l'utilisation d'hydrogels comme matériau a largement simplifié et accéléré la production de MEMS et a permis d'accéder à de plus faibles modules d'élasticité.

En se basant sur le même principe que la photolithographie "dure" mais photo-



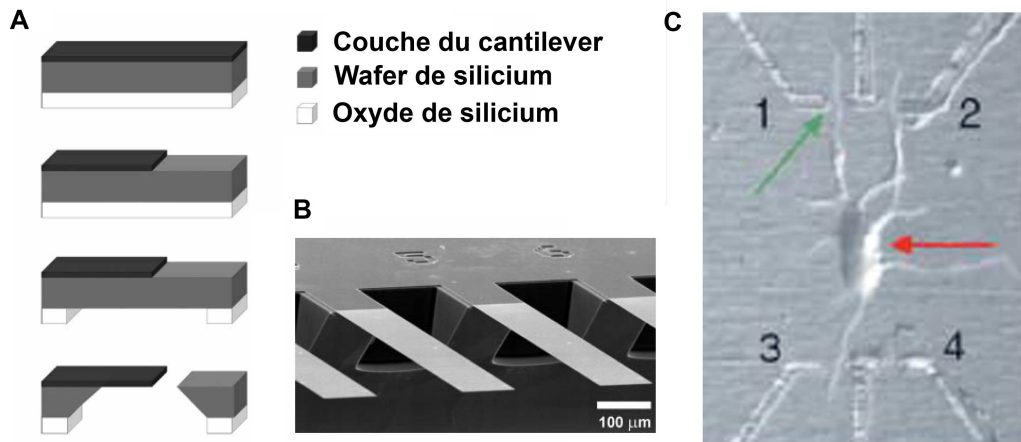


FIG 3.6 – **A** Schéma de la lithographie dure pour la fabrication d'un cantilever. Des couches sont successivement enlevées pour former un objet 3D. **B** Image à microscopie électronique à balayage d'un réseau de cantilevers pour la détection de l'hybridation d'oligonucléotides réalisée dans [Fritz et al., 2000]. **C** Cellule neuronale unique connectée à 3 des 4 nanowires. Une stimulation intracellulaire peut être appliquée dans le soma (flèche rouge) ou une stimulation extracellulaire avec le nanowire 1 (flèche verte). Les réponses des nanowires donnent accès aux informations sur la propagation du signal neuronal. Extrait de [Patolsky et al., 2006]

polymérisant des hydrogels photosensibles, Simms *et al.* ont incorporé un réseau de matrices pour la culture de cellules dans une puce microfluidique [Simms et al., 2008]. Malgré la facilité de mise en place de cette technique et la biocompatibilité des matériaux mis en jeu, la résolution de cette technique reste sub-millimétrique.

La projection du masque depuis le plan focal d'un microscope a permis de réduire les motifs du facteur de grossissement du tube du microscope multiplié par celui de l'objectif. Les masters ainsi réalisés [Love et al., 2001] ont montré une résolution  $R$  de  $0,6\mu\text{m}$ , avec un objectif 100X, limitée par la diffraction :  $R = K\lambda/NA$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde (pour les résines photosensibles les UV sont les rayonnements utilisés)  $NA$  l'ouverture numérique de l'objectif, et  $K$  un paramètre égale à 1 pour un substrat réfléchissant [Moreau, 1988].

Beebe *et al* [Beebe et al., 2000] ont ainsi photoréticulé des hydrogels acrylate pour l'implémentation de vannes dans les microcanaux. Les hydrogels, qui ont la propriété d'absorber le milieu aqueux environnant, peuvent se gonfler spécifiquement en réaction à certains stimuli. Des hydrogels ont été développés pour gonfler en réaction à la température [Hoffman et al., 1999], au pH [Sudipto et al., 2002], à la lumière [Suzuki and Tanaka, 1990], ou encore en présence de glucose [Kataoka et al., 1998], d'antigènes [Miyata et al., 1999] ou de protéines [Kim et al., 2005]. Ces propriétés

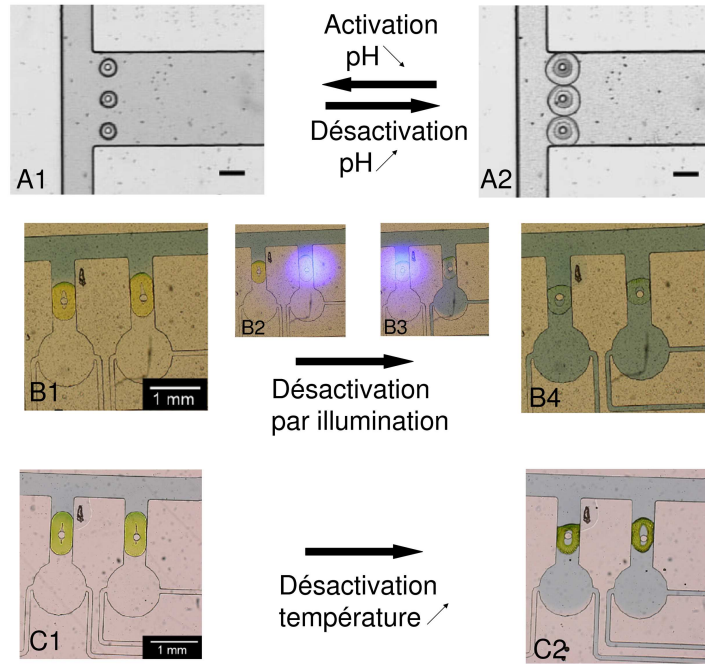


FIG 3.7 – Valves activées par pH. **A** Un réseau de 3 piliers composé d'un hydrogel sensible au pH est photopolymérisé autour de plots de PDMS [Beebe et al., 2000]. Ainsi la vitesse de diffusion de la solution tamponnée dans l'hydrogel est augmentée et le temps de réponse de la valve diminué. Échelle  $300\mu\text{m}$ . **B** Valve activée par illumination aux UV. Chaque valve peut être activée séquentiellement grâce à une illumination localisée. **C** Un hydrogel sensible à la température gonfle quand celle-ci passe de  $23^{\circ}\text{C}$  à  $46^{\circ}\text{C}$ . **B** et **C** : Tirés de [Sugiura et al., 2007]

ont été utilisées pour fabriquer des valves dont le principe de base est le gonflement d'hydrogel en réponse à divers stimuli : un changement de pH ([Beebe et al., 2000] et [Yu et al., 2001]), de température [van der Linden et al., 2004], [Shirasaki et al., 2006] une irradiation aux UV [Sugiura et al., 2007], et qui ne nécessitent donc aucun contrôle externe, ni source d'énergie (figure 3.7).

La propriété de sensibilité à la température d'un hydrogel couplé à un barreau magnétique a permis d'intégrer un régulateur de température dans un microcanal [Agarwal et al., 2007].

La porosité de ces hydrogels, qui est de l'ordre de  $0,1\text{-}1\mu\text{m}$  a permis la microfabrication *in situ* de membranes séparatrices [Kim and Beebe, 2008], et l'encapsulation de colorants sensibles au changement de pH pour la détection d'ions [Moorthy and Beebe, 2002].

Mais le gonflement des hydrogels est contrôlé par la diffusion, qui, malgré la petite taille de ces MEMS, limite grandement les temps de réponse qui sont de l'ordre de



la dizaine de secondes. De plus les hydrogels sont attachés à la surface de la puce, ce qui limite le gonflement dans 2 dimensions.

En outre les stimuli, comme le pH ou la température, sont des paramètres critiques pour le matériel biologique, et les variations abruptes de ces paramètres nécessaires pour activer les MEMS ne sont pas désirés dans les analyses biologiques.

La découverte de la propriété d'inhibition de la photopolymérisation radicalaire à la surface du PDMS natif a permis l'avènement de la photolithographie en flux, technique très puissante permettant de produire à grand rendement des particules polymérisées *in situ* dans un microcanal [Dendukuri et al., 2006].

Cette inhibition est due au fait que le PDMS est un matériau très perméable aux gaz. Il a été montré que si le PDMS n'est pas traité au plasma avant la fermeture du microcanal, le dioxygène diffuse très rapidement à travers celui-ci. Une couche de dioxygène d'environ  $5\mu\text{m}$  se forme à la surface du microcanal. Cette couche n'est pas observée après un traitement au plasma qui rend le PDMS imperméable aux gaz [Shiku et al., 2006]. La constante de réaction du dioxygène avec le photoinitiateur est beaucoup plus grande que celle du monomère. Le dioxygène inhibe donc la réaction de polymérisation [Decker and Jenkins, 1985]. Ainsi, si les conditions expérimentales d'illumination et de concentration en initiateur font que la consommation du dioxygène n'est pas totale, les structures photopolymérisées ne sont pas attachées à la surface [Dendukuri et al., 2006]. Le groupe de P. Doyle a ainsi développé des sondes à ADN [Pregibon et al., 2007], sous la forme d'une particule d'hydrogel chargée en allèles, et porteuse d'un code de par sa forme (typiquement un code binaire de points permettant plus de  $10^{12}$  combinaisons). Chaque allèle est chargé dans une particule portant un code différent ce qui permet la détection de plusieurs milliards d'hybridations.

Ces particules ont servi à encapsuler des cellules [Panda et al., 2008], et ont été chargées de particules magnétiques pour la production de particules superparamagnétiques [Hwang et al., 2008]

C'est cette technique qui a été utilisée pour microfabriquer les capteurs de flux que j'ai développés pendant ma thèse.

Grâce à des plots présents dans le microcanal, les capteurs ont pu être immobilisés localement tout en gardant leur libre mouvement autour du plot. Les plots étant en PDMS, ils possèdent aussi la couche d'inhibition à leur surface ce qui permet à la structure photopolymérisée d'être désolidarisée du plot. La facilité de mise en place et la rapidité de fabrication des objets, leur confèrent des atouts non-négligeables. De plus, la possibilité de pouvoir dessiner n'importe quel motif, ainsi que d'obtenir des objets déformables mais fixés au microcanal grâce à des plots multiplie les possibilités de MEMS que seule l'imagination du chercheur limite.

## 3.2 Capteur de flux basé sur l'élongation d'une microstructure photopolymérisée

### 3.2.1 Soft Flow Sensors

Cet article a été publié le 12 février 2009 dans Lab on a Chip, et est disponible à <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/LC/article.asp?doi=b813860e>

Le modèle décrivant le comportement du ressort est présenté dans l'annexe 7.

## Soft microflow sensors

Rafaele Attia<sup>1</sup>, Daniel C. Pregibon<sup>2</sup>, Patrick S. Doyle<sup>2</sup>, Jean-Louis Viovy<sup>3</sup>,  
Denis Bartolo<sup>3</sup>

We present a rapid prototyping method for integrating functional components in conventional PDMS microfluidic devices. We take advantage of stop-flow lithography [Dendukuri et al., 2007] to achieve the *in situ* fabrication of mobile and deformable elements with a controlled mechanical response. This strategy is applied to the fabrication of microflow sensors based on a deformable spring-like structure. We show that these sensors have a large dynamic range, typically 3 to 4 orders of magnitude, and that they can be scaled down to measure flows in the nl per mn range. We prepared sensors with different geometries, and their flow-elongation characteristics were modeled with a simple hydrodynamic model, with good agreement between model and experiments.

## Introduction

Beyond miniaturization and reduction of reagents consumption, one of the major advantages of microfluidics is the possibility to fully integrate biological or chemical processes in a single device without the requirement of expensive and cumbersome robotics (sample-to-result strategy) [Whitesides, 2006]. This lab on a chip approach requires the integration in a single chip of various functional components, such as valves, pumps, mixers, sensors and analyzers. Silicon "hard" lithography is the most common approach to microfabricate and integrate functional structures, such as MEMS [Torres, 2003]. This technology can yield mobile structures with high spatial resolution (below 1 $\mu$ m) and reproducibility. Important examples are micro-cantilevers for environmental, chemical and biological detection [Waggoner and Craighead, 2007], [Fritz et al., 2000], membranes micropumps [Doll et al., 2007], and electrostatic rotary motors [Bart et al., 1992]. However the multi-step techniques used to develop these components are highly time-consuming and require specialized clean room equipment. Several days to several weeks are typically required, making these methods inappropriate for laboratory prototyping and small production series. Moreover, the conventional materials involved in MEMS technologies have a large elastic modulus, allowing for weak deformations only. Finally, their chemical properties are usually not compatible with biological processes,

---

1. Laboratoire Physicochimie Curie, CNRS/UMR 168, 11 rue Pierre et Marie Curie, Paris, France, Tel : (33) 1 56 24 68 44; Fax : (33) 1 40 51 06 36 E-mail : rafaele.attia@curie.fr, jean-louis.viovy@curie.fr

2. Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Ave., Cambridge MA 02139 USA, E-mail : pregibon@mit.edu, pdoyle@mit.edu

3. PMMH laboratory ESPCI, 10, rue Vauquelin 75231 Paris cedex 05 France. E-mail : denis.bartolo@espci.fr

unless specific surface modifications are performed.

Recently, a few alternative strategies have been proposed to achieve rapid prototyping of integrated functional components. Simms et al. [Simms et al., 2008] proposed a promising method, also based on sequential lithography and etching process but involving polymeric materials. This method does not require expensive and specialized equipment, but it was so far limited to millifluidic applications with typical minimal sizes in the  $100\mu\text{m}$ -1mm range. Beebe and coworkers [Beebe et al., 2000] have proposed a very simple and elegant method to fabricate microstructures by *in situ* photolithography of acrylic polymer gels, demonstrating for instance the fabrication of pH sensitive microvalves in millifluidic channels. This single step process is fast and easy to implement. The integrated gel based components are deformable, but they cannot freely move in the channel (they are bound to the walls), and the typical time constant of actuation by gel swelling is rather long. Another limitation of this strategy is that pH is a critical parameter for many biological applications, so it is not always possible to use this property as a flow-control parameter. As for the technology proposed in [Simms et al., 2008] the typical size of the photopolymerized valves described in [Beebe et al., 2000] is in the millifluidic range.

In this paper, we show how to take advantage of continuous flow lithography [Dendukuri et al., 2006], a high-throughput technique recently proposed for the fabrication of microparticles, to easily include mobile and deformable "soft MEMS" inside PDMS microchannels. The main idea underlying this approach is to shape a photopolymerizable polymer flown in a microchannel, by microscope projection photolithography. The functional component is thus fabricated *in situ*, which simplifies greatly the process of integrating and aligning soft-MEMS inside microfluidic circuits.

The use of polymer-based materials enables the fabrication of soft structures with elastic moduli typically six orders of magnitude smaller than that of silicon used in conventional MEMS. These structures also have a considerably larger range of reversible elastic deformation. In addition, the free radical photopolymerization process yields hanging structures free to move in the microchannel, without dealing with complex sacrificial layers. Stop-flow lithography allows for the preparation of various designs in a matter of minutes, offering unprecedented versatility for the testing of integrated mechanical elements. Finally, it does not require high resolution tools or masks or, indeed, any specific clean room equipment. It is thus particularly well adapted to laboratory fast prototyping, and low-cost production of small series.

As a first step toward highly-integrated soft-MEMS design, we demonstrate here the fabrication of in-channel spring-like microflow sensors, and study their characteristics. These flow sensors do not require the addition of specific components in the fluid as microparticles (as used *e.g.* for flow measurement based on particle tracking velo-

cimetry) [Santiago et al., 1998], salt (for electrokinetic detectors) [Collins and Lee, 2004], or electrochemically-responsive molecules [Rossier et al., 1999]. As we shall see below, they can also offer a large dynamic range.

## Fast integration of soft mobile component in microfluidic devices.

### Microscope-based projection lithography method

Our microfabrication strategy relies on "microscope-based" projection lithography. This method only requires a UV lamp, a PDMS microchannel and a microscope objective (Figure 3.8). For convenience, we used here an inverted microscope. The prepolymer solution is introduced in the microchannel with a syringe pump. The flow is then stopped and focus is precisely made on the bottom surface of the microchannel. Subsequently, the prepolymer is exposed to UV light through a mask located at the field stop position. The exposure time (typically a few tenths of a second) is precisely set thanks to a computer-controlled shutter. As a result, we obtain a solid lithographically defined object. The object size is smaller than the feature on the mask. The reduction factor corresponds to the ratio of the magnification of the microscope objective over the magnification of the tube lens of the microscope. With simple, low-cost dot-printed masks, the size of the functional element can be varied from 1 micrometer, with a high magnification objective (100X), to 10 millimeters, with a low magnification objective (4X). Whatever the chosen shape, the sides of the polymerized structures are essentially parallel to the UV beam direction. Aspect ratios up to 10 :1 can be easily achieved with low numerical aperture objectives. Importantly, the microfabricated elements do not adhere to the channel walls. This is due to the high permeability of PDMS to gases. Oxygen diffuses rapidly into the prepolymer solution near the PDMS walls, inhibiting free radical in a thin layer (3-4  $\mu\text{m}$ ), in which the prepolymer remains uncured. This prepolymer (or the suspending liquid if the channel is flushed by another fluid after polymerization) lubricates the contact between the cross-linked objects and the PDMS walls [Pregibon et al., 2006]. Hence, the cross-linked structures are free to move and to deform. In the present application, in order to keep one end of the sensor at a fixed position in the channel, we photopolymerize an anchoring loop around a post integrated at a predefined position in the PDMS microchannel during its fabrication. The loop is centered on the post prior to photopolymerization (see Figure 3.9). In order to demonstrate the versatility of the method, we developed several spring-like deformable elements of different geometries (Figure 3.8 and 3.9).

In our experiments, we mostly used polyethyleneglycol diacrylate (PEGDA). These acrylate-based polymers are highly reactive and form tightly cross-linked networks

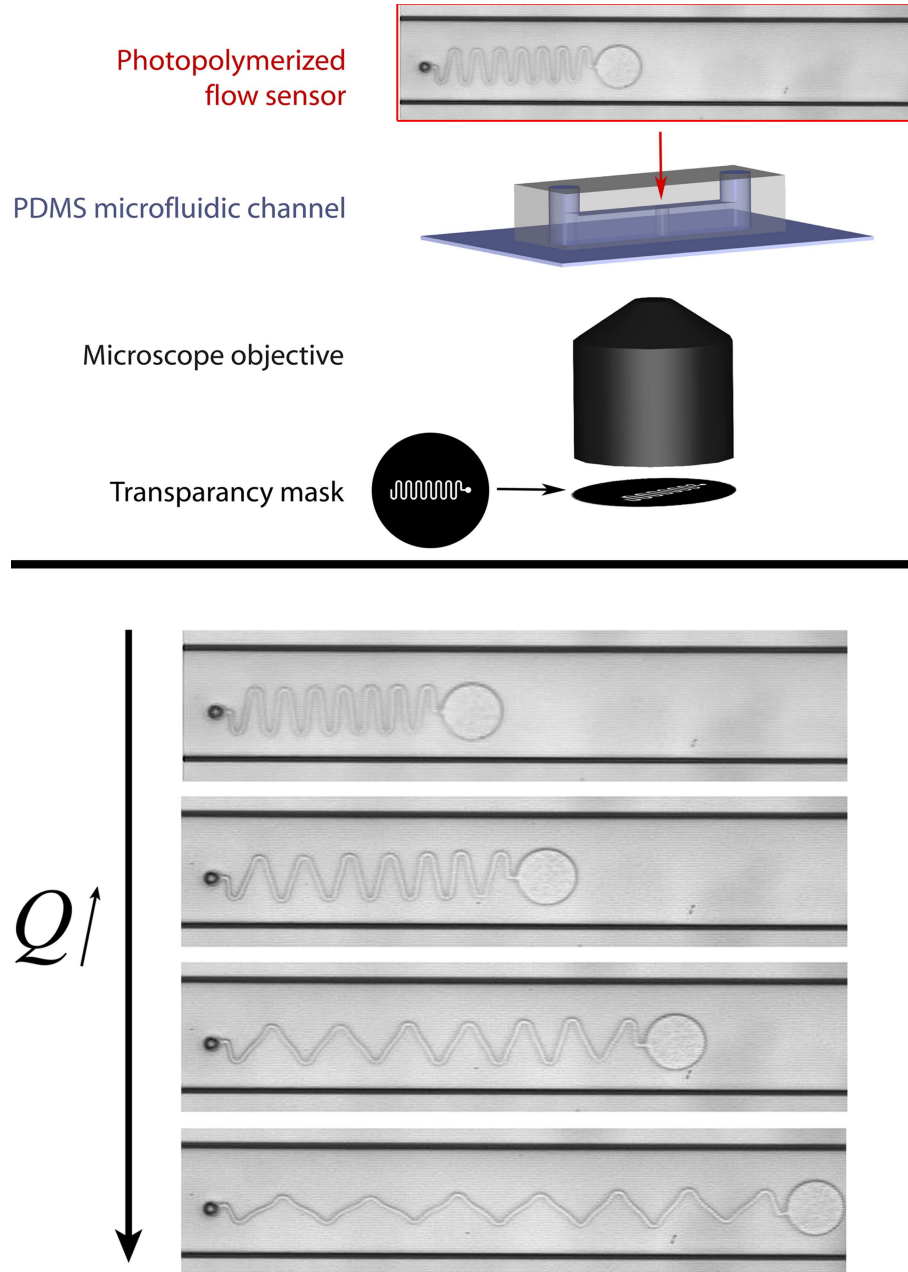


FIG 3.8 – Top : Schematics of the experimental set-up. A printed mask is placed in the microscope focal plane in order to texture the UV illumination and photopolymerize a resin (PEGDA) with the desired shape. Bottom : Deformation of the photopolymerized spring-shaped component upon flow rate increase. The oxygen inhibition layer in the vicinity of the PDMS surfaces enables the PEGDA microspring to deform freely in the channel.

upon free radical polymerization. The "softness", or more precisely the elastic modulus, of the resulting material can be easily and finely tuned by changing the monomer to cross-linker ratio or by lowering the photoinitiator concentration. Moreover, PEGDA polymers combine numerous advantages for biological applications : they have a low swelling ratio in water, they display excellent biocompatibility and biofouling properties, and they are known to reduce non-specific adsorption of biomolecules or cell adhesion [Wang et al., 2008a]. However, the stop-flow lithography strategy can be applied to a wide range of materials with different chemical and physical properties, provided the pre-polymer solution does not appreciably swell PDMS. Depending on the material used as a substrate, the patterned object can be either a resin or a hydrogel.

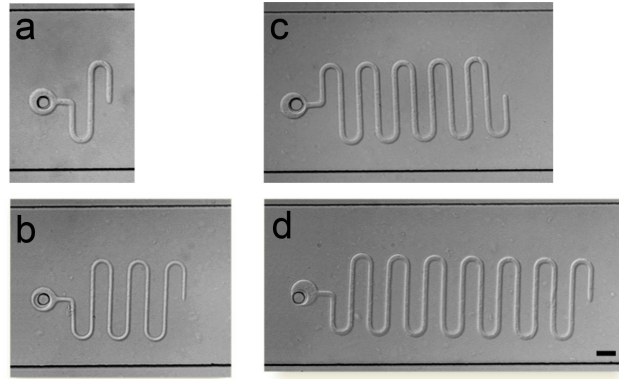


FIG 3.9 – Pictures of four different PEGDA microspring flow sensors (width  $13\ \mu\text{m}$ ). a : 1 turns, b : 3 turns c : 5 turns And d : 7 turns Scalebars :  $100\ \mu\text{m}$ .

## Soft Flow Sensor characterization

We now focus on a specific example of integrated functional element. Cross-linked PEGDA networks can reversibly undergo large deformations. We take advantage of this important property to construct spring-like flow sensors with a high range of operation. The spring has the shape of a folded ribbon with a  $200\ \mu\text{m}$  width. Its length at rest depends on the number of turns in the spring, and the height is set by the channel height (here it was kept constant at  $25\ \mu\text{m}$ ). A  $70\ \mu\text{m}$  circle at one end is used as an anchor, Figure 3.9. The spring is thus immobilized in the microchannel at one end, and free to deform and move everywhere else. Springs with various numbers of turns  $N$  and different thicknesses  $w$  were prepared and characterized ( $N=3, 5, 7$  and  $9$  turns,  $w=9, 13, 16$  and  $22\ \mu\text{m}$ ). Just after polymerization, a constant flow rate is imposed to the PEGDA solution in the  $4\text{cm} \times 500\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$  channel. For the different flow rates, we took pictures of the spring and measured its elongation.



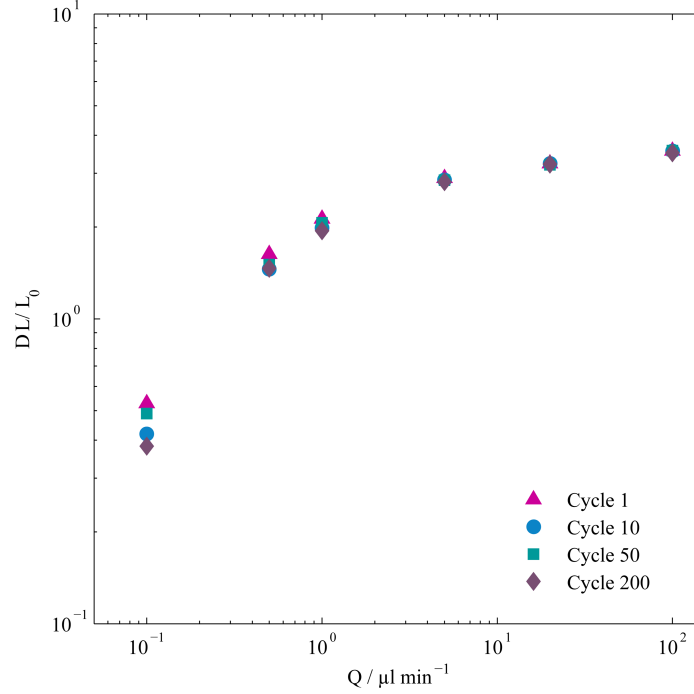


FIG 3.10 – Flow cycling experiments. The overall strain of a microspring composed of 7 turns ( $w=13\mu\text{m}$ ) is plotted at different flow rate. The experiment is repeated 200 times. Triangles : first cycle, circles : 10th cycle, squares : 50th cycle and diamonds 200th cycle

Figure 3.10 displays the length obtained for a spring with 7 turns, upon repeated cycling of the flow. Deformation was measurable, reproducible and reversible over typically 3 orders of magnitude, for more than 200 cycles. In Figure 3.11, we plot the data obtained for spring with different thicknesses, over 4 orders of magnitude of flow rate  $Q$ , within the range of 10nl/min to 1ml/min (the range available to our syringe pump). At low  $Q$ , the total strain first increases linearly with the flow rate. At high flow rate the total elongation tends to saturate to a constant value, which depends on the spring geometry. To better understand this non-linear response, we investigated the evolution of strain amplitude along the flow sensor. The deformation is essentially localized at the "hinges" of the spring, (Figure 3.8). It is reflected by a progressive orientation of the spring's linear segments along the flow direction, which provides the essential contribution to changes in the end-to-end distance of the spring.

The elongation of each "turn" of the spring (combination of one hinge and the two adjacent half-segments) in the flow direction is plotted in Figure 3.15). Turns closer to the attachment point are the most deformed and they also are the first to reach a saturation of their elongation. This saturation progressively extends towards the free end. At small flow rates, the strain (projected onto the flow direction) increases

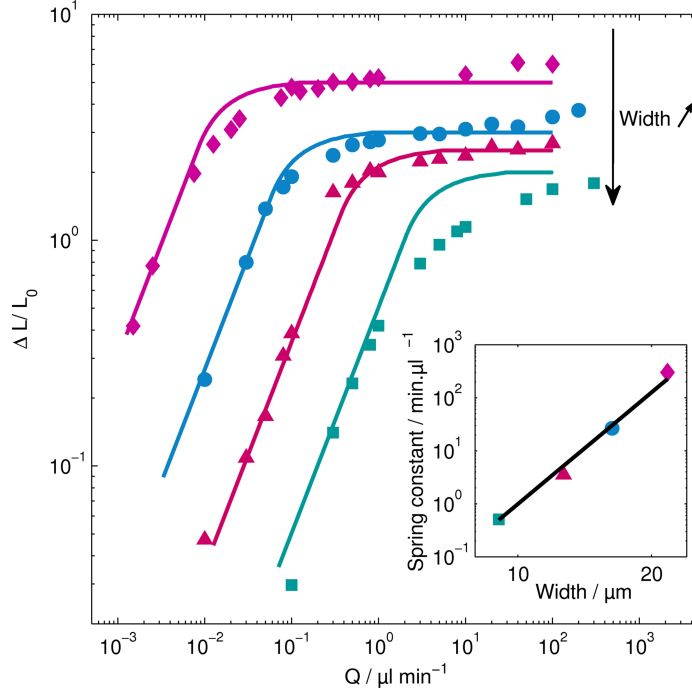


FIG 3.11 – Strain versus flow rate for 4 different spring-like flowmeters. The springs are made of 7 turns. Squares : width  $w=9\mu\text{m}$ , triangle : width  $w=13\mu\text{m}$ , circle :  $w=16\mu\text{m}$ , diamonds :  $w=22\mu\text{m}$ . Insert : the spring constant (defined as the slope of the strain versus flow rate curves at low  $Q$ ) is plotted as a function of the spring width in a linear/log scale (squares). It shows a good agreement with a  $w^7$  power law (line)

linearly with  $Q$  for each turn. The slope of this strain change increases with the turn index (from the anchor to the end). Indeed, each turn undergoes a friction force from the flow, and it is in addition subject to a stretching force equal to the sum of all friction forces received by the turns downstream to it. This linear regime crosses over to a saturation regime, corresponding to a full alignment of the turn's straight section in the flow direction. When this happens, the segments are essentially aligned with the flow, and cannot yield any further elongation. This saturation is reached earlier by turns close to the anchoring point, because the force is higher there. The distribution of these saturation points contributes to smoothen the elongation profile, and to increase significantly the dynamic range of the flow sensor. We checked that all the turns in the spring have the same mechanical properties. To do so, we showed that the flow- elongation characteristics of all segments collapse on a single master curve for microsprings with different  $N$  (supplementary Figure S1).

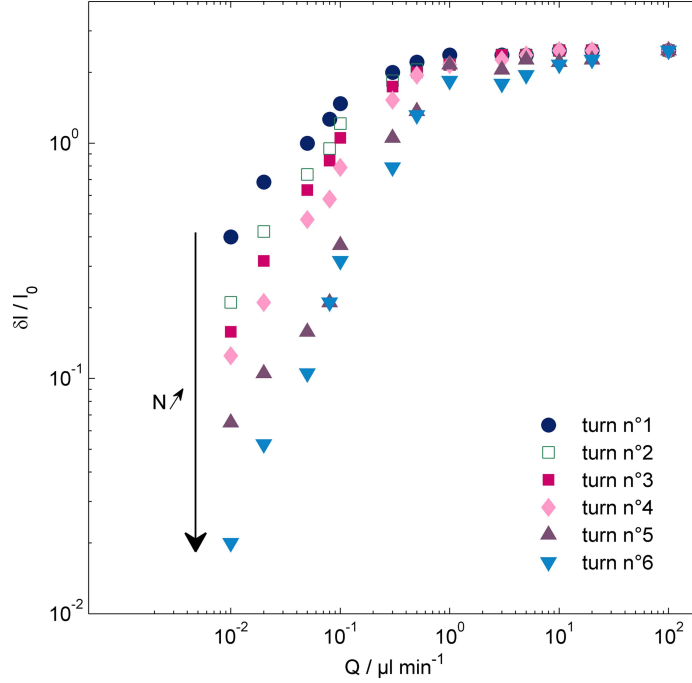


FIG 3.12 – Local strain versus flow rate for each turn along a 7 turns spring-shaped flow sensor,  $w=13\mu\text{m}$ . The first turn is the closest to the attachment point.

## Modeling

To account for the measured flow-elongation characteristics of the microsprings, we propose a simplified beads and springs model. Each turn of the flow sensor is modelled by a bead connected to two frictionless non-linear elastic springs of stiffness  $k$ . On top of the associated elastic forces, each bead experiences a viscous friction force  $\xi Q$ . Contrary to the spring stiffness  $k$ , the precise value of the friction coefficient  $\xi$  is difficult to estimate. It is proportional to the fluid viscosity, but its precise value depends both on the spring shape and on the channel geometry. In the model, the elongation  $\delta l$  of each connecting spring is supposed to increase linearly with the applied force until it reaches its maximal value  $\delta l_{max}$ , and then remain constant. We then deduce the conformation of the flow sensor from the force balance between elastic and viscous forces. In the linear regime, the total elongation of a spring composed of  $N$  turns is given by :

$$\delta L = \frac{N(N+1)}{2} \frac{\xi}{k} Q \quad (3.2)$$

This linear regime ends when the first turn saturates and reaches its maximal elongation (*i.e.*  $\delta l = \delta l_{max}$ ). We are thus left with a spring made of  $(N-1)$  turns attached to a rigid segment, the total elongation of which is given by the above formula replacing  $N$  by  $N-1$ . For a given  $Q$ , we computed the total elongation by iterating this

elementary algorithm. When all the turns are fully elongated, the non-linear regime ends by a constant plateau value. This model involves two independent parameters. We extracted  $(\xi/k)$  from the linear fit of the experimental curve at low deformations, and kept  $\delta l = \delta l_{max}$  as a free fitting parameter. The model's prediction is compared with 4 different experiments corresponding to four different spring geometries. As shown in Figure 3.11, this crude model is in very reasonable agreement with the experiments. Note that, the elongation  $\delta l$  is modeled by a simple linear approximation until full saturation, so our model should overestimate the spring's length in the crossover region between the linear and the saturated regime. Conversely, even after full alignment in the flow direction, the straight sections of the spring can undergo an elongational elastic deformation (stretching), which is not taken into account in the model. Thus, the model should underestimate the spring's elongation at very high flow rate. Combining these two effects, we expect that the real length increase should be more progressive than predicted at high flow rates, which is indeed observed.

## Range of operation : sensitivity and dynamic range

In order to increase the range of measurable flow rates we investigated the geometrical factors that modify the overall spring constant of the flow sensor. The overall spring constant is proportional to the bending modulus of the hinges, which can be easily tuned by changing the thickness of the spring. The slopes of the linear segments at low  $Q$  in Figure 3.11 follow a  $w^7$  scaling law, as depicted in Figure 3.11 inset. This strong variation demonstrates that changing the spring thickness (by a change in the mask) is an efficient strategy to modulate the range of operation of the flow sensor over several decades. This effect that cannot be easily achieved by adjusting the exposure time or the polymer elastic modulus. It is also worth noticing that a change in the mask design does not require any extra fine tuning of the polymerization parameters or of the material formulation. Furthermore, according to Eq. 3.2, the sensitivity of this flow sensor increases linearly with the number of turns  $N$ . Thus, the minimal measurable flow rate can be reduced by sequentially adding turns to an existing spring.

## High robustness

These photopolymerized flow-sensors have a high mechanical and chemical robustness. Firstly, we never observed any fatigue effect upon flow cycling experiments. Even after 200 flow rate cycles the spring deformations proved to be perfectly reversible (see Figure 3.10) Secondly, the springs deformation is highly reproducible from one spring to another (error < 5%) and it remains reversible over a large dynamic range of flow rates, typically 4 orders of magnitude. We were indeed limited here by the dynamic range of our syringe pump, and not by any apparent degradation in the spring's response.

Eventually, measurements were performed both in prepolymer solution or in water, and after different exposure times. Rescaling the flow rate by the fluids shear viscosity, the elongation versus flow rate curves perfectly collapse on the same master curves, Figure 3.13. This demonstrates that the elastic properties of the sensors, and thus their response, was not affected by this exchange between two solvents with very different viscosities and polarities. This suggests that, if some residual swelling of the PEGDA flow sensors exists in water, it does not appreciably modify its mechanical response, and that these sensors should be usable with high accuracy with a high variety of water-based liquids encountered in biological assays.

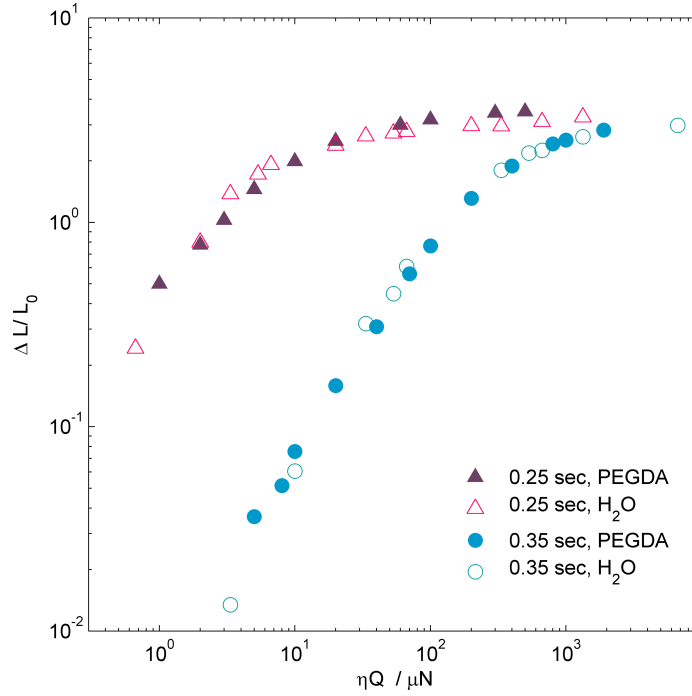


FIG 3.13 – Strain versus normalized flow rate curves in water (filled symbols) and liquid PEGDA (empty symbols). The flow rate is renormalized by the viscosity ( $\eta$ ) of water or PEGDA. Two springs were made with two different UV exposure times : 0.25sec (triangles) and 0.35sec (circles).

### Toward shape optimization : Non-homogenous spring

As shown in the previous section, the measurable flow rate range is highly related to the spring geometry. Increasing the spring thickness increases the bending modulus and the measurable flow rate range is shifted to higher flow rates. In order to widen the dynamic flow range, we designed a composite spring with two widths in serial (half of the turns are  $9\mu\text{m}$  thick, and the other half are  $13\mu\text{m}$  thick). The thinnest

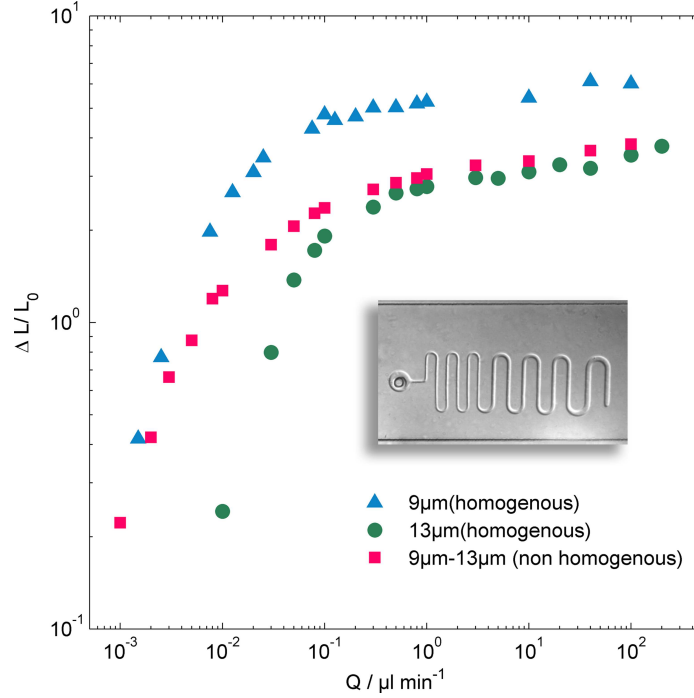


FIG 3.14 – Strain versus flow rate for 2 springs with homogenous widths ( $w=9$  and  $w=13\mu\text{m}$ ), and for one spring, showed in the picture, with non-homogenous turns width. Half of the turns have a  $9\mu\text{m}$  width and the second half a  $13\mu\text{m}$  width.

turns are located close to the anchor and the widest at the free end. Figure 3.14 compares the flow-elongation characteristics of three different springs composed of 7 turns, two "homogenous" and one composite. At low  $Q$  the composite spring shows an elongation similar to that of an homogenous  $9\mu\text{m}$  width spring. Then the flow is sufficient to deform the turns with higher bending modulus, and all the turns elongate. At higher flow rates in the linear regime, the composite spring behaves like the homogenous  $13\mu\text{m}$  width spring. At intermediate flow rate, its elongation curve deviates from the linear behaviour at smaller flow rates than for the thin homogenous spring, and it finally merges with the curve from the thickest homogeneous spring, in the crossover region between linear and "pseudo-plateau" region. The measurable flow range of the heterogeneous spring is increased by one order of magnitude as compared to homogenous springs. Notably, the length in the "plateau" region at high flow rates continues to increase regularly. We interpret this as a consequence of the elongation of the spring's segments aligned along the flow. This elongation is reversible and measurable, and it contributes to extend the range of exploitable flow rates, for both the homogeneous and the non-homogeneous springs. For the latter, this range extends over 5 orders of magnitude (with maximal accuracy over 2 orders of magnitude). Also note that this extra contribution to the extension, associated

with elastic elongation is stronger with the  $w=9\mu\text{m}$  spring, leading to an offset of the plateau towards higher lengths.

## Conclusions

We demonstrated that microscope-based stop flow lithography allows the easy preparation of deformable microstructures inside microchannels, without any clean room equipment. These structures can be prepared with mechanical properties and dimensions reproducible to within better than 5%. We applied this technology to the preparation of spring-like flow sensors. These sensors can measure flow reversibly in a range of typically 4 orders of magnitude. The accuracy in the first two decades is around 3%. Accuracy decreases slightly in the upper range, but it remains better than 10%. It is worth mentioning that these performances were obtained in day-to-day experiments, in the research laboratory, on a microscope also used for other purposes. This tolerance could certainly be reduced much further in an industrial, automated and fully calibrated process.

With an optimized design involving heterogeneous springs, measurable flow rate had been increased by one order of magnitude. This spring-based flow sensor requires a prior knowledge of the fluid's viscosity, in order to provide an absolute measurement of the flow. However, viscosity is an easy to measure property. Besides its ease of fabrication and fast prototyping, spring-based flow sensors are insensitive to the chemical content of the fluid if the viscosity is unchanged. This corresponds to many bioanalytical applications. This is a significant advantage as compared to sensors based on electrolysis, electrochemistry or thermal conduction. Also, this sensor does not require any specific tracer in the solution. It should thus be useful in many applications, in particular when flow sensing should be combined with other components in a single microfluidic chip. As a final notice, we used here imaging to measure the extension of the spring, but other detection means, such as AC impedancemetry with integrated electrodes could be easily contemplated, since PEGDA has a strong dielectric and conductivity contrast with water-based solutions.

## Experimental

### Materials

All photopolymerized structured shown in this work were prepared using 10% (w/w) solutions of Darocur 1173 (Sigma Aldrich) initiator in 50% (w/w) poly(ethylene glycol)(400) diacrylate (PEGDA, Polysciences) and 50% (w/w) poly(ethylene glycol)(700) diacrylate (PEGDA, Sigma-Aldrich). This ratio of PEGDA was chosen to yield maximal sensitivity of the sensor at the most practically useful flow rates.



All the springs were designed to have a width of  $200\mu\text{m}$ . The total length depended on the number of turns (typically  $600\mu\text{m}$  at rest for a 7 spires spring), and with a  $70\mu\text{m}$  circle was built at one end for as an anchor surrounding the PDMS post in the microchannel. The spring was made of a series of straight sections joined by semicircular "hinges", with an external radius twice the width of the straight section. Under flow, most of the deformation is undergone by these hinges, progressively increasing their effective radius, and increasing the angle between the two contiguous straight sections. The illumination time (0.25 seconds) and the concentrations ratio of polymer over photoinitiator were adjusted for the spring to elongate at the reachable flow rates (from 0.001 to  $200\mu\text{l}/\text{min}$  with our syringe pump).

The PDMS devices were fabricated by pouring polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) on a silicon wafer containing positive-relief channels patterned in SU-8 photoresist (Microchem). The devices were rectangular channels of  $500\mu\text{m}$  widths and  $25\mu\text{m}$  height, with  $40\mu\text{m}$  diameter posts every 4mm. These devices were placed on glass slides spin-coated with PDMS to ensure that the pre-polymer was only contacted with PDMS surfaces. The formation and the deformations of the microsprings were visualized using a CCD camera (KP-M1EK-S10, Hitachi). Images were captured and processed using NIH Image software.

## Photopolymerization setup

Photomasks were designed in AUTOCAD 2006 and printed using a 24000 dpi high-resolution printer at Selba S.A. (Versoix, Switzerland). The mask was then inserted into the field-stop of the microscope (Zeiss Axiovert 200, tube lens magnification 4x). A 100W HBO mercury lamp served as the source of UV light. Objective magnification was 10X (Zeiss Achroplan, 10X/0.25). A filter set allowing wide UV excitation (Excitation 365HT25, emission 400EFLP, Omega Optical) was used to select light of the desired wavelength and a VS25 shutter system (Uniblitz) driven by a computer-controlled D122 shutter driver provided pulses of UV light with the specified duration. Solutions were driven through the microfluidic device with a Kd Scientific 210P syringe pump.

Acknowledgements : Work supported in part by European project NeuroTAS under the NMP 6th framework program, and by ANR project "Polygen" under program TECSAN.

## Supplementary Data

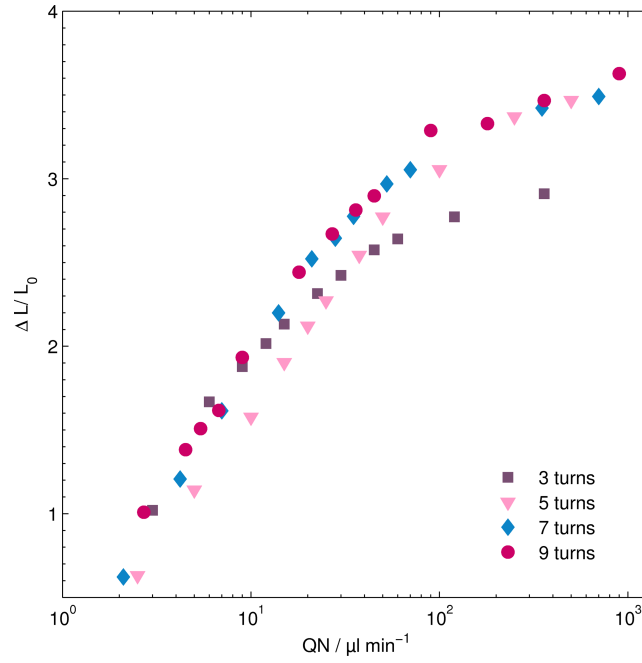


FIG 3.15 – S1 : Strain versus NQ for different number of turns  $N=3, 5, 7$  and  $9$ . Data collapse on a single master curve.

### 3.2.2 Conclusions

En plus de la facilité avec laquelle il est produit, le capteur de flux présenté ici montre des performances qui n'ont jamais été atteintes. Il couvre jusqu'à 4 ordres de grandeur de flux, résultat qui n'a été limité que par notre pousse-seringue, et avec un défaut de reproductibilité inférieur à 10 % sur plus 200 cycles d'allers-retours (ce chiffre étant une limite basse car le ressort n'a montré aucune fatigue après les 200 cycles, contrairement à l'expérimentateur!). Il a par ailleurs été montré qu'en changeant la géométrie, et particulièrement la largeur du ressort, la gamme de flux mesurables pouvait être augmentée d'un ordre de grandeur. Cela a été montré sur un capteur de flux ayant deux raideurs en série. Il est très vraisemblable que les performances du capteur de flux peuvent être encore améliorées en fabriquant des ressorts à grand nombre de raideurs en série.

Ce capteur présente d'autres avantages : il est biocompatible et ne nécessite aucun traitement de surface. Il ne requiert aucun traceur risquant d'interagir avec les biomolécules, ni l'addition de concentrations précises d'électrolytes ou de gaz. La seule propriété physico-chimique qui doit être préalablement connue est la viscosité. Mais la viscosité ne varie pas beaucoup d'une solution aqueuse à l'autre, dans les concentrations en biomolécules usuelles dans les laboratoires sur puce, et si nécessaire, sa mesure est très simple à réaliser. De plus la réponse du capteur varie linéairement avec la viscosité, ce qui facilite la calibration.

Un deuxième capteur de flux a été développé avec la même technique, dont la mesure de vitesse repose sur un principe différent. C'est la rotation d'un objet autour d'un axe qui servira à déterminer la vitesse du fluide.

## 3.3 Capteur de flux indépendant de la viscosité

Un deuxième capteur de flux a été développé de telle sorte que la mesure ne dépende pas de la viscosité. En effet, dans le cas du ressort, la force qui entraîne l'élongation est directement proportionnelle à la viscosité. La mesure du flux de ce deuxième capteur est basé sur la rotation d'un objet autour d'un axe. Il sera donc appelé dans la suite de ce manuscrit "roue". Brièvement, une roue qui porte en son centre une cavité circulaire est photopolymérisée autour d'un axe présent dans le microcanal. Le flux entraîne une rotation de la roue autour de l'axe, ce qui permet de mesurer sa vitesse. Nous verrons que cette rotation ne dépend pas de la viscosité du fluide dans lequel la roue est immergée. Dans un premier temps les améliorations techniques qui ont été développées pour réaliser un tel capteur seront détaillées. Puis les résultats seront présentés, et enfin nous verrons une explication physique de la rotation du capteur.

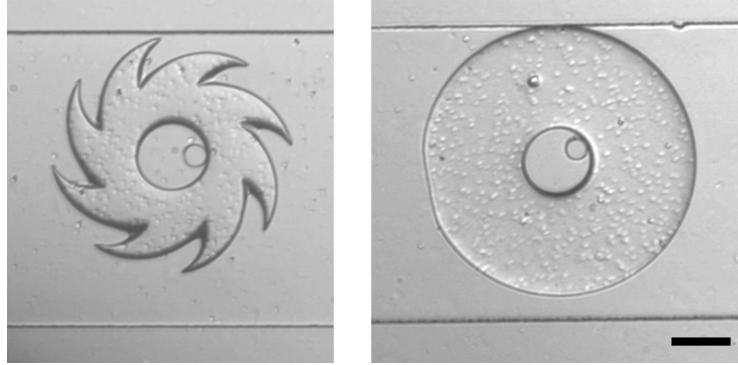


FIG 3.16 – Images en microscopie à transmission de l’hélice (à gauche) et du cercle (à droite) photopolymérisés au 10X (observation au 4X). Échelle : 100 $\mu$ m.

### 3.3.1 Améliorations techniques

#### Frictions entre la roue et le canal dues aux rugosités

Les frictions entre la roue et la surface du canal sont beaucoup plus importantes dans le cas de la roue que dans le cas du ressort car le ressort atteint rapidement son état stationnaire, alors que la roue reste dans son état dynamique. Ces frictions ont plusieurs sources. Le moule en SU8 est assez rugueux, ce qui entraîne une rugosité du canal en PDMS. Le grossissement de l’objectif a été diminué (en l’occurrence d’un 40X à un 10X). La taille de l’objet a ainsi été augmentée par rapport à la taille des rugosités du canal, ce qui a diminué l’importance des frictions qu’elles entraînaient sur l’objet.

De plus le masque imprimé sur film transparent présente des micro-bulles qui se retrouvent en terme de petites rugosités dans l’objet photopolymérisé, comme on peut le voir sur la figure 3.16.

#### Profil du faisceau d’UV non homogène

Malgré un réglage minutieux de la lampe à mercure et des différentes lentilles du chemin optique, le faisceau d’UV obtenu n’a pas un profil parfaitement parallèle sur la hauteur du canal. Cela rend la polymérisation non homogène et cela accentue les frictions. Pour palier à ce problème, la hauteur du canal a été diminuée (en l’occurrence d’un facteur 2), ce qui, combiné à un grossissement d’objectif plus faible a eu pour effet de rendre plus homogène le profil du faisceau d’UV sur la hauteur du canal. La roue ainsi polymérisée a un profil latéral beaucoup plus vertical.

#### Friction entre la cavité de la roue et l’axe du canal.

La friction que la cavité de la roue produit sur l’axe du canal constitue un deuxième paramètre critique. Le rapport d’aspect diamètre sur hauteur de l’axe du canal étant élevé, il est difficile d’obtenir un axe parfaitement lisse et non-conique avec la pho-

tolithographie *in situ* en microcanal par microscope. Si la cavité de la roue et l'axe du canal sont trop proches, les frictions rugueuses sont alors prépondérantes sur la force d'entraînement de la rotation. La roue a donc été dessinée pour que le diamètre de sa cavité soit beaucoup plus grand que le diamètre de l'axe du canal, ce qui a beaucoup contribué à la diminution des frictions.

### Conditions expérimentales

Le prépolymère est ici composé de 10% de photoinitiateur (Darocur 1173) dans un mélange 50% de PEGDA 400 et 50% de PEGDA 700. L'objectif utilisé est le 10X (Zeiss, N.A. 0.25). Le canal mesure  $500\mu\text{m}$  de large et  $20\mu\text{m}$  de haut. Les axes ont des diamètres de  $40\mu\text{m}$  et sont décalés de  $40\mu\text{m}$  par rapport au centre du canal. Deux formes ont été testées : une hélice de  $390\mu\text{m}$  de diamètre et un cercle de  $456\mu\text{m}$  de diamètre. Chaque forme a en son centre une cavité de  $110\mu\text{m}$ , comme le montre la figure 3.16. La distance entre l'hélice et la paroi du canal est de  $13,5\mu\text{m}$ , ce qui est plus faible que la hauteur du canal. La distance entre le cercle à la paroi latérale du canal (on nomme paroi latérale celle qui détermine la hauteur : voir figure 3.20) est encore plus faible et est égale à la couche d'inhibition de polymérisation. Ces objets ont un petit trou de  $10\mu\text{m}$  à mi-chemin entre leur centre et leur extrémité, qui sert de marqueur afin que leur rotation puisse être clairement détectée.

### 3.3.2 Résultats

Bien que la composition du prépolymère n'ait pas d'influence notable sur le fait que la roue entre en rotation ou non, le degré de photopolymérisation qui détermine la taille de la couche inhibée joue un rôle. Une roue qui est peu polymérisée, et qui présente donc une plus grande distance entre sa surface et la surface du canal, ne tournera pas. Le temps d'illumination minimum à partir duquel la roue entre en rotation est de 0,5 seconde. Il a donc été fixé à 0,5 seconde.

La hauteur de la structure photopolymérisée a été caractérisée avec un profilomètre. Après la photopolymérisation, le canal est rincé à l'eau, puis découpé au scalpel et la structure est récupérée et déposée sur une lamelle de verre. La hauteur donnée par le profilomètre est de  $10\mu\text{m}$ . Cette hauteur est cohérente avec les  $5\mu\text{m}$  d'inhibition de photopolymérisation observés dans [Shiku et al., 2006]. De même, lorsqu'on polymérise une forme pleine autour d'un axe de PDMS, la distance entre la structure et l'axe est elle aussi de  $5\mu\text{m}$ .

Quand un flux s'établit dans le canal, l'objet se déplace jusqu'à ce que sa cavité soit en contact avec l'axe du canal. Lorsque le flux est suffisant (environ  $10\mu\text{l/min}$ ), l'objet se met en rotation, et sa position vis à vis de l'axe du canal reste constante quel que soit le flux. La vitesse moyenne de rotation de la roue est constante. Par contre, la vitesse "instantanée" varie au cours d'une période  $T$ . Ces variations de vitesse sont constantes d'une période à l'autre. On peut distinguer deux phases : une phase où la vitesse augmente, et une autre où elle diminue. Pour caractériser

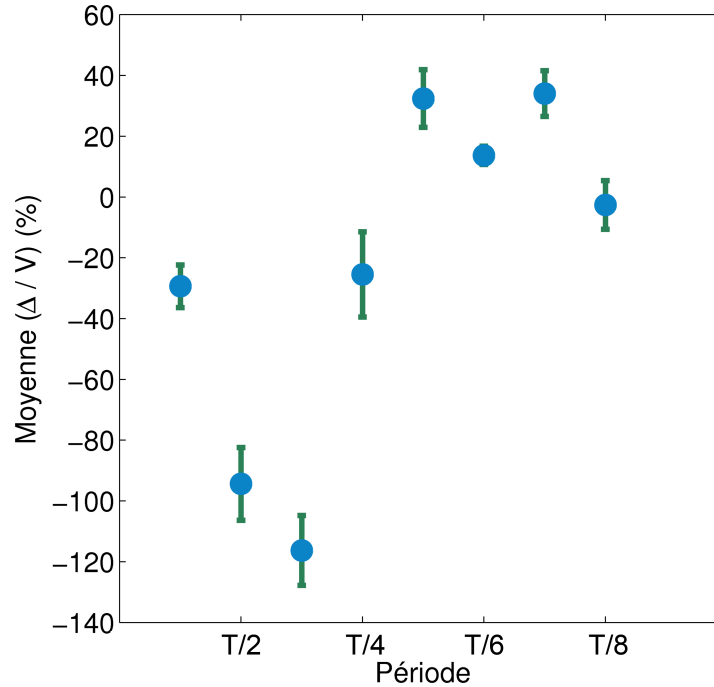


FIG 3.17 – Moyenne des variations de vitesse instantanées (pour les débits 15, 40, 60, 80, 100 et 150  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) en fonction de la période  $T$ . Les faibles barres d'erreur ( qui représentent l'erreur de la moyenne sur les 6 débits) montrent que les variations par rapport à la vitesse moyenne ne dépendent pas de la vitesse du fluide.

cela, la roue a été divisée en 8 parties. Les vitesses ont été mesurées pour différents débits (de 15 à 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). La variation de la vitesse instantanée (c'est à dire sur la période  $T/8$ ) par rapport à la vitesse moyenne ne dépend pas du débit. La moyenne des variations pour tous les débits mesurés a donc pu être reportée sur la figure 3.17. Les deux phases ont la même durée ( $T/2$ ). Ces variations de vitesses sont vraisemblablement dues à un défaut dans la symétrie circulaire parfaite qui est traduit par une inhomogénéité des frictions.

Sur la figure 3.18 sont reportées les vitesses tangentielles de rotation d'une hélice immergée dans le prépolymère et dans le milieu aqueux (eau + 0,1% Tween 20). Les courbes ont la même pente : la réponse du capteur de flux est indépendante de la viscosité du fluide environnant. Le capteur de flux est moins sensible dans le milieu aqueux à cause des frictions qui y sont plus grandes, car le milieu aqueux lubrifie moins la structure en PEGDA que le prépolymère. La rotation en mm/sec en ordonnée correspond à des vitesses entre 0,25 et 77 tours par seconde. La vitesse moyenne de rotation est linéaire avec la vitesse du flux comme le montre l'interpolation linéaire sur la figure 3.18. La vitesse tangentielle de la roue est environ 40 fois plus faible que la vitesse du fluide. Par exemple pour une vitesse du fluide de

27,8mm/sec, la vitesse tangentielle de la roue est de 0,56mm/sec. De plus, comme le montre la figure 3.19, la rotation ne dépend pas de la forme de la roue : une hélice ou un cercle ont une vitesse de rotation comparable. De même le sens dans lequel est polymérisée l'hélice, qui n'est pas symétrique par rapport à l'axe perpendiculaire au canal, n'influe pas sur la rotation.

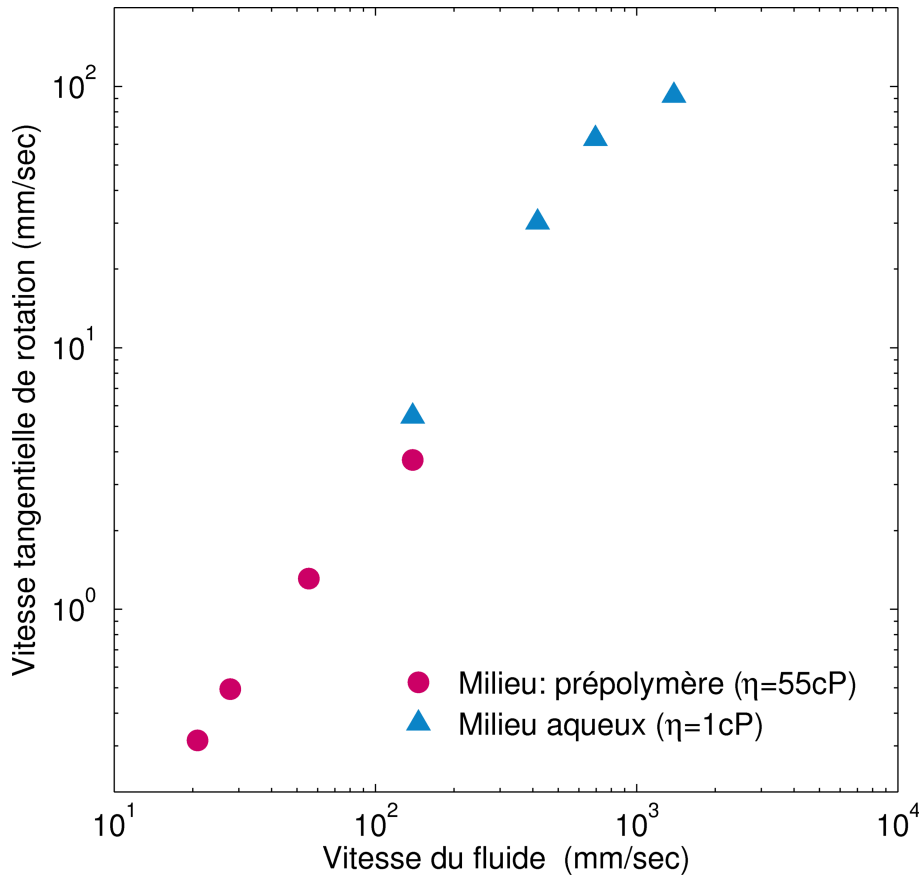


FIG 3.18 – Vitesse de rotation de l'hélice en fonction du flux de prépolymère ou d'eau +0,1% Tween 20

### 3.3.3 Interprétations

Nous interprétons de manière quantitative les résultats pour une meilleure compréhension de la rotation de la roue. Pour les flux de prépolymère sondés, le nombre de Reynolds est compris entre 0,002 et 0,1. Dans l'eau, à cause des frictions le flux minimum mesurable est élevé (100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), et le nombre de Reynolds est compris entre 3 et 33. Ces nombres de Reynolds sont relativement importants pour un système microfluidique, mais le régime de flux est encore laminaire. La rotation n'est



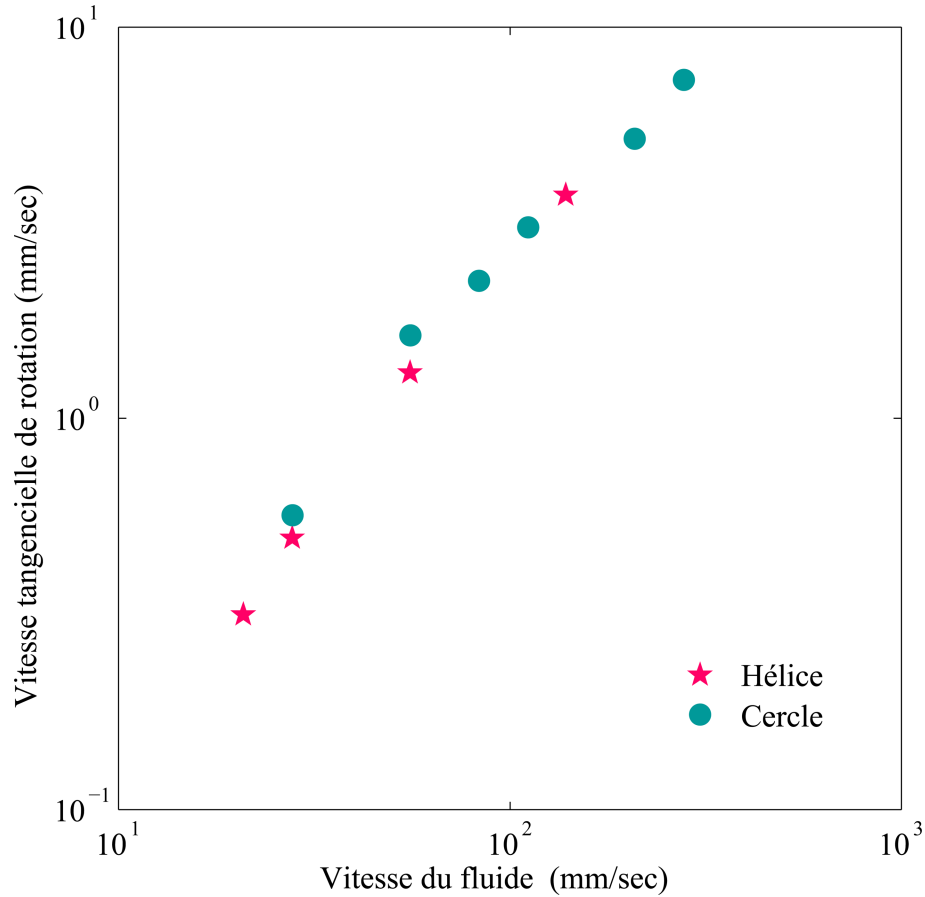


FIG 3.19 – Vitesse de rotation de l’hélice en fonction du flux imposé de prépolymère pour l’hélice (étoiles) et le cercle (ronds)

donc vraisemblablement pas due à des recirculations. Ceci est confirmé par le fait que la rotation d’un objet symétrique (le cercle) est la même que celle de l’hélice, qui n’est pas symétrique par rapport à l’axe du flux. Le fait que l’inversion de l’hélice par rapport à son axe de symétrie n’influence pas non plus la rotation, comme on est habitué à le voir dans le monde macroscopique, par exemple dans le cas d’un anémomètre, montre aussi que la rotation n’est pas due à des recirculations.

L’écoulement est un écoulement de Poiseuille. La largeur du canal étant 20 fois plus grande que la hauteur, le profil de l’écoulement est parabolique sur la hauteur du canal, et est quasiment plat sur la grande section du canal. Ceci est schématisé figure 3.20. En décalant l’axe de rotation vers la paroi latérale du canal, on fait subir à la roue un gradient de vitesse perpendiculaire à la direction du flux. On a vu que la roue n’entre en rotation qu’à partir d’un certain taux de polymérisation. En d’autres termes il faut qu’il ait une distance minimum entre la roue et la paroi basale du canal pour entraîner une rotation. Ainsi, la résistance hydrodynamique entre la roue et

la paroi basale du canal est augmentée, la vitesse du fluide à cet endroit du canal est diminuée et la trajectoire de l'écoulement contourne l'objet. De plus la roue est très proche de la paroi latérale du canal. Dans le cas du cercle, sa distance avec la paroi latérale est quasiment nulle. Dans le cas de l'hélice, cette distance ( $13\mu\text{m}$ ) est inférieure à la hauteur du canal ( $20\mu\text{m}$ ), l'écoulement de Poiseuille prépondérant est celui dans la direction de la hauteur du canal, ce qui revient à dire que la vitesse du flux entre la paroi latérale et l'hélice est très faible par rapport à la vitesse moyenne du fluide. Donc dans les deux cas la résistance hydrodynamique est très grande à cet endroit du canal, et tout le fluide passe entre la roue et l'autre paroi latérale. Cela génère un fort gradient de vitesse au niveau de l'objet. La force d'entraînement de la rotation est donc générée par ce gradient de vitesse. Le gradient entraîne le mouvement de l'objet des plus grandes vers les plus faibles vitesses. Ainsi le sens de rotation ne change pas, et est dicté par la direction du décalage de l'axe (la rotation est dans le sens horaire pour un flux allant de gauche à droite et un décalage de l'axe vers le bas).

La force qui s'oppose à la force d'entraînement est la friction visqueuse qui résulte de l'écoulement de cisaillement plan/plan qui prend place entre la paroi basale du canal et la roue.

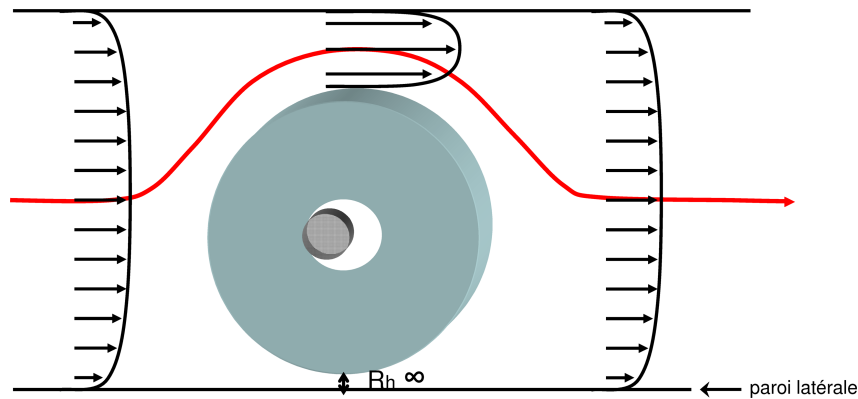


FIG 3.20 – Schéma qualitatif de l'écoulement autour de la roue. La ligne de flux de vitesse maximale est représentée en rouge.

Dans une première étape, pour confirmer notre interprétation qualitative, une simulation du profil d'écoulement a été réalisée avec le logiciel d'analyse numérique aux éléments finis COMSOL Multiphysic. Le module choisi est le module MEMS 3D, avec des équations de Navier-Stokes en statique. La géométrie est celle la plus proche du cas de l'hélice : un élément composé d'un rectangle de  $500\mu\text{m} \times 1500\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  auquel a été soustrait un cylindre de rayon  $180\mu\text{m}$  et de hauteur  $10\mu\text{m}$  éloigné de  $h=5\mu\text{m}$  (figure A) et  $h=13\mu\text{m}$  (figure B) du canal, placé à  $5\mu\text{m}$  de la face basale du rectangle (il y a donc  $5\mu\text{m}$  entre l'autre face basale et le haut du cylindre). La

vitesse initiale du fluide (de l'eau) a été choisie à 16mm/sec (correspondant à un débit de 10 $\mu$ l/min). La condition en sortie a été choisie de pression nulle, et toutes les autres parois définies avec la condition de non-glissement.

Le profil obtenu est asymétrique par rapport à l'axe du canal, et on peut observer deux points de stagnation de part et d'autre du capteur de flux. On remarque que plus la géométrie est asymétrique, plus cela entraîne une asymétrie dans le profil d'écoulement et plus les points de stagnation sont déplacés loin de l'axe de symétrie. De plus, les tranches de fluide entre les parois basales du canal et le capteur de flux ont une vitesse quasiment nulle, comme on peut le voir figure A2 et B2.

Instinctivement, on sent bien que de cette asymétrie naît un couple de forces entraînant la rotation de la roue, mais l'interaction fluide/structure n'a pu être simulée pour des raisons pratiques.

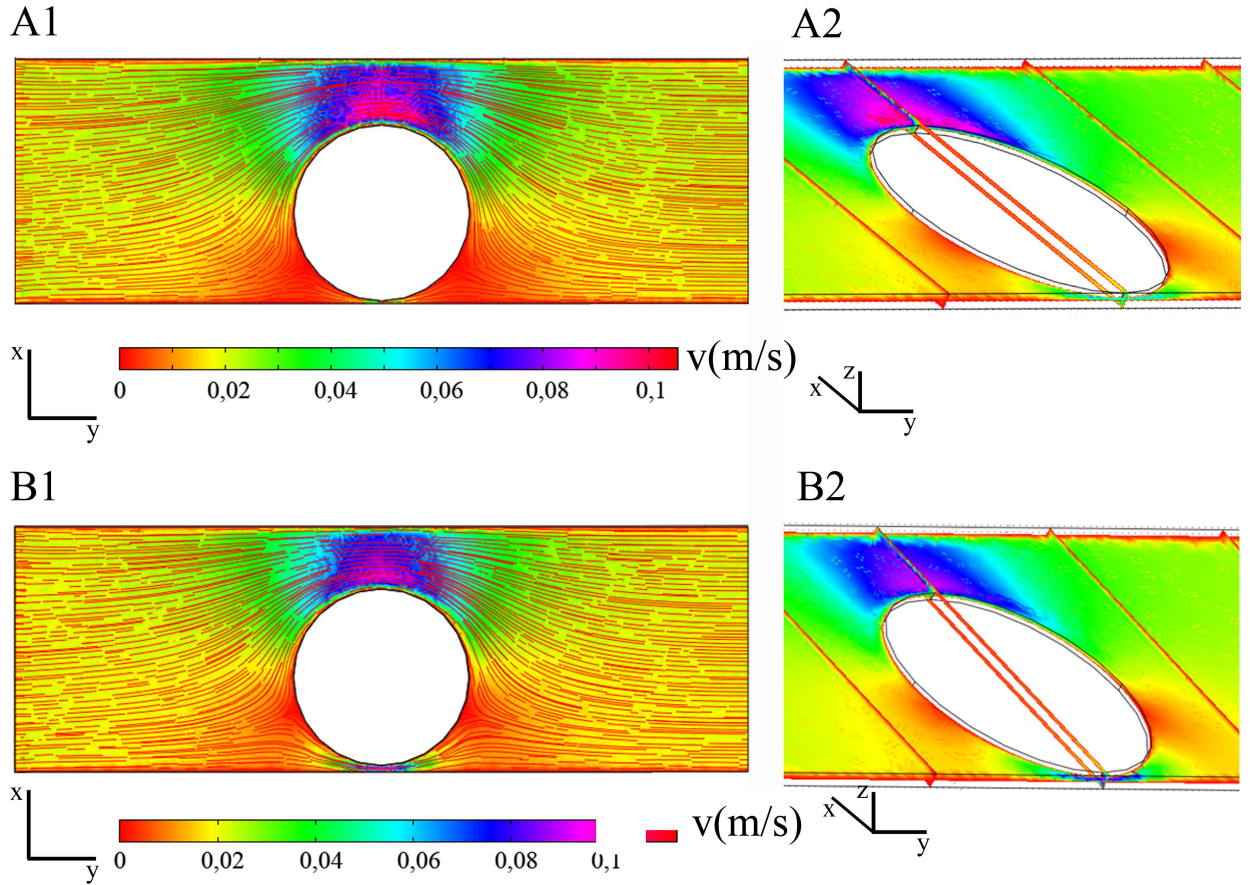


FIG 3.21 – Simulations du profil de l'écoulement autour du capteur de flux, placé à **B** 5 $\mu$ m et **A** 13 $\mu$ m de la paroi du canal. **1** Plans (xy) où les normes des vitesses sont représentées en code couleur, et les lignes du flux en rouge. **2** Vue de biais

### 3.3.4 Conclusions et perspectives

Pour confirmer l'interprétation physique, un modèle doit être développé. Les grandes lignes de ce modèle sont détaillées ici. Dans l'approximation où le mouvement de rotation de la roue est découplé de celui du fluide, une analyse numérique aux éléments finis (effectuée avec un logiciel spécialisé comme COMSOL) peut prédire la force d'entraînement de la roue. Cette approximation est réaliste puisque la vitesse du fluide est environ 40 fois plus grande que celle de la roue d'après l'interpolation linéaire effectuée sur la courbe 3.18. Pour vérifier cette hypothèse, le profil du flux doit être caractérisé avec et sans mouvement de la roue. Ceci peut être réalisé grâce à la PIV (voir chapitre 3.1.3). Les profils de flux en aval et en amont de la roue, ainsi qu'entre la roue et la paroi latérale (c'est à dire les 3 profils de Poiseuille qui ont été schématisés figure 3.20) pourront être connus. Pour obtenir l'immobilité de la roue, on pourra oxyder le canal préalablement à la polymérisation (voir chapitre 4).

La force visqueuse peut être modélisée comme une force de cisaillement entre deux plans dans l'approximation où la distance qui sépare le canal de la roue ne subit pas des variations trop importantes lorsque que le flux est modifié. En effet les canaux de PDMS ont un faible module élastique qui leur permet de se déformer lorsque le débit devient important, ce qui est précisément le cas ici. Pour vérifier cette hypothèse, cette distance devra être caractérisée en fonction du flux appliqué. Pour ce faire, la quantification de l'intensité de fluorescence du flux d'une solution de fluorophore, qui est directement proportionnelle à la distance sur laquelle elle est observée, sera interprétée pour donner la distance entre la roue et la paroi du canal.

En résumé, un capteur de flux basé sur la rotation d'une microstructure photopolymérisée a été développé. Son indépendance par rapport à la viscosité du fluide a été caractérisée. Cela constitue une amélioration importante par rapport au capteur de flux basé sur l'élongation. L'avantage d'un tel capteur de flux est que sa mesure est universelle : à part une bonne compatibilité avec le matériau du capteur, aucune propriété physico-chimique spécifique n'est requise pour le fluide, et les propriétés physico-chimiques du fluide ne doivent pas être connues. De plus, l'unique calibration requise est la relation vitesse du fluide/vitesse de la roue. Pour l'instant sa sensibilité aux faibles flux est moindre que celle du capteur de flux basé sur l'élongation. Il couvre seulement 2 ordres de grandeurs de flux mesurables contre 4 pour le ressort. De plus, les plus faibles débits mesurables ( $10\mu\text{l}/\text{min}$ ) sont assez élevés pour un système microfluidique où les débits sont généralement compris entre 0,01 et  $5\mu\text{l}/\text{min}$ . Cette limitation est due aux frictions de la roue contre la surface, et il est possible d'apporter quelques améliorations pour les réduire : les rugosités de la roue peuvent être supprimées en utilisant un masque en verre avec dépôt de chrome. Les rugosités du canal en PDMS peuvent elles aussi être supprimées en changeant de stratégie de photolithographie : le moule est produit en effectuant une photo-

lithographie "positive" du motif. Du PDMS est coulé sur ce moule positif. Après réticulation il est décollé et constitue le moule pour la puce. La partie du moule qui déterminera la forme du canal est moulée sur le wafer et est donc parfaitement plate (dans notre lithographie, elle est moulée contre la résine de SU8, qui est rugueuse). Par ailleurs la configuration actuelle n'est pas optimale. On pourrait imaginer augmenter l'asymétrie en décalant l'axe, voire en créant une asymétrie dans le micro-canal en lui insérant une cavité dans laquelle serait polymérisée la roue.

### 3.4 Conclusion générale sur les capteurs de flux

Deux types de capteurs de flux ont été développés et caractérisés. Les capteurs sont fabriqués avec la même technique, seul le masque a été changé. La technique de photopolymérisation *in situ* constitue une manière d'intégrer les capteurs extrêmement facile à mettre en œuvre, rapide (la réalisation d'un capteur prend à peine quelques minutes, dont quelques dixièmes de seconde de photopolymérisation), peu coûteuse, et applicable facilement dans n'importe quel laboratoire possédant un microscope muni d'une lampe à mercure. Ces capteurs offrent plusieurs avantages : ils ne nécessitent ni la présence de marqueurs dans le fluide qui pourraient nuire à l'analyse, ni la connaissance préalable des propriétés physico-chimiques du fluide (comme la capacité calorifique ou la molarité). Ils sont donc très polyvalents. De plus leurs performances en terme de sensibilité et de gamme de mesure sont déjà très satisfaisantes, malgré le fait qu'il n'y ait eu aucun effort de fait pour les optimiser. Il est vraisemblable qu'avec peu d'effort ces performances pourront être largement augmentées.

Dans le futur, une autre méthode de détection pourra être mise en place pour remplacer la détection visuelle et permettre l'automatisation de la mesure, comme un réseau d'électrodes qui détecterait la position du ressort, ou un marqueur géométrique dans la roue.





# Chapitre 4

## Incorporation de protéines dans un réseau de colonnes

### 4.1 Introduction

Ce chapitre constitue une preuve de concept de la possibilité d'incorporer des protéines dans des colonnes de PEGDA photopolymérisées avec la technique de micro-fabrication des capteurs de flux : la photolithographie en microscopie. Un réseau de colonnes fonctionnalisées avec des protéines a diverses applications dans les domaines de la protéomique, de la détection de protéines et du tri cellulaire. Dans le cadre de la protéomique, un réseau de colonnes de billes magnétiques modifiées avec une enzyme, la trypsine, a été développé pour la digestion de protéines d'intérêt [Bilkova et al., 2006]. L'immobilisation d'enzymes sur un réseau de colonnes magnétiques a trouvé une autre application dans la détection de la protéine pathogène du Prion [Le Nel et al., 2008]. L'avantage de l'immobilisation d'enzymes par rapport à des digestions en volume est que, en plus de tous les avantages apportés par la micro-fluidique en terme de diminution des quantités de produits et des temps d'analyses, il n'y a pas de contamination des produits de digestion par des enzymes libres. De plus les enzymes immobilisées ont une durée de vie plus longue car leur structure tridimensionnelle est moins sensible aux changements de pH et de température, car le fait qu'elles soient liées aux colonnes les stabilisent.

Les réseaux de colonnes ont été aussi beaucoup développés pour le tri cellulaire [Pappas and Wang, 2007]. Ils ont permis de réaliser le tri de cellules rares grâce à des billes magnétiques modifiées avec un anticorps spécifique de la cellule pathogène [Saliba et al., 2007].

Dans ce chapitre une alternative au réseau de billes magnétiques est proposée. En effet les billes magnétiques modifiées avec des protéines sont chères et ne sont pas disponibles pour toutes les protéines. Dans ce cas, la modification de surface de la bille avec la protéine est souvent longue à développer et fastidieuse à réaliser. C'est pourquoi l'incorporation directe de biomolécules dans un réseau d'hydrogel est très avantageux. De plus le réseau de colonnes magnétiques n'est pas assez robuste pour



soutenir un flux suffisant pour décrocher les biomolécules piégées, ce qui permettrait de les récupérer pour les analyser sans les détériorer avec des agents dénaturants. Le réseau de colonnes d'hydrogel devrait offrir une solution à cette demande.

## 4.2 Fabrication et caractérisation du réseau de colonnes

Ce travail a été réalisé en collaboration de Charlie Koechlin, étudiant de 3ème année à l'ESPCI.

Le principe de la photopolymérisation est le même que celui décrit précédemment pour microfabriquer les capteurs de flux. Pour que les colonnes soient liées à la surface du canal, le canal est refermé par une lame de verre, ce qui empêche la diffusion du dioxygène de ce côté de la puce. De plus on réalise un traitement plasma/ozone sur la puce et la lame de verre avant de refermer la puce. La diffusion de l'oxygène à travers le PDMS est ainsi drastiquement réduite [Shiku et al., 2006], et la couche d'inhibition de la polymérisation n'est plus une barrière à l'attachement de la colonne à la surface du PDMS. Les objets polymérisés sont ainsi liés à la surface du canal.

L'objectif utilisé est le 20X, ce qui donne, combiné au facteur de réduction du tube du microscope, un facteur de réduction total de 8,2. Le masque placé dans le plan focal du microscope représente ici un réseau de cercles de  $250\mu\text{m}$  de diamètre espacés de  $800\mu\text{m}$ . Les motifs obtenus après photopolymérisation ont un diamètre d'environ  $31\mu\text{m}$  et sont espacés de  $97\mu\text{m}$ , comme le montre la figure 4.1. Les temps d'illumination sont approximativement deux fois plus longs que pour la photopolymérisation de structures mobiles. Ceci est dû au fait que la hauteur à réticuler est plus grande : les 6 à  $10\mu\text{m}$  des couches d'inhibition doivent être réticulées, et la couche d'inhibition due à la porosité du PDMS est grandement réduite grâce au traitement plasma/ozone, mais il semble qu'elle soit encore présente. Ces temps d'exposition aux UV plus longs ont été divisés en impulsions de 0,1s à 0,2s pour éviter de brûler les masques, qui, étant imprimés sur un simple film transparent supportent mal la chaleur produite par les UV.

Deux hauteurs de canaux ont été étudiées : une qui est inférieure au diamètre de la colonne ( $24\mu\text{m}$ ) et une autre qui lui est deux fois supérieure ( $62\mu\text{m}$ ). Pour vérifier la robustesse des colonnes, elles ont été soumises à de très grands flux de solution aqueuse. Le flux maximum atteint avec le pousse-seringue et testé est 10ml/min, ce qui correspond à une vitesse de 5,2cm/sec pour les canaux de  $24\mu\text{m}$  de haut, et 13,9cm/sec pour ceux de  $62\mu\text{m}$  de haut. La fabrication de réseaux de colonnes avec des compositions de prépolymères différents a permis de montrer que dans les conditions de photopolymérisation décrites ici, la masse moléculaire du PEGDA

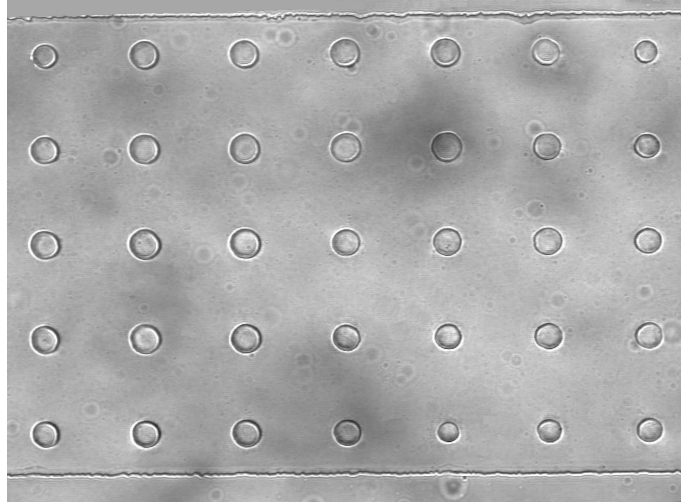


FIG 4.1 – Image en microscopie à transmission du réseau de colonnes dans un canal de  $24\mu\text{m}$  de haut.

n'influence pas la robustesse des colonnes. Trois compositions différentes ont été testées : les PEGDA de masse moléculaire 200, 400 et 700 avec 10% d'initiateur. La composition du prépolymère n'influence pas la résistance des colonnes aux débits extrêmes. Par contre elles sont très sensibles au passage de bulles d'air, de grosses impuretés, ou à l'interface de liquides de différentes viscosités (quand on remplace le prépolymère par une solutions aqueuse, la viscosité est divisée par un facteur 90 pour le PEGDA 700). Ceci est du au fait que les forces capillaires sont très grandes dans les systèmes microfluidiques. Une attention particulière est donc nécessaire lors des changements de solutions pour éviter l'introduction de bulles, et les solutions ont été filtrées (Minisart High Flow  $0,2\mu\text{m}$ )

**Taux de gonflement** Un polymère photoréticulé en immersion en solution aqueuse est appelé *hydrogel*. Les hydrogels ont la propriété d'absorber une grande quantité d'eau<sup>1</sup>. Pour caractériser cet effet de gonflement, différents diamètres de colonnes, ainsi que des rectangles de largeurs variables (et de longueur fixe égale à  $1100\mu\text{m}$ ), mais sensiblement comparables à la largeur du canal, ont été photopolymérisés dans des canaux de  $24\mu\text{m}$  avec un temps d'illumination de 0,4 seconde. Les diamètres des colonnes et la largeur des rectangles avant et après gonflement, ont été reportés dans la figure 4.2. Les mesures ont été prises après un temps de stabilisation de 10

1. Notre système a été caractérisé macroscopiquement : 1 ml de prépolymère a été déposé sur une lame de verre, puis photopolymérisé avec une lampe UV. Après immersion dans l'eau pendant 24 heures, l'hydrogel contenant le PEGDA 700 a vu son poids augmenter de 45% et celui contenant le PEGDA 400 de 23%. Il faut noter que le gonflement des hydrogels entraîne une force suffisante pour faire "exploser" la lame de verre, ainsi le film d'hydrogel de quelques dizaines de microns est en contact maximum avec l'eau.

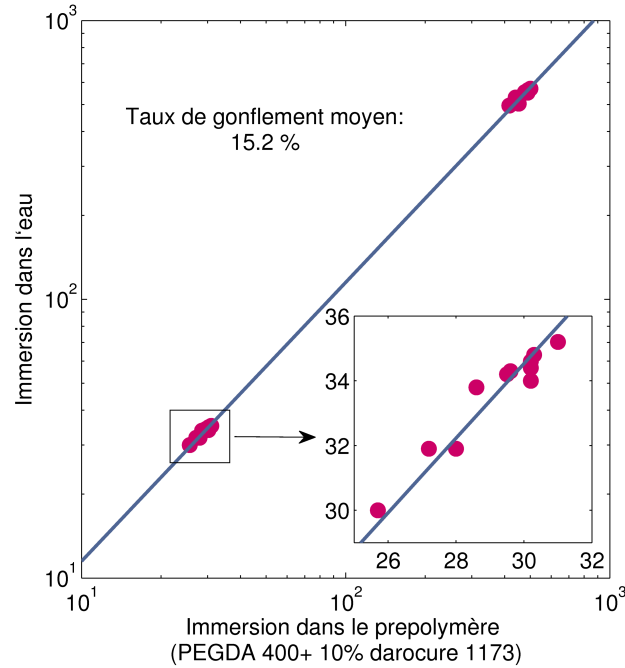


FIG 4.2 – Diamètres des colonnes et largeur des rectangles en immersion dans le prépolymère ou dans l’eau pour différentes tailles de motifs sur le masque. Le gonflement moyen observé est de 15,2%.

minutes. Le taux de gonflement ne dépend pas de la taille de l’objet et est environ égal à 15,2%, comme le montre la figure 4.2.

**Forme des colonnes** Pour contrôler la forme des colonnes en fonction du temps d’illumination, elles ont été observées en microscopie confocale. Pour une observation en fluorescence, un monomère acrylate modifié avec un fluorophore (la fluorescéine-o-acrylate à la concentration 0,1% w/w) est ajouté au prépolymère afin d’être copolymérisé dans la colonne. Des temps d’exposition entre 0,1 et 1,4 secondes ont été testés. Après photopolymérisation, les colonnes sont rincées à l’eau pendant une heure et observées dans l’heure qui suit au microscope confocal. En effet au delà de ce temps les fluorophores qui n’ont pas copolymérisé diffusent dans le milieu aqueux et le signal n’est plus assez fort pour être observé. L’intensité de la fluorescence ne dépend pas exclusivement de la quantité de fluorophore co-polymérisé aux colonnes et ne permet donc pas de la quantifier. Il est important de noter qu’en dessous d’un temps d’illumination de 0,1 seconde, les structures sont photopolymérisées mais ne sont pas liées à la surface. Les images confocales pour 4 temps d’illumination sont représentées figure 4.4 pour les colonnes de  $24\mu\text{m}$  et de  $62\mu\text{m}$ . Le pas entre les plans est de  $1\mu\text{m}$ . Dans la figure 4.4, chaque plot est représenté par 3 vues : l’image en haut à gauche est le plan horizontal (xy), pris ici toujours à moins de  $5\mu\text{m}$  de la

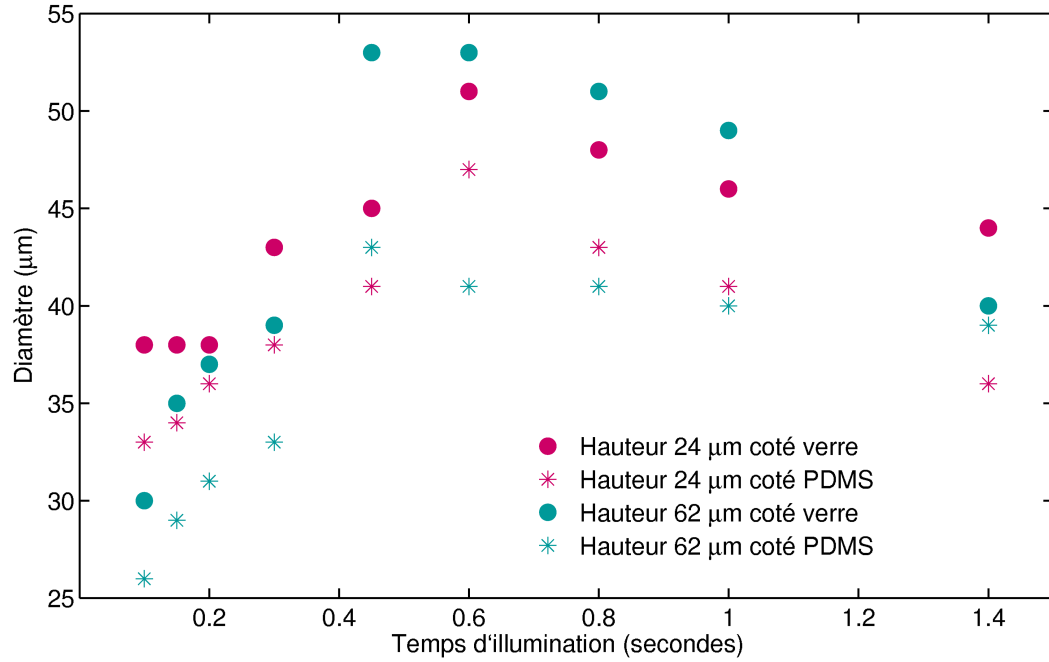


FIG 4.3 – Diamètres des colonnes en fonction du temps d'illumination et de la hauteur de canal.

lamelle de verre. Les deux autres images sont les reconstitutions des plans verticaux (xz) et (yz), qui ont été pris au milieu de la colonne.

Les diamètres des colonnes pour les deux hauteurs de canaux et pour les différents temps sont représentés figure 4.3.

Dans les deux configurations, les colonnes ont une forme légèrement conique. Les diamètres des colonnes ont une valeur maximum côté verre et une valeur minimum côté PDMS. Ceci est la conséquence de deux effets combinés. Premièrement, il reste une faible diffusion de gaz côté PDMS après le traitement plasma, il y a donc plus de dioxygène côté PDMS que côté verre. De plus, le faisceau lumineux est focalisé sur la lame de verre, et n'est pas exactement parallèle sur la distance de la hauteur du canal. Cet effet augmente avec la hauteur des canaux, les colonnes de  $62\mu\text{m}$  sont donc plus coniques. Ainsi, le rapport entre les diamètres maximum et minimum est plus grand pour les colonnes de  $62\mu\text{m}$  ( $1,20\pm 0,08$ ) que pour les colonnes de  $24\mu\text{m}$  ( $1,12\pm 0,05$ ) mais ne dépend pas du temps d'exposition.

Les diamètres des colonnes n'ont pas le même comportement suivant la hauteur du canal.

- Pour les canaux de  $24\mu\text{m}$ , l'énergie fournie par une impulsion de 0,1 seconde est suffisante pour polymériser toute la colonne. Durant les impulsions suivantes, les

radicaux résiduels diffusent vers la partie non illuminée et réagissent avec les monomères adjacents, augmentant ainsi le diamètre de la colonne de 24%. Cet effet est dû à la diffusion et non à un flux résiduel dans le canal car les plots sont symétriques. Après 0,6 seconde d'illumination, les monomères qui peuvent être atteints par diffusion sont réticulés et les radicaux sont disponibles pour créer de nouveaux points de réticulation dans la colonne. Le taux de réticulation augmente et la taille des pores diminue. Ceci a pour conséquence de diminuer le taux de gonflement de l'hydrogel immergé dans l'eau. C'est pourquoi à partir de 0,6 seconde le diamètre des colonnes diminue avec le temps d'illumination.

- Pour les canaux de  $62\mu\text{m}$ , la quantité de radicaux générés par la première impulsion n'est pas suffisante pour polymériser toute la colonne, celle-ci étant plus haute donc plus volumineuse que celle de  $24\mu\text{m}$ , nécessitant donc plus d'énergie. Le diamètre imposé par le motif du masque n'est atteint qu'à partir de  $\approx 0,2$  seconde. Puis la diffusion des radicaux a pour effet d'augmenter le diamètre des colonnes. A partir de 0,6 seconde l'augmentation du taux de réticulation est comparable à celle du  $24\mu\text{m}$ . Par contre, le canal étant plus haut, il y a une zone où le dioxygène n'est pas en quantité suffisante pour inhiber la propagation de la polymérisation due aux radicaux qui ont diffusé. Il commence à apparaître ce qu'on appelle une "surpolymérisation" en volume, c'est à dire que du polymère se forme en dehors du motif. A 1,4 secondes, quasiment toute la surface du canal est photopolymérisée. L'imagerie confocale a permis de mettre en évidence le fait que cette couche surpolymérisée est créée à partir de 0,6 seconde d'exposition. Une fine couche de quelques microns de large est photopolymérisée à la surface du verre entre les colonnes "plus proches voisines". Il est donc vraisemblable que la surpolymérisation est due à de la diffraction. Lorsque le temps d'illumination augmente, la couche surpolymérisée croît en largeur et en hauteur, se décolle de la surface de verre et est suspendue entre les colonnes. Autrement dit il y a entre les colonnes deux zones non polymérisées, une au contact du PDMS, et une, moins épaisse, au contact du verre. Tout ce passe comme si il y avait une couche d'inhibition proche de la lamelle de verre, ce qui n'a pas trouvé d'explication. La raison la plus probable est qu'il y a des forces de tension de surface qui ont pour effet le décollement de la couche surpolymérisée.

Cette phase de caractérisation a permis de sélectionner les paramètres pour une robustesse optimum et une forme de colonne homogène. Par la suite un seul protocole a été employé : le prépolymère est composé de PEGDA 700 avec 10% de photoinitiateur, avec un temps d'illumination de 0,4 seconde dans des colonnes de  $24\mu\text{m}$ .

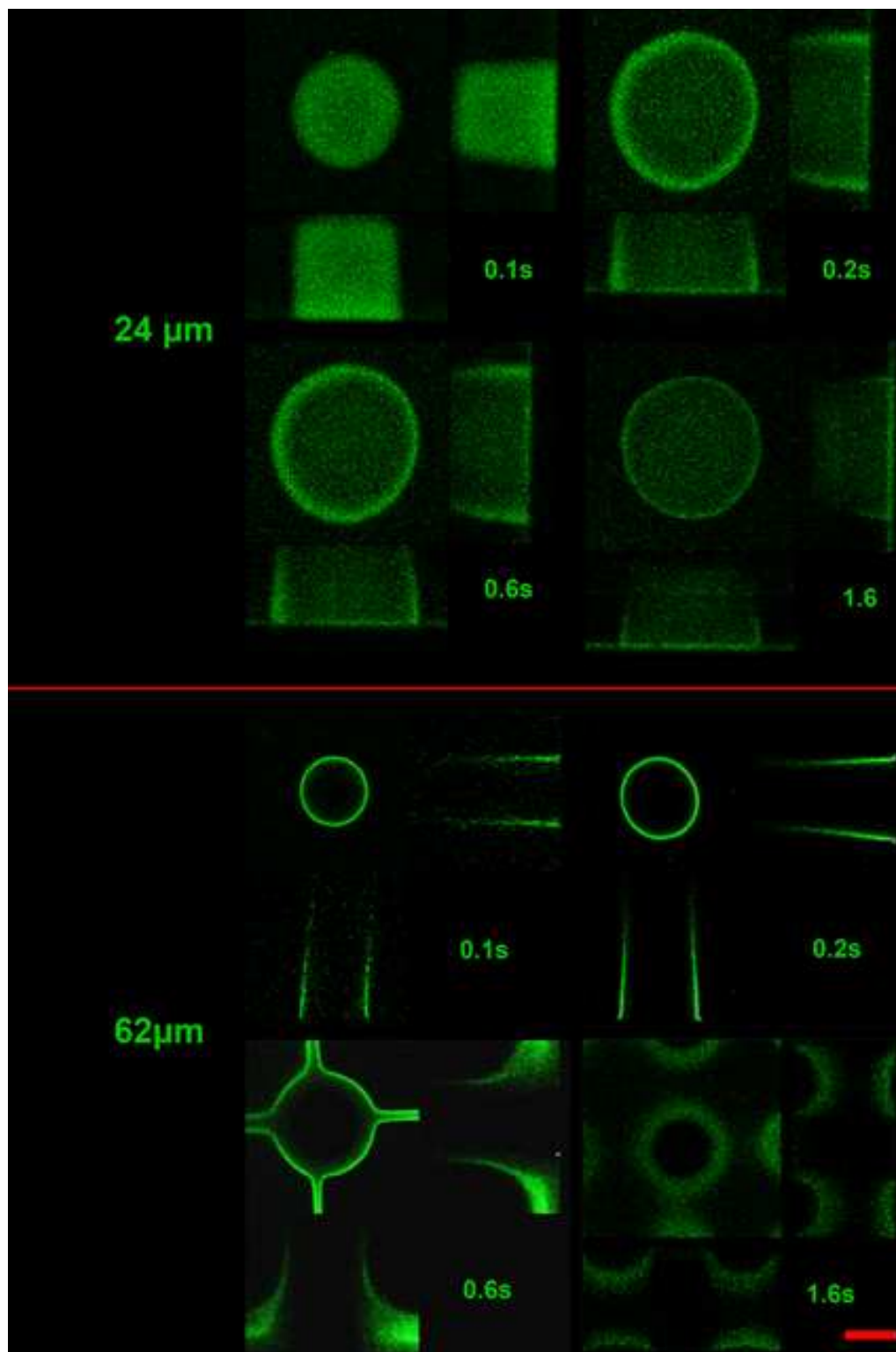


FIG 4.4 – Imagerie confocale de colonnes dans les canaux de  $24\mu\text{m}$  et de  $62\mu\text{m}$  d'épaisseur pour des temps d'illumination de 0,1, 0,2, 0,6 et 1,2 secondes. Échelle (rouge) :  $20\mu\text{m}$  .



## 4.3 Incorporation de protéines : application à l'adhésion cellulaire

La preuve de concept de l'incorporation de protéines à l'intérieur des colonnes, a été réalisée avec deux protéines clé de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire<sup>2</sup> la fibronectine et le fibrinogène. La présence des protéines a été révélée grâce à la visualisation de fibrinogène fluorescent dans les colonnes. Dans un deuxième temps la conservation des propriétés d'adhésion cellulaire de la protéines a été mise en évidence.

### Visualisation de l'incorporation des protéines grâce à la fluorescence

Le fibrinogène de plasma humain modifié avec un fluorophore (Alexa fluor 488) est très peu soluble dans le prépolymère, contrairement au monomère fluorescent qui a été employé pour imager les colonnes dans la phase de caractérisation. Le fibrinogène Alexa 488 est dans un premier temps solubilisé dans du tampon phosphate (Phosphate Saline Buffer : PBS 0.05% pH 7.2) à la concentration 2mg/ml puis mélangé au prépolymère. Au delà de 10% de prépolymère, le fibrinogène tend à s'agréger. De plus la concentration de fibrinogène a du être diminuée à  $4.10^{-3}$ mg/ml car sa forte concentration inhibe la photopolymérisation. Cela est vraisemblablement dû à la présence du fluorophore qui absorbe une partie importante des UV. La solution à photopolymériser étant composée de 90% de phase aqueuse, elle démouille du PDMS hydrophobe. De plus, la solution a tendance à démixer, la phase de prépolymère formant des gouttes à la surface du PDMS. Une modification de surface a alors été nécessaire pour rendre les canaux hydrophiles, car un simple traitement plasma a entraîné l'adsorption des protéines contenues dans la solution. Les canaux ont été modifiés comme décrit au chapitre 2. Le résultat est présenté figure 4.5. La grande taille du champ et la faible sensibilité de la caméra ne permettent pas un signal de fluorescence fort. De plus la caméra ne permet pas de quantifier la fluorescence. La fluorescence est présente dans tout le volume de la colonne. Elle est un peu moins marquée au centre de la colonne, vraisemblablement par solvatochromisme<sup>2</sup> : l'intensité du fluorophore est plus grande lorsqu'il est au contact de l'eau qu'au contact de l'hydrogel. Mais la possibilité d'encapsuler une protéine, ici du fibrinogène fluorescent, dans des colonnes photopolymérisées *in situ* est démontrée.

---

2. Le *solvatochromisme* est l'effet qui rend compte de l'influence de la polarité du solvant sur le spectre d'absorption d'un fluorophore. Soit la conjugaison des niveaux d'énergie du solvant et du fluorophore entraîne un déplacement du pic d'absorption du fluorophore et donc un changement de couleur (effet *bathochrome* quand le pic est déplacé vers les grandes longueurs d'onde et effet *hypsochrome* à l'inverse). Soit, comme ici, un changement de polarité du solvant modifie le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$  (qui rend compte de la probabilité d'absorption dans la loi de Beer-Lambert :  $A = \varepsilon Cl$  où  $A$  est l'absorbance,  $C$  la concentration du fluorophore, et  $l$  le trajet de la lumière), ce qui a pour effet de diminuer (*hypochromisme*) ou augmenter (*hyperchromisme*) l'intensité de fluorescence.



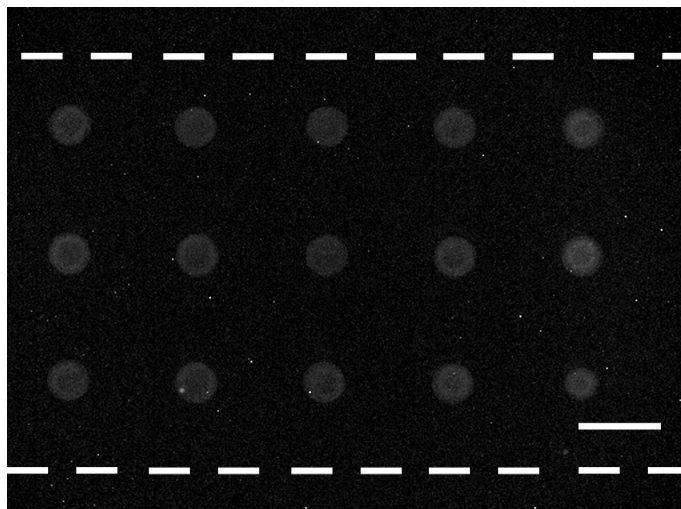


FIG 4.5 – Image en microscopie de fluorescence du réseau de colonnes dans lequel le fibrinogène fluorescent a été incorporé. Échelle  $100\mu\text{m}$ . Le canal a été délimité par des pointillés.

### Fonctionnalité et accessibilité des protéines

Pour démontrer que les protéines encapsulées ne perdent pas leur fonctionnalité et restent accessibles au milieu environnant, trois couples de ligands récepteurs ont été testés : streptavidine/biotine, IgG/anti-IgG et fibronectine/cellules épithéliales. Dans chaque cas un "blanc" a été réalisé en parallèle, consistant en un réseau colonnes sans protéine fabriqué dans les mêmes conditions que celui contenant la protéine d'intérêt.

Dans un premier temps une streptavidine a été encapsulée et révélée par une biotine fluorescente. Le couple streptavidine-biotine possède la plus grande affinité non-covalente connue. Il est de ce fait très employé en biochimie pour attacher les biomolécules entre elles ou sur un support permettant ainsi la détection et la localisation des molécules. Chaque streptavidine a quatre sites de liaison avec la biotine qui est elle-même une petite vitamine hydrosoluble de poids moléculaire 244 Da. La streptavidine est très soluble dans le prépolymère donc les colonnes ont pu être photopolymérisées sans ajout de PBS. 15% w/w de streptavidine à  $1\text{mg/mL}$  a été ajouté au prépolymère. Malheureusement pour cette expérience, le "blanc" a montré la présence de biotine fluorescente à l'intérieur des colonnes, ce qui montre que la biotine a une taille suffisamment petite (sa plus grande dimension étant de  $21\text{\AA}$  d'après les données cristallographiques [Traub, 1956]) par rapport à la taille des pores de l'hydrogel pour diffuser à l'intérieur des colonnes. Cela rend impossible la démonstration que la streptavidine incorporée se lie à la biotine.

Le choix s'est donc porté sur un complexe mettant en jeu des biomolécules de

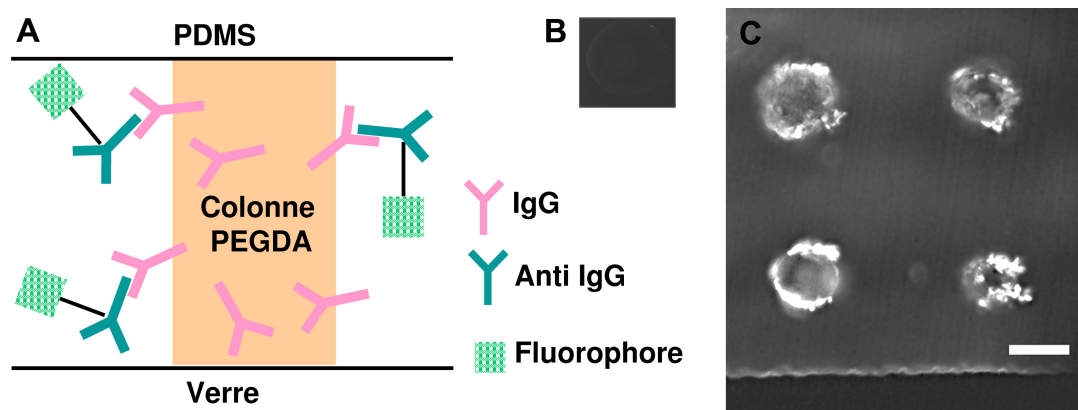


FIG 4.6 – **A** Schéma explicatif de l'expérience : les IgG sont incorporés dans les colonnes de PEGDA. Les IgG disponibles forment un complexe avec l'anti-IgG fluorescent. **B** Image en microscopie de fluorescence du "blanc" : colonne sans protéine. **C** Image en microscopie de fluorescence du réseau de colonnes. L'IgG est incorporé dans les colonnes puis l'anti IgG fluorescent est hybridé. Échelle pour **B** et **C** : 50 µm.

plus grande taille : le complexe antigène(IgG)/anticorps(anti-IgG) (Immunoglobuline IgG1 de souris, Catlab et Alexa Fluor 488 Anti IgG(H+L) dirigé contre les IgG de souris, produit chez la chèvre, Invitrogen. Poids moléculaires  $\approx 150$  kDa). La liaison du complexe est moins forte que la liaison streptavidine/biotine, mais elle reste très énergétique, et la taille des molécules mises en jeu est *a priori* beaucoup plus grande que la taille des pores des colonnes. L'anticorps de souris IgG a été incorporé dans les mêmes conditions que la streptavidine. Un schéma explicatif de l'expérience est présenté figure 4.6 A. Comme escompté, après rinçage avec la solution d'anti-IgG fluorescent (à 0.02 mg/mL), il n'y a pas de pénétration dans les colonnes. Par contre une très forte adsorption non-spécifique sur les parois en PDMS empêche la visualisation de la fluorescence due au complexe immun. La surface des puces a donc été modifiée avec le traitement de surface covalent au polyacrylamide, ce qui a permis de réduire cette adsorption, comme le montre le "blanc" sur la figure 4.6 B. Sur la figure 4.6 C, on observe un fort signal de fluorescence à la surface des colonnes, ce qui prouve que les anticorps immobilisés dans les colonnes ont réagi avec les antigènes pour former un complexe immun. Une fluorescence plus faible est observée au milieu des colonnes. On peut voir en changeant le focus de l'objectif que cette fluorescence est présente en haut des colonnes. Cela est sûrement dû au fait que les colonnes ne sont pas fortement attachées au PDMS et que les molécules d'antigène ont pu diffuser entre la colonne et la surface de PDMS.

Le travail qui suit a été réalisé en collaboration avec Simon De Beco, doctorant dans l'équipe de F. Amblard.

Afin de finaliser la caractérisation de la disponibilité et la fonctionnalité des protéines

incorporées, les propriétés d'adhésion de la fibronectine sur des cellules épithéliales ont été testées. La fibronectine est une protéine de la matrice extra-cellulaire qui joue un rôle clé dans l'adhésion cellulaire. Elle possède en effet des sites de liaison avec les intégrines de la membrane cellulaire, créant des jonction adhérentes cellule/matrice, ainsi qu'avec d'autres protéines de la matrice comme, entre autres, le collagène. Les cellules qui ont été mises en jeu sont des cellules épithéliales de la lignée MDCK du rein du chien.

Les cellules épithéliales ont la particularité de s'organiser en tissus hautement polarisés. Elles sont liées entre elles et à la matrice par deux types de jonctions qui préservent l'intégrité des tissus sous-jacents : d'une part les jonctions cellules/matrice via les interactions entre les fibronectines secrétées par la matrice et les intégrines qui sont des protéines transmembranaires, et d'autre part les jonctions adhérentes intercellulaires réalisées par les cadhérines (voir figure 4.7). Ici les cellules ont été modifiées par génie génétique pour exprimer une E-cadhérine-GFP. L'expression de la E-cadherine modifiée GFP par la cellule permet de visualiser la membrane de celle-ci en fluorescence.

Ces jonctions adhérentes ont pour effet de polariser la cellule : un côté apical en regard du milieu extérieur et un côté basal où la cellule est liée à la matrice intra-cellulaire, comme schématisé sur la figure 4.7.

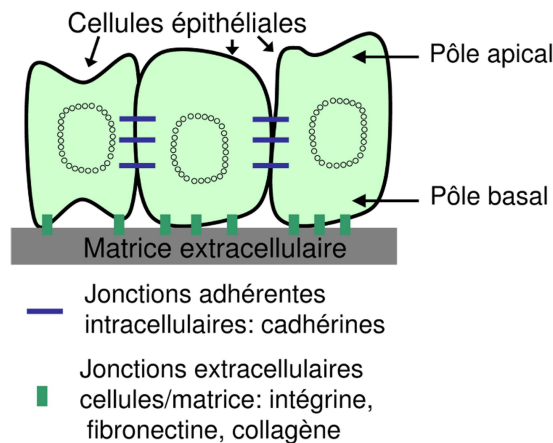


FIG 4.7 – Schéma explicatif de l'organisation des cellules épithéliales

La fibronectine a été ajoutée à 5% w/w à 1mg/ml au prépolymère. La photopolymérisation a été réalisée à l'aide d'un masque en verre recouvert d'une fine couche de chrome (Optimask S.A.) pour une illumination longue. Le motif est un cercle unique de 200 $\mu$ m de diamètre. Plusieurs motifs ont été réalisés dans le canal soit en illuminant de canal statiquement, soit en balayant le canal à l'aide de la platine du microscope. Les temps d'illumination varient suivant les motifs, mais sont de l'ordre de quelques secondes, avec l'objectif 10X. Les motifs obtenus par balayage

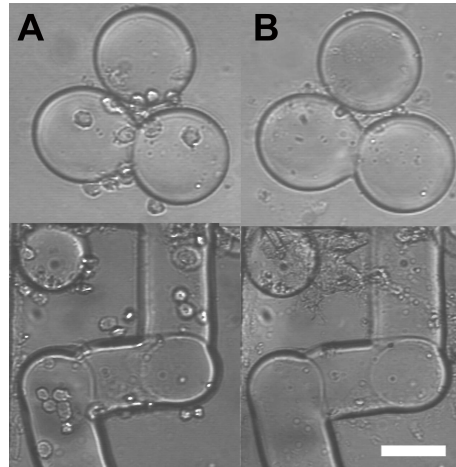


FIG 4.8 – **A** Image en microscopie à transmission (observation au 10X) des colonnes chargées avec la fibronectine adhérant avec les cellules épithéliales **A** avant et **B** après le traitement à la trypsine. Échelle  $50\mu\text{m}$ .

de la surface sont alors de forme et de taille différentes, comme le montre la figure 4.8. Après la fabrication des motifs le canal est rempli d'une solution très concentrée en cellules, dispersées dans le milieu de culture DMEM + 10% de sérum de veau foetal (SVF). Après avoir fermé le système, il est laissé à incuber dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 12 heures, ce qui laisse le temps aux jonctions adhérentes de s'établir entre la fibronectine des colonnes et les cellules. Puis le canal est rincé avec le DMEM + 10% SVF pendant 30 minutes, ce qui enlève les cellules qui n'ont pas adhéré. Les cellules restantes sont vivantes, malgré le peu d'effort pour maintenir une concentration suffisante de  $\text{CO}_2$  comme il est d'usage en culture cellulaire pour préserver le pH. Elles adhèrent autours des colonnes, ou entre les colonnes et la surface du canal (figure 4.8A). Il est vraisemblable que pendant l'incubation les colonnes se sont détachées du PDMS créant un endroit où la vitesse du fluide est quasiment nulle, et donc propice à l'adhésion. Les cellules ont été comptées grâce à leur observation en fluorescence.

Avec une observation de 17 colonnes (motifs ronds de  $55\mu\text{m}$  de diamètre) ou équivalent de colonne (motifs carrés dont le coté est égal au diamètre de la colonne, et obtenus par translation de la platine du microscope pendant l'illumination), on obtient 5,8 cellules par colonne. Si on considère que le haut de la colonne est disponible aux cellules et qu'une cellule a un diamètre d'environ  $10\mu\text{m}$ , cela représente 7% de surface de colonne occupés.

Afin de vérifier la spécificité de la liaison des cellules avec les colonnes plusieurs réseaux de colonnes ont été préparés d'une part sans protéine, d'autre part avec de la BSA et de la caséine, deux protéines qui ne jouent aucun rôle dans l'adhésion cellulaire, à la même concentration que la fibronectine. Après incubation le canal

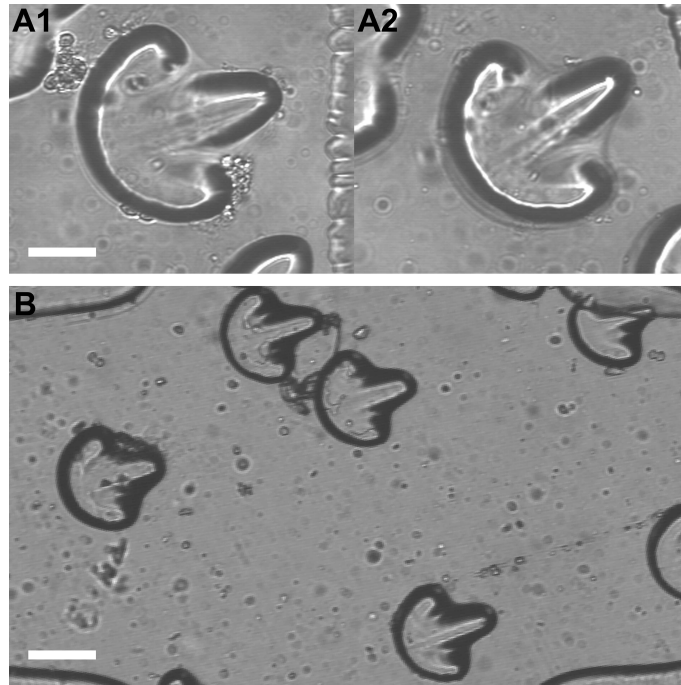


FIG 4.9 – **A1** Image en microscopie à transmission (observation au 10X) d'une colonne (ici la forme a été modifiée) chargée avec de la BSA juste après l'incubation. Il y a quelques cellules. **A2** Même colonne après un simple rinçage au DMEM + 10% SVF, ce qui a détaché les cellules adsorbées de manière non-spécifique. Échelle  $50\mu\text{m}$ . **B** Colonnes chargées avec de la caséine après rinçage au DMEM + 10% SVF. De même que pour A2, les cellules ont été détachées.

est rincé. Les cellules ne restent pas dans le canal, ce qui prouve la spécificité de l'interaction fibrinogène/cellule (figure 4.9).

Un autre test a été réalisé pour mettre en évidence que la liaison colonne/cellule est bien une adhésion via les intégrines de la cellule. Une enzyme, la trypsine, dont la fonction est d'hydrolyser les protéines après certains sites spécifiques (typiquement après les acides aminés basiques arginine et lysine) est ajoutée au système. L'ajout de trypsine a pour conséquence de cliver en petits oligonucléotides la fibronectine et la partie extra-cellulaire de l'intégrine, faisant disparaître la liaison entre ces deux protéines basée sur des interactions faibles (électrostatique, de Van der Waals et des liaisons hydrogènes). Le canal est rincé avec de la trypsine à 0,05% dans du tampon HBSS + 0,53M EDTA pendant 15 minutes à  $10\mu\text{l}/\text{min}$ . Ce traitement ne doit pas être trop long sous peine de désintégrer complètement les cellules, mais assez pour hydrolyser leur lien avec la fibronectine des colonnes. Après 10 minutes, toutes les cellules se sont détachées des colonnes sur lesquelles il reste un fin amas protéique (voir figure 4.8 B). Cela montre bien que les cellules ne sont pas liées aux colonnes

par adhésion non spécifique mais bien par jonction adhérentes avec la fibronectine.

## 4.4 Conclusion

La microfabrication reproductible de réseaux de colonnes a été réalisée et caractérisée. Les colonnes sont assez robustes pour soutenir des flux supérieurs au mm/sec. L'incorporation de protéines a été visualisée grâce à la microscopie en fluorescence et l'accessibilité de ces protéines pour des liaisons spécifiques avec des anticorps ou des cellules a été démontrée. La très grande résistance des colonnes aux flux élevés offre un avantage conséquent par rapport aux colonnes magnétiques. En particulier cela offre la possibilité de récupérer les cellules simplement en employant de grands flux, sans ajout d'agents dénaturants qui ne sont pas voulus si l'on veut analyser les cellules récupérées. L'autre avantage de ce système par rapport aux colonnes magnétiques est la simplicité de la fabrication du réseau de colonnes. L'application d'un gradient de champ magnétique n'est pas requis, et les protéines peuvent être incorporées telles quelles, sans modification de surface, ce qui représente aussi un avantage financier.

Ce chapitre est une preuve de concept, mais d'autres caractérisations sont nécessaires. Il serait intéressant de quantifier et optimiser la quantité des protéines accessibles. Cela peut être fait en quantifiant la fluorescence d'une protéine liée à la protéine incorporée, dont la concentration varie. Il serait aussi intéressant d'effectuer un tri de cellules, en incorporant un anticorps spécifique d'un type de cellules, et de mettre en présence les colonnes avec différents types de cellules qui sont marquées avec des fluorophores différents pour la détection.



# Chapitre 5

## Conclusions et perspectives

Ma thèse s'est déroulée en deux volets, autour d'un unique fil directeur, la photopolymérisation radicalaire, et dans un même cadre, le développement de solutions pour les laboratoires sur puce. Bien que la photopolymérisation soit commune aux deux parties de ma thèse, elles n'en sont pas moins très différentes l'une de l'autre. La photopolymérisation appliquée en surface, puis en volume a pu répondre à deux thématiques différentes de la microfluidique et en explorer une troisième.

Dans un premier temps j'ai développé une modification de surface *in situ* dans les microcanaux pour le PDMS et le COC. Cette modification de surface est particulièrement bien adaptée pour les microcanaux car ceux-ci peuvent être fortement scellés avant la modification, et ne sont pas bouchés car la polymérisation reste localisée en surface. Les différentes caractérisations ont montré la longue durée de vie de son caractère hydrophile et neutre ainsi que sa grande épaisseur. J'ai eu à cœur de simplifier au maximum les étapes tout en mettant l'accent sur la robustesse du revêtement, pour que cette modification de surface puisse être utilisée en routine en laboratoire. En effet la modification de surface doit tenir ses promesses et rendre la surface des puces en plastiques hydrophile et inerte aux adsorptions non-spécifiques, mais il ne s'agit pas de réaliser une chimie périlleuse et longue. Le fait que les autres thésards du laboratoire aient adopté cette modification de surface est en soi un succès car cela a été une preuve de ses qualités.

La deuxième partie de ma thèse a été initiée dans l'équipe de Patrick S. Doyle (MIT). Au cours de ma visite dans son équipe, j'ai pu me familiariser avec la technique de photopolymérisation en volume *in-situ* à l'aide d'un microscope (qui a été nommée par lui "Stop Flow Lithography"). Avec le soutien de Dan C. Pregibon, à l'époque doctorant dans cette équipe, nous avons essayé de développer le capteur de flux indépendant de la viscosité - la "roue". Mais comme la roue ne parvenait pas tourner, de retour à Paris j'ai mis en place le capteur de flux en élongation. Il s'est révélé être très performant en terme de gamme des flux mesurables et de résolution, malgré sa dépendance à la viscosité du liquide environnant. Ce capteur



a été caractérisé, en collaboration avec Denis Bartolo (ESPCI), et a fait l'objet d'un article. C'est finalement une chance d'être revenue à Paris et d'avoir du remonter tout un dispositif expérimental car, ce faisant, j'ai pu apporter les améliorations qui ont été décrites dans ce manuscrit afin d'obtenir des résultats plus reproductibles dans la caractérisation du "ressort". Toutes ces petites améliorations ont finalement permis à la "roue" de tourner. Les premières caractérisations ont été réalisées. Elles ont confirmé que la rotation ne dépend pas de la viscosité et ont permis de pressentir un modèle.

Dans l'avenir d'autres améliorations pourront facilement être appliquées pour diminuer les frictions, et ainsi augmenter la gamme de mesures du capteur. De plus, dans la perspective de valider le modèle qui a été proposé, certaines caractérisations devront être réalisées, et seront présentées lors de la soutenance.

Les études menées sur le capteur de flux en élongation ont montré que l'on pouvait augmenter la gamme de mesures en faisant varier la largeur au sein d'un même capteur. Avec 2 largeurs, et donc avec deux raideurs en série, la gamme a été augmentée d'un ordre de grandeur. De plus le comportement de chaque partie du capteur se retrouve dans le comportement élongation/débit global du capteur : il serait très intéressant de dessiner des capteurs suivant une gamme de flux imposée. *A priori* cela est réalisable si l'on s'appuie sur le modèle qui a été développé pour décrire le comportement d'un capteur en fonction de sa raideur.

Enfin la technique de photopolymérisation *in-situ* dans un microcanal a permis de créer des réseaux de colonnes fonctionnalisées avec des protéines, qui restent accessibles et fonctionnelles. Il serait possible à l'avenir de polymériser en le décalant par rapport au premier, un autre réseau de colonnes décorées avec une deuxième, voire une troisième protéine. Si les colonnes peuvent être différenciées par leur forme, cela permettrait de produire plusieurs analyses en même temps.

On voit bien la puissance de cette technique qui permet d'implémenter très aisément des structures mobiles ou non, déformables ou rigides, qui peuvent prendre une multitude de formes et qui peuvent être décorées avec des biomolécules. Certaines applications ont tiré parti ici de cette souplesse. Mais tout prête à penser que les ressources qu'offre cette technique ne sont pas encore épuisées et que diverses solutions pour la microfluidique verront le jour.

## Liste des symboles utilisés

$\Delta P$  : différence de pression appliquée le long du canal  
 $D$  : coefficient de diffusion  
 $D_{eff}$  : coefficient de diffusion effectif du à la dispersion de Taylor.  
 $\eta$  : viscosité du fluide.  
 $\epsilon$  : permittivité diélectrique relative de la solution d'électrolyte.  
 $\epsilon_o$  : permittivité diélectrique absolue du vide.  
 $\lambda_D$  : longueur de Debye  
 $\mu_{EOF}$  : mobilité électroosmotique  
 $\mathcal{N}_A$  : nombre d'Avogadro.  
 $Q$  : débit du fluide.  
 $\rho_o$  : densité du fluide.  
 $R$  : constante des gaz parfaits  
 $\sigma$  : conductivité du fluide.  
 $T$  : température  
 $v$  : vitesse moyenne du fluide.

Equation de Navier-Stokes pour le fluide continu :

$$\rho_o \cdot \left[ \frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + (\vec{V} \cdot \vec{\nabla}) \vec{V} \right] = -\vec{\nabla} P + \eta_o \Delta \vec{V} + \vec{f}_v$$

où  $\vec{f}_v$  représente d'éventuelles forces en volume.

Les nombres sans dimension qui suivent nous seront utiles pour caractériser nos systèmes.

Nombre de Reynolds (compare les effets de convection et de diffusion de la quantité de mouvement pour une taille caractéristique  $R$ ) :

$$Re = \frac{\rho \cdot V \cdot R}{\eta}.$$

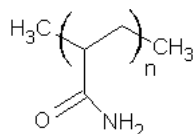
Nombre de Péclet (compare le mélange de molécules par convection et par diffusion moléculaire sur une longueur caractéristique de variation de concentration  $l$ ) :

$$Pe = \frac{vl}{D}$$

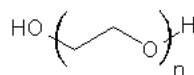
## Annexe 2 : formules chimiques des molécules

### Polymères

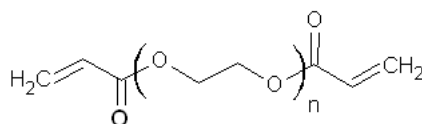
Polyacrylamide



Polyéthylène glycol

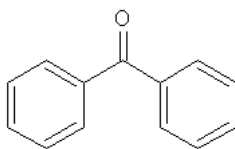


Polyéthylène glycol diacrylate

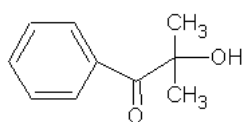


### Photoinitiateurs

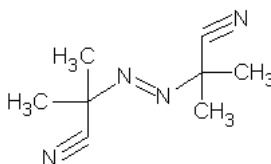
Benzophénone



Darocur 1173

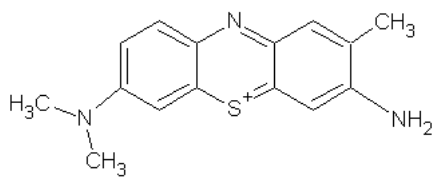


AIBN



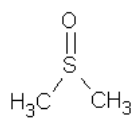
## Colorant

Bleu de toluidine

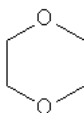


## Solvants

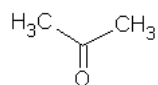
Diméthylsulfoxyde



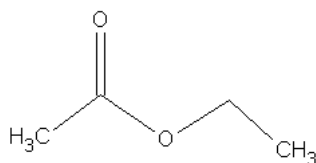
Dioxanne



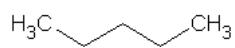
Acétone



Ethyle acétate



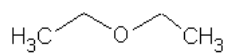
Pentane



Heptane



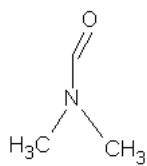
Diéthyl éther



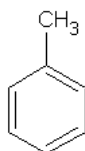
Hexadécane



Diméthylchloride



Toluène



Cyclohexane



## Annexe 3 : L'ellipsométrie

Ceci est une courte introduction à l'ellipsométrie. Pour plus de précisions, le lecteur pourra se référer à [Azzam and Bashara, 1977]. Le phénomène physique sur lequel est basée l'ellipsométrie est le changement de polarisation de la lumière lors d'une réflexion sur une surface plane. La polarisation passe de plane à elliptique. Les paramètres de l'ellipse obtenus (le rapport  $\rho$  des coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire, et l'inclinaison  $\Theta$  du grand axe par rapport à l'axe de polarisation) permettent la caractérisation de l'épaisseur optique (produit de l'épaisseur par l'indice optique complexe) du matériau constitutif de l'échantillon. Une étape d'analyse est nécessaire pour remonter aux indices optiques et à l'épaisseur, étape d'autant plus importante lorsque l'échantillon est épais, complexe, et constitué d'un empilement de couches de matériaux distincts. Les points forts de cette technique de métrologie optique sont sa grande sensibilité, sa large gamme de mesure (couche allant d'une fraction de monocouche atomique à 330,8 nm dans le cas de notre ellipsomètre Sen-tech GmbH) et son caractère non destructeur. Les informations dont est porteur le faisceau réfléchi dépendent également du domaine spectral d'étude. Ainsi, dans le domaine visible-proche ultraviolet, qui correspond à l'absorption électronique, l'ellipsométrie permet de déterminer la composition, la structure et la morphologie des matériaux. c'est ce domaine qui nous intéressera. Dans l'infrarouge, elle est sensible aux modes de vibration des liaisons chimiques (données qualitatives et quantitatives) et permet d'accéder aux grandeurs électriques (permittivité, conductivité des couches).

### Equations ellipsométriques

Les composantes du champ électrique  $\vec{E}_i$  incidente sont (voir figure 1) :  $\vec{E}_{pi}$ , la composante, dans le plan d'incidence et  $\vec{E}_{si}$ , la composante, perpendiculaire au plan d'incidence. De même, le champ électrique réfléchi  $\vec{E}_r$  se décompose en  $\vec{E}_{sr}$  dans le plan d'incidence et  $\vec{E}_{pr}$ , perpendiculaire au plan d'incidence. La quantité mesurée par l'ellipsomètre est  $\rho$ , qui est défini comme :

$$\rho = \frac{r_p}{r_i} = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} * \frac{E_{si}}{E_{sr}} = \tan(\psi) \exp(j\Delta) \quad (1)$$

avec  $\tan(\psi) = \frac{|r_p|}{|r_i|}$  et  $\Delta$  la différence de phase introduite par la réflexion. Pour un échantillon isotrope et massif, l'angle de réfraction  $\varphi_1$  est régi par la loi de Descartes :

$$N_0 \sin \varphi_0 = N_1 \sin \varphi_1 \quad (2)$$

avec  $N_0$  indice du milieu 0 (milieu extérieur).

L'indice optique du milieu 1,  $N_1 = n_1 + jk_1$  avec  $n_1$  indice (réel) de réfraction et  $k_1$  coefficient d'extinction du milieu 1, peut être déduit des expressions des coefficients de réflexion ( $r_p$ ,  $r_s$ ) et de transmission ( $t_p$ ,  $t_s$ ) :



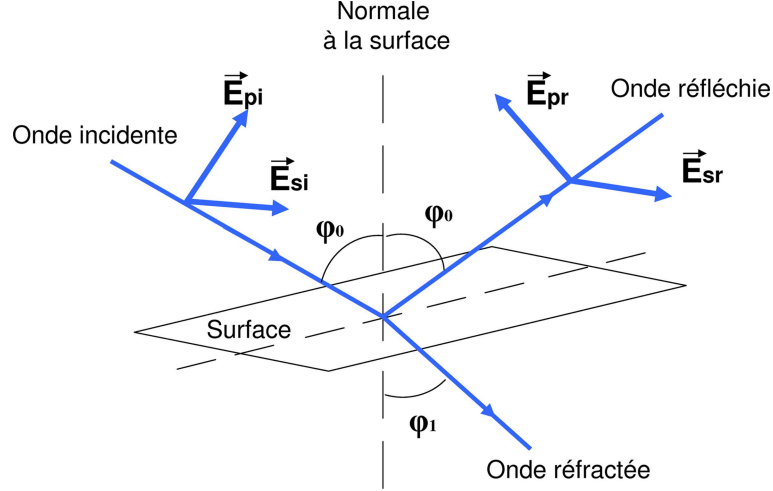


FIG 1 – Réflexion des axes de polarisation à la surface de l'échantillon

$$r_p = \frac{N_1 \cos \varphi_0 - N_0 \cos \varphi_1}{N_1 \cos \varphi_0 + N_0 \cos \varphi_1}$$

$$r_s = \frac{N_0 \cos \varphi_0 - N_1 \cos \varphi_1}{N_0 \cos \varphi_0 + N_1 \cos \varphi_1}$$

$$t_p = \frac{2N_0 \cos \varphi_0}{N_1 \cos \varphi_0 + N_0 \cos \varphi_1}$$

$$t_s = \frac{2N_0 \cos \varphi_0}{N_0 \cos \varphi_0 + N_1 \cos \varphi_1}$$

Pour nos systèmes qui sont constitués d'une couche d'oxyde, et après traitement de une à plusieurs couches organiques, on fait l'approximation que ces multicouches forment une unique couche organique d'indice commun :  $n=1.49 + ik$  ( $k=1.6$ )

Il faut noter que l'ellipsométrie ne permet de mesurer l'épaisseur d'une couche que modulo une certaine période  $P$ . Cette période est atteinte pour une épaisseur telle que le chemin optique réalisé par l'onde lors d'un passage (aller-retour) dans le film vaut la longueur d'onde du rayon lumineux. Cette période  $P$  vaut donc :

$$P = \frac{1}{2} n \lambda \sin \varphi_0$$

où  $n$  est l'indice de la couche (1.49).  $\varphi_0$  vaut  $45^\circ$ . Pour une longueur d'onde de 628 nm, cette période vaut 330,8 nm. Pour lever cette indétermination sur l'épaisseur de la couche, on peut coupler la mesure avec une mesure au réfractomètre, mais cela n'a pas été nécessaire ici car nos couches ont une épaisseur inférieure à  $P$ .

## Annexe 4 : Protocole "classique" de polymérisation thermique

Le protocole de polymérisation thermique qui a servit de comparaison à la photopolymérisation en ellipsométrie est présenté ici. Ce protocole est basé sur la fonctionnalisation de la surface avec une double liaison. Un photoinitiateur radicalaire thermique initie la polymérisation en volume.

### Silanisation

Dans un premier temps, la surface est fonctionnalisée avec une double liaison. Pour cela, on silanise la surface avec le heptadecyl-dimethyl-monochlorosilane en phase liquide, sous atmosphère inerte (c'est à dire sans dioxygène). Le silane est dissout à 5% dans un solvant anhydre (ici, l'isopropanol) et est mis en présence avec le wafer qui a été préalablement oxydé au plasma. Après 4 heures de réaction, le wafer est rincé à l'isopropanol et est séché sous flux d'azote.

### Polymérisation

Une solution à 5% w/w d'acrylamide dans l'eau déionisée et le wafer sont placés dans un ballon fermé et un flux d'azote permet de retirer le dioxygène. Lorsque le ballon est dégazé, l'initiateur (AIBN, à 10% w/w) est ajouté à l'aide d'une seringue et la température est élevée jusqu'à 60°C, température à partir de laquelle les radicaux se forment à partir de l'AIBN.

Après 1h30, les wafers sont rincés abondamment à l'eau.

## Annexe 5 : La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique permet de sonder la surface avec une précision de l'ordre du nanomètre. Les mesures d'AFM sont basées sur l'interaction à très courte portée d'une pointe montée sur un microlevier très flexible et les atomes de la surface à analyser. Lorsqu'il y a interaction attractive ou répulsive cela fait fléchir le microlevier (voir le schéma de la figure 2). La force de rétroaction qu'il faut appliquer sur le microlevier pour compenser cette flexion donne la distance entre la pointe et la surface. La mesure de la flexion donne une mesure directe de la force d'interaction entre la pointe et la surface. En déplaçant le microlevier sur la surface, on obtient un profil topographique de celle-ci. Il existe plusieurs modes d'AFM. Le mode utilisé ici est dit "tapping" : il consiste à faire vibrer le microlevier à sa fréquence de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface (essentiellement de façon répulsive), la fréquence de résonance change, ce qui fait décroître l'amplitude. La rétroaction qui permet d'obtenir le profil isoforce, et dont le profil topographique se fait sur l'amplitude d'oscillation du microlevier. Cette amplitude est traduite par la déflexion d'un laser dirigé sur le microlevier qui est réfléchissant. La déflexion du laser est mesurée grâce à une photodiode circulaire divisée en quatre parts égales selon deux diamètres : lorsque le laser n'est pas défléchi, il tape au centre de la photodiode.

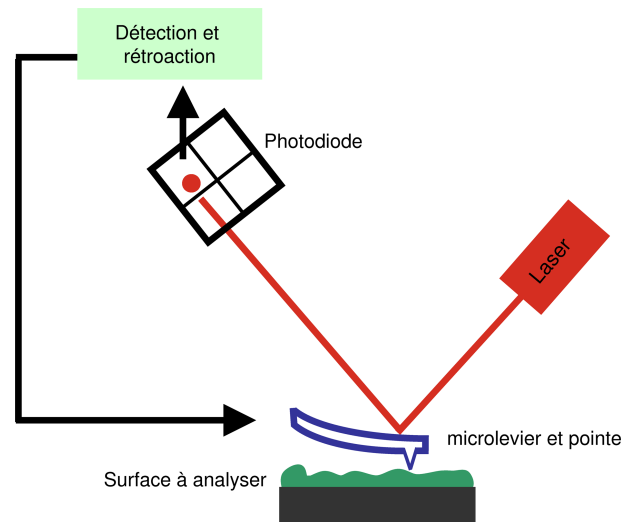


FIG 2 – Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique

Les mesures d'AFM ont été effectuées avec Pascal Silberzan et Antoine Pallandre à l'Institut Curie, sur un Nanoscope 3 (Veeco). Pour éviter une interaction entre la

pointe de l'AFM et la surface due à une trop grande différence de leurs modules élastiques, les pointes ont été modifiées comme la surface à sonder. Le microlevier (Ultralevers, Veeco) sur lequel est monté la pointe a une raideur de 10mN/m.

## Annexe 6 : Le P(AM-PDMA)

Le P(AM-PDMA) est constitué d'un squelette de poly(acrylamide) (PAM), sur lequel sont greffées de courtes chaînes de poly(diméthylacrylamide) (PDMA) (figure 3).

Ce copolymère a l'avantage d'allier l'hydrophilicité du PAM et le caractère plus

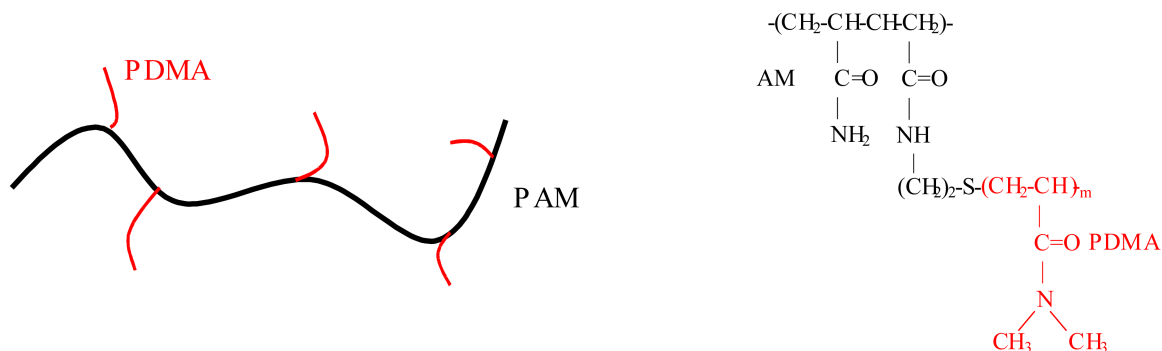


FIG 3 – Structure (à gauche) et formule chimique (à droite) du P(AM-PDMA).

hydrophobe des greffons PDMA qui permettent au polymère de s'adsorber sur la paroi du capillaire. Grâce à son squelette en acrylamide, le P(AM-PDMA) combine les bonnes propriétés d'adsorption du PDMA et les bonnes propriétés de séparation du PAM. Il peut donc jouer le rôle de matrice de séparation pour l'électrophorèse capillaire, et c'est dans ce but qu'il a été synthétisé au cours de mon DEA. Ici, le caractère hydrophobe est utilisé pour créer des interactions hydrophobes avec le PDMS, et le squelette d'AM confère son caractère hydrophile à la surface.

## Synthèse du P(AM-DMA)

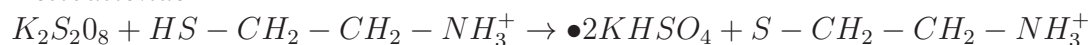
On synthétise d'abord les greffons PDMA porteurs d'une double liaison polymérisable en bout de chaîne (on les appellera macromonomères). Puis on réalise une copolymérisation avec l'acrylamide.

## Synthèse des macromonomères

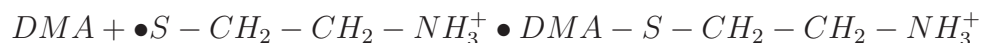
### Polymérisation du DMA

La polymérisation du N,N-diméthylacrylamide (DMA) est radicalaire et est effectuée dans l'eau à 25°C. L'amorceur est le couple redox aminoéthanthiol (AET, HCl)/persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). L'AET joue le rôle d'agent de transfert, c'est donc en jouant sur le rapport de concentration  $R = [AET]/[monomère]$  qu'on contrôle la longueur des chaînes.

*Activation de AET :*



*Activation d'un monomère :*

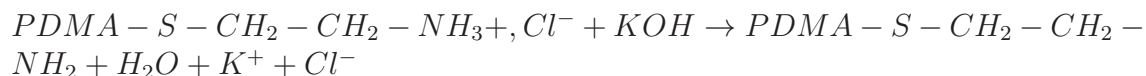


Mode opératoire :

Dans un ballon tricol de 500mL équipé d'un dispositif d'arrivée d'azote, on introduit 30g de DMA et 300L d'eau milliQ. Le mélange est agité à l'aide d'un barreau magnétique et dégazé pendant deux heures. Les amorceurs sont ensuite introduits et la réaction démarre immédiatement. Le mélange est maintenu sous agitation et barbotage pendant 4 heures.

### Neutralisation

Chaque macromolécule comporte, en bout de chaîne, un groupement  $NH_3^+$  provenant de l'AET. Celui-ci est neutralisé par la soude.



Mode opératoire :

Il faut  $nNaOH = nAET, HCl$ . On ajoute goutte à goutte la soude dans la solution contenant le polymère.

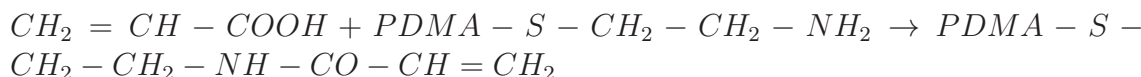
### Ultrafiltration et lyophilisation

La solution obtenue est ultrafiltrée sur des membranes 1000Da (Millipore) afin d'éliminer  $Na^+, Cl^-$ . Le filtrat est ensuite lyophilisé.

### Fonctionnalisation

Afin de pouvoir copolymériser le PDMA avec l'AM on introduit un groupement susceptible de former des radicaux. Les macromolécules précédemment synthétisées présentent une fonction amine en bout de chaîne. On fait réagir cette fonction sur l'acide acrylique ( $CH_2 = CH - COOH$ ) afin de fixer une double liaison vinylique

à l'extrémité de la chaîne.



La fonctionnalisation est réalisée dans le dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ ).

Mode opératoire :

On dissout le produit de la lyophilisation dans le  $CH_2Cl_2$  puis on ajoute le DCCI puis l'acide acrylique. On laisse agir une heure, le temps qu'un précipité trouble de DCCI se forme. Pour 1 g de PDMA il faut 0.455g de DCCI, 0.166g d'acide acrylique et environ 5 mL de dichlorométhane.

La solution est ensuite filtrée sur fritté jusqu'à retrouver sa limpidité initiale.

## Précipitation

On concentre un maximum en évaporant dans l'étuve sous vide, puis on fait une précipitation fractionnée dans l'éther (environ 4 fois 500 mL d'éther pour une solution initiale de 150 mL). La solution est filtrée sur Büchner et le macromonomère est séché sous vide.

Le macromonomère synthétisé a un rapport de  $R=0.015$  et une masse moléculaire de 40000-45000 Da.

## Copolymérisation

Il s'agit d'une polymérisation radicalaire. L'amorceur utilisé est le couple redox persulfate d'ammonium ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )/métabisulfite de sodium ( $Na_2S_2O_5$ ). Le rapport entre la quantité de macromonomère et d'acrylamide permet de jouer sur la densité de greffage, le rapport  $Na_2S_2O_5/((NH_4)_2S_2O_8)$  sur la longueur des chaînes par un mécanisme de terminaison de chaîne par transfert de radicaux.

Mode opératoire :

On introduit la quantité désirée de réactifs (AM et les macromonomères PDMA) dans de l'eau milliQ (50 mL pour 3,2 g de réactifs). On agite le mélange à température ambiante avec un barbotage d'azote pendant 2 heures. On ajoute ensuite les amorceurs, et on laisse la solution sous agitation avec un barbotage d'azote pendant 4 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite précipité lentement dans 2.5L d'acétone puis filtré sur Büchner et lavé trois fois avec 100mL d'acétone. Le solide est alors séché sous vide.



## Annexe 7 : Modélisation du comportement du ressort sous un flux.

### Notations

Le ressort est ancré dans le microcanal par le rond à son extrémité. Chaque spire est composée d'un demi-cercle et d'une partie linéaire. Suivant le sens de notation, les  $N$  spires sont notées de  $n=1$  à  $n=N$  ou de  $m=1$  à  $m=N$ .

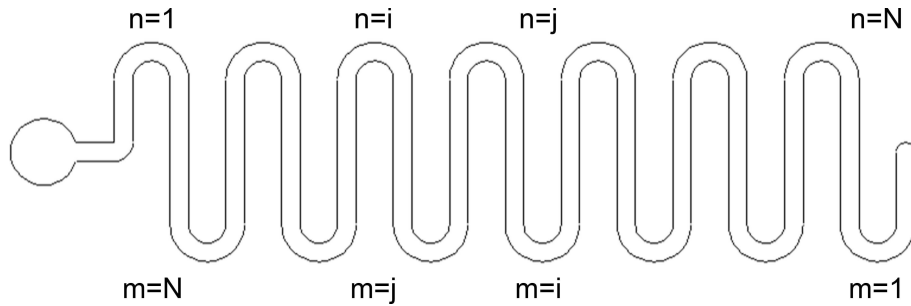


FIG 4 – \*

FIG 1 - Notation des indices  $n$ ,  $m$ ,  $i$  et  $j$  pour un ressort à  $N$  spires.

	Une spire	Ressort $N$ spires
Longueur initiale	$l_i^0$	$L^0 = \sum_{i=1}^N l_i^0$
Longueur avec un flux $Q$	$l_i$	$L = \sum_{i=1}^N l_i$
Élongation due au flux	$\delta l_i$	$\Delta L$
Constante de raideur	$k_i = k_j$ $= k$	$K = \frac{k}{N}$
Coefficient de friction visqueuse	$\xi_i = \xi_j$ $= \xi$	$\xi_{ressort}$

## Modèle

Chaque spire du ressort est modélisée par une boule subissant la force visqueuse  $\xi Q$ , reliée à un ressort élastique linéaire de raideur  $k$ , sans friction. L'énergie de rappel d'un ressort constitué de  $N$  spires de longueur  $l_i$  et de constante de raideur  $k_i$  s'écrit :

$$E = \frac{1}{2}k_1(l_1 - l_0)^2 + \dots + \frac{1}{2}k_i(l_i - l_0)^2 + \dots + \frac{1}{2}k_N(l_N - l_0)^2 \quad (3)$$

Le bilan des forces sur chaque spire donne :

$$\xi_i Q + \left( -\frac{\delta E}{\delta l_i} \right) = 0 \implies \begin{cases} \xi_1 Q - [k_i \underbrace{(l_1 - l_0)}_{\delta l_1} - k_{1+1} \underbrace{(l_2 - l_0)}_{\delta l_1}] \\ \dots \\ \xi_i Q - [k_i \underbrace{(l_i - l_0)}_{\delta l_i} - k_{i+1} \underbrace{(l_{i+1} - l_0)}_{\delta l_{i+1}}] \\ \dots \\ \xi_N Q - [k_N \underbrace{(l_N - l_0)}_{\delta l_N}] \end{cases} \quad (4)$$

$$\implies \begin{cases} \sum_{i=1}^N \xi_i Q = k_1 \delta l_1 \\ \dots \\ \sum_{i=n}^N \xi_i Q = k_n \delta l_n \implies \delta l_n = \frac{\sum_{i=n}^N \xi_i Q}{k_n} \\ \dots \\ \xi_N Q = k_N \delta l_N \end{cases} \quad (5)$$

## Régime linéaire

Dans le régime linéaire  $k_i = k_j = k$  et  $\xi_i = \xi_j = \xi$  pour des spires de même géométrie. Ainsi, la variation de longueur de la  $n$ ème spire s'exprime en fonction du flux  $Q$  comme :

$$\delta l_n = \frac{(N - n + 1) \xi Q}{k} \quad (6)$$

Si on inverse la numérotation, c'est à dire en numérotant  $m=1$  la dernière spire et  $M$  la spire attachée (voire figure 4), on a  $m = N - n + 1$ , d'où :

$$\delta l_m = \frac{\xi_i}{k} Q m \quad (7)$$

La variation  $\Delta L$  de la longueur du ressort est définie par rapport à la variation  $\delta l$  de la longueur d'une spire comme :

$$\Delta L = L - L^0 = \sum_{i=1}^N \delta l_i \quad (8)$$

Si on remplace  $\delta l_i$  par son expression définie dans Equ.7 on a :

$$\Delta L = Q \sum_{n=1}^N \sum_{i=n}^N \frac{\xi_i}{k_n} \quad \begin{matrix} k_i = k_j \\ \xi_i = \xi_j \end{matrix} \quad \Delta L = Q \frac{\xi}{k} \sum_{n=1}^N \underbrace{\sum_{i=n}^N}_{N-n+1} i = n^N \quad (9)$$

$$\Rightarrow \Delta L = Q \frac{\xi}{k} \underbrace{\left[ N^2 - \frac{N(N+1)}{2} + N \right]}_{\frac{N^2}{2} + \frac{N}{2}} \quad (10)$$

$$\Rightarrow \Delta L = Q \frac{\xi}{k} \frac{N(N+1)}{2} \quad 1 \quad (11)$$

La raideur  $K$  d'un ressort à  $N$  spires de raideur  $k$  est  $K = \frac{k}{N}$  d'où :

$$\Delta L = Q \frac{\xi}{K} \frac{(N+1)}{2} \quad (12)$$

### Relations entre les coefficients de frictions et entre les pentes du ressort et d'une spire

Par analogie avec l'expression de  $\Delta L$  pour un ressort (c'est à dire  $\Delta L = \frac{\xi_{ressort}}{K} Q$ ) on obtient :

$$\xi_{ressort} = \frac{(N+1)}{2} \xi$$

D'où :

$$\left( \frac{K}{\xi_{ressort}} \right) = \left( \frac{k}{\xi} \right) \frac{2}{N(N+1)} \quad (13)$$

Dans le régime linéaire, les pentes des courbes  $Q = f\left(\frac{\Delta L}{L}\right)$  et  $Q = f\left(\frac{\delta l}{l}\right)$  sont donc respectivement :

$$pente_{ressort} = \left( \frac{K}{\xi_{ressort} L} \right) \text{ et } pente_{spire} = \left( \frac{k}{\xi l} \right)$$

$$pente_{ressort} = \frac{2}{N^2(N+1)} pente_{spire}$$

Si on augmente de nombre de spires,  $pente_{ressort}$  diminue, ce qui augmente la sensibilité de la mesure.

---

1. Si on divise cette expression par  $L = Nl$ , on obtient  $\frac{\Delta L}{L} = Q(N+1) \frac{\xi}{lk}$ . Ainsi, les courbes  $\frac{\Delta L}{L}$  collapsent en fonction de  $NQ$ , comme le montre la figure S1 (Supplementary Data).

**Régime non linéaire**

Le régime linéaire se termine quand l'élongation  $\delta l$  de la première spire atteint sa valeur maximale, c'est à dire  $l$ . Il reste alors  $(N-1)$  spires qui contribuent à l'élongation du ressort, qui est alors donnée par l'équation 9 en remplaçant  $N$  par  $(N-1)$ .

**Plateau**

Lorsque toutes les spires ont atteint leur élongation maximales, un plateau de valeur  $Nl$  est atteint.



# Bibliographie

- A. K. Agarwal, L. Dong, D. J. Beebe, and H. Jiang. Autonomously-triggered microfluidic cooling using thermo-responsive hydrogels. *Lab on a Chip*, 7 :310–315, 2007.
- A. Ajdari. Electro-osmosis on inhomogeneously craged surface. *Physical Review Letter*, 75 :755–758, 1995.
- A. Ajdari. Pumping liquids using asymmetric electrode arrays. *Physical Review E*, 61 :R45–R48, 2000.
- C. Amatore, M. Belotti, Y. Chen, E. Roy, Sella C., and L. Thouin. Using electrochemical coupling between parallel microbands for *in situ* monitoring of flow rates in microfluidic channels. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 573 :333–343, 2004.
- M. Ashauer, H. Glosch, F. Hedrich, N. Hey, H. Sandmaier, and W. Lang. Thermal flow sensor for liquids and gases based on combinations of two principles. *Sensors and Actuators A : Physical*, 1999.
- R. Attia, D. C. Pregibon, P. S. Doyle, J.-L. Viovy, and D. Bartolo. Soft microflow sensors. *Lab on a Chip*, 9, 2009.
- Auroux, D. P.-A. Iossifidis, D. Reyes, and A. Manz. Micro total analysis systems. 2. analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, 74 : 2637–2652, 2002.
- R. M. A. Azzam and N. M. Bashara. Ellipsometry and polarized light. *North-Holland Personal Library*, 1977.
- E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H.-G. Janssen, and C. Cramers. Study into the equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes : Adsorption or sorption ? *Analitical Chemistry*, 71 :5213–5216, 1999.
- S. L. R. Barker, M. J. Tarlov, H. Canavan, J. J. Hickman, and L. E. Locascio. Plastic microfluidic devices modified with polyelectrolyte multilayers. *Analitical Chemistry*, 72 :4899–4903, 2000.

- D. A. Barrett, M. S. Hartshorne, M. A. Hussain, P. N. Shaw, and M. C. Davies. Resistance to nonspecific protein adsorption by poly(vinyl alcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry*, 73 :5232–5239, 2001.
- S. F. Bart, M. Mehregany, L. S. Tavrow, J. H. Lang, and S. D. Senturia. Electric micromotor dynamics. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 39 :566–575, 1992.
- M. Z. Bazant and T. M. Squires. Induced-charge electrokinetic phenomena : Theory and microfluidic applications. *Physical Review E.*, 92 :066101, 2004.
- H. Becker and C. Gartner. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390 :89–111, 2008.
- D. J. Beebe, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss, and B.-H. Jo. Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, 404 :588–590, 2000.
- Z. Bilkova, M. Slovakova, N. Minc, C. Fütterer, R. Cecal, D. Horak, M. Benes, I. le Potier, J. Krenkova, M. Przybylski, and J.-L. Viovy. Functionalized magnetic micro- and nanoparticles : Optimization and application to  $\mu$ -chip tryptic digestion. *Electrophoresis*, 27 :1811–1824, 2006.
- S. L. Biswal and A. P. Gast. Micromixing with linked chains of paramagnetic particles. *Analytical Chemistry*, 76 :6448–6455, 2004.
- K. Boonsong, M. M. Caulum, B. M. Dressen, O. Chailapaku, D. M. Crokek, and C. S. Henry. Influence of polymer structure on electroosmotic flow and separation efficiency in successive multiple ionic layer coatings for microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 29 :3128–3134, 2008.
- A. B. D. Brown, C. G. Smith, and A. R. Rennie. Pumping of water with ac electric fields applied to asymmetric pairs of microelectrodes. *Physical Review E.*, 63 : 016305, 2000.
- Feng X. J. Chen, P. and, W. Du, and B. F. Liu. Microfluidic chips for cell sorting. *Frontiers in biosciences*, 13 :2464–2483, 2008.
- M. Chiari, M. Cretich, and J. Horvath. A new adsorbed coating for dna fragment analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21 :1521–1526, 2000.
- S. Colin. Microfluidique. *Hermes Science Publications*, 2004.
- J. Collins and A. Lee. Microfluidic flow transducer based on the measurement of electrical admittance. *Lab on a Chip*, 4 :7–10, 2004.



- 
- Y. Cui, Q. Wei, H. Park, and C. M. Lieber. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, 293 :1289–1292, 2001.
- F. Q. Dang, M. Tabata, O. Kurokawa, A. A. Ewis, L. Zhang, H. Yamaoka, Y. Shinohara, M. Ishikawa, and Y. Baba. High-performance genetic analysis on microfabricated capillary array electrophoresis plastic chips fabricated by injection molding. *Analytical Chemistry*, 77 :2140–2146, 2005.
- R. V. Davalos, G. J. McGraw, T. I. Wallow, A. M. Morales, K. L. Krafcik, Y. Fintschenko, E. B. Cummings, and Simmons B. A. Performance impact of dynamic surface coatings on polymeric insulator-based dielectrophoretic particle separators. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390 :847–855, 2008.
- A. J. de Mello. On-chip chromatography : The last twenty years. *Lab on a Chip*, 2 (31N-36N), 2002.
- G. Decher. Fuzzy nanoassemblies : Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277 :1232–1237, 1997.
- C. Decker and A. D. Jenkins. Kinetic approach of oxygen inhibition in ultraviolet- and laser-induced polymerizations. *Macromolecules*, 18 :1241–1244, 1985.
- E. Delamarche, C. Donzel, F. S. Kamounah, H. Wolf, M. Geissler, R. Stutz, P. Schmidt-Winkel, B. Michel, H. Mathieu, and K. Schaumburg. Microcontact printing using poly(dimethylsiloxane) stamps hydrophilized by poly(ethylene oxide) silanes. *Langmuir*, 19 :8749–8758, 2003.
- D. Dendukuri, D. C. Pregibon, J. Collins, T. A. Hatton, and P. S. Doyle. Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis. *Nature Materials*, 5 :365–369, 2006.
- D. Dendukuri, S. S. Gu, D. C. Pregibon, Hatton T. A., and P. S. Doyle. Stop-flow lithography in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 7 :818–828, 2007.
- S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, L. N. Li Jeon, and G. M. Whitesides. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Analytical Chemistry*, 73 :1240–1246, 2001.
- M. Dijkstra, M.J. de Boer, J.W. Berenschot, R.J. Lammerink, T.S.J Wiegerink, and M. Elwenspoek. Miniaturized thermal flow sensor with planar-integrated sensor structures on semicircular surface channels. *Sensors and Actuators A : Physical*, 2008.
- P.S. Dittrich and A. Manz. Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nature reviews in drug discovery*, 5 :210–218, 2006.

- A. F. Doll, M. Wischke, A. Geipel, F. Goldschmidtboeing, O. Ruthmann, U. T. Hopt, Schrag H.-J., and P. Woias. A novel artificial sphincter prosthesis driven by a four-membrane silicon micropump. *Sensors and Actuators A*, 139 :203–209, 2007.
- D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70 :4974–4984, 1998.
- C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, A. Paulus, and Ehrat M. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices : Analysis of dna restriction fragments and detection of single dna molecules on microchips. *Analytical Chemistry*, 69 :3451–3457, 1997.
- B. Ekström, G. Jacobson, O. Ohman, and H. Sjodin. Separating and collecting particles of one liquid suspended in another liquid. *PCT Patent Application WO 91/16966*, 1991.
- A. Folch, B.-H. Jo, O. Hurtado, D. J. Beebe, and M. Toner. Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 :346–353, 2000.
- J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, Gerber C., and J. K. Gimzewski. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, 288 :316–318, 2000.
- C. Fütterer, N. Minc, V. Bormuth, J.-H. Codarbox, P. Laval, J. Rossier, and J.-L. Viovy. Injection and flow control system for microchannels. *Lab on a Chip*, 4 : 351–356, 2004.
- J. S. Galder Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, and S. Fraden. Using microfluidics to decouple nucleation and growth of protein crystals. *Crystal Growth and Design*, 7, 2007.
- Y. Ge, M. Wang, X. Chen, and H. Rong. An optical mems pressure sensor based on a phase demodulation method. *Sensors and Actuators A*, 143 :224–229, 2008.
- T. Gervais, J. El-Ali, A. Gunther, and K. F. Jensen. Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 6 :500–507, 2006.
- R. Gomez-Sjoberg, A. A. Leyrat, D. M. Pirone, C. S. Chen, and S. R. Quake. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Analytical Chemistry*, 79 :8557–8563, 2007.
- P. Gravesen, J. Branebjerg, and O. S. Jensen. Microfluidics-a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 3 :168–182, 1993.

- 
- O. Gustafsson, K. B. Mogensen, and J. P. Kutter. Underivatized cyclic olefin copolymer as substrate material and stationary phase for capillary and microchip electrochromatography. *Electrophoresis*, 29(3145-3152), 2008.
- S. Hayamizu, K. Higashino, Y. Fujii, Y. Sando, and K. Yamamoto. Development of a bi-directional valve-less silicon micro pump controlled by driving waveform. *Sensors and Actuators A : Physical*, 103 :83–87, 2003.
- M. Heller and A. Guttman. Integrated microfabricated biodevices. *Marcel Dekker, New York*, 2001.
- S. Hjerten. High-performance electrophoresis : elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of chromatography*, 347 :191–198, 1985.
- J. Hoffman, M. Plotner, M. D. Kuckling, and W.-J. Fischer. Photopatterning of thermally sensitive hydrogels useful for microactuators. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 77 :139–144, 1999.
- S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C. E. Sims, G. P. Li, and N. L. Allbritton. Surface-directed, graft polymerization within microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 76(1865-1870), 2004.
- R. J. Hunter. Zeta potential in colloid science. *Academic Press*, 1981.
- D. K. Hwang, D. Dendukuri, and P. S. Doyle. Microfluidic-based synthesis of non-spherical magnetic hydrogel microparticles. *Lab on a Chip*, 8 :1640–1647, 2008.
- A. E. Kamholz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson, and P. Yager. Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel : The t-sensor. *Analytical Chemistry*, 71 :5340–5347, 1999.
- K. Kataoka, H. Miyazaki, M. Bunya, Okano T., and Y. Sakurai. Totally synthetic polymer gels responding to external glucose concentration : their preparation and application to on-off regulation of insulin release. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 :12694–12695, 1998.
- Y. Kikutani, K. Mawatari, K. Katayama, M. Tokeshi, T. Fukuzawa, M. Kataoka, and T. Kitamori. Flowing thermal lens micro-flow velocimeter. *Sensors and Actuators B*, 2008.
- D. Kim and D. J. Beebe. Interfacial formation of porous membranes with poly(ethylene glycol) in a microfluidic environment. *Journal of Applied Polymer Science*, 110 :1581–1589, 2008.
- D.-K. Kim, A. Majumdar, and S. J. Kim. Electrokinetic flow meter. *Sens. Actuators A*, 136 :80–89, 2007.

- J. Kim, S. Nayak, and L. A. Lyon. Bioresponsive hydrogel microlenses. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :9588–9592, 2005.
- H. Kinoshita, S. Kaneda, and T. Fujii. Three-dimensional measurement and visualization of internal flow of a moving droplet using confocal micro-piv. *Lab on a Chip*, 7 :338–346, 2007.
- D. Kohlheyer, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, and R. B. M. Schasfoort. Miniaturizing free-flow electrophoresis - a critical review. *Electrophoresis*, 29 :977–993, 2008.
- G. J. M. Krijnen, M. Dijkstra, J. J. van Baar, S. S. Shankar, W. J. Kuipers, D. de Boer, R. J. H. Altpeter, Lammerink T. S. J., and R. Wiegink. Mems based hair flow-sensors as model systems for acoustic perception studies. *Nanotechnology*, 17 :S84–S89, 2006.
- L. Lam, R. Iino, K. V. Tabata, and H. Noji. Highly sensitive restriction enzyme assay and analysis : a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 :2423–2432, 2008.
- T. S. J. Lammerink, N. R. Tas, M. Elwenspoek, and J. H. J. Fluitman. Micro-liquid flow sensor. *Sensors and Actuators A : Physical*, 37-38 :45–50, 1993.
- A. Le Nel, N. Minc, C. Smadja, M. Slovakova, Z. Bilkova, J.-M. Peyrin, J.-L. Viovy, and M. Taverna. Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip. *Lab on a Chip*, 8 :294–301, 2008.
- N. Li Jeon, S. K. W. , Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 22 :8311–8316, 2000.
- N. Li Jeon, D. T. Chiu, C. J. Wargo, H. Wu, I. S. Choi, J. R. Anderson, and G. M. Whitesides. Microfluidics section : Design and fabrication of integrated passive valves and pumps for flexible polymer 3-dimensional microfluidic systems. *Biomedical Microdevices*, 4 :117–121, 2002.
- V. Lien and F. Vollmer. Microfluidic flow rate detection based on integrated optical fiber cantilever. *Lab on a Chip*, 7 :1352–1356, 2007.
- R. Lima, S. Wadac, M. Takedaa, K. Tsubotaa, and T. Yamaguchia. In vitro confocal micro-piv measurements of blood flow in a square microchannel : The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles. *Journal of Biomechanics*, 40 : 2752–2757, 2007.
- R. H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, and P. Grodzinski. Fully integrated microfluidic separations systems for biochemical analysis. *Journal of Chromatography A*, 1168 :170–188, 2007.

- 
- D. Long, H. A. Stone, and A. Ajdari. Electroosmotic flows created by surface defects in capillary electrophoresis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212 :338–349, 1999.
- J. C. Love, D. B. Wolfe, H. O. Jacobs, and G. M. Whitesides. Microscope projection photolithography for rapid prototyping of masters with micron-scale features for use in soft lithography. *Langmuir*, 17 :6005–6012, 2001.
- H. Makamba, Y.-Y. Hsieh, W.-C. Sung, and S.-H. Chen. Stable permanently hydrophilic protein-resistant thin-film coatings on poly(dimethylsiloxane) substrates by electrostatic self-assembly and chemical cross-linking. *Analytical Chemistry*, 77 :3971–3978, 2005.
- A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1 :244–248, 1990.
- C. D. Meinhart, S. T. Wereley, and Santiago J. G. Piv measurements of a micro-channel flow. *Experiments in Fluids*, 1999.
- T. Miyata, N. Asami, and T. Uragami. A reversible antigen responsive hydrogel. *Nature*, 399 :766–796, 1999.
- M. R. Mohamadi, L. Mahmoudian, N. Kaji, M. Tokeshi, , and Y. Baba. Dynamic coating using methylcellulose and polysorbate 20 for nondenaturing electrophoresis of proteins on plastic microchips. *Electrophoresis*, 28 :830–836, 2007.
- J. Moorthy and D. J. Beebe. A hydrogel readout for autonomous detection of ions in microchannels. *Lab on a Chip*, 2 :76–80, 2002.
- W. M. Moreau. Semiconductor lithography : Principles, practices, and materials. *Plenum Publishing Corp.*, 1988.
- H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano, and Y. Baba. Microchip electrophoretic protein separation using electroosmotic flow induced by dynamic sodium dodecyl sulfate-coating of uncoated plastic chips. *Electrophoresis*, 26 :2247–2253, 2005.
- P. Nath, S. Roy, T. Conlisk, and A. J. Fleischman. A system for micro/nano fluidic flow diagnostics. *Biomedical Microdevices*, 7 :169–177, 2005.
- N. T. Nguyen. Micromachined flow sensors—a review. *Flow Measurement and Instrumentation*, 8 :7–16, 1997.
- N. T. Nguyen, X. Y. Huang, and K. C. Toh. Thermal flow sensor for ultra-low velocities based on printed circuit board technology. *Measurement Science and Technology*, 12 :2131–2136, 2001.

- T. B. Nielsen and C. M. Hansen. Significance of surface resistance in absorption by polymers. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44 :3959–3965, 2005.
- G. Ocirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, and K. D. J. Westra, Harrison. Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. *Electrophoresis*, 21(107-115), 2000.
- M. H. Oddy, J. G. Santiago, and J. C. Mikkelsen. Electrokinetic instability micro-mixing. *Analytical Chemistry*, 73 :5822 –5832, 2001.
- R.E. Oosterbroek, T.S.J. Lammerink, J.W. Berenschot, G.J.M. Krijnen, M.C. Elwenspoek, and A. Van den Berg. A micromachined pressurer/flow-sensor. *Sensors and Actuators A : Physical*, 1999.
- S. A. Pabit and S. J. Hagen. Laminar-flow fluid mixer for fast fluorescence kinetics studies. *Biophysical Journal*, 8 :2872–2878, 2002.
- P. Panda, S. Alib, E. X. Lob, E. Chung, A. Hatton, T. A. Khademhosseini, and P. S. Doyle. Stop-flow lithography to generate cell-laden microgel particles. *Lab on a Chip*, 8 :1056–1061, 2008.
- D. Pappas and K. Wang. Cellular separations : A review of new challenges in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 601 :36–35, 2007.
- F. Patolsky, B. P. Timko, Y. Yu, G. Fang, A. B. Greytak, G. Zheng, and C. M. Lieber. Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays. *Science*, 313 :1100–1104, 2006.
- D. Paul, A. Pallandre, S. Miserere, J. Weber, and J.L. Viovy. Lamination-based rapid prototyping of microfluidic devices using flexible thermoplastic substrates. *Electrophoresis*, 28 :1115–1122, 2007.
- J.-C Pedinotti, M. Max Chabert, R. and Lambert B. D. Pallandre, A. Attia, D. Paul, C. Hougayer, and J.-L. Viovy. Mélangeur microfluidique chaotique à toutes échelles pour l’adn et les protéines. In Société hydrotechnique de France, editor, *3rd Microfluidics French Conference*. 3rd Microfluidics French Conference, 2006.
- J. Pihl, J. Sinclair, E. Sahlin, M. Karlsson, F. Petterson, J. Olofsson, and O. Orwar. Microfluidic gradient-generating device for pharmacological profiling. *Analytical Chemistry*, 77 :3897–3903, 2005.
- J.-L.-M. Poiseuille. Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres. *Imprimerie Royale*, 1846.



- 
- M. S. Pommer, A. R. Kiehl, G. Soni, N.S. Dakessian, and C.D. Meinhart. A 3d-3c micro-piv method. In *2nd IEEE International Conference on, Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, NEMS 07*.
- D. C. Pregibon, M. Toner, and P. S. Doyle. Magnetically and biologically active bead-patterned hydrogels. *Langmuir*, 22 :5122–5128, 2006.
- D. C. Pregibon, M. Toner, and P. S. Doyle. Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis. *Science*, 315 :1393–1396, 2007.
- Q. Pu, M. S. Elazazy, and J. C. Alvarez. Label-free detection of heparin, streptavidin, and other probes by pulsed streaming potentials in plastic microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 80 :6532–6536, 2008.
- S. Z. Qi, X. Z. Liu, S. Ford, J. Barrows, G. Thomas, K. Kelly, A. McCandless, K. Lian, J. Goettert, and S.A. Soper. Microfluidic devices fabricated in poly(methyl methacrylate) using hot-embossing with integrated sampling capillary and fiber optics for fluorescence detection. *Lab on a Chip*, 2(2) :88–95, 2002.
- A. Quist, A. Chand, A. S. Ramachandran, D. Cohena, and R. Lal. Piezoresistive cantilever based nanoflow and viscosity sensor for microchannels. *Lab on a Chip*, 6 :1450–1454, 2006.
- X. Ren, C. Bachman, M. Sims, G. P. Li, and N. Allbritton. Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane). *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 762 :117–125, 2001.
- J. P. Renault, A. Bernard, D. Juncker, B. Michel, H. R. Bosshard, and E. Delamarche. Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, , No. 13, 41 :2320–2323, 2002.
- D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, and A. Manz. Micro total analysis systems. 1. introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 74 :2623–2636, 2002.
- D. Ross, T. J. Johnson, and L. E. Locascio. Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels. *Analytical Chemistry*, 73 :2509–2515, 2001.
- J.S. Rossier, A. Schwarz, F. Reymond, R. Ferrigno, F. Bianchi, and H. H. Girault. Microchannel networks for electrophoretic separations. *Electrophoresis*, 20 :727–731, 1999.
- K. S. Ryu, K. Shaikh, E. Goluch, Z. F. Fan, and C. Liu. Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 4 :608–613, 2004.



- A.-E. Saliba, E. Psichari, L. Saias, V. Minc, N. Studer, and J.-L. Viovy. Ferrofluid pattern for guiding magnetic beads self-organisation : Application to affinity cell separation and on chip cell culture. In *Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pages 575–577, Paris, France, 2007.
- J.-B. Salmon, C. Dubrocq, P. Tabeling, S. Charier, D. Alcor, L. Jullien, and F. Ferge. An approach to extract rate constants from reaction-diffusion dynamics in a microchannel. *Analytical Chemistry*, 77 :3417–3424, 2005.
- J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart, D. J. Beebe, and Adrian R. J. A particle image velocimetry system for microfluidics. *Experiments in Fluids*, 25 : 316–319, 1998.
- E. A. Schilling, A. E. Kamholz, and P. Yager. Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay. *Anal. Chem.*, 74 :1798 –1804, 2002.
- G. Shekhawat, S.-H. Tark, and V. P. Dravid. Mosfet-embedded microcantilevers for measuring deflection in biomolecular sensors. *Science*, 311 :1592–1595, 2006.
- H. Shiku, T. Saito, C.-C. Wu, T. Yasukawa, H. Yokoo, M. Abe, T. Matsue, and H. Yamada. Oxygen permeability of surface-modified poly(dimethylsiloxane) characterized by scanning electrochemical microscopy. *Chemistry Letters*, 35 :234–235, 2006.
- Y. Shirasaki, J. Tanaka, H. Makazu, K. Tashiro, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Funatsu. On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermoreversible gelation polymer to control flow. *Analytical Chemistry*, 78 :695–701, 2006.
- T. Sikanen, L. Heikkilä, S. Tuornikoski, R. A. Ketola, R. Kostainen, S. Franssila, and T. Kotiaho. Performance of su-8 microchips as separation devices and comparison with glass microchips. *Analytical Chemistry*, 79 :6255–6263, 2007.
- H. M. Simms, C. M. Bowman, and K. S. Anseth. Using living radical polymerization to enable facile incorporation of materials in microfluidic cell culture devices. *Biomaterials*, 29 :2228–2364, 2008.
- A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, and G. M. Whitesides. Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 295 :647–651, 2002.
- V. Studer, G. Hang, A. Pandolfi, M. Ortiz, W. F. Anderson, and S. R. Quake. Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve. *Journal of Applied Physics*, 95 :393–398, 2004.

- 
- K. D. Sudipto, N.R. Aluru, B. Johnson, W. C. Crone, D. J. Beebe, and J. S. Moore. Equilibrium swelling and kinetics of ph-responsive hydrogels : models, experiments, and simulations. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 11 :544–555, 2002.
- K. Sueyoshi, F. Kitagawa, and K. Otsuka. Recent progress of online sample preconcentration techniques in microchip electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 31 :2650–2666, 2008.
- S. Sugiura, K. Sumaru, K. Ohi, K. Hiroki, T. Takagi, and T. Kanamori. Photoresponsive polymer gel microvalves controlled by local light irradiation. *Sensors and Actuators A*, 140 :176–184, 2007.
- A. Suzuki and T. Tanaka. Phase transition in polymer gels induced by visible light. *Nature*, 346 :345–347, 1990.
- P. Tabeling. Some basic problems of microfluidics. In *Australasian Fluid Mechanics Conference*, Adelaide University, Australia, 2001.
- P. Tabeling. Introduction à la microfluidique. *Belin, Paris*, 2003.
- P. Tabeling, M. Chabert, A. Dodge, C. Jullien, and Okkels F. Chaotic mixing in cross-channel micromixers. *Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 362 :987–1000, 2004.
- G. I. Taylor. Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. *Proceedings of the Royal Society A*, 1953.
- D. Theriault, S. R. White, and J. A. Lewis. Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly. *Nature Materials*, 2 :265–271, 2003.
- T. Thorsen, S. J. Maerk, and S. R. Quake. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298 :580–584, 2002.
- C. S. Torres. Alternative lithography unleashing the potentials of nanotechnology. *Springer*, 2003.
- W. Traub. Crystal structure of biotin. *Nature*, 178 :649–650, 1956.
- M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S. R. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288 :113–116, 2000.
- H. van der Linden, W. Olthuis, and P. Bergveld. An efficient method for the fabrication of temperature-sensitive hydrogel microactuators. *Lab on Chip*, 4 :619–624, 2004.

- R. A. Van Wagenen, D. L. Coleman, R. N. King, P. Triolo, L. Brostrom, Smith, L. M. Gregonis, D. E., and J. D. Andrade. Streaming potential investigations : Polymer thin films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 84 :155–162, 1981.
- P. S. Waggoner and H. G. Craighead. Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab on a Chip*, 7 :1238–1255, 2007.
- A.-J. Wang, J.-J. Xu, and H.-Y. Chen. In-situ grafting hydrophilic polymer on chitosan modified poly (dimethylsiloxane) microchip for separation of biomolecules. *Journal of Chromatography A*, 1147 :120–126, 2007.
- B. Wang, L. Chen, Z. Abdulali-Kanji, J. H. Horton, and R. D. Oleschuk. Aging effects on oxidized and amine-modified poly(dimethylsiloxane) surfaces studied with chemical force titrations : Effects on electroosmotic flow rate in microfluidic channels. *Langmuir*, 19 :9792–9798, 2003.
- Y. Wang, G. T. Salazar, J.-H. Pai, H. Shadpour, C. E. Sims, and N. L. Allbritton. Micropallet arrays with poly(ethylene glycol) walls. *Lab on a Chip*, 8 :734–740, 2008a.
- Y. N. Wang, Y. J. Kang, D. Y. Xu, C. H. Chon, L. Barnett, S. A. Kalams, D. Y. Li, and D. Q. Li. On-chip counting the number and the percentage of cd4+t lymphocytes. *Lab on a Chip*, 8 :309–315, 2008b.
- Miserere S. Weber, J. and, J. Champ, R. Looten, D. Stoppa-Lyonnet, J.-L. Viovy, and C. Houdayer. High-throughput simultaneous detection of point mutations and large-scale rearrangements by ce. *Electrophoresis*, 28 :4282–4288, 2007.
- G.M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442 :368–373, 2006.
- D. Wu, Y. Luo, X. Zhou, Z. Dai, and B. Lin. Multilayer poly(vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation. *Electrophoresis*, 26 :211–218, 2005.
- J. Wu and W. Sansen. Electrochemical time of flight flow sensor. *Sens. Actuators A*, 97-8 :68–74, 2002.
- S. Wu, Lin, Y. Q. Yuen, and Y.-C. Tai. Mems flow sensors for nano-fluidic applications. *Sensors and Actuators A : Physical*, 2001.
- Y. Xiao, X.-D. Yu, K. Wang, J.-J. Xu, J. Huang, and H.-Y. Chen. Study on the separation of amino acids in modified poly(dimethylsiloxane) microchips. *Talanta*, 71 :2048–2055, 2007.

- C.-T. Yang and H.-S. Chuang. Measurement of a microchamber flow by using a hybrid multiplexing holographic velocimetry. *Experiments in Fluids*, 39 :385–396, 2005.
- Q. Yu, J. M. Bauer, J. S. Moore, and D. J. Beebe. Responsive biomimetic hydrogel valve for microfluidics. *Applied Physics Letters*, 78 :2589, 2001.
- C. Zhang and D. Xing. Miniaturized pcr chips for nucleic acid amplification and analysis : latest advances and future trends. *Nucleic Acids Research*, 35 :4223–4237, 2007.



