



Génération de gouttes en microfluidique pour l'étude de la cellule unique, l'extraction liquide-liquide et la vectorisation.

Pascaline Mary

► To cite this version:

Pascaline Mary. Génération de gouttes en microfluidique pour l'étude de la cellule unique, l'extraction liquide-liquide et la vectorisation.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT: . pastel-00005739

HAL Id: pastel-00005739

<https://pastel.hal.science/pastel-00005739>

Submitted on 10 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique des Liquides et Matière Molle
(ED 107)

Présentée par

Pascaline Mary

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Génération de gouttes en microfluidique pour
l'étude de la cellule unique, l'extraction liquide-
liquide et la vectorisation.**

Composition du jury :

Mme Françoise BROCHARD-WYART Examineur
M. Patrick DOYLE Rapporteur
M. Moncef STAMBOULI Examineur
M. Vincent STUDER Directeur de thèse
M. Patrick TABELING Directeur de thèse
M. Jean-Louis VIOVY Rapporteur

Remerciements

Une thèse commence par la confiance accordée par le directeur de thèse lorsqu'il ouvre les portes de son laboratoire au doctorant pour trois années de travail en commun. Je remercie Patrick Tabeling de toute la disponibilité dont il a fait preuve avant ma thèse pour la sinueuse course des dossiers de bourse et pendant ma thèse pour son encadrement scientifique et humain d'une grande compétence. Mes apparitions devant la porte G3.06, nombreuses et imprévues, ont toujours été accueillies par "mais tu ne me déranges jamais Pascaline".

Un grand merci à Vincent Studer, mon deuxième directeur de thèse, pour tous les conseils avisés qu'il m'a apportés pendant ma thèse. C'est avec un très grand honneur que j'endosse le rôle de premier doctorant de Vincent ; ses innombrables idées ingénieuses et sa clairvoyance m'ont motivée et orientée tout au long de ce travail.

La biologie ne s'improvise pas, c'est évident ! Un grand merci à Luce Dauphinot pour sa patience et sa grande disponibilité ; elle m'a initiée aux techniques de quantification de gènes avec un très grand professionnalisme et m'a apporté un soutien constant dans les expériences de biologie.

Merci également à Jean-Christophe Galas, post-doctorant de Vincent, toujours à l'écoute pour répondre avec pertinence à mes questions scientifiques, technologiques, pratiques ...

Le travail de thèse est certes le travail d'une personne mais n'a aucune existence sans les nombreuses et précieuses collaborations, entraides et discussions ; la notion d'équipe a pris tout son sens dans mon esprit.

Merci à Marie-Claude Potier pour ses discussions fructueuses sur l'orientation à prendre dans le projet.

La culture cellulaire est tout un métier. Je remercie Pascal Poncet pour tout le temps qu'il a consacré à m'initier à la culture cellulaire, pour la préparation et les dons de cellules et pour sa collaboration dans la vectorisation.

J'en viens aux membres du MMN, mon laboratoire d'accueil. Les trois années passées dans ce laboratoire furent très riches scientifiquement et culturellement. J'exprime d'abord mes excuses aux personnes du laboratoire que je n'aurai pas citées. L'arrivée de Fabrice Monti, l'ingénieur du laboratoire "aux doigts de fée" fut une source d'amélioration incontestable. Toujours disponible, ses compétences indéniables sont une aide au quotidien et je l'en remercie vivement. Merci à Hervé Willaime et à Marie-Caroline Jullien pour leurs conseils et leur soutien ; leur rôle de pilier en tant que permanents du laboratoire est fort appréciable pour les étudiants "toujours de passage" dont le savoir expérimental repose sur la transmission. Merci à tous les thésards et postdoctorants du laboratoire qui ont parcouru un bout de chemin avec moi : Philippe, Annick, Emmanuel, Florent, Nicolas, Boris, Marc, Raphaëlle, Cédric et Avin qui reprend "le bébé". Merci aux deux stagiaires que j'ai encadrées Yuri Hanada et Nadège Bois pour leur contribution.

Merci aux membres du jury d'avoir consacré du temps à la lecture du manuscrit malgré

leur très grande occupation, à mes rapporteurs Jean-Louis Viovy et Patrick Doyle, à mes examinateurs Françoise Brochard-Wyart et Moncef Stambouli.

Merci à Luc Talini d'avoir eu la gentillesse de relire et de critiquer mon manuscrit de thèse.

Merci à ma famille pour leur aide au quotidien. Entreprendre de (très) longues études est une source d'efforts et de sacrifices, je remercie ma mère de m'avoir accompagnée sur cette longue route.

Merci à tous mes amis de m'avoir supportée dans les hauts (ça marche) et dans les bas (ça ne marche pas) de mon moral et pour m'avoir soutenue jusqu'au bout.

Merci enfin à tous ceux, anonymes, qui m'ont aidée dans leur cur ou avec leurs mains.
Merci.

Table des matières

Introduction	1
1 Microfluidique en gouttes pour la biologie cellulaire	3
1.1 La cellule	3
1.1.1 Rappels sur la cellule	3
1.1.2 De la nécessité d'étudier la cellule à l'échelle individuelle	4
1.1.3 Approches expérimentales conventionnelles de l'étude d'une cellule unique	5
1.2 La microfluidique, un outil adapté à l'étude de la cellule	6
1.2.1 La microfluidique ou l'art de manipuler des petits volumes de liquide	6
1.2.2 Analyse de l'expression des gènes d'une cellule en microfluidique	7
1.3 La microfluidique discrète dans des gouttes	12
1.3.1 Génération de gouttes dans des microsystèmes	13
1.3.2 Manipulation de gouttes	15
1.3.3 Stabilisation des gouttes pour une observation à long terme	16
2 Analyse quantitative haut débit de l'expression de gènes sur la cellule	19
2.1 Stratégie expérimentale développée lors de cette thèse	19
2.1.1 Conception des microsystèmes : matériaux employés	19
2.1.2 Connectiques, stockage, génération et stabilisation des gouttes	21
2.1.3 Montage expérimental	25
2.2 Analyse quantitative de l'expression de gènes sur ARN et cellule en micro- fluidique	36
2.2.1 Analyse d'un échantillon d'ARN	36
2.2.2 RT-PCR quantitative sur cellule unique	40
3 Extraction liquide-liquide dans les microgouttes : fondements et appli- cations	51
3.1 Article : <i>Microfluidic droplet-based liquid liquid extraction</i>	51
3.2 Extraction réactive du zinc suivi par fluorescence dans des gouttes	65
3.3 Premières étapes de purification de l'ARN dans des gouttes	69
3.3.1 Transfert de l'ADN à l'interphase	71
3.3.2 Précipitation des protéines	72
4 Génération contrôlée d'émulsions micrométriques pour la phagocytose	73
4.1 Introduction	73
4.2 Article : <i>Monodisperse colloids generated with nanofluidic technology</i>	74
4.3 Vers des émulsions submicrométriques	97
Conclusion	99

Annexes	101
A La polymérisation en chaîne avec transcription inverse.	103
A.1 Transcription inverse	103
A.2 Réaction de polymérisation en chaîne.	103
B Protocoles de microfabrication	107
B.1 Microsystèmes en NOA	107
B.2 Réalisation des microvannes intégrées aux connectiques en PDMS	107
C Séquence des amorces et des sondes.	111
D Culture et préparation des cellules.	113
E Kit de RT-PCRq en une étape.	115
F Traitement d'images de PCRq en temps réel.	117
G Article sur l'optimisation de forme d'une source de chauffage pour des systèmes microfluidiques.	119
Bibliographie	121
Liste des abréviations	131

Introduction

Depuis les pensées de Blaise Pascal au XVII^{ème} siècle, les notions d'infiniment petit et grand questionnent les scientifiques. Entre les deux infinis se trouvent de nombreuses échelles caractéristiques aux comportements et aux lois variés.

Les développements humains et technologiques ont donné naissance, trois siècles après Pascal, à des possibilités de miniaturisation des systèmes fluidiques par utilisation des techniques de microfabrication développées en électronique. En 1990, la microfluidique a ainsi connu un essor important, avec pour principale cible les analyses chimiques et biologiques. Des technologies de microfabrication, beaucoup plus légères que le silicium en microélectronique ou le verre, voient le jour : des méthodes de fabrication de puce en PDMS par lithographie douce permettent d'augmenter les possibilités d'intégration et de faciliter leur mise en oeuvre [Duffy 1998].

Les concepts de laboratoire miniaturisé d'analyse chimique sur puce [Manz 1990], puis de laboratoire sur puce, prennent naissance ; il s'agit de miniaturiser une succession d'opérations de chimie ou de biologie dans des microcanaux de volumes inférieurs à 1 μL pour augmenter rendement, vitesse et sécurité.

La microfluidique, *i.e.* la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres) en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres [Whitesides 2006], a connu un développement rapide et de nombreux concepts ont été revisités : mélange, séparation, criblage, détection, cinétiques chimiques ... Les laboratoires sur puce ont également suscité une grande motivation en biologie, domaine où les techniques conventionnelles sont limitées par les volumes prélevables : analyse d'acides nucléiques et de protéines, diagnostic, culture cellulaire, détection de molécules sont ainsi miniaturisés.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte pluridisciplinaire à la frontière entre la physique, l'ingénierie et la biologie, il est voué à l'analyse de l'expression de gènes au niveau de la cellule unique par l'outil microfluidique dans des gouttes. La structure des différentes étapes du cahier des charges est schématisée dans la figure ??.

Le chapitre 1 situe la problématique biologique et les enjeux associés à l'étude de la cellule unique, présente les avantages inhérents à la miniaturisation pour la biologie cellulaire et introduit, de façon non exhaustive, les concepts et utilisations de la microfluidique en gouttes, technologie employée dans toutes les études détaillées de ce manuscrit.

Le chapitre 2 est consacré aux étapes 4 et 5 de la figure ??, c'est à dire l'expression de gènes sur la cellule en microgouttes par RT-PCR temps réel. A notre connaissance, cette étude a été réalisée dans des conditions expérimentales originales.

Le chapitre 3, relié à l'étape de purification d'ARN, s'attarde plus généralement aux phénomènes d'extraction liquide-liquide entre une phase dispersée et une phase porteuse. L'étude fondamentale y est présentée sous forme d'article, les applications sont détaillées dans le manuscrit.

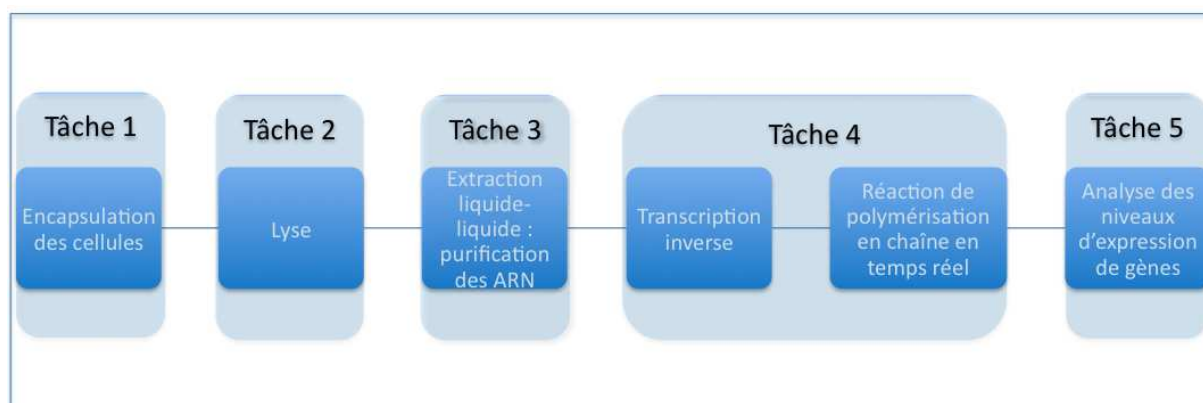


FIG. 1 – Stratégie employée au cours de cette thèse pour l'étude de la cellule unique.

Enfin le chapitre 4, relativement indépendant, repose sur un article et ouvre des perspectives de vectorisation dans les cellules par phagocytose d'émulsions complexes générées en microfluidique.

Microfluidique en gouttes pour la biologie cellulaire

1.1 La cellule

1.1.1 Rappels sur la cellule

On peut distinguer deux classes de cellules. La plus simple du point de vue structural est la cellule procaryote. Les procaryotes sont des cellules sans noyau possédant une paroi cellulaire et un ADN circulaire unique, elles sont dites cellules haploïdes (les chromosomes sont présents en un seul exemplaire) et sont caractéristiques du règne bactérien. La deuxième classe correspond aux cellules eucaryotes, elle comprend la grande majorité des espèces vivantes (animaux, plantes ...). La cellule eucaryote est une cellule de structure et d'organisation complexes comportant de nombreux organites. Elle contient un noyau délimité par une enveloppe et qui renferme deux jeux de chromosomes dépositaires du matériel génétique (cellule dite diploïde). Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à ce type cellulaire.

Le terme gène désigne une unité d'information génétique, codée sous forme d'une séquence de nucléotides sur un brin d'ADN.

Les gènes codent pour les protéines, leur expression détermine donc la vie cellulaire.

Le dogme central définit le paradigme de la biologie moléculaire ; les gènes sont conservés sous forme d'acides nucléiques mais ils exercent leur fonction sous forme de protéines. Trois types de réactions sont responsables de la transmission de l'information génétique et de sa transformation d'un gène à l'autre :

- L'information est conservée grâce à la *réplication* ; un acide nucléique double brin est dupliqué en deux copies identiques. L'information est exprimée selon un mode semi-réplicatif.
- La *transcription* produit un ARN dont la séquence est identique à celle des brins du duplex d'ADN. Une cellule eucaryote contient typiquement 20 pg d'ARN, dont moins de 5 % correspond à l'ARN messager (ARNm), au rôle central de vecteur de l'information génétique.
- La *traduction* convertit la séquence nucléotidique de l'ARN en une chaîne d'acides aminés qui constituent une protéine. Un ARNm est traduit en une séquence protéique ; les ARN de transfert (ARNt) et ARN ribosomiaux (ARNr) sont d'autres constituants de la machine protéique. Chaque ARNm contient au moins une région codante qui correspond à une séquence protéique (figure 1.1).

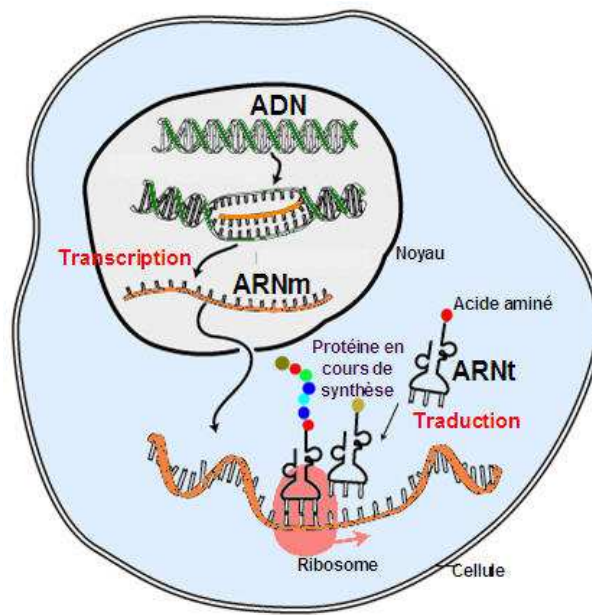


FIG. 1.1 – Le dogme central de la biologie moléculaire.

Voici quelques ordres de grandeur utiles : une cellule a une taille caractéristique de 10 μm . Dans une cellule eucaryote classique, on trouve 6 pg d'ADN génomique, 10 à 30 pg d'ARN dont 0,1 à 1,5 pg d'ARNm.

1.1.2 De la nécessité d'étudier la cellule à l'échelle individuelle

Les cellules d'un même type présentent, à l'échelle individuelle, une variété de comportements liée à une différence d'expression de gènes. Cette variation d'expression est due en partie à la nature discrète des événements moléculaires et cellulaires comme l'initiation de la transcription où le nombre fini de protéines est traduit par transcrit [Paulsson 2004]. Elle implique de nombreuses conséquences sur les mécanismes de différenciation cellulaire et peut entraîner des hétérogénéités phénotypiques dans une population de cellules pourtant maintenues dans un environnement homogène. L'étude de l'ensemble d'une population ne permet que d'obtenir des grandeurs moyennées et laisse ouverte des questions fondamentales concernant les gènes exprimés dans la cellule unique, les communications intercellulaires et la réponse des cellules à différents stimuli [Levsky 2003]. La principale raison de ce manque d'information est due à la grande difficulté d'étudier la cellule unique avec des techniques conventionnelles : perte de matériel génétique au cours des différentes opérations d'analyse, contamination et volume non adapté rendent l'expérience de cellule unique fastidieuse. Or, savoir quand et où un gène est exprimé apporte des informations cruciales sur le rôle potentiel des gènes ; cette connaissance a été à l'origine de la découverte des gènes [Brady 2000].

1.1.3 Approches expérimentales conventionnelles de l'étude d'une cellule unique

Les variations observables d'une cellule à l'autre, loin d'être des artéfacts, peuvent donc être mesurées, soit au niveau de l'ARN, soit au niveau de la protéine. Les techniques d'analyse au niveau de la protéine sont souvent plus informatives que les études sur l'ARN mais elles nécessitent une grande quantité de matériel vivant car les protéines ne peuvent pas être amplifiées. L'analyse des taux d'ARNm suffit à quantifier l'expression d'un gène ; la réaction de polymérisation en chaîne quantitative, précédée d'une transcription inverse (RT-PCRq), est la méthode la plus reproductible et quantitative pour identifier et quantifier des acides nucléiques (cf. annexe A et chapitre 2). Nous reviendrons sur les deux approches dans la partie consacrée à l'étude la cellule unique dans les systèmes microfluidiques section 1.2.2.

La biologie moléculaire de la cellule unique est une branche scientifique de la biologie relativement nouvelle. La première analyse de la cellule unique concerne la caractérisation de l'ADN mitochondrial en 1988 [Li 1988]. Les techniques employées pour étudier l'expression génique de la cellule unique impliquent une première étape d'isolation de la cellule avant analyse par la RT-PCR. Les méthodes conventionnelles utilisées pour isoler et trier les cellules sont basées sur les méthodes de micro-manipulation, telles que des aspirations du cytosol par *patch-clamp* [?] (consistant à mettre en continuité électrique une micropipette en verre remplie d'une solution ionique de composition définie avec la membrane d'une cellule vivante isolée) ou des aspirations de cellules individuelles dans une micropipette (les risques de contamination et de perte de matériel génétique sont importants), des microdissections par captures laser (rapides et efficaces mais délicates) et des cytométries de flux (pour le tri de cellules). Ces étapes sont ensuite généralement suivies d'une RT-PCR quantitative, méthode robuste et fiable. La potentialité de ces études offre de nouvelles perspectives dans l'étude des tissus hétérogènes [Hinkle 2003], notamment en neurologie pour la compréhension de mécanismes impliqués dans les maladies neurologiques [Hinkle 2003], mais aussi dans la détection et l'étude de pathogènes microbiens [Makino 2003] ou dans l'étude des tumeurs [Klein 2002]. De nombreux protocoles d'analyse de la cellule unique ont été élaborés [Liss 2002], [Hartshorn 2005]. Récemment Taniguchi *et al.* ont réussi à quantifier l'expression de quatre gènes d'une cellule unique par immobilisation de l'ADNc sur billes magnétiques et PCR successives sur le même échantillon [Taniguchi 2009]. Les ADNc ainsi fixés sont ensuite amplifiés par PCR successives ; les températures de cycles de PCR ont été optimisées de façon à ne pas complètement dénaturer l'ADNc à chaque amplification, le rendant disponible pour l'étude d'un autre gène (cf. figure 1.2). Les protocoles sur cellule unique impliquent une multitude d'étapes complexes et délicates, la principale difficulté résidant dans l'inadéquation entre les volumes manipulés avec les techniques conventionnelles (de 10 à 100 μL) et le volume d'une cellule ($\approx 10^{-6}$ μL). Pour pallier à cette difficulté, la microfluidique, parce qu'elle manipule des petits volumes de fluide, est un outil adapté pour l'étude de l'expression génique au niveau de la cellule.

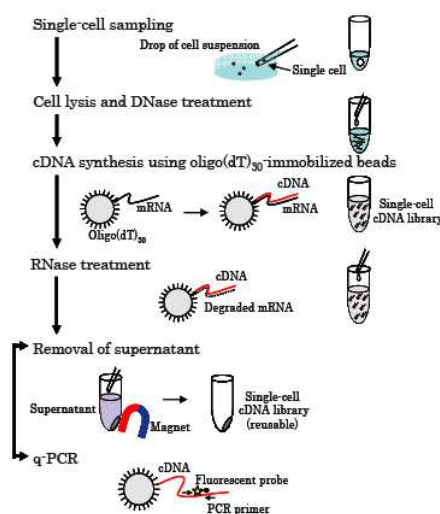


FIG. 1.2 – Les différentes étapes d’étude de quatre gènes d’une cellule unique à partir d’ADNc immobilisés sur billes magnétiques, d’après [Taniguchi 2009].

1.2 La microfluidique, un outil adapté à l’étude de la cellule

1.2.1 La microfluidique ou l’art de manipuler des petits volumes de liquide

La microfluidique étudie le transport de fluides dans des canaux de dimensions transverses allant de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres, et de longueur caractéristique le millimètre ou le centimètre. A cette échelle, les nombres de Reynolds sont inférieurs à 1, les effets inertiels (à l’origine de la turbulence) sont donc généralement négligeables.

Les premiers dispositifs microfluidiques ont vu le jour dans les années 80 avec quelques réalisations isolées, inspirées de l’utilisation de nouvelles techniques de microfabrication développées pour les composants électroniques afin de réaliser des systèmes miniatures au sein desquels circulaient des fluides. La microfluidique a réellement connu un essor dans les années 90 avec pour objectif des analyses en chimie ou biochimie, plus efficaces que les méthodes « macroscopiques » habituelles.

Le développement d’une technologie beaucoup plus légère que les techniques de gravures du silicium a révolutionné la thématique ; ainsi, l’apparition des systèmes en PolyDiMethylSiloxane (PDMS) fabriqués par lithographie douce, a permis la réalisation de circuits en des temps très courts avec des coûts de fabrication très faibles.

La microfluidique offre de nouvelles opportunités pour l’analyse des cellules. Grâce à des contrôles et des manipulations de petits volumes de fluides précis, elle ouvre des voies à l’analyse des constituants cellulaires.

1.2.2 Analyse de l'expression des gènes d'une cellule en microfluidique

Diverses méthodes expérimentales d'analyse d'expression génique ont été développées dans des microsystèmes ; une première approche concerne l'étude du protéome, une deuxième, l'étude du transcriptome. Alors que le génome est constant (aux mutations somatiques près) dans toutes les cellules d'un organisme, le protéome, tout comme le transcriptome, varie d'un type cellulaire à l'autre et selon la situation physiologique et de développement dans lesquelles se trouve chaque cellule.

Etude du protéome. Le défi de la protéomique consiste à trouver des moyens de mesurer les protéines actives à l'échelle du protéome et de connaître avec quels composants de la cellule elles interagissent (ADN, ARN, autres protéines et molécules). Une grande partie des variations de fonctionnement d'une cellule s'expliquerait au moins autant par la modulation de la quantité des protéines que par la présence ou l'absence de certaines d'entre elles. Huang *et al.* [Huang 2007] ont développé une nouvelle approche permettant de compter au niveau moléculaire plusieurs types de protéines exprimées au sein d'une cellule unique. La stratégie expérimentale repose sur l'utilisation d'une cellule microfluidique dans laquelle il est possible de manipuler une seule cellule, d'en extraire le contenu protéique, de marquer les protéines, les séparer et les quantifier en utilisant des techniques de microscopie de fluorescence adaptées au comptage de molécules uniques. Les variations de fluorescence de protéines identifiées par des études de génomique permettraient de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'évolution du cancer et dans le développement des résistances. Le degré d'activité des protéines se trouve cependant fréquemment modulé et régulé par des modifications post-traductionnelles ; la grande variabilité des protéines associée aux faibles quantités disponibles rendent critiques leur analyse au profit de l'analyse des acides nucléiques moins variables et détectables par amplification.

Etude du transcriptome. L'étude de l'expression des gènes consiste à caractériser et quantifier les produits d'expression de l'ADN, c'est à dire les ARNm, de manière à identifier dans un tissu, dans un état et à un moment donnés du développement, les séquences actives et donc à révéler le niveau d'expression des gènes dont elles sont issues. L'analyse du transcriptome fournit ainsi le profil d'expression des gènes dans des conditions physiologiques et pathologiques données et à un instant précis. Elle permet de comprendre la réponse des cellules à leur environnement, mais elle ne peut pas être utilisée pour caractériser directement les ARNm en quantités trop faibles dans une cellule ; une étape préalable d'amplification du matériel génétique est nécessaire. La méthode d'amplification la plus populaire est sans doute la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) précédée d'une transcription inverse (RT). La PCR est une technique d'amplification d'ADN, son développement a accéléré les progrès des études concernant la structure génétique d'une grande diversité d'organismes (cf. annexe A).

A un niveau fondamental, la miniaturisation des volumes en PCR a suscité un grand engouement et conduit à une diminution des temps de transferts thermique et massique. Le premier système de PCR miniaturisé à l'échelle microscopique utilisait une chambre

en silicone de volume caractéristique 25 à 50 μL placée sur un module à effet Peltier [Northrup 1993]. Ce système a amplifié une séquence du gène CAG impliqué dans le HIV.

Depuis, de nombreux systèmes miniaturisés ont été proposés et plusieurs revues répertorient et commentent ces systèmes dédiés à la PCR [de Mello 2001], [Kricka 2003], [Zhang 2006].

PCR en gouttes. L'utilisation de gouttes apporte une puissance supplémentaire à la microfluidique car elle autorise l'analyse haut débit. Un progrès substantiel dans la PCR microfluidique fut l'intégration de la détection en temps réel de l'amplification par ajout de sondes fluorescentes (cf. chapitre 2). Kiss *et al.* [Kiss 2008] ont intégré cette étape dans un système de PCR à flux continu : chaque goutte formée circule dans une phase d'huile fluorée et passe périodiquement dans des zones de températures différentes (figure 1.3). Le canal est constitué de zones d'étranglement permettant le passage d'une seule goutte, zones où la mesure de fluorescence est réalisée par excitation avec un laser à 561 nm et un photomultiplicateur.

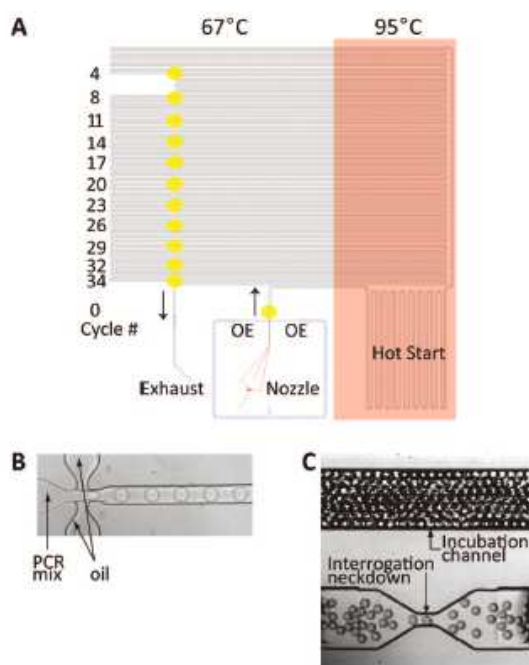


FIG. 1.3 – Puce de PCR à flux continu. (A) Schéma de principe du microsystème. Les zones en rose sont maintenues à 95 °C, les autres zones sont maintenues à 67 °C. Les zones en jaune correspondent aux mesures de fluorescence. (B) Génération des gouttes. (C) Les gouttes sont uniformes et passent une par une dans la constriction. D'après [Kiss 2008].

D'autres approches à flux continu ont été développées, notamment les travaux décrits dans [Chabert 2007], où les gouttes sont transportées dans un capillaire enroulé 35 fois autour d'un cylindre chauffant divisé orthoradialement en trois zones distinctes de température.

Dans le contexte d'une approche statique où les gouttes demeurent immobiles et où la température fluctue périodiquement, des systèmes de chauffage originaux ont été proposés.

Ainsi, par excitation des bandes vibrationnelles de l'eau, le chauffage par infrarouge (IR) optimise la durée des cycles thermiques. Le groupe de James P. Landers, pionnier de la méthode dans les microsystèmes, a amplifié un fragment de 211 paires de bases en 18,8 minutes pour 30 cycles en utilisant une lampe au tungstène [Roper 2007]; Kim *et al.* ont réalisé une PCR quantitative en temps réel sur des gouttes de volume 2 à 200 nL avec une radiation provenant d'un laser IR de 30 mW [Kim 2009].

L'étude de l'expression d'un gène particulier dans une cellule cible est réalisée sur l'ARN messager, présent en plus grand nombre que l'ADN génomique (présent en une seule copie). Elle se fait généralement par PCR précédée d'une transcription inverse. La RT consiste à synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir de l'ARNm (cf. annexe A). Cette étape, beaucoup plus délicate que la PCR et dont le rendement ne dépasse généralement pas 20 %, nécessite un soin particulier dans la préparation et le choix des réactifs. La miniaturisation de la réaction RT-PCR dans des gouttes a donné lieu à une seule publication à notre connaissance [Beer 2008] ; travaillant dans un système en verre muni de vannes destinées initialement à la chromatographie en phase liquide pour stabiliser les gouttes, Beer *et al.* ont réussi à isoler des virions à ARN dans des gouttes et à amplifier quantitativement leur ARN.

Etude de l'expression de gènes sur cellule unique en microfluidique. Au moment où la cellule unique provoque un véritable intérêt dans la communauté de la biologie moléculaire, la mesure haut débit de l'expression de gènes à partir d'une cellule constitue un défi en microfluidique. Le groupe de Stephen Quake fut le premier à le relever ; il réalisa notamment une puce en PDMS (figure 1.4) intégrant les étapes de lyse de la cellule, d'isolation et de purification de l'ARNm et de RT pour une à quatre cellules simultanément [Marcus 2006b].

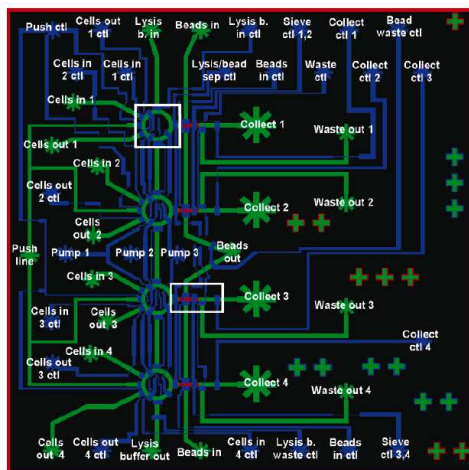


FIG. 1.4 – Schéma réalisé sous Autocad du système microfluidique d’analyse simultanée de quatre cellules. Les canaux bleus sont les canaux où circulent les fluides, ceux représentés en vert sont les canaux de contrôle, les zones en rouge sont les colonnes d’affinité utilisées pour purifier l’ARN, d’après [Marcus 2006b].

Ce même groupe a développé un microsystème de PCRq après isolation des cellules

par cytométrie de flux et RT en tube. Le système, de volume total $7.5 \mu\text{L}$, est constitué de 1200 chambres isolées, séparées par des systèmes de microvannes et destinées à accueillir au plus une copie d'ADN complémentaire d'une seule cellule. Le concept de PCR digitale a été repris par la société Fluidigm qui commercialise une puce de 48×48 ou 96×96 chambres destinées à accueillir jusqu'à 96 cellules et amplifier jusqu'à 96 gènes (cf. figure 1.5). Le système, d'une haute complexité technologique, est rempli par un robot et la PCR dans chacune des chambres est analysée par un appareil de détection spécifique. Le protocole consiste à réaliser tris des cellules, RT, étapes de préamplification et dilutions des ADNc en dehors du microsystème ; les solutions sont ensuite injectées dans les puits de la puce pour l'étape de l'amplification. La transcription inverse simultanée de plusieurs gènes de niveaux d'expression différents dans un grand volume sont la source de biais et peuvent conduire à la non détection des gènes les plus faiblement exprimés : les travaux de Bontoux *et al.* [Bontoux 2008] ont démontré la supériorité de la réduction d'échelle sur le rendement de la RT (74 % des gènes exprimés par une cellule sont détectés pour seulement 4 % avec des méthodes conventionnelles). Leur étude s'est portée sur une RT sur l'ensemble des gènes d'une cellule unique dans un microsystème accueillant 10 nL d'échantillon suivie d'une TS-PCR (TS pour "template switching").

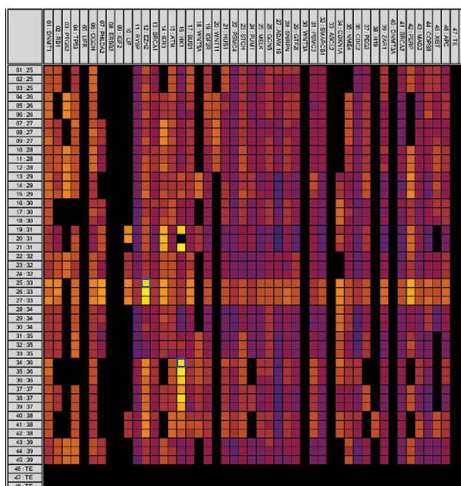


FIG. 1.5 – Représentation des différentes chambres de PCR digitale d'une puce 48×48 chambres commercialisée par Fluidigm. Les valeurs des Ct sont déterminées à partir d'un code couleur.

Citons également d'autres techniques d'amplification, dites linéaires, basées sur la transcription in vitro (IVT) d'ARN à partir d'ADN double brins et réalisées en micro-systèmes [Kralj 2009]. Elles consistent en la synthèse des ADN double-brins à partir des ARNm puis en la transcription des ADN en ARN (cf. figure 1.6). Au cours d'une PCR, les ADN peuvent en effet être amplifiés avec des efficacités différentes, générant des profils d'expression biaisés. Une IVT introduit théoriquement moins de biais d'amplification, mais les protocoles d'IVT sont souvent longs et laborieux. Pour l'étude de l'expression quantitative de gènes spécifiques, ce biais n'intervient théoriquement pas et la méthode

de PCR demeure la méthode de choix pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution.

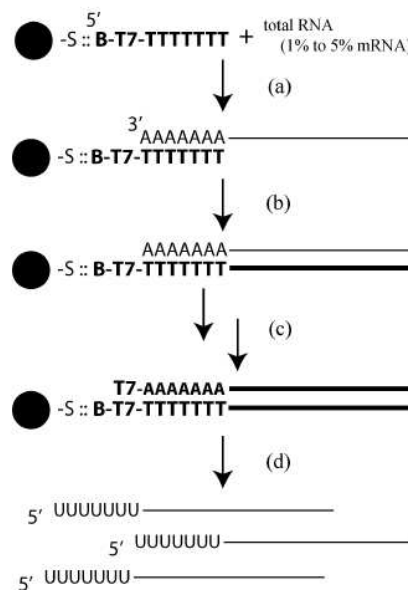


FIG. 1.6 – Protocole utilisé par la référence [Kralj 2009] pour générer les premiers brins d'ADNc. L'ARN est reverse transcrit (a) et (b), puis les ARN sont digérés et l'ADNc est synthétisé (c), l'IVT est réalisée à l'étape (d).

Lyse cellulaire dans des microsystèmes. L'analyse des constituants cellulaires nécessite au préalable la lyse de la cellule. Des méthodes appliquées dans les laboratoires ont été miniaturisées avec succès. La lyse chimique par ajout de tensioactifs, tels que le Triton X-100 et le SDS, a prouvé son efficacité en microsystèmes [El-Ali 2005], [Lee 1999]. Des procédés physiques de lyse ont été proposés en alternative à des lyses chimiques si l'utilisation de détergents interfère avec l'analyse. Di Carlo *et al.* [Di Carlo 003] ont réussi à lyser mécaniquement des cellules en les forçant à traverser des constriction nanostructurées.

Un procédé physique de lyse membranaire fréquemment utilisé consiste à électroporer irréversiblement les cellules par application d'impulsions électriques. La bicouche lipidique de la membrane plasmique, faiblement conductrice, sépare deux solutions ayant une force ionique différente (le cytoplasme et le milieu extracellulaire) ; la membrane se comporte donc comme un diélectrique et l'ensemble milieu externe, membrane, cytoplasme est modélisable par un condensateur en série avec des résistances. L'application d'un champ électrique uniforme induit un potentiel transmembranaire à l'origine de la perméabilisation.

Dans les microsystèmes, il est possible d'induire des champs électriques locaux élevés par intégration d'électrodes et d'obtenir des lyses électriques en 33 ms [McClain 2003]. D'autres méthodes de lyse sont possibles, on peut notamment citer les phénomènes de photolyse engendrés par :

- une émission laser en continu,
- une impulsion d'un laser pulsé. Ce laser crée un plasma autour de la cellule ; il

s'ensuit une émission d'ondes de choc et la formation de bulles de cavitation à l'origine de la rupture de la membrane plasmique. He *et al.* [He 2005] ont réussi à piéger optiquement une cellule dans une goutte par utilisation d'un laser infrarouge et à la lyser par émission d'une impulsion provenant d'un YAG-laser de 5 ns.

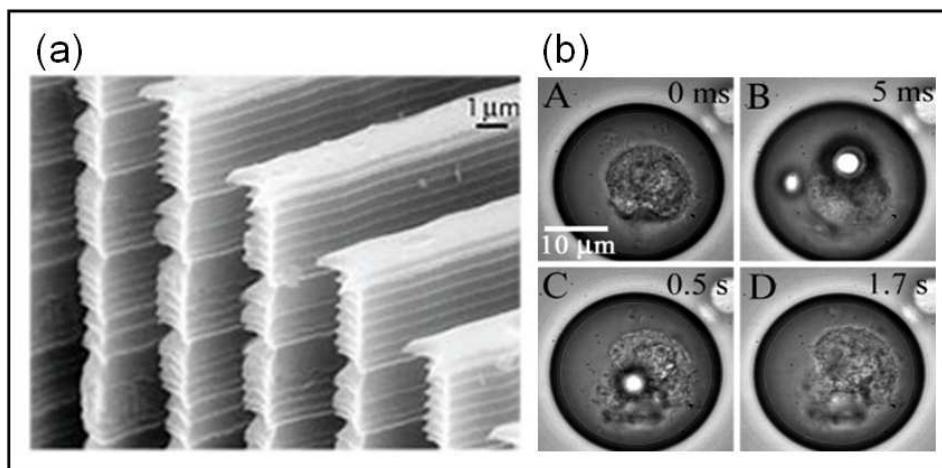


FIG. 1.7 – (a) Image en microscopie électronique à balayage du système de lyse mécanique à motifs tranchants. (b) Séquence vidéo acquise par une caméra rapide montrant la photolyse d'une cellule dans une goutte. Le pulse appliqué forme un plasma et des bulles de cavitation qui lysent rapidement la cellule (B,C).

La microfluidique est un outil adapté à l'étude de l'expression génétique de la cellule unique. Cependant, jusqu'à présent, la plupart des études se sont limitées à un nombre restreint de cellules étudiées simultanément. L'utilisation d'écoulements diphasiques et plus particulièrement la génération de gouttes, permet d'introduire la notion de haut débit, indispensable pour des études simultanées de population de cellules à l'échelle individuelle, chaque goutte jouant potentiellement le rôle d'un réservoir isolé pour une cellule.

1.3 La microfluidique discrète dans des gouttes

Les systèmes diphasiques ont été décrits en physique macroscopique [Hestroni 1980]. Au moment où deux fluides immiscibles se rencontrent, des comportements extrêmement complexes peuvent survenir et les régimes rencontrés sont difficiles à décrire. Ces études sont nées de motivations principalement industrielles comme le co-écoulement de pétrole et d'eau dans un pipe-line. A petite échelle, les phénomènes sont complètement différents : à condition de disposer de surfaces chimiques homogènes et avec éventuellement l'utilisation de tensioactifs, il est possible de générer des formes très régulières sur de larges plages de paramètres.

La microfluidique de gouttes ou microfluidique digitale (notion qui accentue sur la nature discrète et distincte des volumes de fluides en contraste avec la nature continue

d'autres systèmes) implique la génération et la manipulation de gouttes dans des micro-canaux. Voici quelques ordres de grandeur utiles : les dimensions typiques des canaux de microfluidique varient entre 10 et 100 μm et les débits volumiques s'échelonnent entre 10 et 1000 nL/s. Les gouttes générées, de volumes caractéristiques de 100 pL à 10 nL, sont produites à des fréquences de 10 à 10000 Hz, et se déplacent à des vitesses variant entre 1 $\mu\text{m/s}$ et 1 cm/s. Deux méthodes passives de génération de gouttes basées sur la géométrie des canaux sont communément utilisées. Ces méthodes permettent d'obtenir des variations de taille de l'ordre de 1 % bien en deçà de la polydispersité imposée par une technique traditionnelle consistant à agiter et cisailier deux fluides immiscibles.

1.3.1 Génération de gouttes dans des microsystèmes

Jonction en T. Première technique développée pour générer des gouttes de façon contrôlée en microsystème [Thorsen 2001], [Nisisako 2002], elle consiste en l'intersection d'un canal contenant la phase dispersée avec un canal contenant la phase porteuse. Les deux phases forment une interface à la jonction, et la phase dispersée, envahissant le canal principal, finit par se détacher (figure 1.9). Plusieurs modèles physiques ont été proposés pour décrire le mécanisme de rupture. Le premier décrit par Thorsen *et al.* [Thorsen 2001], propose un mécanisme lié à la compétition entre forces capillaires et forces visqueuses. D'autres groupes ont élaboré des modèles basés sur la chute de pression due à la présence d'une phase dispersée dans le canal [Garstecki 2006]. La génération de gouttes est affectée par de nombreux paramètres incluant la taille du canal secondaire relativement au canal principal [Dreyfus 2003] et le caractère mouillant de la phase continue sur les parois. Dans tous les cas, la taille des gouttes est ajustable par variation du rapport des débits entre la phase dispersée et la phase continue.

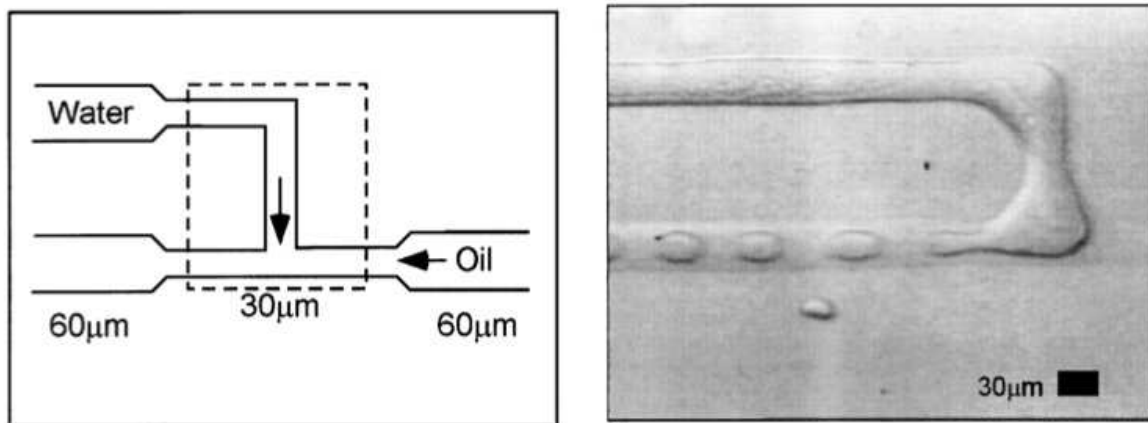


FIG. 1.8 – Géométrie typique utilisée pour la formation de gouttes à une jonction en T, d'après [Thorsen 2001].

Géométrie flow-focusing. Dans cette configuration, les phases continues et dispersées sont poussées colinéairement à travers un canal. La grande différence avec la géométrie

Bancroft [Bancroft 1913] .

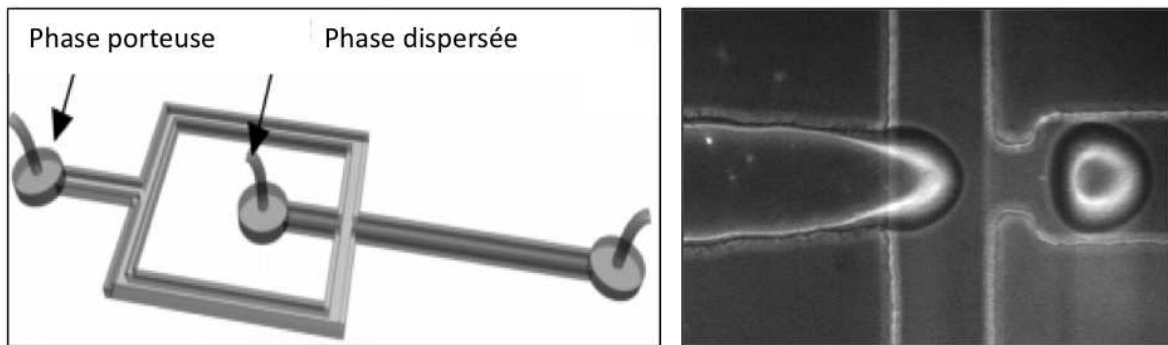


FIG. 1.10 – Géométrie typique utilisée pour la formation de gouttes à une jonction en flow-focusing.

La microfluidique digitale permet *a priori* un contrôle indépendant des gouttes ; ces réservoirs peuvent être transportés, mélangés et analysés individuellement.

1.3.2 Manipulation de gouttes

Fusion de gouttes. La coalescence contrôlée de gouttes est une opération importante pour réaliser des réactions dans les gouttes. Les méthodes de fusion se répartissent en deux catégories : les méthodes passives et actives. La géométrie des canaux est souvent utilisée pour contrôler la zone de fusion passive des gouttes. La méthode la plus simple est l'incorporation d'une expansion dans le canal [Liu 2007], [Bremond 2008] qui draine la phase continue entre deux gouttes successives. Les gouttes accèdent ensuite à une zone du canal plus étroite qui augmente leur vitesse, cause la rupture du film de fluide de drainage et, par voie de conséquence, la coalescence. Fidalgo *et al.* [Fidalgo 2007] ont réalisé un traitement de surface rendant localement le PDMS hydrophile ; une goutte qui arrive dans cette région est piégée par mouillage partiel sur la paroi et la goutte qui lui succède vient alors fusionner avec elle. Les techniques de fusion actives sont généralement réalisées par action d'un champ électrique. Des électrodes placées en parallèle du canal avec une gamme variée de tensions alternatives, continues ou par diélectrophorèse ont été utilisées pour fusionner des gouttes [Wang 2006], [Singh 2007]. Les méthodes passives présentent l'avantage de la simplicité de mise en œuvre ; cependant elles nécessitent des interfaces non stabilisées par des tensioactifs et limitent donc les couples de fluides utilisables. Les méthodes actives sont plus efficaces mais l'intégration d'électrodes augmente le degré de complexité de microfabrication ; de plus, la coalescence par champ électrique n'est induite que si les gouttes sont à proximité l'une de l'autre, il faut donc combiner astuce géométrique et électrodes pour obtenir une fusion robuste et reproductible.

Fission de gouttes. Comme la fusion de gouttes, des méthodes passives et actives ont été employées pour fissionner des gouttes. Les méthodes passives sont réalisées par

des géométries de canaux différentes telles qu'une jonction en T, des canaux de bifurcation [Ménétrier-Deremble 2006] ou la présence d'obstacle dans le canal [Link 2004]. La technologie basée sur l'électromouillage est la plus utilisée pour générer la fission active [Cho 2003]; des systèmes de gradients thermiques ont également été utilisés avec succès : une modification de température implique un changement de viscosité et de tension interfaciale; ainsi, il est possible d'attirer une goutte par variation de température comme le fait une électrode activée [Ting 2006].

Tri de gouttes. Le tri de gouttes constitue une étape importante pour l'isolation de gouttes d'intérêt. Les tris passifs correspondent à des systèmes pour lesquels un biais est appliqué de façon constante pour distinguer les espèces à trier. Chabert *et al.* ont ainsi réalisé un système capable de séparer les gouttes vides de celles contenant des cellules; la déviation, d'origine hydrodynamique, est basée sur la taille des gouttes, les gouttes "pleines" ayant un diamètre plus élevé [Chabert 2008]. Les tris par des méthodes actives peuvent être réalisés par diélectrophorèse [Choi 2005], mais également par thermocapillarité grâce à l'action d'un laser modifiant localement les propriétés de tension interfaciale des gouttes [Baroud 2007].

1.3.3 Stabilisation des gouttes pour une observation à long terme

L'observation et l'analyse à long terme de gouttes nécessitent leur stabilisation. De nombreux articles ont récemment montré la possibilité de réaliser des pièges géométriques pour stabiliser les gouttes. Schmitz *et al.* [Schmitz 2009] ont ainsi réalisé un réseau de milliers de chambres permettant de stocker des gouttes individuellement. D'autres groupes ont réalisé des pièges géométriques [Shim 2007], [Huebner 2009], [Edd 2009]. L'idée générale est de stabiliser des gouttes dans des régions hydrodynamiquement favorables pour la goutte; une fois piégée, la goutte est stabilisée par modification des résistances hydrodynamiques mais elle peut être récupérée.

La stabilisation des gouttes peut se faire de façon *ex situ*, par l'utilisation de vannes placées au niveau des tubes d'alimentation des fluides. Cette stratégie a été employée par Beer *et al.* : l'utilisation d'une vanne à six voies et deux positions, placée en position intermédiaire, empêche tout mouvement de fluide et stabilise les gouttes dans le canal microfluidique [Beer 2009]. Citons également la réalisation de systèmes hybrides PDMS/capillaires; les gouttes sont générées dans un système en PDMS et directement stockées dans un capillaire emboîté dans le microcanal. Une fois les gouttes collectées le capillaire est fermé à ses deux extrémités et les gouttes peuvent être stockées durablement [Li 2006].

Les gouttes sont des réacteurs quasi idéaux car ils créent des conditions expérimentales contrôlées et homogènes [Song 2003]. Leur grand ratio surface/volume leur confère des temps caractéristiques de transferts thermiques très courts. Chaque goutte joue potentiellement le rôle de réacteur isolé soumis à des recirculations internes favorables au mélange, comme nous le verrons au chapitre 3. Ainsi de nombreux groupes ont vu en la microfluidique un outil idéal pour des applications dans le domaine biologique et pharmaceutique, de part sa flexibilité et sa versatilité. Plusieurs revues ont été écrites à ce sujet

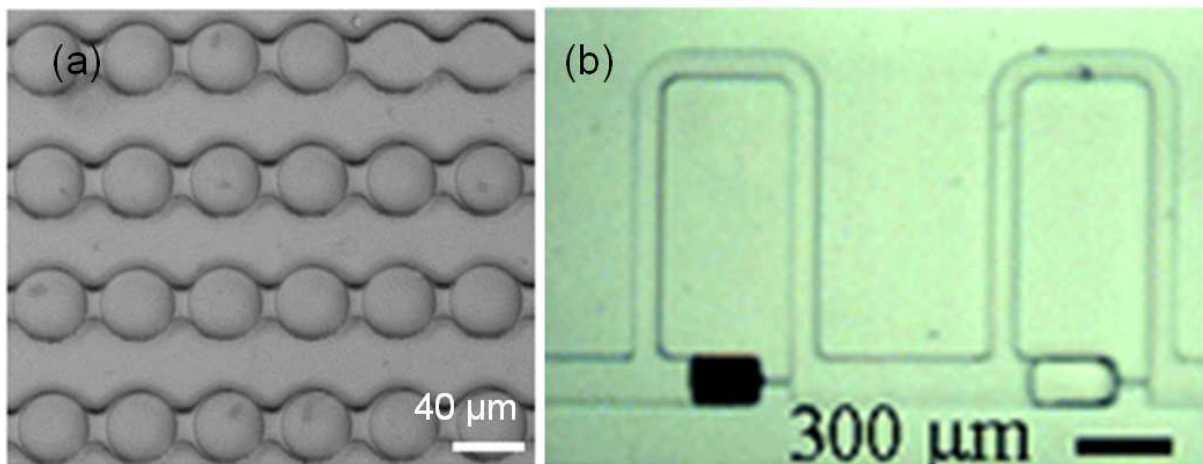


FIG. 1.11 – (a) Chambres microfabriquées dans le PDMS pour le stockage de gouttes. D’après [Schmitz 2009]. (b) Système de pièges de gouttes par vannes capillaires, d’après [Boukellal 2009].

[B. T. Kelly 2007], [Breslauer D.N. 2006], [Yager 2006]. Les manipulations de gouttes *in situ*, telles que fusion, fission et tri sont rendues possibles par des géométries particulières ou par des champs extérieurs appliqués. Elles demeurent néanmoins délicates, nécessitent un contrôle très précis des fréquences d’émission des gouttes et des flux. Ainsi chacune de ces étapes ont été présentées de manière isolée et peu de travaux incorporent une de ces opérations à un processus plus complexe d’analyse. L’intégration de toutes les étapes dans l’objectif de créer un microsystème d’analyse totale, quand elle n’est pas obligatoire, doit être étudiée avec circonspection : il est parfois plus rentable et surtout beaucoup plus simple d’externaliser certaines étapes d’un processus.

Tirant profit de la notion de haut débit apportée par les gouttes, je présenterai dans le chapitre 2 la solution développée pendant cette thèse, pour une étude quantitative en temps réel de l’expression de gènes d’intérêt sur des cellules encapsulées dans des gouttes.

Analyse quantitative haut débit de l'expression de gènes sur la cellule

Si $f(x) = \frac{x}{h}$
 Si h (connaissance de l'homme) $\neq \infty$
 Et si x (connaissance de ce qu'il y a à connaître du monde) $= \infty$
 Alors $f(x) \rightarrow 0$

2.1 Stratégie expérimentale développée lors de cette thèse

2.1.1 Conception des microsystèmes : matériaux employés

La géométrie flow-focusing a été choisie pour réaliser les gouttes dans les systèmes microfluidiques (cf. figure 2.1). La répétition des étapes de dénaturation à 95°C lors de cycles de PCR nous contraint à considérer les phénomènes d'évaporation. Le film d'huile séparant les gouttes du microsystème n'est en effet pas une barrière suffisante à l'évaporation de la phase aqueuse à travers le matériau constituant le microsystème. Or le PDMS, très utilisé pour réaliser des microcanaux, est fortement perméable à la vapeur d'eau et aux gaz de façon général. Cette propriété est mise à profit dans certaines applications, comme par exemple la construction de diagrammes de phases de mixtures de polymères dans des microcanaux [Shim 2007], ou la culture de cellules dans des chambres en PDMS rendue possible grâce à la perméabilité du PDMS aux gaz [Leclerc 2004]. Ses conséquences sont en revanche catastrophiques pour d'autres applications impliquant des temps de réaction longs et des compositions contrôlées [Mukhopadhyay 2007]. Dans le cas de la PCR, la diminution de volume des gouttes est dramatique car elle modifie les concentrations des différents réactifs et peut même conduire à la disparition totale du milieu réactionnel. Pour pallier à ce problème, des travaux ont montré la possibilité de coupler le PDMS à d'autres techniques permettant d'éviter ou de limiter la perméabilité à la vapeur d'eau. Des procédés multicouches de systèmes ont vu le jour [Marcus 2006a] : une couche correspond aux canaux fluidiques, une deuxième couche correspond à des canaux d'hydratation situés au-dessus du canal réactionnel, en permanence alimentés en eau, générant une barrière diffusive à la vapeur d'eau. Cette technique efficace présente cependant l'inconvénient de complexifier le protocole de fabrication et détériore également la qualité de détection optique ; l'ajout d'une couche augmente la hauteur totale du système et la présence d'eau risque de "gonfler" le PDMS et de diminuer sa transparence.

Une alternative est la réalisation de matériaux hybrides, par exemple l'ajout d'un implant en polyéthylène dans un système en PDMS qui limite la perméabilité à la vapeur d'eau et laisse le système transparent [Prakash 2006]; néanmoins cette solution n'est pas totalement satisfaisante puisqu'elle ne fait que diminuer d'un facteur trois la perméabilité à la vapeur d'eau du PDMS. D'autres méthodes de prototypage rapide ont été développées [Huang 2007], [Bartolo 2008], [Mukhopadhyay 2007]. Celle qui a retenu notre attention est la technologie inspirée des techniques de lithographie sous UV à partir de polymères photoréticulables développée par Bartolo *et al.* [Bartolo 2008]. Le polymère utilisé est la NOA 81 (Norland optical adhesive), une résine à base de thiolène initialement à vocation de colle pour fibres optiques. Le protocole expérimental de réalisation des microsystèmes est détaillé en annexe B. Les circuits en NOA 81 sont réalisés par des techniques d'impression par lithographie douce. L'idée principale réside en la réalisation d'un timbre en PDMS comportant les motifs d'intérêt; une goutte de colle est déposée ensuite entre ce timbre et un morceau de PDMS plat puis réticulée sous UV. Le dioxygène inhibant la polymérisation radicalaire de la NOA 81 [Rolland 2004], la perméabilité aux gaz du PDMS assure qu'une couche superficielle de polymère extrêmement fine demeure non réticulée et conserve ses propriétés adhésives. Ainsi, après une première réticulation, le système est découlé du timbre puis recollé sur une lame de verre (préalablement percée pour permettre l'arrivée ultérieure des fluides dans les canaux) et enfin réticulé de nouveau pour assurer l'adhésion au verre et la fermeture des canaux. Les canaux réalisés en NOA 81 présentent de nombreux avantages. Les principales caractéristiques retenues sont ses faibles absorption et perméabilité à la vapeur d'eau et sa très bonne transmission optique du fait de la faible épaisseur des circuits (cf. tableau 2.1).

	Indice optique à 532 nm	Module de Young (kPa)	Biocompatibilité	Perméabilité aux gaz
PDMS	1.4	750	oui	oui
NOA 81	1.56	1380000	oui	non

TAB. 2.1 – Tableau des principales caractéristiques du PDMS et de la NOA réticulés.

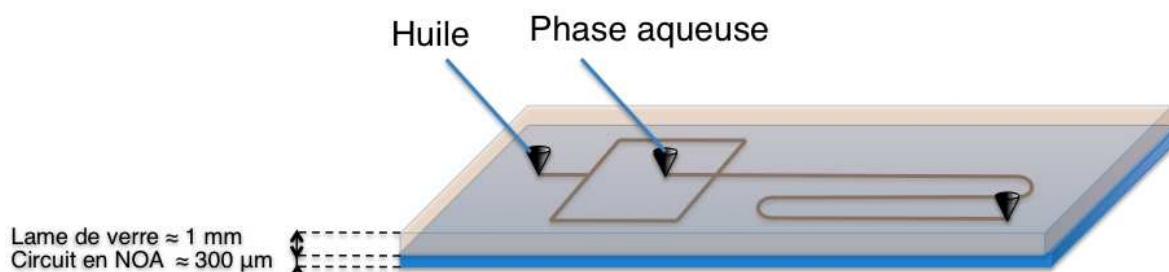


FIG. 2.1 – Représentation schématique d'un circuit en géométrie flow-focusing générant des émulsions d'eau dans l'huile.

2.1.2 Connectiques, stockage, génération et stabilisation des gouttes

Le suivi en temps réel de l'amplification par fluorescence nous impose d'observer dans le temps chaque goutte du système. Chaque goutte étudiée doit donc rester dans la fenêtre d'observation de la caméra. Au cours de cette thèse, plusieurs stratégies ont été développées. La première concerne la réalisation d'une chambre où sont stockées les gouttes après leur formation (figure 2.2(a)) ; cette géométrie simple permet de stocker un grand nombre de gouttes. Cependant pour obtenir une densité suffisamment grande, il est nécessaire de stocker des gouttes proches les unes des autres, voire uniquement séparées par un film de drainage. Les comportements dynamiques engendrés par le chauffage (incluant mouvements et rupture du film lubrifiant) ont pour conséquence la coalescence de gouttes.

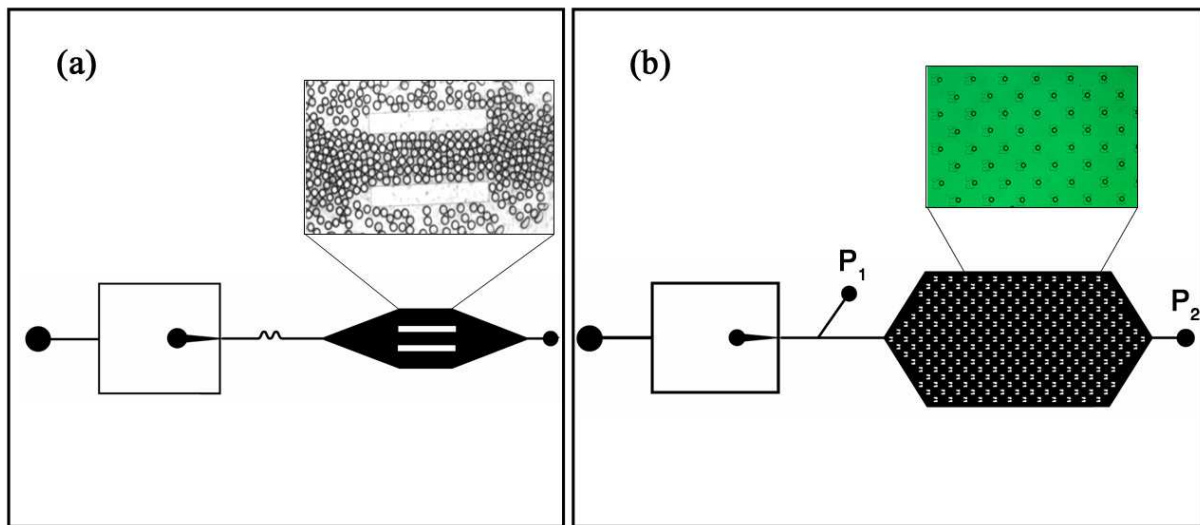


FIG. 2.2 – Géométries de stockage : (a) une chambre pouvant contenir des centaines de gouttes, (b) une chambre avec des pièges contenant une goutte au plus.

La deuxième stratégie concerne la stabilisation de gouttes dans des pièges ; de nombreux articles ont été publiés à ce sujet [Shim 2007], [Huebner 2009], [Edd 2009]. Nous nous sommes inspirés de la géométrie de pièges employée par la référence [Huebner 2009] pour réaliser le piégeage de gouttes. Le dispositif microfluidique est représenté figure 2.2(b). Les gouttes sont générées dans une géométrie flow-focusing ; tant que les gouttes ne sont pas uniformes et à la taille voulue, elles sont envoyées dans la sortie 1 (la pression P_2 est à l'état haut, P_1 est nulle) et, une fois le régime stationnaire établi, elles sont introduites dans la chambre de stockage par inversion des pressions en sortie (P_1 est à l'état haut, P_2 est nulle). Pour assurer la présence d'une goutte par puits, chaque piège possède un canal d'évacuation en son centre : un piège vide modifie peu les lignes de courants ; un piège occupé par une goutte change au contraire l'hydrodynamique locale, les lignes de courants sont alors écartées de son passage, empêchant une autre goutte de s'y stabiliser. Ce système très utile pour repérer les gouttes séparément au cours du temps ne s'est pas avéré une solution technologique convenable pour la PCR : au cours des cycles thermiques, les gouttes sortent de leur piège et leur repérage devient alors impossible. Ces

mouvements peuvent être évités par l'existence d'un flux d'huile permanent qui maintient la goutte dans les encoches. Cependant, ce flux d'huile minérale non saturée en eau contribue fortement à la diminution du volume des gouttes : la solubilité de l'eau dans l'huile minérale est de l'ordre 70 ppm à 25°C mais atteint 600 ppm à 95 °C. La stabilisation des gouttes, clé de l'observation et de l'analyse des résultats, nous a conduits à considérer l'intégration d'éléments de contrôle telles que des vannes. Le groupe de S. Quake a développé une technique élégante de fabrication de vannes en PDMS [Unger 2000]. La méthode repose sur la lithographie multicouches et tire bénéfice des propriétés d'élasticité du polymère. Le principe est simple : un canal actuateur est disposé perpendiculairement à un canal microfluidique, les deux canaux étant séparés par une membrane de PDMS. La mise en pression du canal actuateur défléchit suffisamment la membrane pour obstruer le canal fluidique. Le contrôle du canal actuateur permet une ouverture et une fermeture de la microvanne sur demande. Comparé à des vannes "tout ou rien" externalisées, le volume mort est négligeable. Le module élastique de la NOA est beaucoup trop grand pour réaliser des membranes en NOA flexibles, il n'est donc pas concevable de générer des vannes *in situ*. Cependant, le concept d'intégration et de contrôle des volumes est très important pour limiter les possibles contaminations biologiques. Couplant la notion de connectique et d'actuation nous avons développé des vannes microfluidiques dans des connectiques réalisées en PDMS [Galas 2009]. Ce couplage permet d'obtenir une connectique simple et universelle alliant un interfaçage rapide, une stabilisation des flux et un découplage dans la réalisation des canaux fluidiques du microsystème et des actuateurs. Le protocole de réalisation des "connectiques-vannes" en PDMS est détaillé en annexe B. Ces vannes, une fois réalisées, sont alignées et collées avec le microsystème par plasma à oxygène [Jo 2000]. La figure 2.3(a) et (b) représente respectivement une connectique et des images vues de dessus d'une microvanne ouverte et fermée. Utilisées dans un état bistable "ouvert-fermé", ces vannes doivent être dimensionnées correctement pour que les pressions d'actuation (typiquement 1 bar) suffisent à fermer le canal fluidique. La géométrie impose un grand rapport d'aspect dans les dimensions du canal microfluidique. Bénéficiant des études de dimensionnement publiées, [Studer 2004], [Goulpeau 2005], et tenant compte de la taille minimale admissible pour le passage de cellules, deux tailles de canaux ont été retenues (cf. tableau 2.2). Il est apparu qu'avec un canal fluidique de 200 μm de large, de 20 μm de hauteur et avec une épaisseur de membrane d'environ 70 μm , la génération de gouttes au niveau du flow focusing est déstabilisée par des mouvements fluctuants de la membrane mise sous pression ; il en résulte une génération de gouttes non monodisperses. Les canaux de 500 μm et une membrane plus épaisse donc plus rigide ont été retenus. Le stockage des gouttes est réalisé dans une succession de canaux droits.

Hauteur du canal de contrôle (μm)	Largeur du canal de contrôle (μm)	Hauteur du canal fluidique (μm)	Hauteur du canal fluidique (μm)
200	70	200	20
500	70	500	40

TAB. 2.2 – Les deux dimensions de vannes testées.

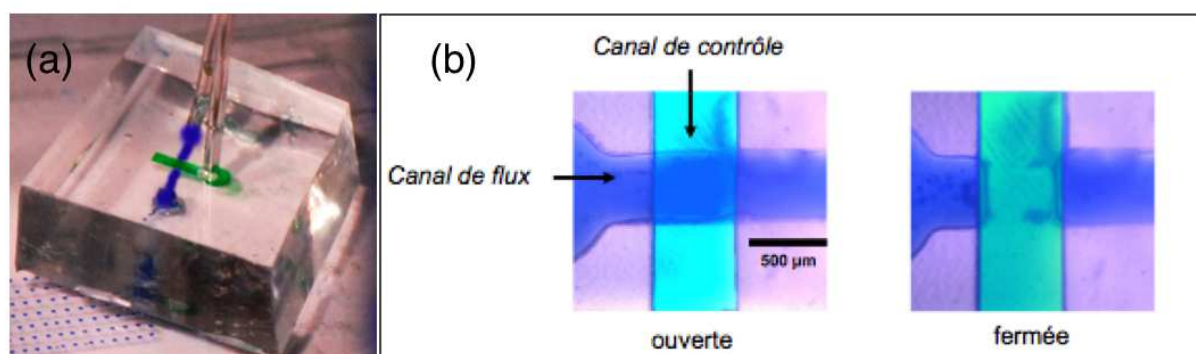


FIG. 2.3 – "Connectiques-vannes" : (a) photographie de la connectique en PDMS collée sur un circuit, (b) vue de dessus de la vanne respectivement ouverte à gauche et fermée à droite.

Injection des réactifs. Les fluides peuvent être contrôlés soit en débit par des pousse-seringues, soit en pression par gravité ou à l'aide de contrôleurs de pression. Dans cette application, l'option "contrôleur de pression" a été retenue : les temps de réponse à une variation de consigne sont beaucoup plus faibles qu'avec des pousse-seringues. L'alimentation en fluide du système ainsi que l'actionnement des microvannes sont effectués par un contrôleur de pression commercial (MFCS 8C, Fluigent Technologies) disposant de 8 voies indépendantes et reliées au système par l'intermédiaire de tubes en polymère de type tygon. Le volume typique du milieu réactionnel contenant l'échantillon biologique préparé avant injection est de $10\ \mu\text{L}$, le volume consommé pour générer 200 gouttes de $4\ \text{nL}$ est de $800\ \text{nL}$. La plus grosse consommation de fluide intervient pendant le régime transitoire de génération de gouttes précédant la mise en place du régime permanent optimal pour le remplissage du système. Avant la génération des gouttes de réactifs, une première phase d'étalonnage des pressions est systématiquement réalisée avec de l'eau MilliQ. La fermeture des vannes permet un changement de réactifs et une déconnexion des tubes d'arrivée des fluides sans aucun risque de mouvements intempestifs d'huile dans la voie d'entrée de la phase aqueuse. Pour limiter les contaminations et la perte de matériel, le milieu réactionnel de RT-PCR est prélevé au moyen d'une pipette (volume de prélèvement entre 0.1 et $20\ \mu\text{L}$) et le cône de pipette est directement connecté au tube mis sous pression : l'élasticité du tygon suffit à rendre étanche la jointure cône-tube sous pression.

Analyse de la stabilisation des gouttes avec les microvannes. Les gouttes sont générées puis stockées dans une succession de canaux droits parallèles ou dans une géométrie circulaire type colimasson (voir figure 2.4). Le système est ensuite fermé par actionnement des microvannes à chacune des entrées-sorties de fluide. En principe, une seule vanne fermée suffit à stabiliser le système mais l'existence de surfaces libres laisse place à de possibles mouvements liés à d'éventuelles dilatations. La figure 2.5 représente le mouvement typique d'une goutte pendant deux cycles de température, chaque cycle correspondant à un palier à 60°C pendant 30 s, suivi d'un palier à 95°C pendant 10 s.

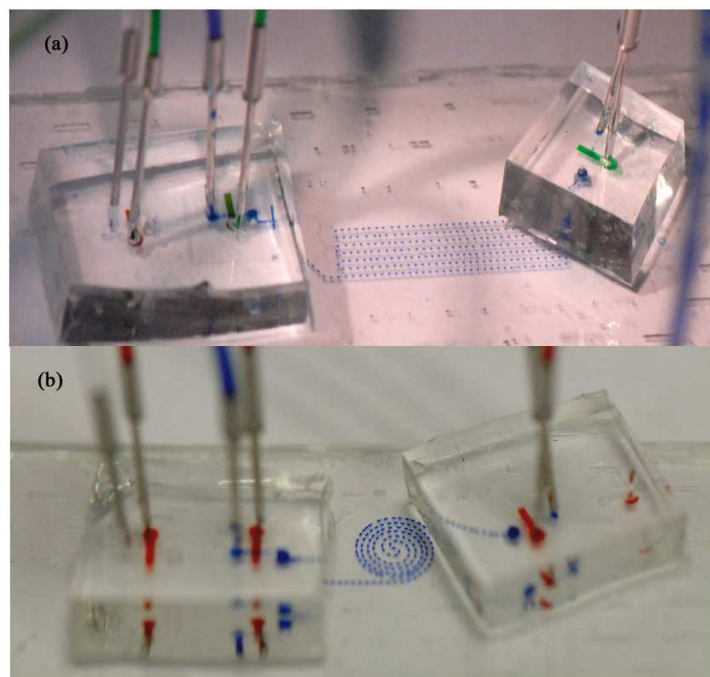


FIG. 2.4 – Les deux géométries utilisées : (a) géométrie droite, (b) géométrie en colimasson.

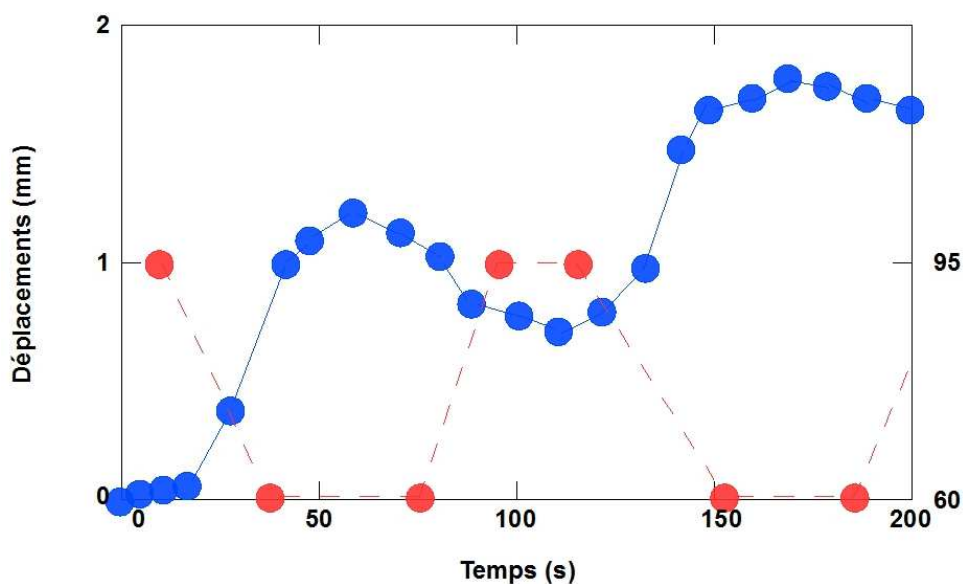


FIG. 2.5 – Mouvement typique d'une goutte sur deux cycles, lié à la dilatation du matériau. La courbe en rouge correspond à la température, la courbe en bleu correspond au déplacement des gouttes.

Il apparaît très clairement un mouvement périodique à chaque gradient de température, de valeur moyenne non nulle car les gradients ne sont pas les mêmes en chauffage et en refroidissement. Ces mouvements sont dus aux diverses dilatations : dilatation thermique de la NOA et dilatation des connectiques en PDMS.

Amélioration de la stabilité. Partant du constat que :

- l’analyse RT-PCR quantitative sur gène spécifique ne nécessite aucun post traitement : après amplification, l’analyse est achevée et la récupération des gouttes ne trouve pas d’application, excepté peut-être lors de la phase de caractérisation du système et du rendement de la réaction en gouttes,
- les technologies rapides employées nous permettent de réaliser des puces à usage unique, limitant ainsi les éventuelles contaminations entre échantillons,

un système permettant un blocage *in situ* des gouttes a été développé par insertion de polymère photoréticulable en amont et en aval de la zone de stockage des gouttes. Le circuit modifié est représenté en figure 2.6. La sortie se divise en trois canaux dont deux sont perpendiculaires au canal principal et munis de microvannes. Une fois les gouttes contenant l’échantillon biologique générées dans la zone de stockage, l’entrée des réactifs est alimentée par du polymère photoréticulable, la NOA 89 (Norland optical), très semblable chimiquement à la NOA 81 mais moins visqueuse (les viscosités des colles NOA 81 et 89 sont respectivement de l’ordre de 300 cP et de 20 cP à 25 °C). Les sorties étant fermées, l’arrivée de NOA 89 remplit les canaux d’entrée des fluides sans déplacer les gouttes (zone 1 de la figure 2.6). La lampe UV est focalisée au moyen d’un objectif de microscope au niveau de la croix du flow-focusing, générant ainsi une obstruction irréversible. Cette étape est suivie par l’ouverture des vannes aux sorties b et c ; le polymère alors injecté dans l’une de ces deux sorties remplit le canal qui les relie. Après réticulation aux UV en sortie, les gouttes sont stabilisées en amont et en aval du canal. Il est important de protéger la zone 2 de stockage des gouttes par un masque noir absorbant pour ne pas dégrader les enzymes et les sondes fluorescentes par une exposition aux UV (risque de dégradation et de photoblanchiment). Lors des cyclages thermiques, le mouvement des gouttes n’est pas nul du fait d’une dilatation du matériau alliée à des phénomènes de déplacement relatif de gouttes par rapport à la phase porteuse ; toutefois, la conservation de la matière et le confinement imposé assurent un déplacement très faible autour de la position d’équilibre. Ainsi, la réticulation de photopolymère *in situ* est un outil efficace de stabilisation des gouttes. Les microvannes sont cependant une alternative intéressante pour des analyses qui nécessitent une récupération des gouttes sans suivi en temps réel.

2.1.3 Montage expérimental

2.1.3.1 Détection

La détection de fluorescence est réalisée *via* un stéréomicroscope ou un macroscopie (Nikon) équipé d’un filtre de fluorescence (filtre monobande FAM de longueurs d’onde caractéristiques 490 nm en excitation et 520 nm en émission, ou filtre à bande passante multiple FAM/Texas Red caractérisé par les longueurs d’onde 490 nm, 580 nm en excita-

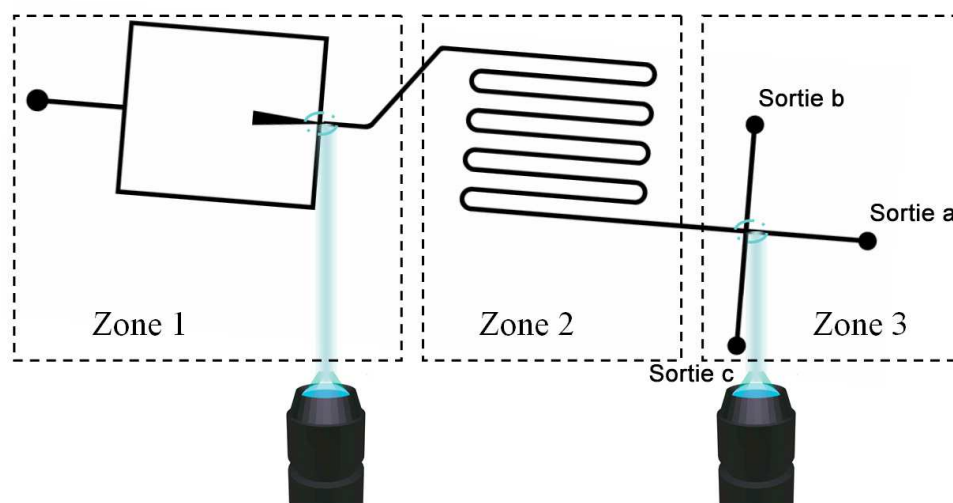


FIG. 2.6 – Circuit retenu pour l'analyse RT-PCR temps réel. Les deux zones illuminées correspondent aux endroits où un bouchon de polymère réticulé est formé.

tion et 520 nm, 620 nm en émission). Ces deux dispositifs d'observation permettent une observation complète de la zone de stockage des gouttes. La différence principale entre microscope et stéréomicroscope se situe au niveau du prisme, présent uniquement dans le stéréomicroscope, qui sépare le faisceau lumineux principal en deux faisceaux déviés de l'axe optique principal vers chacun des deux oculaires ou bien vers un oculaire et la caméra. Cette déviation implique des distorsions appelées parallaxes. Dans le cas du microscope, le faisceau lumineux émergent sur la caméra n'est pas dévié. En revanche, pour les deux systèmes optiques, les ouvertures numériques sont plus faibles que pour un microscope optique classique et les aberrations géométriques liées au grand rayon de courbure des objectifs (certains rayons lumineux ne passent pas au centre des lentilles) ne sont pas négligeables. Ces défauts optiques ne perturbent pas les mesures de fluorescence à notre échelle, où la sensibilité plus que la résolution joue un rôle prépondérant. Les échantillons sont éclairés au moyen d'une fibre optique UV (Nikon Intensilight) et d'un shutter intégré à la lampe ; les images sont prises au moyen d'une caméra sensible (EM CCD Camera C9100, Hamamatsu). La prise d'image est synchronisée à l'ouverture/fermeture du shutter *via* le logiciel libre Micromanager. La figure 2.7 représente une photographie de l'ensemble expérimental de détection de la fluorescence émise par les gouttes. Dans le cas de l'observation simultanée d'un échantillon en fluorescence avec deux longueurs d'onde différentes, le filtre à passe bande multiple est couplé à un système de détection optique (Optosplit II, Cairn) placé entre la caméra et la binoculaire, capable de décomposer la lumière en deux bandes spectrales. Son schéma de principe est représenté figure 2.8. Un miroir dichroïque décompose le faisceau incident en deux bandes spectrales. Sur chacun des axes des faisceaux émergents, un filtre est ajouté pour ne récupérer que les longueurs d'ondes d'intérêt. Une fois filtrés, les deux faisceaux sont collectés sur deux zones distinctes du capteur CCD ; par ajustement de la rotation des différents miroirs, il

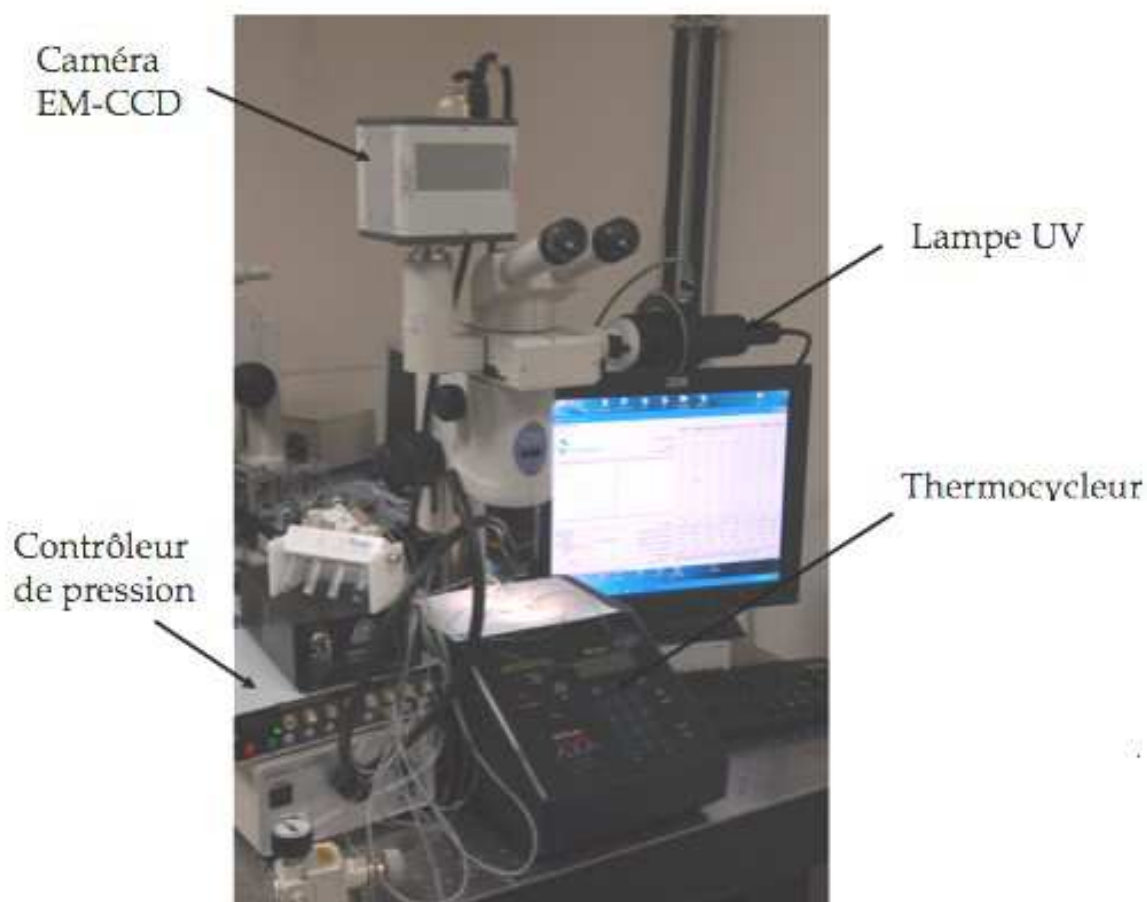


FIG. 2.7 – Photographie du montage expérimental de détection en temps réel de la fluorescence émise par les gouttes.

est possible d'obtenir deux fenêtres distinctes d'observation représentant la même région d'intérêt de l'échantillon, mais excitée à deux longueurs différentes.

2.1.3.2 Thermalisation

Le choix de réalisation de la PCR en flux continu ou en statique demeure discutable. Le système de chauffage en flux continu s'affranchit des limites imposées par la performance des systèmes de thermalisation en termes de temps de réponse. Cependant le contrôle du flux et des temps d'équilibration de pression sur des durées de l'ordre de l'heure demeure très délicat. Par ailleurs, le suivi en temps réel des gouttes est plus facile dans le cas d'une chambre statique autorisant l'observation d'un grand nombre de gouttes par un seul cliché de caméra. Dans notre cas, les cycles en température sont imposés statiquement par un thermocycleur à effet Peltier programmable (PTC 200, MJ Research). Ces appareils, initialement conçus pour de la PCR, présentent l'avantage d'être optimisés pour les températures d'intérêt de la RT-PCR et de délivrer une température homogène sur

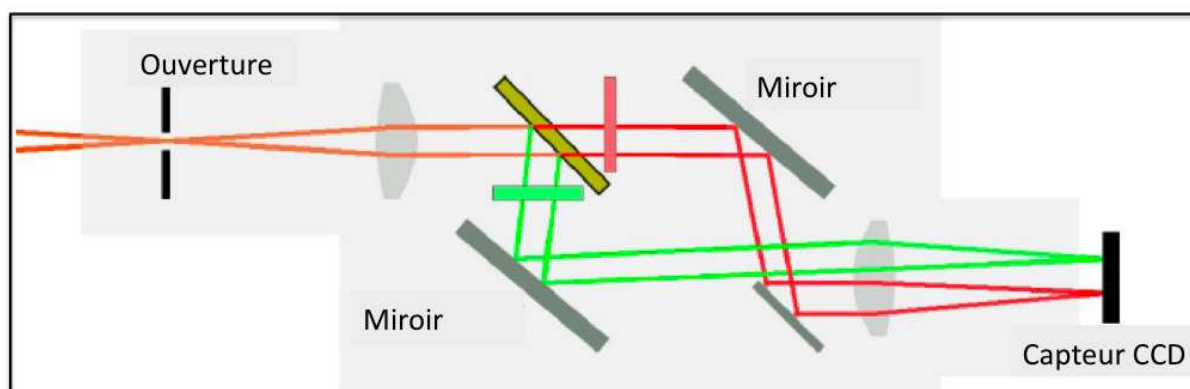


FIG. 2.8 – Représentation schématique du principe de l'optosplit. Le faisceau incident est séparé en deux faisceaux émergents.

l'ensemble de la zone de chauffage. Les vitesses de refroidissement/chauffage atteignent 3°C/s et l'homogénéité de la température atteint 0.4°C en 30 secondes. La non intégration du système de chauffage n'optimise pas les temps nécessaires à la réalisation de la RT-PCR : la miniaturisation réduit les temps de réponse face à des variations de consigne. Cependant l'action des enzymes pendant l'étape d'élongation est fortement dépendante de la température ; une erreur, même minime, sur la consigne de température peut être catastrophique pour les rendements de PCR. L'étape d'élongation par les enzymes est, de plus, l'étape la plus longue du processus de PCR, indépendamment de tout dispositif de chauffage. L'utilisation d'un élément à effet Peltier intégré au microsystème couplé à un PID (proportionnel intégral dérivateur) demanderait un étalonnage répété et délicat ; l'augmentation des gradients thermiques temporels est de plus souvent couplée à des dépassements de consigne. Il est en effet facile d'imposer une consigne stable mais beaucoup plus difficile d'osciller périodiquement entre deux températures, rapidement et précisément, sans dépassement (propriétés des systèmes caractérisées par une fonction d'ordre supérieur à 1). D'autres solutions d'intégration de modules thermiques sont pourtant envisageables [Roper 2007] mais elles ne sont pas étudiées dans ce manuscrit car leur mise en oeuvre est délicate et elles n'offrent pas réellement d'autres avantages qu'un gain de temps.

Pour s'assurer du bon fonctionnement du module à effet Peltier et du bon contact thermique entre l'appareil et le microsystème, le système a été étalonné avec une sonde de température absolue, les Molecular Beacons (MB) [Dodge 2004], [Yamamoto 2002]. Les MB sont des oligonucléotides courts qui ont la particularité de se replier sur eux-mêmes à basse température. Si un fluorophore et un inhibiteur sont greffés à leurs extrémités, dans la configuration repliée, le fluorophore n'émet pas de fluorescence par phénomène de FRET. A haute température, le MB change de configuration, il se déplie ; fluorophore et inhibiteur sont alors suffisamment éloignés pour que la molécule émette de la fluorescence. Le MB utilisé est FAM-GCTCTGTATGGTTAATTCGAATCTTGACAGAGC-Dabcyl à la concentration de 250 nM dans une solution MilliQ tamponnée (contenant 50 mM de Tris-

HCl, pH = 8 et 0.15 X SSC). En pratique on mesure la fluorescence du MB injecté dans le microcanal en faisant varier la température graduellement de degré en degré. On réalise de même avec le nucléotide sans l'inhibiteur pour tenir compte de la dépendance du rendement quantique du fluorophore avec la température. Cette courbe est comparée à la courbe obtenue dans un fluorimètre parfaitement thermalisé (tel que le Lightcycler 480 de chez Roche Applied Science). Les deux courbes se superposent (figure 2.9), il est donc possible de conclure que la consigne du thermocycleur correspond à la température *in situ*.

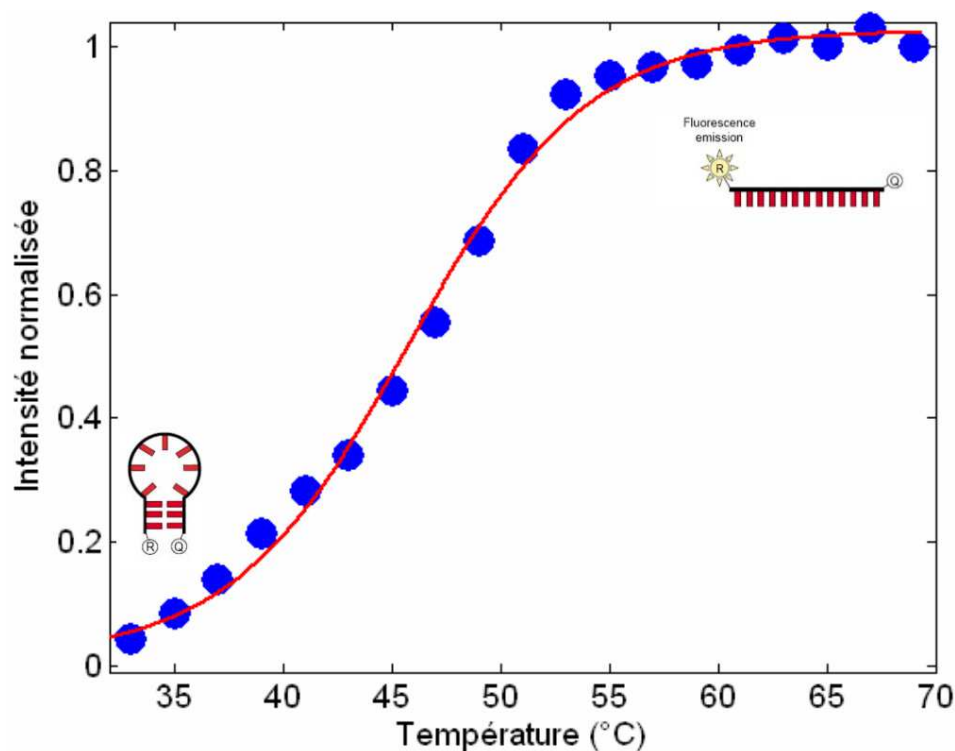


FIG. 2.9 – Signal de fluorescence du MB normalisé par le signal de fluorescence du MB sans inhibiteur en fonction de la température. La courbe expérimentale se superpose avec celle d'un thermocycleur parfaitement thermalisé.

2.1.3.3 La PCR quantitative

La transcription inverse suivie de PCR quantitative est une méthode de plus en plus populaire pour quantifier l'expression de gènes pris individuellement. La PCR classique n'est généralement pas quantitative, puisque l'on observe le produit final de la réaction après une synthèse importante de produit, quand le taux de la réaction de synthèse de nouvelles molécules sature. De ce fait, de petites différences de quantité de cible au début de la réaction sont masquées. La méthode de PCR quantitative la plus précise consiste à suivre en temps réel l'amplification par visualisation de la phase exponentielle de la

réaction. Le suivi est réalisé au moyen d'un fluorochrome spécifique à l'ADN ou par une sonde oligonucléotique fluorescente spécifique à une séquence.

La figure 2.10 représente une courbe typique de PCR temps réel par suivi de fluorescence à chaque cycle.

On distingue plusieurs phases. Lors de la première phase, nommée phase d'initialisation, l'intensité de fluorescence est trop faible pour pouvoir être mesurée par le détecteur. Il s'en suit une phase d'augmentation de la fluorescence, d'abord de façon exponentielle puis de façon linéaire, la polymérase devenant facteur limitant. La dernière portion de courbe correspond aux phases d'amortissement puis de saturation du fait, soit de facteurs limitants non constants (dNTP, fluorophore, etc.), soit de dégradation de l'activité enzymatique ou de la qualité de fluorescence. La principale difficulté réside dans la détermination du cycle PCR au-delà duquel la mesure est significative et ne correspond plus à du bruit. On parle de cycle seuil C_t , et il s'agit en quelque sorte de la sensibilité de détection de l'instrumentation. Il existe globalement à l'heure actuelle deux types de chimie applicables à la méthode PCR temps réel : celle des intercalants et celle des sondes d'hydrolyse.

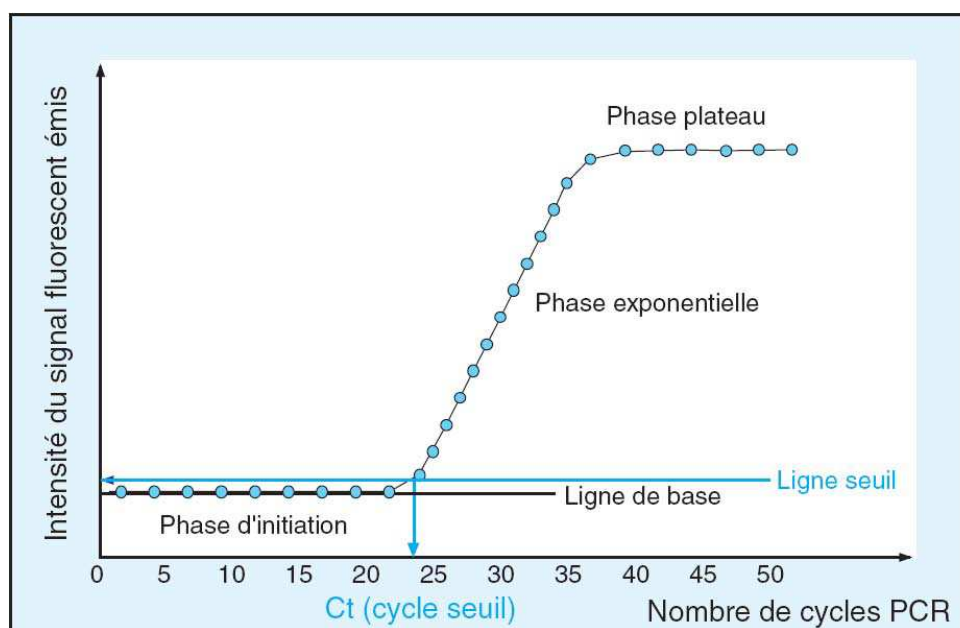


FIG. 2.10 – Courbe caractéristique de fluorescence d'une PCR quantitative en temps réel.

Chimie des intercalants. La chimie des intercalants est basée sur l'utilisation de marqueurs fluorescents lors de leur fixation à l'ADN double brin et après excitation (le sybr green ou SG et le bromure d'éthidium ou BET). Le SG est plus utilisé que le BET (qui a été utilisé dans les travaux fondateurs de la PCR temps réel [Higuchi 1992] car il permet d'obtenir des signaux plus puissants. Ce n'est pas réellement un intercalant car il ne s'intercale pas entre les bases de l'ADN, mais il se loge dans le sillon mineur de l'ADN double brin en cours de synthèse toutes les 10 bases environ. Sa forme non liée est très faiblement fluorescente, alors que sa liaison à l'ADN lui permet d'émettre,

après excitation, une fluorescence intense. Au cours de la PCR, tout l'ADN devient simple brin après dénaturation. A ce stade, le SG ne se lie pas à l'ADN et la fluorescence est faible. Pendant la phase d'appariement, les amorces de PCR s'hybrident sur la séquence cible et forment de petites zones double brin dans l'ADN auxquelles le SG peut se lier, augmentant par conséquent la fluorescence. Pendant la phase d'élongation de la PCR, de plus en plus de SG se lie à l'ADN double brin synthétisé. A la fin de cette phase, tout l'ADN est double brin et permet un maximum de liaison du marqueur. La fluorescence est enregistrée à la fin de la phase d'élongation après excitation à 530 nm du SG. La plus grande limitation de cette technique est sa non spécificité, ainsi que sa dépendance à la longueur de l'ADN. Pourtant, cette méthode reste très sensible et reproductible, elle est donc un bon choix pour les études de faisabilité ou de calibration.

Chimie des sondes. La chimie des sondes est basée sur le principe de FRET ("fluorescence resonance energy transfer"), phénomène par lequel l'énergie émise par un fluorochrome appelé émetteur ou "reporter" est absorbée par un inhibiteur ou "quencher" qui la réémettra à son tour dans une longueur d'onde différente ou sous forme de chaleur. Pour que cette absorption fonctionne il faut que reporter et quencher soient proches, et que leur spectre respectivement d'émission et de réception se chevauchent, mais non l'inverse. Ainsi, en concevant des sondes pour lesquelles reporter et quencher se trouvent très proches, puis éloignés après la réaction que l'on souhaite observer, la fluorescence du reporter devient un marqueur directe de la réaction. Parmi ces sondes les plus utilisées sont :

- les sondes Taqman, cette sonde (figure 2.11) est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3' [Livak 1995]. L'extrémité 5' porte le fluorophore donneur souvent dérivé de la fluorescéine. A l'extrémité 3', se trouve le fluorophore quencher qui est habituellement un dérivé de la rhodamine. Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores liée à la petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides, soit moins de 55 angströms entre les deux fluorophores), l'énergie absorbée par le fluorophore donneur excité est transférée par FRET au fluorophore accepteur. Le spectre d'excitation de l'inhibiteur ne chevauchant pas le spectre d'émission du fluorophore donneur, le quencher absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence. La particularité du système Taqman est d'exploiter l'activité 5'-3' nucléase de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces [Holland 1991]. Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le fluorophore donneur de l'effet quenching exercé par l'inhibiteur et ainsi de rétablir son émission de fluorescence (figure 2.12). L'intensité de la fluorescence émise par le fluorophore donneur, couramment dénommé fluorophore reporter dans une sonde Taqman, est mesurée en fin de chaque cycle d'amplification.
- Les sondes d'hybridation phare ou Molecular Beacons (MB) [Tyagi 1996] consistent en une boucle d'ADN avec une partie simple brin en boucle, complémentaire de la séquence cible, et une partie double brin terminée de part et d'autre par un



FIG. 2.11 – Une sonde d'hydrolyse telle que Taqman est constituée d'un fragment nucléotidique et de deux fluorophores, une émetteur et un inhibiteur.

fluorophore et son inhibiteur (voir figure 2.13). Après la dénaturation de l'ADN pendant la réaction de PCR, la partie simple brin du beacon peut se lier au simple brin d'ADN, ouvrant ainsi sa boucle et éloignant le fluorophore de son inhibiteur ; une augmentation du signal de fluorescence en résulte. La différence notable avec les sondes de type Taqman est l'aspect réversible de cette augmentation de fluorescence, la boucle pouvant se dissocier du simple brin et se refermer lorsque la température s'élève.

- De nouvelles sondes d'hydrolyse nommées "Locked Nucleic Acid" (LNA) ont fait leur apparition récemment. Ces sondes fonctionnent sur le même principe que les sondes Taqman mais ont une chimie modifiée (voir figure 2.14). Ces sondes sont des analogues synthétiques d'acides nucléiques caractérisés par la présence d'un méthylène entre les positions 2'-O et 4'-C du ribose. Les LNA peuvent se lier à leurs séquences cibles complémentaires et former des duplex LNA/ADN, LNA/ARN ou LNA/LNA. La stabilité de ces duplex est très élevée comparée à celle des duplex ADN/ADN ou ARN/ARN. Ces sondes augmentent la spécificité de l'hybridation.

Les sondes fluorescentes apportent un double niveau de spécificité, limitant ainsi l'amplification de produits non spécifiques. Elles permettent aussi un multiplexage de la réaction de PCR par utilisation de fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes. On peut ainsi dans un même tube amplifier des fragments d'ADN distincts et repérer indépendamment le résultat de chaque amplification en utilisant des sondes spécifiques de chaque fragment émettant à des longueurs d'ondes disjointes, dans la mesure où les spectres d'émission sont disjointes. Cette description présente de manière non exhaustive les principales technologies ; on peut cependant rencontrer d'autres types de sondes (telles que les sondes scorpions, peu utilisées, dont le principe repose sur celui des molecular beacons).

La quantification des acides nucléiques peut se faire soit de façon absolue après établissement d'un étalonnage, soit de façon relative par rapport à un gène de référence [Tse 2003].

- Quantification absolue par étalonnage avec un standard : les cinétiques sont mesurées pour différentes concentrations du gène ou transcrit cible. On en déduit une

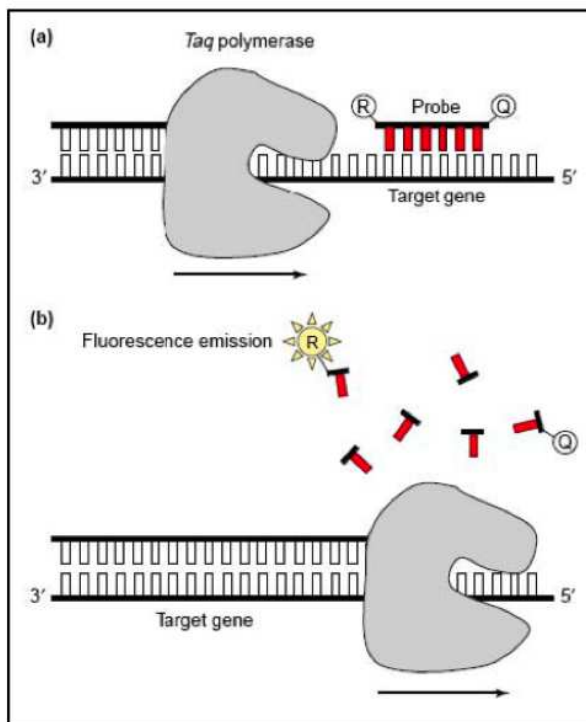


FIG. 2.12 – Principe d'une sonde d'hydrolyse telles qu'une sonde Taqman.

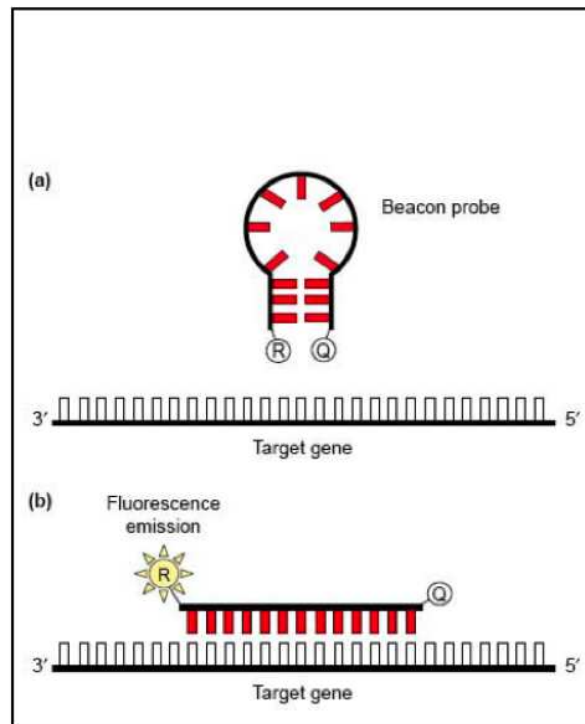


FIG. 2.13 – Principe d'une sonde d'hybridation phare telle qu'une molecular beacons.

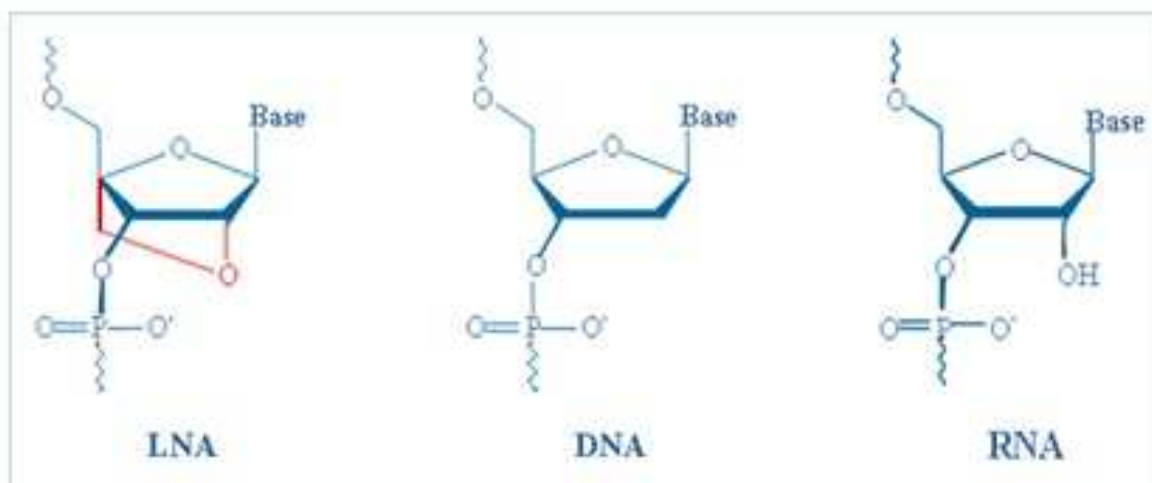


FIG. 2.14 – La chimie des sondes LNA est très proche de celle des acides nucléiques.

courbe du Ct en fonction de la quantité d'acides nucléiques et une mesure du coefficient d'efficacité E (qui doit être le plus proche possible de 2). La courbe d'étalonnage ainsi constituée permet de déduire la concentration à partir d'une mesure du Ct. La principale difficulté réside dans la capacité à titrer avec précision et reproductibilité les solutions d'étalonnage. Etant donnée cette limitation, la quantification absolue est le plus souvent réservée à des applications bien particulières, telle que la virologie [Tse 2003].

- Quantification relative : un gène de référence est quantifié en même temps que le gène étudié, la concentration de ce dernier étant ensuite normalisée par rapport à celle connue du gène de référence. Cette méthode permet de comparer les variations d'expression de deux échantillons *via* un même gène de référence dont l'expression ne varie pas.

Instrumentation conventionnelle. Le premier thermocycleur de PCR temps réel disponible, le ABI 7700, composé d'un bloc cylindrique de 96 puits couplé à un fluorimètre, fut commercialisé par Applied Biosystems en 1997 et reste encore aujourd'hui un automate de PCR très utilisé. Peu de temps après, Idaho Technologies développa un appareil composé de capillaires en tant que supports de réaction, le Lightcycler, maintenant commercialisé par Roche Diagnostics. Il existe actuellement de très nombreux appareils de RT-PCR en temps réel, pouvant être classés en deux catégories :

- les systèmes haut débit pouvant analyser au moins 96 PCR simultanément. Ils comportent généralement des modules à effet Peltier ou effet Joule et leur vitesse peut atteindre 1 à 10°C par seconde ;
- les systèmes flexibles pour lesquels le contrôle de la température se fait par de l'air homogénéisé puis pulsé ou par rotation d'un carrousel contenant des capillaires où ont lieu les PCR, pour des vitesses pouvant atteindre jusqu'à 20° C/s.

Les cycles de PCR quantitative en temps réel sont effectués dans des tubes fermés, limitant ainsi le risque de contamination, et sous un contrôle très précis de la température dans un thermocycleur. Les performances de l'instrumentation dépendent fortement du rapport signal sur bruit, fonction de la technologie de détection employée et de la qualité des optiques, de la répétabilité de la mesure, fonction de l'homogénéité en température des échantillons.

Protocoles de RT-PCR en une étape *versus* en deux étapes. La découverte d'enzymes communes à la RT et à la PCR a ouvert les protocoles à deux stratégies, en une étape ou en deux étapes. La RT-PCR une étape consiste à réaliser les réactions de RT et de PCR dans le même milieu réactionnel ; les milieux réactionnels sont différents pour la RT et la PCR en deux étapes.

2.1.3.4 Choix des réactifs

Kits commerciaux proposés. Les kits de RT-PCR sont récents sur le marché et la plupart des études publiées sur la cellule utilisent des protocoles impliquant les traditionnels kits en deux étapes pour lesquels RT et PCR se font dans des milieux réactionnels différents. L'approche en une seule étape simplifie les protocoles et diminue les possibilités

de contamination et de perte d'échantillon [Yan 2002]. Les kits de RT-PCR en une étape sont principalement basés sur une RT spécifique. En effet, dans un seul tube l'utilisation d'amorces oligo (dT) peut conduire à des inhibitions de la RT-PCR par des réactions compétitives telles que des amplifications amorces/amorces. La RT-PCR en deux étapes est souvent considérée comme une approche plus sensible du fait d'une formulation optimisée pour les deux réactions ; cependant, dans le contexte microfluidique, l'intégration des deux étapes augmente considérablement le degré de complexité de réalisation. Ainsi, dans cette thèse, le choix s'est porté sur un protocole en une étape, avec au préalable des évaluations de sensibilité sur différents kits proposés dans un appareil de PCR quantitative conventionnel, le Lightcycler 480 fabriqué par Roche Applied Science. Le kit "LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes" commercialisé par Roche s'est avéré le plus sensible et reproductible des trois kits réactionnels testés. Les gouttes contenant les réactifs de RT-PCR sont générées dans une phase lipophile, de l'huile minérale (light oil for molecular biology, Sigma), fréquemment utilisée pour limiter l'évaporation des réactions de RT-PCR conventionnelles. Du fait de la forte influence des parois lors de la génération des gouttes et de la nécessité de stabilisation pendant les cycles thermiques, l'ajout de tensioactifs dans la phase continue, c'est à dire l'huile, apparaît primordial. Les tensioactifs se plaçant à l'interface entre les deux phases, ils ont un potentiel contact avec l'échantillon biologique et doivent donc être biocompatibles. S'inspirant des protocoles de PCR en émulsion [Williams 2006] nous avons opté pour l'ABIL EM 90 (Degussa), un tensioactif non ionique siliconé et très utilisé dans les cosmétiques.

Choix des sondes et des amorces. Dans le cadre de cette étude, l'objectif est d'étudier l'expression d'un, voire de deux gènes d'intérêt ; dans cette optique, la sensibilité et la précision de la RT-PCR sont améliorées par l'utilisation d'amorces spécifiques d'un gène [Stahlberg 2004]. La sensibilité de la RT-PCRq est en effet grandement affectée par l'efficacité de la RT, étape la plus délicate et dont le rendement excède rarement 20 %. La RT globale peut réduire la spécificité et la précision car une large population hétérogène d'ADNc transcrits en résulte, augmentant la probabilité que des amorces non spécifiques de séquences homologues affectent les mesures. Un autre point publié dans [Bontoux 2008] mentionne l'existence du phénomène appelé "macromolecular crowding" lorsque tous les ARN sont *reverse* transcrits : la présence d'une trop grande quantité d'ADNc implique une chute du rendement de PCR par encombrement stérique dans le cas où tous les gènes sont amplifiés. Les sondes et les amorces ont été dessinées par Roche Applied Science (UPL) pour le gène Actine B couplé au fluorophore FAM, par Eurogentec pour le gène Tata Binding Protein (TBP) couplé au fluorophore FAM et Actine B couplé au fluorophore Texas Red. Les séquences correspondantes sont reportées en annexe C. L'Actine B (ActB) est une des isoformes de l'actine que l'on trouve dans les tissus non musculaires. Le gène ActB est fortement exprimé et fréquemment utilisé comme gène de référence pour sa relative stabilité d'expression. TBP est une sous-unité du facteur de transcription TFIID, première protéine à se lier à l'ADN pendant la formation du complexe d'initiation de l'ARN polymérase II au cours de la transcription.

2.2 Analyse quantitative de l'expression de gènes sur ARN et cellule en microfluidique

2.2.1 Analyse d'un échantillon d'ARN

2.2.1.1 Amplification temps réel en simplex

Optimisation du protocole. Les premiers tests ont été réalisés selon le protocole expérimental proposé par le fournisseur du kit de RT-PCR (cf. annexe E). Les conditions expérimentales ont tout d'abord été testées avec de l'ARN total purifié de cerveau de souris à une concentration de 20pg/nL sur le gène Actine B et l'amplification a été réalisée dans le thermocycleur pour PCR temps réel Lightcycler 480 (Roche Applied Science) ; la courbe résultante est représentée figure 2.15. Les cycles thermiques appliqués à l'échantillon sont les suivants :

- *RT*, 63°C pendant 3 min,
- *Dénaturation*, 95°C pendant 30 s,
- *PCR*, 40 cycles de (a) 95°C pendant 10 s, (b) 60 °C pendant 30 s.

Ce même protocole appliqué dans le microsystème s'est avéré négatif. Plusieurs arguments peuvent être émis, dont certains ont pu être facilement écartés. Une des raisons évoquées est le possible photoblanchiment du fluorophore dû à des temps d'exposition de caméra trop longs ; la sonde FAM (6-carboxy-fluorescéine) est un dérivé de la fluorescéine qui a des propriétés de photoblanchiment connues [Song 1995]. Pour vérifier ce point, nous avons récupéré un échantillon après amplification dans le Lightcycler 480 ; nous l'avons injecté dans un microsystème et pris des images en UV à différents temps de pause. L'intensité de fluorescence de l'échantillon n'est pas affectée par des expositions répétées allant jusqu'à 300 ms. Un autre point envisagé est le possible rôle des interfaces mélange réactionnel/huile des émulsions : il est suspecté que les enzymes soient capturées et dénaturées aux interfaces [Williams 2006] ; il est également possible que le groupement fluorophore de la sonde soit absorbé à l'interface. Ce transfert de réactifs vers l'interface peut être limité par l'ajout de la protéine globulaire BSA (albumin from bovine serum, powder, cell culture tested, Sigma). Cette protéine, très rencontrée dans les protocoles de PCR mais absente du kit utilisé, est connue pour ses capacités de stabilisation des enzymes pendant la digestion de l'ADN et d'inhibition de l'adhésion de ces enzymes aux parois des tubes ou des canaux en PDMS [Wang 2006]. Par ailleurs cette protéine est stable et n'interfère pas avec la majorité des réactions biochimiques. Elle est présente dans de nombreux protocoles de PCR en émulsions [Williams 2006]. Des travaux ont même démontré son rôle bénéfique sur l'analyse de l'expression de gènes par RT-PCRq [Silvy 2006]. Une concentration finale de 625 µg/mL de BSA ajoutée au protocole (concentration moyenne utilisée dans les protocoles de PCR) suffit à rétablir une amplification avec une bonne efficacité, elle est finalement adoptée pour toutes les expériences de PCR temps réel en microsystème.

Méthode d'analyse des Ct. Les images sont traitées par la procédure décrite en annexe F. La mesure des Ct repose sur la méthode de la dérivée de seconde. Les courbes de

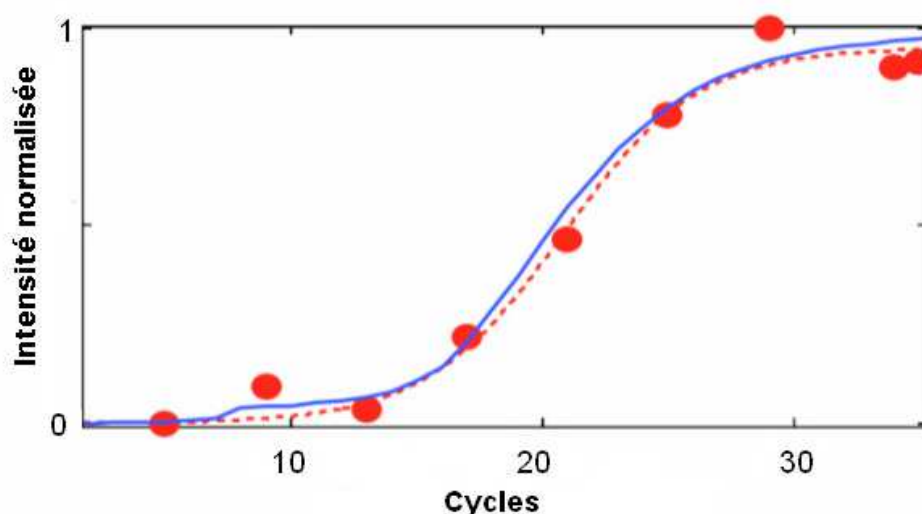


FIG. 2.15 – Courbe d'amplification temps réel de l'ARN à 20 pg/nL ; les symboles rouges représentent les données obtenues dans le microsystème, la courbe en pointillé est la courbe d'ajustement (une sigmoïde) et la courbe en trait plein correspond aux données obtenues dans le Lightcycler 480.

fluorescence obtenues sont d'abord normalisées, puis ajustées à l'aide du logiciel Matlab par une fonction sigmoïde $f(x)$ s'exprimant par la relation suivante :

$$f(x) = a + \frac{b}{1 + \exp(-c(x - x_0))} \quad (2.1)$$

où a , b , c et x_0 sont les paramètres ajustables. Le maximum de la dérivée seconde de la fonction correspond au Ct. Il est important que les résultats comparés soient systématiquement analysés avec la même méthode, même si chaque méthode donne des résultats proches.

La courbe d'amplification en temps réel de l'ARN total à 20 pg/nL moyennée sur 30 gouttes de 4 nL en microsystème est représentée figure 2.15. Pour des concentrations identiques, les courbes obtenues dans le Lightcycler et en microfluidique se superposent, indiquant que les performances des deux instruments sont équivalentes pour cette expérience, à concentration donnée. Cependant il faut avoir en tête que la quantité d'ARN initial contenue dans un puits de plaque 96 puits est de 200 ng, soit 25 fois plus que dans une goutte ! La microfluidique à gouttes nous apporte donc une sensibilité de détection bien supérieure à un appareil conventionnel. Par ailleurs la mesure du Ct est dépendante du système de détection : ainsi une sonde couplée à un fluorophore de meilleur rendement quantique et de meilleure stabilité peut améliorer le Ct, de même que des temps d'exposition plus longs lors de la mesure de fluorescence. Dans le cas du FAM, il est difficile d'augmenter les temps d'exposition au dessus de 300 ms (temps de pause de l'expérience représentée figure 2.15) du fait du photoblanchiment de ce fluorophore. En revanche, l'utilisation d'une sonde couplée au Texas Red améliore nettement la sensibilité de dé-

tection car sa remarquable stabilité autorise des temps d'exposition supérieurs à 250 ms. Ainsi, les cycles-seuils issus de l'amplification en temps réel de l'Actine B sur une gamme de concentration en ARN total universel variant de 10 pg/nL à 0.002 pg/nL, dans des gouttes de 2 nL avec une sonde marquée Texas Red révèlent une sensibilité de détection beaucoup plus grande qu'avec le FAM, avec un temps de pose de caméra égal à 450 ms (cf. figure 2.16).

Un calcul approximatif permet d'estimer combien de molécules d'ADNc ont été synthétisées dans une goutte : en moyenne, une cellule possède 10 pg d'ARN total dont 10000 à 100000 transcrits d'Actine B. En supposant un rendement de RT égal à 20 % (valeur typique), chaque goutte possède 4 à 40 molécules d'ADNc, pour une quantité d'ARN initiale égale à 0.04 pg. Cet ordre de grandeur, situe le nombre de molécules d'ADNc détectable par le système. Ainsi, ces résultats illustrent l'importance fondamentale du choix

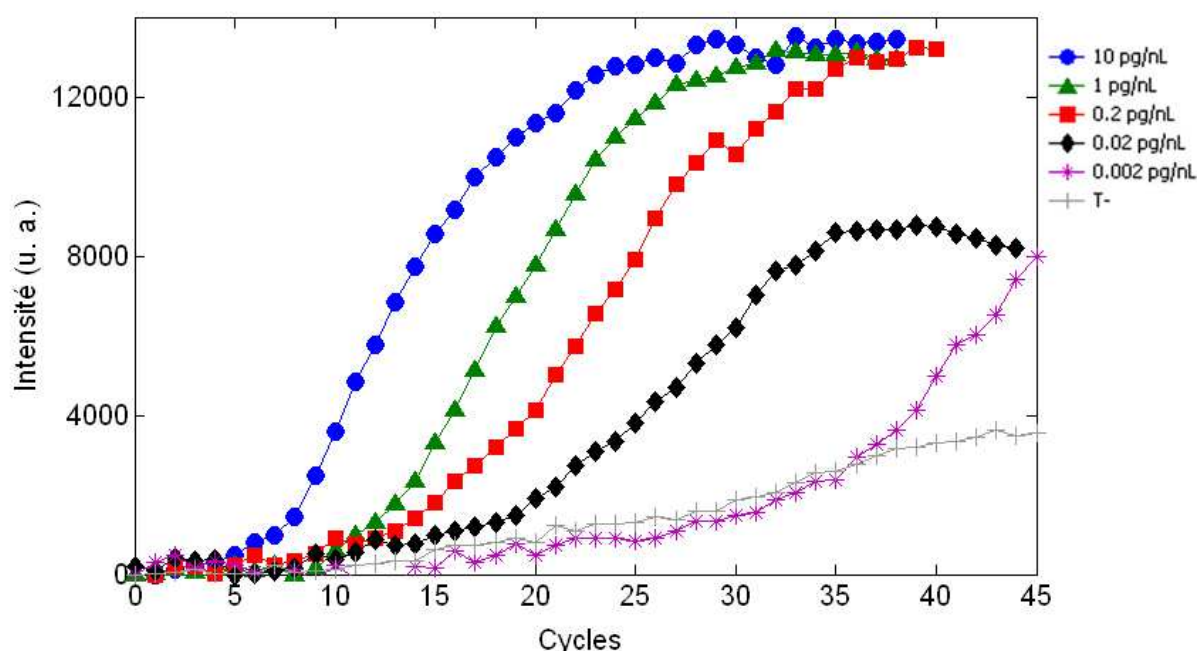


FIG. 2.16 – Courbe d'amplification de l'Actine B suivie en fluorescence avec une sonde marquée Texas Red, à partir d'ARN total universel à différentes concentrations.

des sondes fluorescentes pour mesurer l'expression d'un gène et la nécessité de conserver l'ensemble des paramètres de détection pour pouvoir comparer deux échantillons différents.

2.2.1.2 Amplification temps réel en duplex

La PCR quantitative en temps réel peut être réalisée en duplex (amplification de deux cibles différentes en une seule réaction). Cette méthode élimine les variations dues aux erreurs de pipetage puisque les deux amplifications ont lieu simultanément dans le même

tube ; son domaine d'application concerne la quantification d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence ou la comparaison de l'expression de deux gènes. Cependant, son optimisation est délicate car il faut vérifier que l'efficacité des deux PCR est comparable. Il faut également prendre un soin particulier au choix des sondes fluorescentes : pour une analyse correcte des amplifications, les deux fluorophores doivent avoir un spectre d'émission disjoint.

Optimisation du protocole. L'échantillon d'ARN considéré est à la concentration 18,4 pg/nL ; les deux fluorophores choisis sont respectivement le FAM (absorption : 494 nm, émission : 520 nm) couplé à TBP et Texas Red (absorption : 583 nm, émission : 603 nm) couplé à Actine B, leur spectre d'émission est disjoint. Les deux gènes sont exprimés de façon non équivalente dans les cellules, il est donc nécessaire d'adapter le protocole pour que les rendements d'amplification ne soient pas affectés par l'amplification simultanée. Pour ce faire, nous avons comparé les courbes d'amplification des deux gènes pris séparément et simultanément dans le Lightcycler ; la valeur des Ct n'est pas affectée, en revanche l'intensité de fluorescence du plateau de TBP est beaucoup plus grande lorsqu'il est étudié seul. Actine B est plus abondant, on peut supposer que l'enzyme est majoritairement consommée par ce gène et apparaît en défaut pour l'amplification de TBP. Un test en présence d'enzyme en excès (ajout de 0.5 U pour 10 μ L) révèle une meilleure efficacité d'amplification et des niveaux de fluorescence au plateau identiques pour Actine B et TBP (cf. figure 2.17). Les Ct obtenus dans ces conditions sont respectivement égaux à 18 et 34 pour Actine B et TBP.

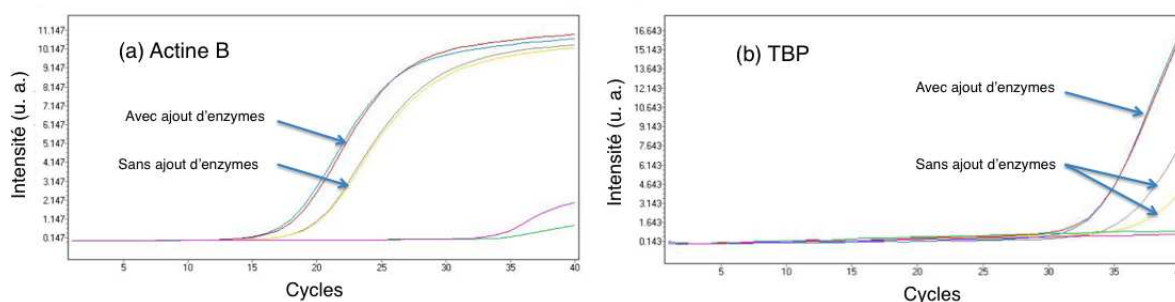


FIG. 2.17 – (a) Amplification du gène Actine B en duplex dans le Lightcycler, avec ou sans ajout d'enzymes. (b) Amplification du gène TBP en duplex dans le Lightcycler, avec ou sans ajout d'enzymes.

Resultats obtenus en microsystèmes. Le protocole optimisé avec le Lightcycler est utilisé dans les microsystèmes. La détection simultanée est réalisée sur 100 gouttes de 2 nL, au moyen d'un séparateur d'images dont le principe est détaillé dans la section décrivant le montage expérimental. L'amplification de TBP apparaît plus tard qu'Actine B, il est donc important que la voie de détection de FAM/TBP soit très sélective en longueur d'onde pour ne pas être affectée par l'amplification d'Actine B. L'utilisation d'un filtre passe-bande très sélectif se fait au détriment du signal collecté. Les résultats d'amplification temps réel, sont représentés figure 2.18. Les deux amplifications sont positives, avec des

valeurs de Ct proches de celles du Lightcycler (32 pour TBP et 18 pour Actine B), cependant nous observons un phénomène de photoblanchiment du FAM à partir du 38^{me} cycle du fait de temps d'exposition trop longs. Le FAM est le plus communément employé, mais il existe des équivalents beaucoup plus stables tels que les fluorochromes ATTO 488 ou Alexa 488. Ce montage expérimental nous ouvre ainsi des voies possibles de normalisation d'un gène par rapport à un gène de référence, ou par rapport à un fluorophore passif (tel que le fluorophore Rox). L'amplification d'ARN a ainsi contribué

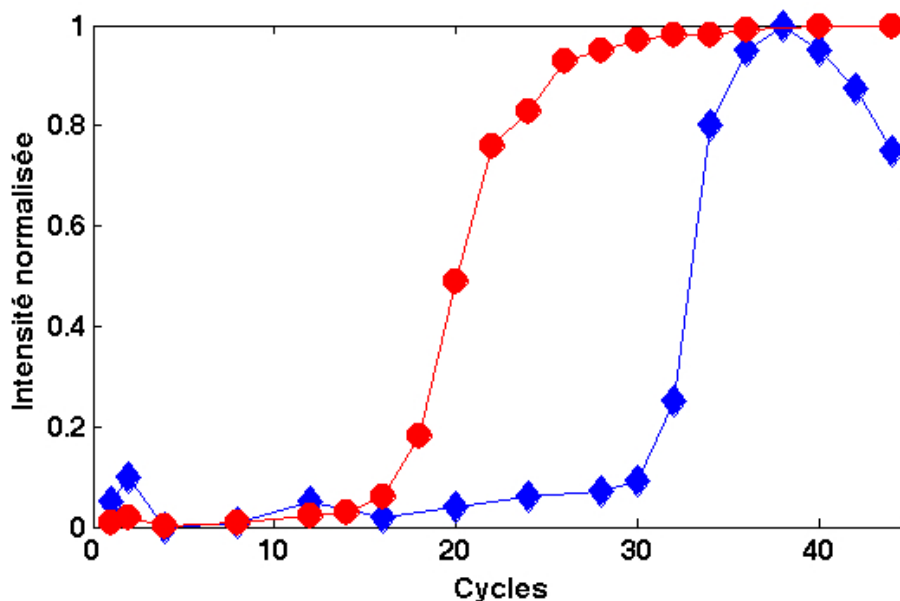


FIG. 2.18 – Courbes de PCR temps réel obtenues dans des microgouttes par amplification des gènes Actine B (ronds rouges) et TBP (losanges bleus) sur une concentration d'ARN égale à 18,4 pg/nL.

à optimiser et à valider le protocole de RT-PCR ainsi que la technologie microfluidique.

2.2.2 RT-PCR quantitative sur cellule unique

2.2.2.1 Encapsulation de cellules

De nombreux groupes de recherche ont utilisé les gouttes comme réservoirs isolés pour les cellules [Köster 2008, Edd 2008]. Pour travailler au niveau de la cellule unique, il est important de contrôler la présence d'une seule cellule dans chaque compartiment ; plus généralement il est important de pouvoir prédire de façon statistique la répartition des cellules dans les gouttes. Le processus d'encapsulation de cellules est un phénomène aléatoire aux événements rares si la concentration de cellules n'est pas trop importante (on s'intéresse à des cas où la concentration n'excède pas cinq cellules par goutte). Le processus d'encapsulation est donc décrit par la statistique de Poisson [Claussell-Tormos 2008],

[Koster 2008]. La distribution de Poisson est donnée par la relation :

$$D(p, n) = \exp(-p) \frac{p^n}{n!} \quad (2.2)$$

avec p la concentration moyenne dans la goutte et n le nombre de cellules dans la goutte.

Les cellules considérées sont des hybridomes T de souris. Leurs conditions de culture sont décrites en annexe D. Les résultats obtenus en faisant varier p de 0.05 à 3 cellules par nL, sont représentés figure 2.19(b) ; ils sont en bon accord avec la statistique de Poisson. Cette adéquation avec la théorie nous confirme l'absence d'adhésion entre cellules et parois du microsystème.

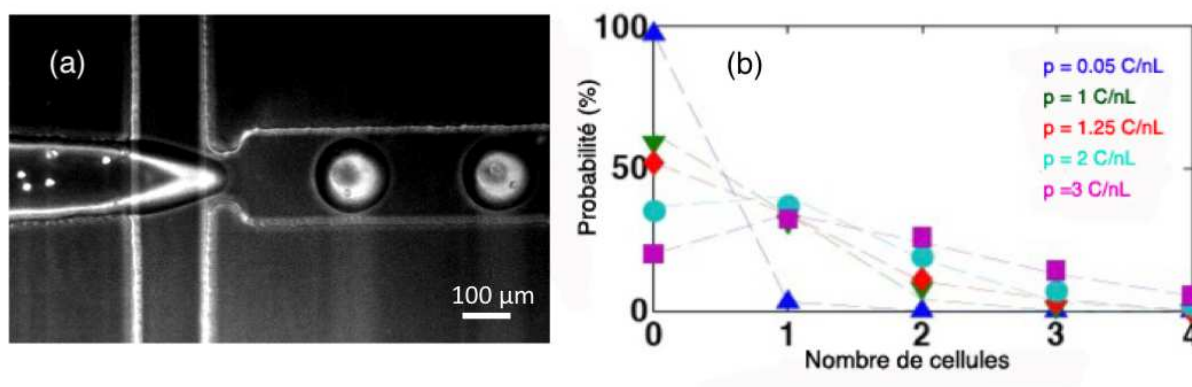


FIG. 2.19 – (a) Encapsulation de cellules au niveau du flow-focusing pour une concentration moyenne de cellules égale à 2 cellules par nL et des gouttes de 750 pL. (b) Les probabilités déterminées expérimentalement sont en bon accord avec la statistique de Poisson (lignes en pointillé) pour différentes densités cellulaires.

2.2.2.2 Lyse cellulaire et libération de l'ARN messenger

La transcription inverse des ARNm nécessite au préalable la lyse de la cellule et la libération du matériel génétique cytoplasmique. Les techniques chimiques ou physiques employées pour la lyse sont nombreuses.

Dans le cas de la RT-PCR, le choix de la méthode de lyse est conditionné par l'absence d'inhibition des réactifs, en particulier de l'enzyme, très facilement dégradable. Les cellules de mammifères peuvent être lysées par des méthodes relativement douces contrairement à certaines bactéries possédant une double membrane plasmique ; en général, un simple choc thermique, un chauffage ou un choc osmotique suffisent. Actuellement les efforts des industriels se concentrent sur l'intégration de différentes étapes d'analyse du transcriptome de la cellule en un seul réactif. Ambion propose un réactif qui permet de lyser la cellule sans interaction avec la RT-PCR. Ce réactif, dont la composition est protégée par un brevet,

contient une association de tensioactifs ; or, l'ajout de tensioactifs dans la phase dispersée, ne satisfait pas à la règle de Bancroft de stabilisation des émulsions. Au niveau de la jonction flow focusing, les interfaces eau/huile sont fortement modifiées (figure 2.20(a)) par l'ajout du produit de lyse et la phase aqueuse a tendance à mouiller les parois. Les gouttes résultantes sont de faible taille et sont générées par brisure de jet suggérant un effet de *tip-streaming* observé lors d'ajout de tensioactifs répartis non uniformément à l'interface [Eggleton 2001] (cf. figure 2.20(b)). Cette solution de lyse, non viable pour le projet, a donc été abandonnée.

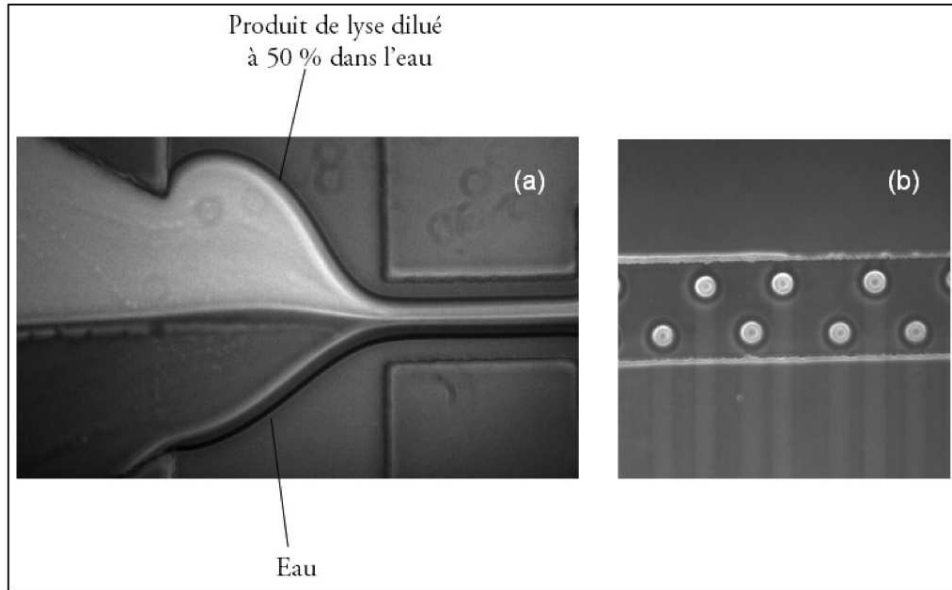


FIG. 2.20 – (a) Les fluides internes sont constitués d'une part d'eau, d'autre part de solution aqueuse de produit de lyse et de fluorescéine à concentration 10^{-6} mol/L. (b) Gouttes résultantes générées.

Il est parfois observé une lyse effective des cellules de mammifères dans le tampon de RT-PCR ([Bengtsson 2005], [Warren 2008]), le plus souvent sous l'action de l'hypotonie du tampon. Cette hypothèse a été vérifiée par RT-PCR temps réel du gène Actine B dans le Lightcycler avec un échantillon de 1000 cellules ajoutées et cyclées en température dans 10 μ L de réactif. L'amplification positive implique une lyse effective des cellules. L'utilisation de source extérieure de lyse est donc inutile dans cette application. Toutefois, nous avons considéré d'autres moyens de lyse pour ouvrir le projet aux bactéries :

- l'utilisation d'un laser induisant une photolyse est délicate car elle risquerait d'endommager les enzymes et les sondes fluorescentes ;
- l'application d'un champ électrique E est également peut favorable dans les gouttes. En effet, dans le cas de gouttes d'eau dans l'huile, le champ E_i ressenti par les cellules à l'intérieur de la goutte est donné par la relation :

$$E_i = \frac{3\varepsilon_e}{(2\varepsilon_e - \varepsilon_i)} E \quad (2.3)$$

Cette relation est valable pour une goutte considérée comme une sphère, constituée dans un matériau homogène de permittivité diélectrique ε_i et plongée dans un milieu diélectrique homogène de permittivité diélectrique ε_e .

Les valeurs des permittivités diélectriques relatives sont égales à 2.2 et 81 respectivement pour l'huile minérale et l'eau, soit un champ interne dans la goutte égal à $0.08 \cdot E$. Il est ainsi très défavorable de travailler en émulsion pour électroporer les cellules.

Nous avons donc uniquement envisagé la lyse par choc osmotique et chauffage à 63°C ; les résultats sont décrits dans le paragraphe qui suit.

2.2.2.3 Intercontamination et bruit de fond lié à l'ADN génomique

La lyse des cellules dans le tampon de RT-PCR est un obstacle majeur à la possibilité de gérer des données sur la cellule unique : si chaque cellule est lysée avant encapsulation, la notion d'analyse d'expression de la cellule à l'échelle individuelle est perdue. Cependant le test décrit dans le paragraphe précédent avec le Lightcycler, n'indique pas si la réaction a lieu avant ou pendant l'étape de RT. En effet, un chauffage à 63°C peut être à la source de la lyse. Pour le vérifier, nous avons préparé dix échantillons de RT-PCR temps réel. Les quatre premiers échantillons, dont deux contenant 1000 cellules et deux contenant de l'ARN à 20 pg/nL, subissent une RT-PCRq, quatre échantillons, dont deux contenant 1000 cellules et deux contenant de l'ARN à 20 pg/nL, sont laissés sur la paillasse pendant trente minutes puis cyclés en température pour une PCRq (étape de chauffage préalable pour la RT), enfin deux échantillons servent de témoins négatifs. Les résultats sont regroupés tableau 2.3 et les courbes concernant les PCRq sur cellules sont représentées figure 2.21(a).

Echantillon	Cellule	Cellule	Cellule	Cellule	ARN	ARN	ARN	ARN	T-	T-
Incubation 30 min	non	non	oui	oui	non	non	oui	oui	non	non
RT à 63°C	oui	oui	non	non	oui	oui	non	non	oui	oui
PCR	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Amplification	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	-	-

TAB. 2.3 – Tableau récapitulatif des résultats d'amplification sur divers échantillons

La RT est effective à température ambiante : les ARN incubés à température ambiante pendant 30 min sont amplifiés. Si les cellules étaient lysées pendant une incubation à température ambiante, la PCRq serait positive. D'après la figure 2.21(a) la courbe d'amplification sur cellules sans RT préalable à 63°C mais avec incubation sur la paillasse pendant 30 min donne un Ct égal à 27, 10 cycles plus tard que pour le témoin positif sur cellules (RT réalisée par chauffage à 63°C pendant 3 min). Cette amplification est néanmoins non confondue avec le témoin négatif; elle peut tirer son origine soit d'un faible taux de cellules lysées, soit de l'amplification de l'ADN génomique. L'amplification de l'ADN génomique est en général limitée du fait de la double spécificité de la méthode

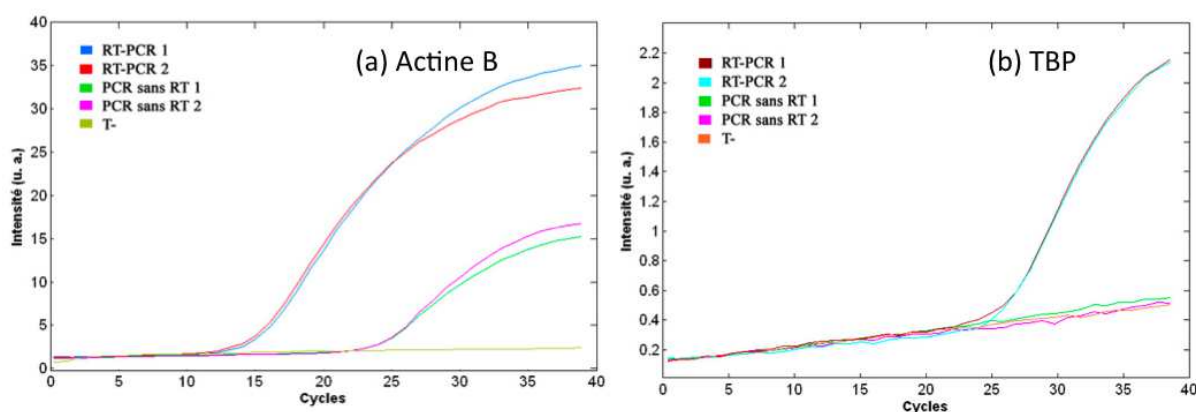


FIG. 2.21 – Courbes de PCR temps réel réalisées sur des cellules avec ou sans RT ; (a) le gène d'intérêt est Actine B, (b) le gène d'intérêt est TBP

induite par l'utilisation d'amorces et de sondes spécifiques. Cependant, dans le cas de l'Actine B, les amorces sont placées sur deux exons différents séparés par un intron court (≈ 450 paires de bases), un risque d'amplification non désirée n'est donc pas exclu. Pour vérifier cette hypothèse, il suffit de considérer un gène dont l'intron qui sépare le site de fixation des amorces est long (>1 kpb). Le gène TBP a un intron de 3000 pb, il est donc un bon candidat. L'expérience réitérée avec TBP indique qu'il n'y a pas d'amplification parasite (2.21(b)). L'amplification de l'ADN génomique semble donc *a priori* être la cause la plus probable de la source de contamination de l'essai avec Actine B. Il faut cependant rester prudent avec cette conclusion car TBP est un gène faiblement exprimé et la contamination par des cellules lysées dans le tampon avant chauffage, si elle existe, peut ne pas apparaître du fait de la faible quantité de cellules lysées (l'amplification pourrait intervenir au delà de 40 cycles). L'information importante à retenir est que l'étude d'un gène tel qu'Actine B possède une incertitude, mais cette erreur demeure très faible et négligeable dans de nombreux cas : la quantité de matériel génétique non désirée et amplifiée est environ 2^{10} fois plus faible que l'échantillon d'intérêt.

La RT-PCR réalisée sans purification préalable de l'ARN de la cellule est potentiellement sujète à des inhibitions liées à la présence de ribonucléases (RNAses) dans le lysat cellulaire. Dans notre cas, le mélange réactionnel contient des inhibiteurs de RNAses. De plus, les RNAses n'ont pas le temps de dégrader l'ARNm libéré car la lyse et la RT se font à la même étape et relativement à haute température (les RNAses sont dénaturées à haute température).

2.2.2.4 Validation de l'outil microfluidique de RT-PCR sur des cellules

Cette validation consiste à déterminer si la synthèse d'ADN est effective dans les gouttes après RT-PCR sur les cellules. Un moyen simple de le vérifier est de récupérer ces gouttes après cyclage thermique et de réaliser une PCR temps réel sur cet échantillon dans le Lightcycler. Le système étudié contient 250 gouttes de 4 nL avec en moyenne 4 cellules

par goutte. Après RT et 30 cycles de PCR dans le microsystème, les gouttes sont collectées dans un tube, centrifugées et coalescent en une seule phase au fond du tube car la phase constituée par l'huile minérale est moins dense. La phase aqueuse est pipetée puis diluée en cascade de 10 en 10 jusqu'à 10^9 fois. Un μL de chacune des solutions obtenues est prélevé et injecté dans des puits distincts d'une plaque 96 puits, préalablement remplis avec 9 μL de réactifs de PCR ; les échantillons sont ensuite amplifiés en temps réel. Dans les deux amplifications successives (microsystème et Lightcycler) le gène considéré est Actine B. La même expérience est réalisée après une RT dans le microsystème sans cycles de PCR : les gouttes sont collectées, amplifiées en temps réel dans le Lightcycler sans dilution préalable.

Pour des dilutions d trop grandes ($d > 10^7$), la probabilité de rencontre des amorces avec l'ADN matrice devient très faible. Il s'en suit une PCR temps réel non exploitable. A trop forte concentration en ADN, la PCR est potentiellement inhibée à cause d'une gêne stérique (le phénomène est appelé "molecular crowding"). Pour $10^2 < d < 10^8$, la PCR temps réel indique que le C_t est une fonction monotone croissante avec d , en accord avec la présence d'ADNc dans les gouttes (figure 2.22). Les C_t exploitables dans la gamme d $[10^2, 10^8]$ sont représentés figure 2.23 en fonction de d .

Soit E l'efficacité de la PCR temps réel, la quantité d'ADN synthétisée s'exprime par la relation donnée par l'équation 2.4. On en déduit :

$$C_t = \frac{\log(d)}{\log(Eff)} + \text{constante} \quad (2.4)$$

La pente de la droite de régression de C_t en fonction de $\log(d)$ permet de déterminer $Eff = 0.95$. Ce bon rendement indique que l'ADNc synthétisé est non dégradé. Cependant il est difficile de conclure quant au rendement de la RT-PCR dans les gouttes. La courbe de PCR temps réel issue d'un échantillon ayant subi uniquement une RT en gouttes coïncide avec la dilution de 10^6 de l'échantillon d'ADNc issu de la RT-PCR en gouttes. Un premier raisonnement conduit à conclure que l'ADNc issu de la RT est amplifié 10^6 fois dans les gouttes pour 30 cycles. Cependant l'étape de pipetage des gouttes induit une perte importante de matériel. Il est tout de même possible de donner une borne inférieure à l'efficacité dans le microsystème égal à $10^{6 \cdot \frac{1}{30}} - 1 \approx 0.58$.

2.2.2.5 RT-PCR temps réel en microsystème sur un gène d'intérêt : Actine B et TBP

Chaque gène est étudié séparément dans deux systèmes microfluidiques distincts. Les mesures de fluorescence sont réalisées à chaque cycle, en fin de période d'élongation, pendant 500 ms sur 100 gouttes de volume 2 nL.

Mesure de l'expression du gène Actine B. Même si l'analyse par RT-PCR de l'Actine B est biaisée par l'ADNg amplifié, ce niveau de contamination est très faible puisque l'ADNg est présent en une seule copie. L'erreur induite sur le C_t est au plus de 10^{-2} . Par ailleurs, l'Actine B est souvent considéré comme un gène de ménage (exprimé de façon relativement stable et constante dans toutes les cellules), il est fortement exprimé et donc intéressant à considérer pour caractériser la cohérence de la méthode. Chaque

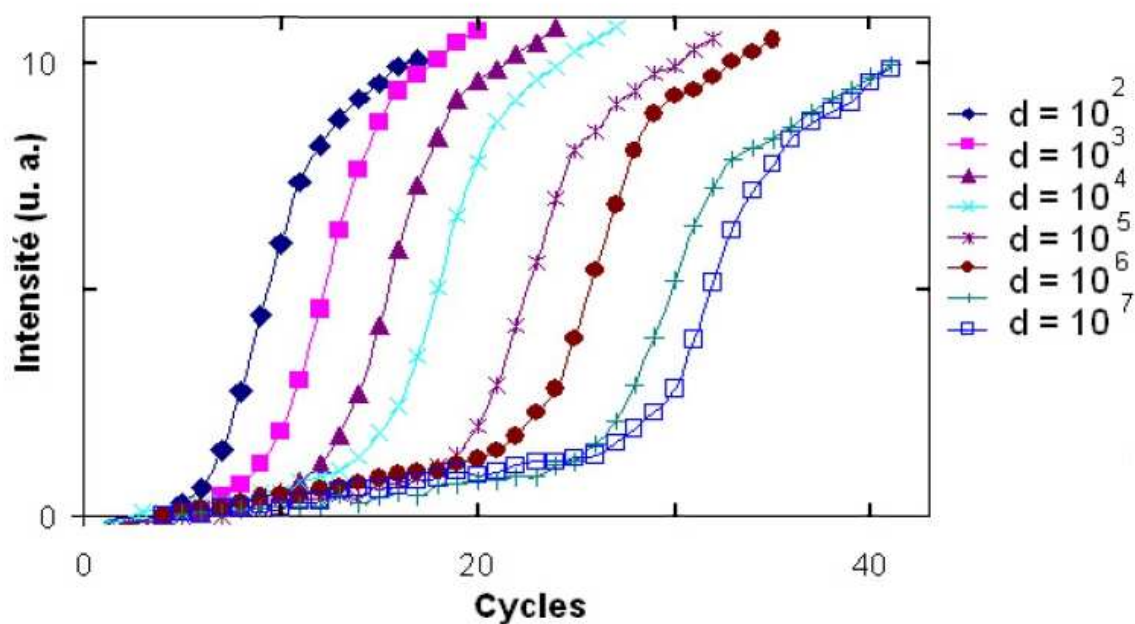


FIG. 2.22 – Courbes de PCR temps réel sur différentes dilutions de l'ADNc synthétisé en microgouttes.

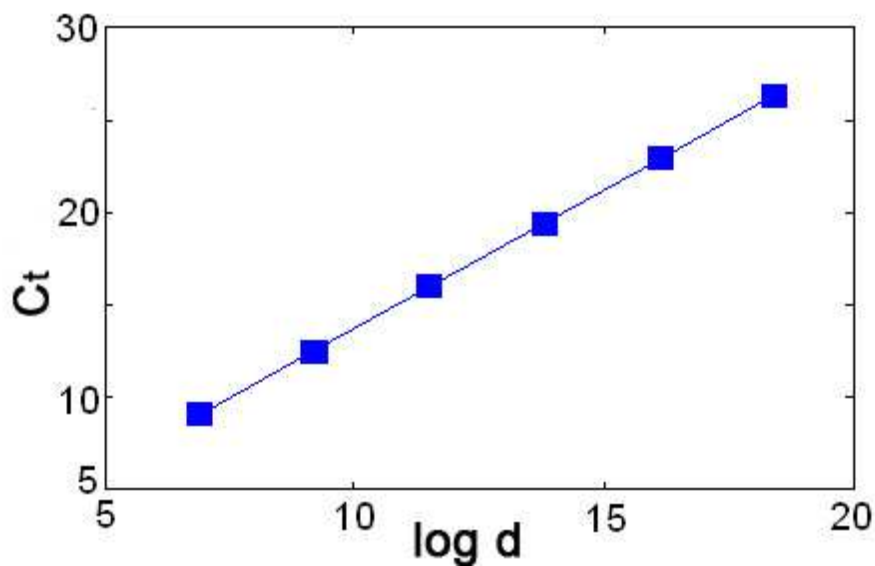


FIG. 2.23 – Tracé du Ct en fonction du logarithme décimal de la dilution d d'ADNc. L'allure de la courbe est une droite conformément à la théorie.

goutte créée dans le microsystème contient une concentration moyenne de 1.5 cellules par goutte. La figure 2.24 représente une courbe d'amplification obtenue sur une goutte contenant une cellule, la répartition des Ct est représentée figure 2.25. L'analyse révèle l'existence de Ct relativement petits et en contradiction avec la statistique de Poisson. Excluant l'hypothèse de grandes variations de cellule à cellule, l'observation d'agrégats cellulaires pendant l'encapsulation est une explication potentielle à la divergence entre loi de Poisson et valeurs de Ct. Ces agrégats considérés comme une entité dans la statistique de Poisson donnent lieu à des Ct caractéristiques du nombre de cellules dans l'agrégat (soit typiquement trois ou quatre). Du fait de l'hydrolyse des sondes après des cycles de température répétés et de la présence d'ARN libéré pendant les étapes de pipetage, les gouttes sans cellule ont un signal de fluorescence non nul à la fin de la PCR. Pour discriminer les réservoirs vides des réservoirs contenant des cellules, un critère sur les Ct est appliqué : les gouttes dont le Ct dépasse de cinq cycles le Ct moyen sont considérées comme vides.

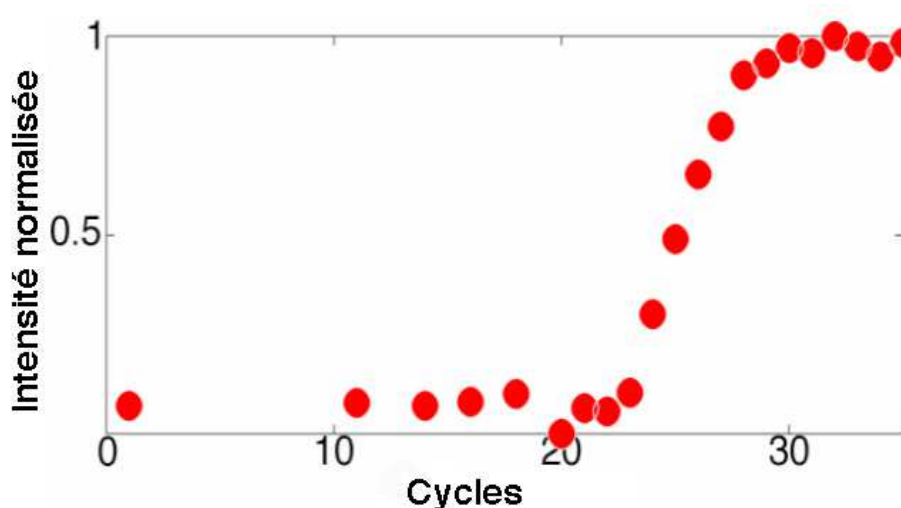


FIG. 2.24 – Intensité de fluorescence sur une goutte contenant une cellule.

Mesure de l'expression du gène TBP. Ce gène est assez faiblement exprimé par les cellules, il demeure néanmoins souvent considéré comme un gène de ménage, on peut donc supposer que les variations de cellule à cellule sont négligeables devant les variations de Ct liées au nombre différent de cellules par goutte. L'analyse est réalisée sur un échantillon de gouttes contenant en moyenne 3.5 cellules par gouttes. Les cellules ont été ajoutées très peu de temps après leur préparation dans le PBS, la présence d'agrégats cellulaires est donc peu probable. La figure 2.26 représente les courbes de PCR temps réel obtenues sur 100 gouttes, la figure 2.27 représente la répartition des Ct, en accord avec la distribution du nombre de cellules.

PCR temps réel en duplex. Nous avons appliqué le protocole de PCR duplex réalisé sur l'ARN à une solution de cellules à la concentration (approximative) 5 cellules par gouttes. Le résultat est très satisfaisant et confirme la possibilité de réaliser des amplifications sur deux gènes, l'un servant à la renormalisation. La figure 2.28 représente

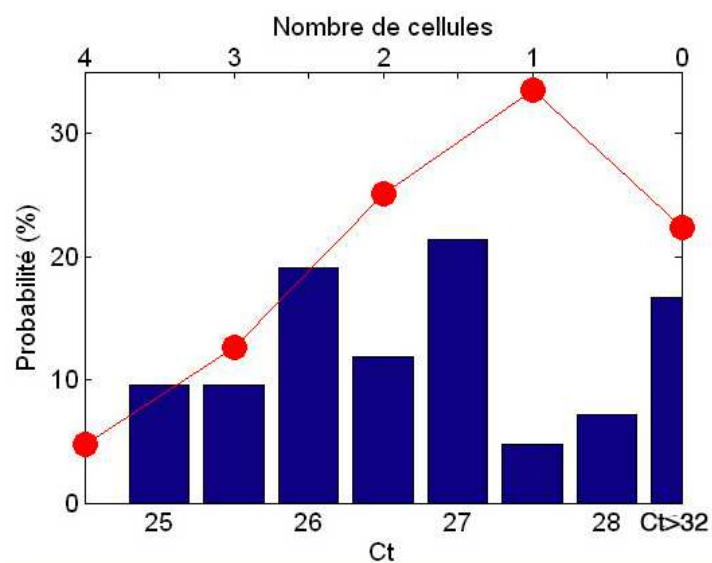


FIG. 2.25 – Valeur des Ct obtenus pour Actine B. La courbe en rouge représente la statistique de Poisson suivie par le nombre de cellules par goutte.

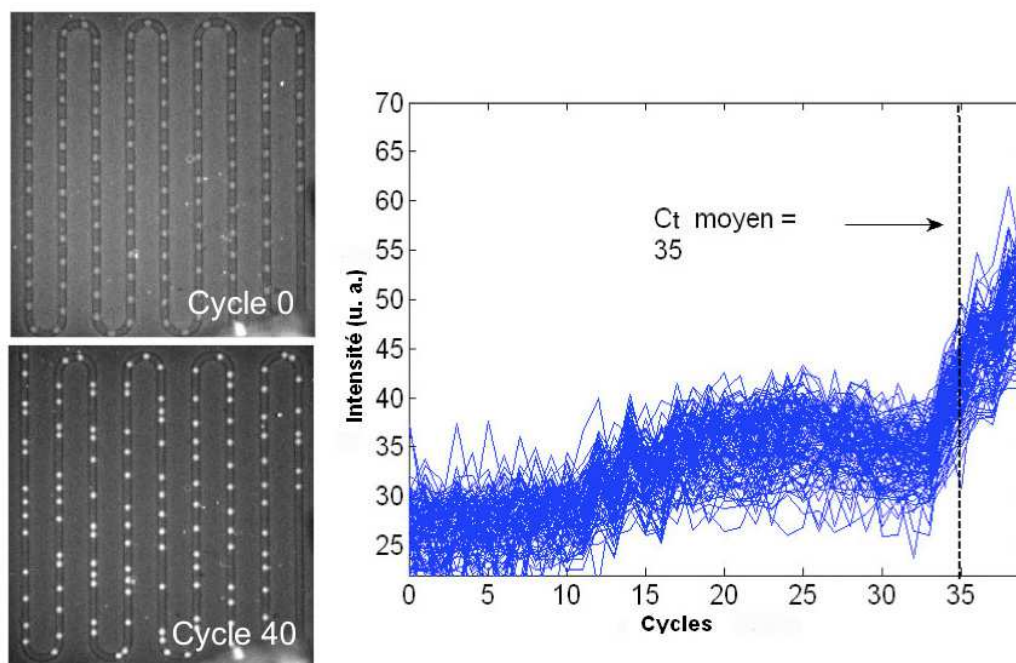


FIG. 2.26 – Suivi de l'intensité de fluorescence pour le gène TBP, sur 100 gouttes, en fonction du nombre de cycle.

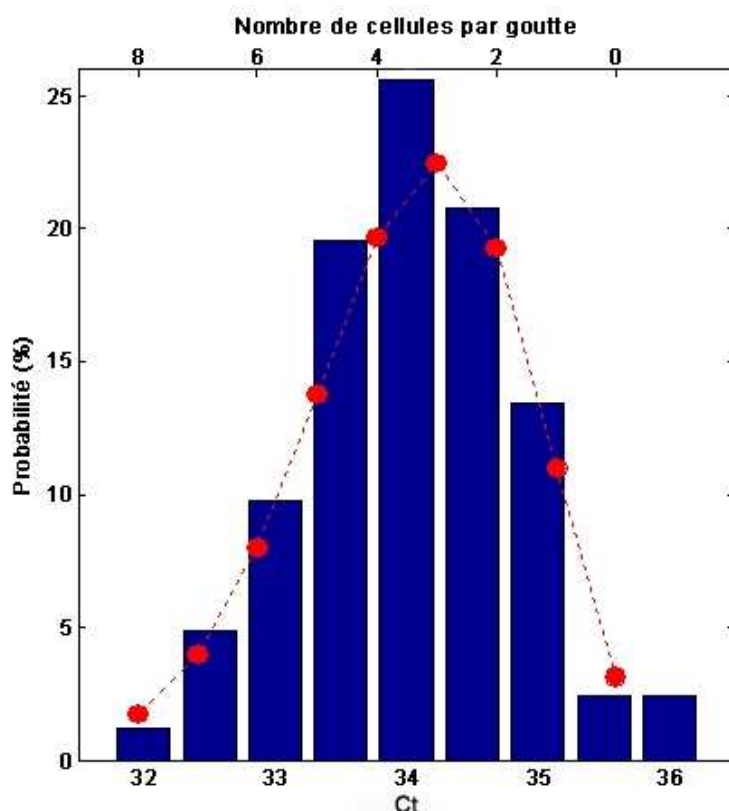


FIG. 2.27 – Valeur des Ct obtenus pour TBP. La courbe en rouge représente la statistique de Poisson suivie par le nombre de cellules par goutte.

les courbes caractéristiques d'amplification d'Actine B et de TBP sur une goutte. Les statistiques des Ct obtenus sur 25 gouttes sont données figure 2.29.

En conclusion, la méthode de RT-PCR quantitative développée est efficace pour les gènes faiblement et fortement exprimés, elle fournit des résultats cohérents avec les appareils de PCRq conventionnels. L'incertitude sur le Ct mesuré est assez difficile à quantifier ; pour la déterminer il faudrait travailler sur des gammes de concentration d'ARN et analyser chacun des Ct, étudier l'incertitude liée à l'ajustement et aux dérivations successives. A l'heure où est écrite cette thèse, il reste à améliorer le code de traitement des images, et à analyser le niveau d'expression d'un gène exprimé de façon hétérogène par les cellules. Un développement est prévu dans le futur : travailler avec deux entrées de phase dispersée, une entrée pour l'arrivée des cellules, une entrée avec l'enzyme, pour pouvoir étudier plusieurs types cellulaires sans avoir à répondre à la question délicate de la lyse des cellules dans le tampon de RT-PCR. Le contrôle se ferait alors par pousse-seringues ; les seringues et les tubes de phases dispersées peuvent être initialement remplis d'un fluide immiscible à l'eau et inerte telle que l'huile fluorée et connectés au microsystème par des cônes de pipette contenant les réactifs et les cellules pour limiter une consommation excessive de produits de RT-PCR.

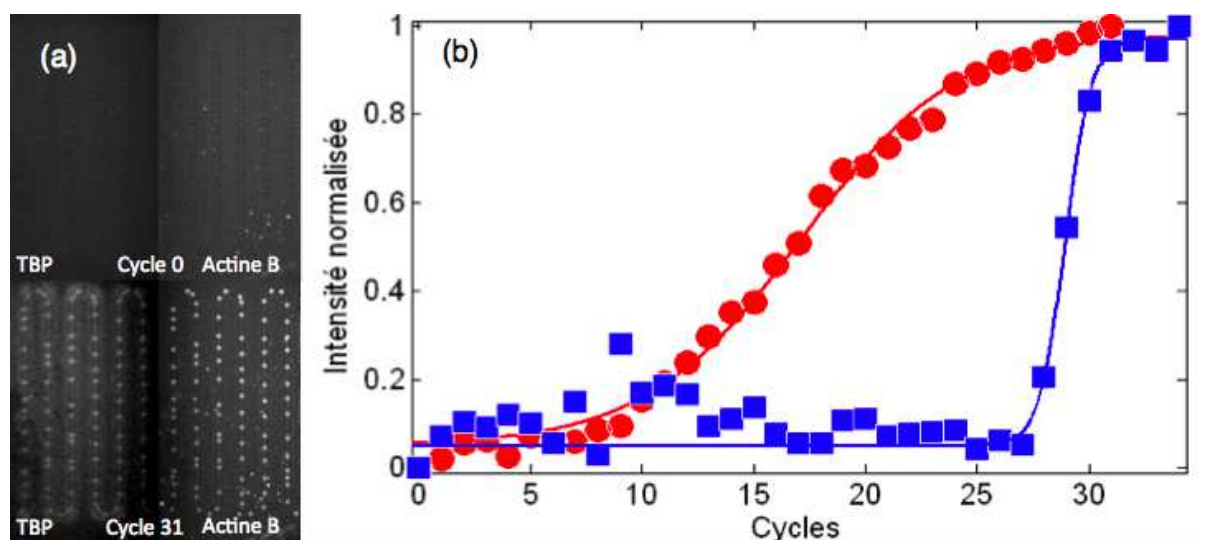


FIG. 2.28 – PCR temps réel en duplex; (a) Images de l'ensemble des gouttes prises en fluorescence aux cycles 0 et 31. (b) Suivi de l'intensité de fluorescence sur 1 goutte : les symboles ronds correspondent à Actine B, les symboles carrés correspondent à TBP.

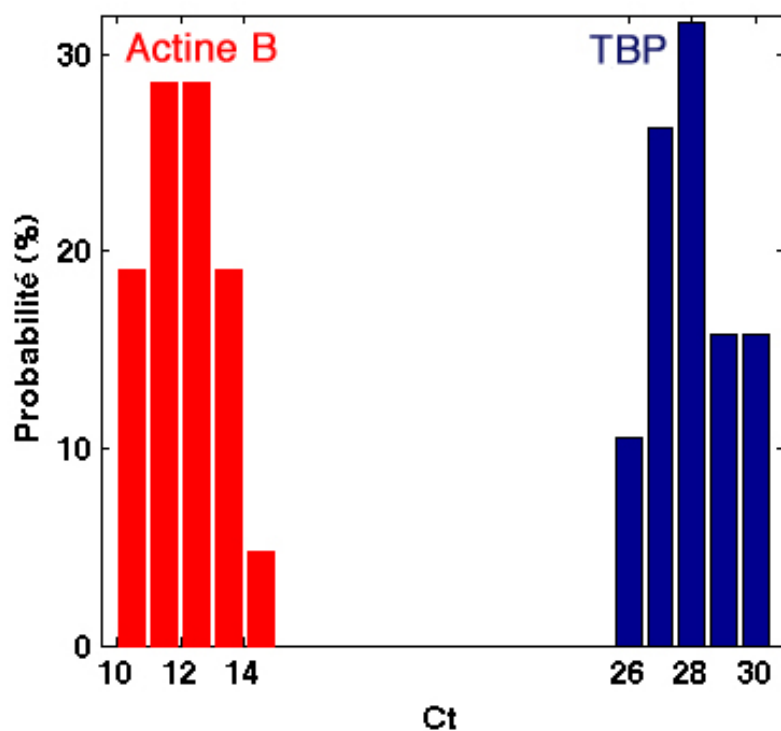


FIG. 2.29 – Valeur des Ct obtenus pour Actine B et TBP en duplex.

Extraction liquide-liquide dans les microgouttes : fondements et applications

Ce chapitre est voué à l'étude détaillée des phénomènes d'extraction dans un micro-canal entre une phase dispersée et une phase continue ; il met en évidence l'importance des phénomènes transitoires dans la cinétique des transferts. Les modèles utilisés en ingénierie chimique sont souvent loin d'être représentatifs des phénomènes considérés et trouvent leur intérêt en tant qu'outil pour dimensionner et quantifier approximativement et rapidement les processus. L'extraction liquide-liquide permet d'extraire et de séparer une grande variété de solutés (métaux, acides, molécules organiques tels que le phénol ou les colorants) à partir de solutions aqueuses (jus de lixiviation, effluents industriels, ...). Elle repose sur la différence de solubilité du soluté entre deux phases non totalement miscibles, l'une aqueuse et l'autre organique.

La première partie de ce chapitre détaille le mécanisme de transferts de masse d'un soluté entre deux solvants, l'un sous forme de gouttes en mouvement générées dans une système microfluidique, le deuxième constituant la phase porteuse. Cette étude est présentée sous la forme d'un article publié dans *Analytical Chemistry*. Les résultats expérimentaux et leur interprétation sont complétés par une résolution numérique de l'équation d'advection-diffusion dans un espace à deux dimensions, réalisée avec le logiciel Femlab 3.0 et pour laquelle le champ de vitesse à l'intérieur de la goutte est supposé connu et correspond à un vortex de Hill.

La deuxième partie est focalisée sur l'étude de l'extraction du zinc sous forme ionique. Le procédé, basé sur l'extraction dite réactive, est très utilisé dans la chimie industrielle des métaux lourds.

Enfin, la troisième partie étudie la possibilité d'extraire de l'ARN à partir d'une cellule ou d'une bactérie ; la méthode s'appuie sur un protocole développé par Chomczynski [Chomczynski 1987], ce qui lui valut un vif succès car, à ce jour, la publication fondatrice a été citée plus de 50000 fois.

3.1 Article : *Microfluidic droplet-based liquid liquid extraction*

Microfluidic Droplet-Based Liquid–Liquid Extraction

Pascaline Mary,^{*,†} Vincent Studer,[‡] and Patrick Tabeling[†]

Laboratory of Microfluidics, UMR Gulliver, and the Laboratory of Biology, UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

We study microfluidic systems in which mass exchanges take place between moving water droplets, formed on-chip, and an external phase (octanol). Here, no chemical reaction takes place, and the mass exchanges are driven by a contrast in chemical potential between the dispersed and continuous phases. We analyze the case where the microfluidic droplets, occupying the entire width of the channel, extract a solute—fluorescein—from the external phase (extraction) and the opposite case, where droplets reject a solute—rhodamine—into the external phase (purification). Four flow configurations are investigated, based on straight or zigzag microchannels. Additionally to the experimental work, we performed two-dimensional numerical simulations. In the experiments, we analyze the influence of different parameters on the process (channel dimensions, fluid viscosities, flow rates, drop size, droplet spacing, ...). Several regimes are singled out. In agreement with the mass transfer theory of Young et al. (Young, W.; Pumir, A.; Pomeau, Y. *Phys. Fluids A* 1989, 1, 462), we find that, after a short transient, the amount of matter transferred across the droplet interface grows as the square root of time and the time it takes for the transfer process to be completed decreases as $Pe^{-2/3}$, where Pe is the Peclet number based on droplet velocity and radius. The numerical simulation is found in excellent consistency with the experiment. In practice, the transfer time ranges between a fraction and a few seconds, which is much faster than conventional systems.

Liquid–liquid extraction techniques are currently used in several fields, mostly chemical engineering, analytical chemistry, and biology. In the passive extraction process, which is the subject of the present paper, no chemical reaction takes place and the transfer of matter is driven by unbalanced chemical potentials between the two liquid phases. Specifically, in a system where two immiscible liquids are in contact, solutes exchange up to a point where the concentration ratios in the two liquids reach their equilibrium values. This technique is indeed interesting for extracting solutes from a specified phase or purifying a medium.

Spectacular applications of liquid–liquid extraction can be found in chemical engineering,^{1,2} analytical chemistry,^{3,4} environmental sciences,^{5–7} and in biology.^{8,9}

There are several incentives to miniaturize liquid–liquid extraction methods.¹⁰ Usual advantages of miniaturization are the reduction of the sample and portability. In addition, transport phenomena are faster in microsystems¹¹ than in ordinary sizes systems, and therefore, one may expect that liquid extraction takes less time to be achieved in miniaturized devices. This comes from the fact that diffusion times (which most often control the transport in microsystems) scale as the square of the system size,¹¹ and obviously the distances to travel are much shorter. This feature was demonstrated recently in coflow geometries,^{12–17} using slug flow in capillaries¹⁸ or droplets,¹⁹ and for droplets trapped in a microchamber.²⁰

Here we investigate microfluidic systems where transfers occur between moving droplets and a continuous phase. Extracting solutes by using emulsions is currently used in the industry, but the results that are available in this domain cannot be extrapolated to the microscale, generally because drops are unconfined and Reynolds numbers are large in ordinary systems. It is thus interesting to know whether miniaturizing droplet-based extraction techniques may lead to interesting performances. Another motivation of the present work is to explore the perspective of fabricating

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pascaline.mary@espci.fr.

[†] Laboratory of Microfluidics.

[‡] Laboratory of Biology.

(1) Seiler, M. *Fluid Phase Equilib.* 2006, 241, 1.

(2) Bowden, S. A.; Monaghan, P. B.; Wilson, R.; Parnell, J.; Cooper, J. M. *Lab Chip* 2006, 6, 740.

(3) Maruyama, T.; Nakashima, K.; Kubota, F.; Goto, M. *Anal. Sci.* 2007, 23, 763.

(4) Hendriks, G.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P. J. *Chromatogr., B* 2007, 853, 234.

(5) Baxter, D. C.; Frech, W. *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, 615.

(6) Hasegawa, M. A.; Sabatini, D. A.; Harwell, J. H. J. *Environ. Eng.* 1997, 123, 691.

(7) Pires, M. J.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. *Biotechnol. Prog.* 1996, 12, 290.

(8) Kula, M.-R.; Kroner, K.; Hustedt, H. *Adv. Biochem. Eng.* 1982, 24, 73.

(9) Jiang, H.; Guo, Q. X. J. *Environ. Eng.* 2007, 133, 198.

(10) Majors, R. E. *LCGC Asia Pac.* 2006, 9, 8.

(11) Tabeling, P. *Introduction to Microfluidics*; Oxford University Press: New York, 2005.

(12) Tokeshi, M.; Minagawa, T.; Kitamori, T. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1711.

(13) Brody, J. P.; Yager, P. *Sens. Actuators, A* 1997, 58, 13.

(14) Kamholz, A. E.; Weigl, B. H.; Finlayson, B. A.; Yager, P. *Anal. Chem.* 1999, 71, 5340.

(15) Hisamoto, H.; Horiuchi, T.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Kitamori, T. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1382.

(16) Hisamoto, H.; Horiuchi, T.; Uchiyama, K.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Kitamori, T. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5551.

(17) Minagawa, T.; Tokeshi, M.; Kitamori, T. *Lab Chip* 2001, 1, 72.

(18) Burns, J. R.; Ramshaw, C. *Lab Chip* 2001, 1, 10.

(19) Kumemura, M.; Korenaga, T. *Anal. Chim. Acta* 2006, 558, 75.

(20) Chen, H.; Fang, Q.; Yin, X.-F.; Fang, Z.-L. *Lab Chip* 2005, 5, 719.

droplet-based lab on a chip including liquid–liquid purification units.

In the present paper, we offer for the first time a detailed analysis of the transfers that take place between moving microdroplets and an external phase, in a microfluidic context. We figure out the physics of the process and find that the process has specific features that differ from usual emulsion-based extraction systems. Along the work, we establish a new law that determines the time it takes to reach the equilibrium, a crucial quantity for the extraction technique. We expect this law to represent well the performances of microfluidic devices using droplet-based extraction, provided the Reynolds number is small and the droplets occupy the entire width of the microchannels, two characteristics that are currently encountered in microfluidic technology.

THEORETICAL BACKGROUND

From a theoretical standpoint, it is usual, in the field of chemical engineering, to view the transfer of mass between a continuous phase and a droplet as a first-order reaction even if there is no chemical reaction in the problem.^{21–23} In this approach the solutes are supposed to be homogeneous at all times within and outside the droplet, and there is a thin layer, of thickness δ , located at the interface, across which mass transfers take place. In this view, by applying Fick's law, one has the following relation:

$$\frac{dC}{dt} = k \frac{(KC_{\text{ext}} - C(t))}{\delta}$$

in which t is time, $C(t)$ is the concentration in the droplet, K is the partition factor, k is an effective diffusivity, and C_{ext} is the concentration outside the droplet (assumed to be fixed). After integration, one obtains

$$C(t) = KC_{\text{ext}} + (C(0) - KC_{\text{ext}}) \exp(-kt/\delta)$$

In this approach, a challenge is to provide a rationale for determining the ratio k/δ , which controls the duration of the entire process.

Although this approach is commonly used in chemical engineering, it is important to mention another theory which applies at high Peclet number (defined as $Pe = UL/D$, where U is the typical velocity, L is the size of the droplet, and D the diffusion constant) and small Reynolds numbers (defined as $Re = \rho LU/\eta$, in which ρ is the density and η is the dynamic viscosity of the fluid) and, contrarily to the precedent one, does not bear on an assumption of homogeneity inside the droplet. This approach is particularly relevant for microfluidics, where mixing is slow, Peclet numbers are large, and Reynolds numbers are small.¹¹ This theory (worked out by Pomeau and Pumir in the years 1980–1990) concerns the transport of tracers through closed zones in the presence of internal circulations²⁴ and is supported by experimental work.²⁵ Here we view the droplet as such a closed zone, immersed in a reservoir held at a fixed concentration. Although this theory was originally devised for purely diffusive problems,

the conclusions also apply to passive extraction processes, like those we consider in this paper. According to the theory, the process splits into two phases. In a first phase, the tracer spreads along the trajectories that pass close to the boundaries, homogenizing the concentration along the fluid streamlines. The corresponding process, called “shear enhanced diffusion”, is now well documented (see, for instance, ref 26, in which the case where many recirculation zones exist is also considered, giving rise to so-called “hyperdiffusion processes”). In this process, shear plays a crucial role by accelerating the spreading of the dye along the streamlines. In the case where there is a shear close to the internal boundary of the droplet, and still using the theory of ref 24, this first regime holds up to a time $t^* = (l^2/D)Pe^{-2/3}$ where l is a characteristic length (typically the droplet size).

In a second phase, the tracer is homogeneous along the streamlines. It diffuses normally to them, under the action of molecular diffusion only (here the shear does not play any role) and, thus, progressively invades the closed zone. In this stage, theory predicts that the boundary layer thickness along with the amount of tracer that penetrates into the closed zone increases as the square root of time, as we expect for a purely diffusive process. We thus have the following law:

$$\frac{C(t)}{C(t^*)} \sim \left(\frac{t}{t^*}\right)^{1/2}$$

where $C(t)$ is the average concentration in the closed zone and $C(t^*)$ is the value of $C(t)$ for $t = t^*$. This process ends when complete homogeneity is achieved, i.e., when the concentration in the closed region equals a constant C_{inf} . We then have the following estimate for the time t_f it takes for the process to be complete:

$$t_f \sim t^* \left(\frac{C_{\text{inf}}}{C(t^*)}\right)^2 \sim t_D Pe^{-2/3} \left(\frac{C_{\text{inf}}}{C(t^*)}\right)^2$$

We shall use these expectations to interpret our experimental measurements.

MATERIALS AND METHODS

Microfabrication. We fabricated the device using soft lithography techniques.²⁷ Briefly, a high-resolution printer was used to generate a mask from a CAD file. The mask was used in contact photolithography with SU-8 photoresist (MicroChem, Newton, MA) to generate a negative “master”, consisting of patterned photoresist on a silicon wafer. Positive replicas with embossed channels were fabricated by molding poly(dimethylsiloxane) (PDMS, RTV) onto the master. PDMS has many advantages including high flexibility, high transparency, low cost, and a simple fast fabrication process. The material is hydrophobic and thus favors water-in-oil emulsions.²⁸ PDMS replicas were placed against glass slides and held onto them by adhesion forces, thus forming microchannels. The dimensions of the rectangular microchannels ranged between 30 and 95 μm for the height, $(205 \pm 5) \mu\text{m}$ for the width, and between 4 and 12 cm for the lengths. The four types of devices we microfabricated are sketched in Figure 1. Type

(21) Cantwell, F. F.; Freiser, H. *Anal. Chem.* **1988**, *10*, 1.

(22) Lucy, A. C.; Cantwell, F. F. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 101.

(23) Mörters, M.; Bart, H.-J. *Chem. Eng. Technol.* **2000**, *23*, 353.

(24) Young, W.; Pumir, A.; Pomeau, Y. *Phys. Fluids A* **1989**, *1*, 462.

(25) Cardoso, O.; Tabeling, P. *Europhys. Lett.* **1998**, *7*, 225.

(26) Young, W. R. *J. Fluid Mech.* **1988**, *193*, 129.

(27) Duffy, D.; McDonald, J.; Schueller, O.; Whitesides, G. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974.

(28) Dreyfus, R.; Willaime, H.; Tabeling, P. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 144505.

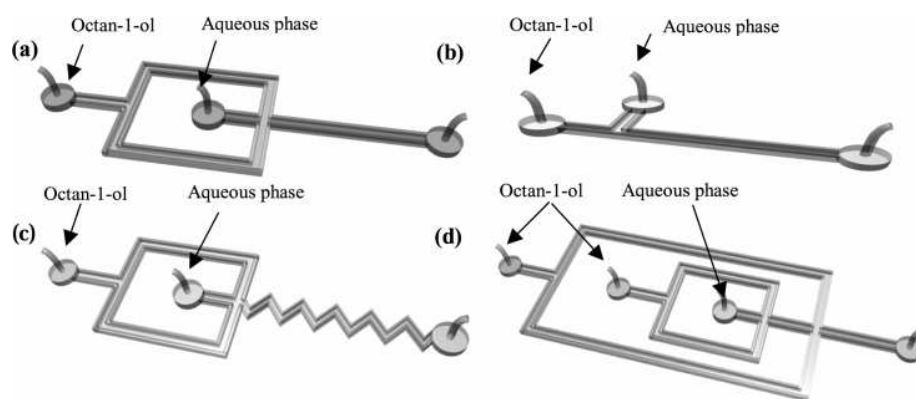


Figure 1. Schematic views of the microfluidic chips used in the paper. (a) Hydrofocusing device. (b) T geometry device. (c) Flow-focusing geometry device with winding channels. (d) Double-flow-focusing geometry device.

A is a flow-focusing geometry device with a 50 μm width and long constriction at the beginning of the outlet channel, type B is a T-shaped junction, type C is a flow-focusing geometry device with a zigzag collecting channel, and type D is a double-flow-focusing geometry device with separate entries.

Droplet Formation. Device A is currently used to produce droplets;^{29–31} in such a configuration, an elongational flow produces a thin filament which breaks into droplets; the droplets are further convected downstream. In configuration B, droplets are formed at the T-junction.^{32,33} In this system, the interface is pinched by the flow of the continuous phase and eventually breaks up into droplets. Configuration C is similar to A, with a zigzag channel that enhances mixing within and outside the droplets.³⁴ In configuration D, mass transfers between the droplet and the continuous phase take place well after the droplet is formed. Then, in this configuration, the two processes (droplet formation and mass transfers) are decoupled.

Chemicals. Droplets are composed by water or water/glycerol mixtures buffered by phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4, PAA Laboratories GMBH) with octan-1-ol (Sigma, 99%, liquid) as the external phase. The materials transferred across the droplet interfaces are fluorescein (Fluka, Standard Fluka, free acid) or rhodamine B (Sigma, dye content 95%). As most of the dyes are surface-active, they have to be used in very dilute concentration. The interfacial tension γ between water and octanol in the presence of fluorophore was measured using the ring method (Krüss tensiometer K9); we checked that within the range of concentrations we considered fluorescein does not significantly modify the interfacial energies (see Supporting Information Figure S-1). PBS is used to ensure stability of quantum yield of fluorescence emission.^{35,36} Partition coefficients K_{ow} (defined by the ratio of the fluorophore concentration in octanol to fluorophore concentration in the aqueous phase under equilibrium conditions) were measured by classical UV–vis spectroscopy. We found 0.01 and 55 for fluorescein and rhodamine, respectively.

Fluorescent tracers (FluoSpheres sulfate fluorescent microspheres, 500 nm, Molecular Probes) were added to the aqueous phase to observe internal recirculations inside the liquid droplets.

Operating Procedure. Depending on whether we work in the purification or extraction modes, the procedures are the following:

Case α : Extraction. The tracer is initially introduced in the continuous phase, and the mass transfer is directed from the external phase toward the droplet. In this situation, we use fluorescein as the transferred quantity.

Case β : Purification. The tracer is initially introduced in the dispersed phase, and the transfer is directed from the droplet toward the external phase. In this situation, we use rhodamine as the transferred quantity.

Flow Control. There exists a number of possibilities favoring the control of the droplets characteristics, such as their size or their velocity;^{37–39} in the present work we controlled the parameters by monitoring flow conditions. Two methods of flow control were used: fluids were placed in elevated plastic syringes to produce a hydrostatic pressure. In the second method, syringe pumps (ICS 3200; KD Scientific, MA) with 2500 μL volume syringe (Gastight syringe, Hamilton, NV) were used. Each syringe needle was connected with the microchip via a Tygon tube. The range of flow rates we span comprised between 0 and 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

The droplet sizes varied between 165 and 195 μm . After they are formed, they move steadily along the main channel.

Fluorescence Measurements. The experimental setup was based on an inverted epifluorescence microscope (Leica, DM IRB). A mercury lamp was used as the excitation source. Different sets of filters were used for each fluorophore (Chroma, FITC; exc, 470 nm/dic, 497 nm/em, 522 nm) for fluorescein and (Chroma, TRITC; exc, 545 nm/dic, 570 nm/em, 610 nm) for rhodamine B. Intensity measurements were performed using a sensitive CCD camera (Hamamatsu, C9100) and a 10 $\times$ lens (Leica, N plan, magnification/aperture: 10 $\times$ /0.25) mounted on the microscope, which displayed via a link to computer a top view image from inside the microchannel. For low concentrations of fluorophore (typically less than $5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), we checked that the intensity of emission varies linearly with the concentration. (See Supporting Information Figure S-2.) Since pH and temperature

(29) Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 364.

(30) Garstecki, P.; Gitlin, I.; DiLuzio, W.; Whitesides, G. M.; Kumacheva, E.; Stone, H. A. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 2649.

(31) Joanicot, M.; Ajdari, A. *Science* **2005**, *309*, 887.

(32) Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163.

(33) Xu, J. H.; Li, S. W.; Tan, J.; Wang, Y. J.; Luo, G. S. *AIChE J.* **2006**, *52*, 3005.

(34) Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 767.

(35) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *51*, L1.

(36) Klonis, N.; Sawyer, W. H. *J. Fluoresc.* **1996**, *6*, 147.

(37) Willaime, H.; Barbier, V.; Kloul, K.; Maine, S.; Tabeling, P. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 054501.

(38) Barbier, V.; Willaime, H.; Tabeling, P.; Jousse, F. *Phys. Rev. E* **2006**, *74*, 046306.

(39) Fair, R. B. *Microfluid. Nanofluid.* **2007**, *3*, 245.

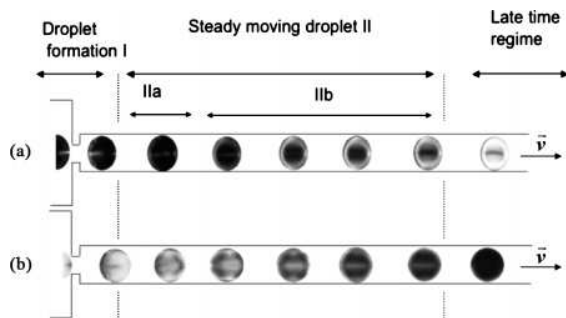


Figure 2. Fluorescence image of droplets at different times in the channel in configuration A: respectively, extraction, droplet composed of a mixture of water/60 wt % glycerol, and purification, water droplet.

are constant in the experiment, and concentrations are low at all times, we assumed, throughout the paper, a linear variation of the intensity emitted by the fluorophores with concentration.

RESULTS

Qualitative Aspects. Figure 2, parts a and b, shows droplets forming and moving along straight microchannels in cases α , i.e., droplet extracting fluorescein from the external phase, and β , i.e., rejecting rhodamine into the external phase. We concentrate here on case α (Figure 2a), but the description we give here can be easily adapted to case β .

The process can be split into three steps:

Step I: Droplet Formation (Picture 1 of Figure 2). Fluorescein penetrates into the precursor droplet before it detaches. In this step, fluorescein is mostly collected around the tip: it penetrates into the precursor droplet through the tip interface and is dispersed internally by the action of recirculating flows. The existence of recirculations is supported by tracer studies, which shows the existence of a pair of eddies within the droplet, during the formation stage (see Supporting Information Figure S-3).

Step II: Steadily Moving Droplets. After the droplet is formed, it moves downstream at constant velocity. In the series of pictures of Figure 2a, the extraction process appears different from the one observed in step I: fluorescein penetrates directly through the side flanks of the droplet and is rapidly advected internally along the droplet boundaries forming an annular region rich in fluorescein. Detailed analysis of the exchange process indicates that one may define two subregimes:

Subregime IIa. The tracer is spreading along the streamlines located close to the droplet interface, driven by the concentration gradients that still exist along the fluid trajectories in those regions. This transient behavior evokes the process of “shear enhanced diffusion”,^{25,26} where mass transfers are considerably enhanced by the shear.

Subregime IIb. The tracer is now homogeneous along the streamlines. This gives rise to annular patterns which grow radially and tend to fill the droplet. This regime evokes the one described theoretically, in which the spreading of the tracer, directed normally to the streamlines, is driven by molecular diffusion only—shear does not play any role.

During step II, the stagnation points located at the tip (and at the rear as well) of the droplet do not seem to play a significant role. This behavior is probably due to the fact that, during step I, a depletion zone forms in the vicinity of the stagnation points, close to the front and the rear of the droplet, preventing them to contribute further to the mass transfers. After the fluorescent ring

is formed within the droplet (i.e., in subregime IIb), its width grows in size and eventually fills the entire droplet homogeneously. Several aspects of this process seem to depend on the viscosity of the aqueous phase. In the case of low viscosity, the fluorescence ring appears just after the formation of the droplet and rapidly disappears by diffusion. In the case of high viscosities, the ring is clearly apparent and remains visible during a substantial lapse of time, typically 1 s. All these observations are consistent with the flow patterns we visualized inside the droplets, which moreover agree with the literature on the subject.^{40–42}

Step III: Late Time Regime. In this regime, a steady state is reached for the concentration fields within and outside the droplet. In the case of extraction, the droplet is homogeneously filled with a steady amount of fluorescein, and in the case of purification, the droplet is almost completely emptied. It is instructive to visualize the structure of the concentration field outside the droplet in the late time regime—they are shown in Figure 3 for the extraction case and in Figure 4a for the purification case. Remarkable patterns appear. On Figure 3, fluorescein depletion areas, in the form of stripes, appear in the external phase. The existence of these stripes comes from the fact that in regime II, fluorophores penetrate through the sides of the droplets, thereby leaving depletion zones behind. Because of low values of Reynolds number Re (typically Re ranges between 0.01 and 0.1), mixing is inefficient and the stripes do not have time to blur by diffusion before the next droplet arrives. This leads to the steady patterns of Figures 3 and 4. We checked that when droplets are far apart stripes vanish at distances comparable to the lateral diffusive length away from the droplets.

The three regimes of extraction that we discussed for the case of configuration A in the extraction case, also hold for configurations B and C and for the purification case; remarkably, purification and extraction are the duals of each other in the sense that the concentration fields are the same at all time provided rich zones are replaced by depleted zones and vice versa. In effect, in step I and in the purification case, rhodamine is expelled from the droplet mostly through the stagnation point located at the tip of the droplet. In step II, the rhodamine is transferred outside the droplet through the side flanks of the droplet; in step III, the droplet is homogeneously emptied and purification is complete. The events are thus similar in the purification and the extraction process. To illustrate this symmetry, one may mention that, in the late time regime, enrichment stripes appear in the external phase at the same locations as depletion stripes for the case of extraction: the correspondence depletion/enrichment in the late time regime is demonstrated in Figure 4.

Initial and Final Quantities of Matter Extracted (or Rejected). Amount of Matter Transferred during the Formation of the Droplet. The quantity of fluorescein that is extracted by the droplet during its formation depends on a number of parameters among which the formation time is the most noticeable. This can be explained by noting that, the longer the formation stage, the larger the amount transferred during this step. This feature is shown in Figure 5, which represents the evolution of the total amount of fluorescein extracted during the formation step as a function of the product of the droplets emission frequency f by

(40) Sarrazin, F.; Loubière, C.; Prat, L.; Gourdon, C.; Bonometti, T.; Magnaudet, J. *AIChE J.* **2006**, *52*, 12.

(41) Wang, C.; Nguyen, N.-T.; Wong, T. *Sens. Actuators, A* **2007**, *53*, 317.

(42) Kashid, M. N.; Gerlach, I.; Goetz, S.; Franzke, J.; Acker, J. F.; Platte, F.; Agar, D. W.; Turek, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 5003.

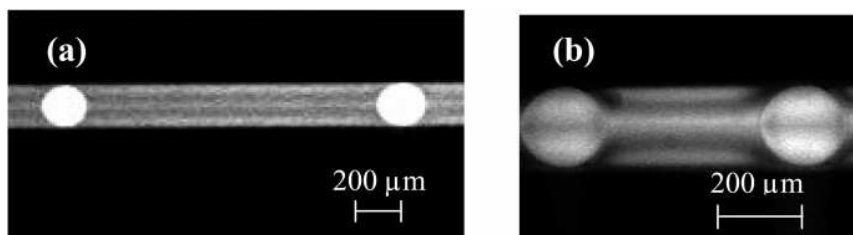


Figure 3. Fluorescence image of the outside phase during extraction for two different distances between droplets in configuration A: (a) was taken with an objective 5× and (b) with an objective 10×. For the two cases, the velocity of the droplet is 10 mm/s and the droplet's diameter is 200 μm. Interdrop distance is 1350 μm for (a) and 565 μm for (b).

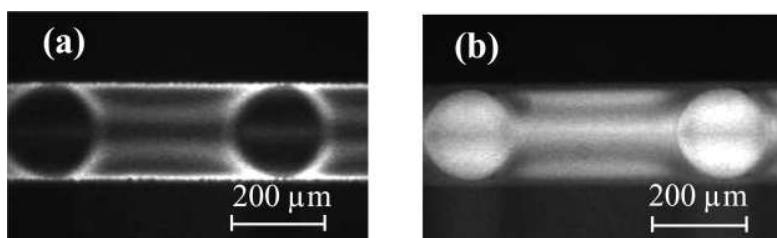


Figure 4. Evidence for a symmetry between the patterns produced during extraction and purification: (a) purification; (b) extraction.

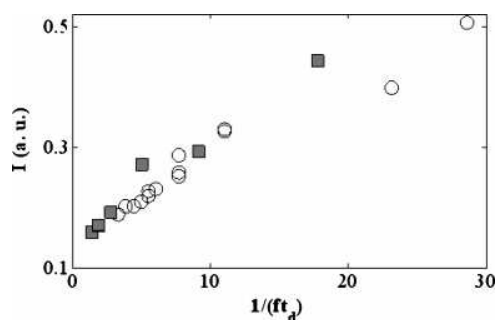


Figure 5. Normalized fluorescence intensity within the droplets just after their formation vs inverse of emission frequency rescaled by the characteristic time of diffusion h^2/D in the case of configuration A. Droplet diameter = (185 ± 10) μm, droplet velocity ranges between 7 and 12 mm/s. ■ glycerol 30 wt %/water mixture, $h = 70$ μm; ○ pure water, $h = 70$ μm.

the characteristic time of diffusion $t_D = h^2/D$ where h is the height of the channel. The graph of Figure 5 indicates an increasing dependence of the amount of matter transferred into the droplet with the characteristic formation time, a result apparently independent of the diffusion constant within the droplet. For each experiment, the final radius of the droplet is kept constant and the time of residence of the growing droplet before liberation is varied by adjusting the flow rates of dispersed and continuous phase (as expected, the greater the flow rates are the lower f is).

Total Amount of Matter Transferred into the Droplet during the Extraction Process. Here, we investigate to which extent the saturation level, which represents the overall quantity of material transferred into the droplet, may be understood on a physical basis.

Figure 6 shows for configuration A and in the case of extraction, the evolution of the total concentration of fluorescein C_w extracted by a droplet with the ratio $\beta = V_o/V_w$, where V_w represents the droplet volume and V_o is the volume of octanol between two successive droplets. C_w is determined as the saturation value of the averaged concentration within the droplet in the late time regime (step III in our precedent classification). On physical grounds, V_o represents the volume of the reservoir

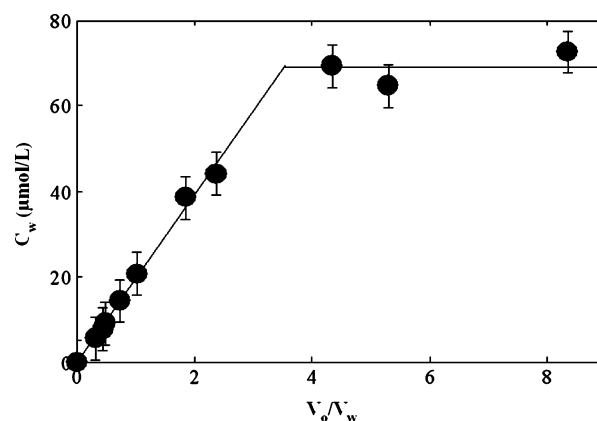


Figure 6. Variation of C_w as a function of $\beta = V_o/V_w$ in configuration A: ● experimental data; the continuous line is a piecewise linear model.

which supplies fluorescein to the droplet. It is thus not surprising to find that, in some range of parameters, the larger V_o is, the more fluorescein can be extracted, as shown in Figure 6. We can make a step further by combining equilibrium condition and mass conservation. One obtains

$$C_w = \frac{\beta C_{\text{oct}}}{1 + \beta K_{\text{ow}}} \quad (1)$$

where C_{oct} is the averaged concentration of fluorescein present, initially, in the external phase, i.e., in octanol. As the quantity $K_{\text{ow}}\beta$ is small, compared to 1

$$C_w \approx \beta C_{\text{oct}} \quad (2)$$

This theoretical line is shown in Figure 6 and agrees well with the experiment. As the ratio $\beta = V_o/V_w$, increases, the model indicates that the curves flattens out, consistently with the experiment. We nonetheless observe a saturation level several times below the expected equilibrium value. We suggest that this

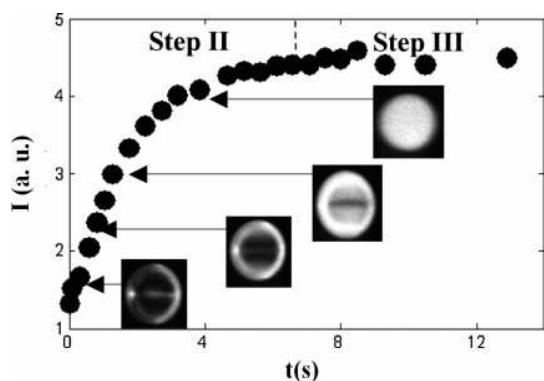


Figure 7. Intensity of fluorescence within the droplets (water/glycerol mixture, 60 wt % in glycerol) as a function of time in configuration A, $h = 70 \mu\text{m}$, droplet diameter = $185 \mu\text{m}$, droplet velocity = 8 mm/s .

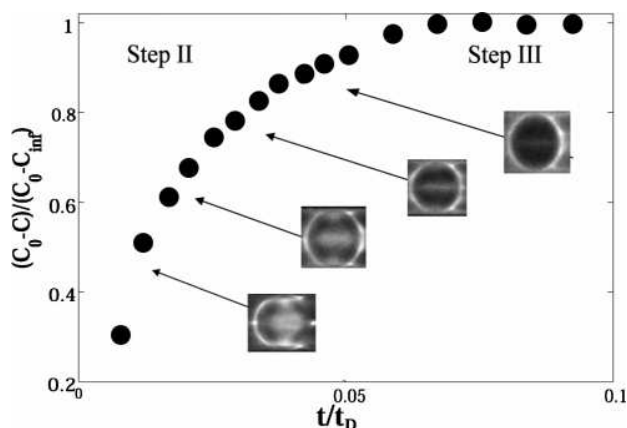


Figure 8. Variation of normalized $C_0 - C$ vs time during rhodamine purification in configuration A: $h = 70 \mu\text{m}$, droplet diameter = $195 \mu\text{m}$, droplet velocity = 10 mm/s .

effect is due to the existence of depleted zones in the external phase. Consequently, the droplet “sees” an average concentration in fluorescein lower than the average concentration in the volume V_w , and thus, the saturation level lies below the theoretical value, which assumes homogeneity in the reservoirs.

Dynamics of the Extraction Process. We now look at the dynamics of the extraction/purification process on a more quantitative basis. Figure 7 shows the temporal evolution of the spatially averaged fluorescence intensity emitted by a droplet, in configuration A, in the extraction case.

On the same graph, we show the concentration patterns observed in the same conditions at different times. One sees a continuous evolution of the fluorescence intensity with time. In this case, the saturation regime is reached after 10 s, which represents a small fraction of the diffusion time h^2/D (which is equal to 89 s in this particular case). Throughout the experiments, the time it takes to reach saturation ranges between 1.5 and 12 s, which is much smaller than in usual extraction devices, a direct consequence of miniaturization.

A similar curve is obtained in the purification case (see Figure 8). In Figure 8, we work in configuration A, and use rhodamine, initially introduced in the droplet before its formation and further transferred into octanol—the external phase. We plot the concentration deficit $C_0 - C$ normalized with respect to the saturation level, along with different droplet images taken at various times, in the same experimental conditions. C_0 represents the initial

concentration in rhodamine and C_{inf} the concentration at saturation. The data have a similar structure as in Figure 7. Here also, the saturation level is reached at a fraction of diffusive time h^2/D , which is 14 s in this particular case.

Detailed Analysis of Regime II. Figure 9a shows a series of graphs similar to Figure 7, representing the time evolution of the averaged intensity of fluorescence emission I normalized by the intensity at saturation I_{inf} , for a number of different fluids, configurations, and flow conditions, both in the extraction and purification cases. We chose log–log coordinates so as to clearly visualize subregimes. This set of curves shows that the amount of matter transferred into the droplets slowly increases, further raises up more vigorously, and eventually levels off. By inspecting the concentration patterns that develop inside the droplet, one may conclude that the first regime should be identified to step IIa, a regime in which the concentration is still not homogeneous along the particle trajectories, close to the droplet interface. According to the theory of ref 24, this regime ends at a time $t^* = (l^2/D)Pe^{-2/3}$, a prediction we found consistent with the observation. After this time, the concentration increases in time in a way consistent with the theoretical expectation, i.e., as the square root of time, in all cases. This range of time corresponds to step IIb. Eventually, the curves level off, giving rise to step III.

Inspired by the theory, we succeeded to represent all our data on a single curve. To obtain this plot, we rescaled the time t by the theoretical expression for t^* , i.e., $t^* = (l^2/D)Pe^{-2/3}$, and the intensity by that measured for $t = t^*$, and we may call I^* . When this intensity could not be directly measured, we extrapolated the experimental curves of regime IIb to obtain an estimate of I^* . Physically, by doing so, we forced the conditions to be the same at $t = t^*$ for all experiments. The result is shown in Figure 9b. It appears that, by using this rescaling, all the experiments collapse onto a single curve up to the late time regime. In agreement with the theory of ref 24, the “universal” curve displays, for $t > 2t^*$, an evolution that may be represented by the following expression:

$$C(t) = C(t^*) \left(\frac{t}{t^*} \right)^{1/2}$$

These measurements support the idea that the theoretical framework established in ref 24 is relevant for interpreting the experiments.

In addition, we analyzed the dynamics of the massic boundary layer, within the droplet for the range of time corresponding to regime IIb. The result is shown in Figure 10. We observed that for $t > t^*$ the boundary layers grow as the square root of time at all Peclet numbers we could produce. The fact that δ increases as the square root of time in this range of time (with a prefactor equal to the diffusion constant) agrees remarkably well with the theoretical expectations established in ref 24 and provides a strong justification for using this theory as a framework of interpretation for our experiment. This result thereby substantiates the idea that the assumption of homogeneity of the tracers at all time is not tenable. One should treat the concentration field as nonhomogeneous at all time to provide an account of the phenomenon.

Finally, we determined the time t_t it takes to reach equilibrium, i.e., the time it takes to extract or purify a crucial quantity for evaluation of the performance of extraction and purification devices. This time (rescaled by the diffusive time h^2/D), plotted against the Peclet number is shown in Figure 11. We found that

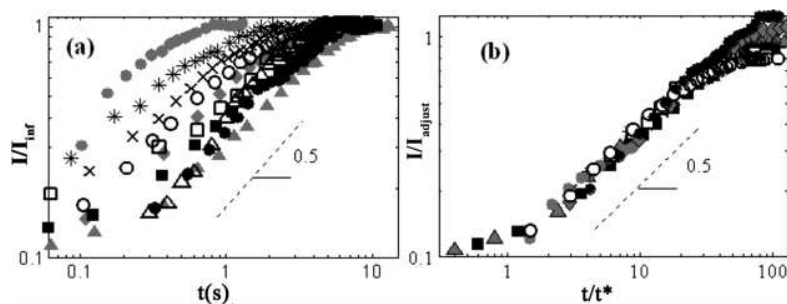


Figure 9. Normalized concentration vs (a) time and (b) time rescaled by the characteristic time of mixing along streamlines. *, ×, and ○ were obtained in a flow-focusing geometry device with pure water as the dispersed phase for a height of channel $h = 30, 40$, and $70 \mu\text{m}$, respectively, ■ with 30 wt % in glycerol for $h = 70 \mu\text{m}$, ▲ with 60 wt % in glycerol for $h = 70 \mu\text{m}$, ● was obtained in a T geometry device for $h = 70 \mu\text{m}$, △ was obtained in a double-flow-focusing geometry device for $h = 90 \mu\text{m}$, ◆ and □ were obtained in curved channels for $h = 50$ and $96 \mu\text{m}$, respectively. All data were obtained in the case of extraction except symbols ●, which represent the purification case, obtained in a flow-focusing geometry device with pure water as the dispersed phase and a channel $h = 70 \mu\text{m}$ (in this case the coordinate I/I_{inf} is replaced by $(I_0 - I)/(I_0 - I_{\text{inf}})$).

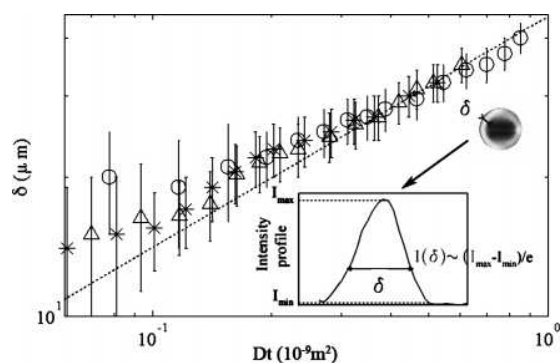


Figure 10. Log-log variation of the boundary layer as a function of the time times the diffusion constant D for * 17 wt %, △ 40 wt %, and ○ 60 wt % in glycerol. Curves collapse together for values of D , respectively, equal to $(5 \pm 0.5) \times 10^{-10}$, $(3 \pm 1) \times 10^{-10}$, and $(2 \pm 1) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, in agreement with the usual diffusion constant; the Peclet numbers are, respectively, equal to 1700, 4100, and 6500. The dashed line represents a square root time fit. δ is estimated by measuring the intensity profile of the boundary layer with the criterion $I(\delta) \approx (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})/e$.

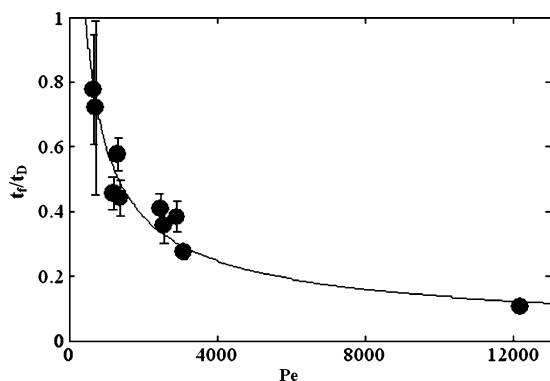


Figure 11. Evolution of the time to reach saturation normalized by the diffusion time h^2/D as a function of the Peclet number Pe . ● correspond to experimental data; the continuous line is an experimental power fit with a power of -0.64 ± 0.05 .

t_i/t_D decreases as a power law as a function of Peclet number with a power equal to 0.64 ± 0.05 . The law takes the form

$$t_i \approx (50 \pm 10)t_D Pe^{-0.6 \pm 0.1}$$

In practice, the time it takes to complete extraction or purification lies between $0.2t_D$ and $0.8t_D$.

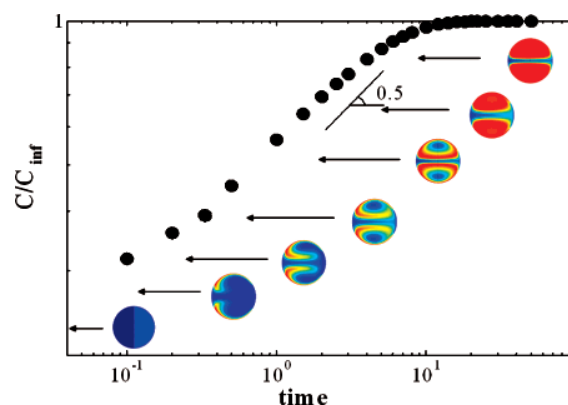


Figure 12. Variation of the normalized average concentration inside the droplet as a function of the time for $Pe = 5000$ and an initial concentration inside the droplet equal to 0.1 mol/L (located in a hemisphere).

The interpretation of this law is straightforward. One starts with the theoretical expression given in the theoretical section of the paper:

$$t_i \sim t_D Pe^{-2/3} \left(\frac{C_{\text{inf}}}{C(t^*)} \right)^2$$

Here $C(t^*)$ is the amount of fluorescein transferred into the droplet just after it is formed; as $C(t)$ increases slowly in step IIa and $t^* \ll t_i$, we can approximate $C(t^*)$ by the initial concentration C_0 . In the range of parameters we consider here, the ratio quantity C_{inf}/C_0 was chosen to be approximately constant, $0.09 < C_{\text{inf}}/C_0 < 0.11$, so that t_i varies as $t_D Pe^{-2/3}$.

Numerical Simulation. In addition to the experimental work, we performed numerical simulations of the two-dimensional advection–diffusion equation using a finite element method. The flow inside the droplet is represented by a Hill vortex; Two different boundary conditions at the droplet interface were considered: fixed concentration C_0 everywhere except close to the two saddle points of the droplets, where it is taken equal to zero (see Supporting Information Figure S-4). The latter situation attempts to reproduce the fact that, in the experiment the stagnation point outside the droplets seems to be permanently depleted. Figure 12 represents the temporal evolution of the

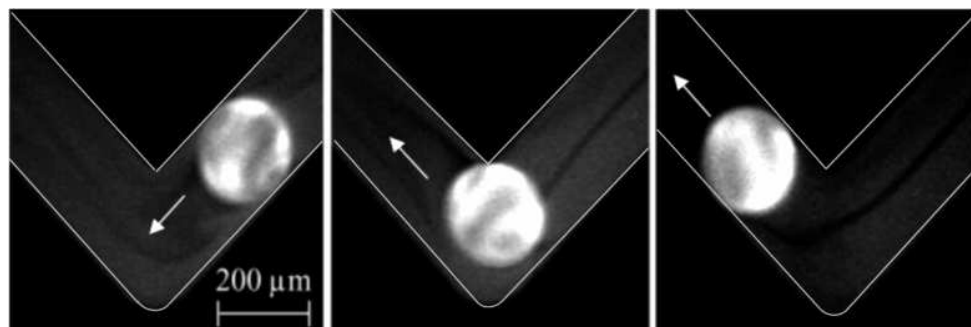


Figure 13. Fluorescence image of a droplet moving through a winding channel (configuration C). The height of the channel is $96\ \mu\text{m}$, the diameter of the droplet is $200 \pm 3\ \mu\text{m}$, and the velocity of the droplet is $8.5 \pm 0.5\ \text{mm/s}$. The time increases from left to right.

average concentration inside the droplet for a Peclet number equal to 5000 with $Pe = U_{\text{max}}R/D$, where U_{max} is the maximum of the velocity in the droplet and R is the radius of the droplet. As expected and observed in the experiment, the concentration field first homogenizes along the streamlines and eventually fills the droplet by diffusing normally to them. The one-half power law is observed beyond $t = 0.3$, and the saturation takes place at $t = 10$. Similar results are found using homogeneous boundary conditions at the droplet interface. We thus find excellent consistency between the simulation and the experiment. Among other things, the simulation shows that the concentration cannot be taken as homogeneous during the process thus ruling out approaches based on homogeneity assumption.

Attempting To Enhance Mass Transfer Kinetics with Winding Channels. In order to investigate whether the mass transfers can be substantially enhanced by increasing the mixing within and outside the droplets, we studied configuration C, i.e., a focusing geometry with a zigzag channel collecting the fluids. In the case of zigzag channels the process of mass transfers is affected by chaotic advection: this is shown on Figure 13. Curved channels are known to produce chaotic advection at low Reynolds number which in turn tends to enhance mixing. Consistently with the literature,^{34,43} mixing is achieved through a baker's transformation process; briefly, during one cycle, a fluid element undergoes folding and stretching and in the meantime the droplets reorients.

Surprisingly, the experiments we carried out revealed that zigzag microchannels change neither the order of magnitude of the time it takes to perform extraction nor the shapes of the curves representing the quantity of fluorophores extracted by the droplet with time (see Figure 9). This suggests that the kinetic of mass transfers is not strongly enhanced by working with chaotic flow patterns. This conclusion may be understood by noting that zigzag channels mix efficiently in two dimensions only (the plane of the zigzag), leaving the concentration field unmixed in the third one. The completion of the extraction process thus still relies on molecular diffusion, as in straight channels.

CONCLUSION

In the present work, we show that, by working in microfluidic systems, the extraction/purification processes are orders of

magnitude faster than in nonminiaturized techniques. Similarly as liquid–liquid extraction studies across planar interfaces, we reveal that a considerable gain of time could be obtained. We could explain, on physical grounds and in some detail, the transfer process by using established theories that describe dispersion phenomena in closed regions with recirculations. It would be incorrect, in this problem, to assume homogeneity of the concentration field inside and outside the droplet at all times. The analysis of the growth of the massic boundary layer within the droplet demonstrates that throughout the development of the process, the field is nonhomogeneous. This feature is crucial. It leads to describe the process in terms of power laws²⁴ and not exponential laws; as a consequence, the characteristic times of the extraction process depend on the initial and final levels of matter extracted by the droplet, the latter depending on the interspace between successive droplets. All these aspects may open opportunities for optimization. As a whole, our findings are encouraging for the development of fast extraction microfluidics units that use smaller amounts of organic solvent, provide superior extraction efficiencies, permit the on-line coupling to analytical measurement techniques, and allow easier automation and higher extraction throughput.

ACKNOWLEDGMENT

We thank A. Ajdari, Y. Pomeau, H. Stone, F. Sarrazin, M. Stambouli, and all members of the MMN Lab for fruitful discussions related to this work. The Ministry of Research in France, CNRS, and Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielle de la ville de Paris are gratefully acknowledged for their supports.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review September 11, 2007. Accepted February 14, 2008.

AC800088S

(43) Stone, Z. B.; Stone, H. A. *Phys. Fluids* **2005**, *17*, 063103–063103–11.

Supporting Information

Microfluidic quantitative liquid-liquid extraction in droplets

Pascaline Mary,^{} Vincent Studer,[#] Patrick Tabeling[†]*

Contribution from the Laboratory of Microfluidics, Gulliver, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005

Paris France and the Laboratory of Biology, UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005

Paris France.

I Influence of fluorescein on the interfacial tension octanol/water

As most of the dyes are surface-active, they have to be used in very dilute concentration. Measuring the interfacial tension with varied concentration proved that the influence of fluorescein can be neglected for $C < 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

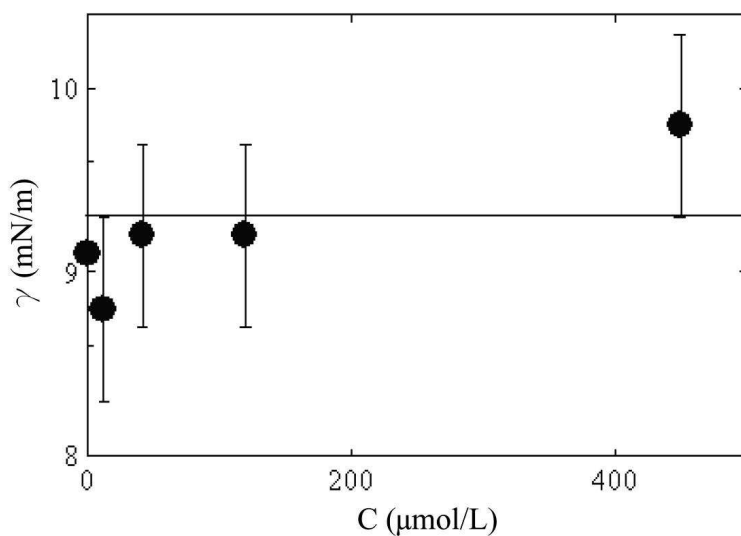


Figure S-1. Variation of the interfacial tension γ for water/octanol systems at different concentrations of fluorescein measured with the ring method.

II Variation of the intensity emitted by fluorescein in function of the concentration

For dilute concentration of fluorophore the intensity of fluorescence varies linearly with the concentration.

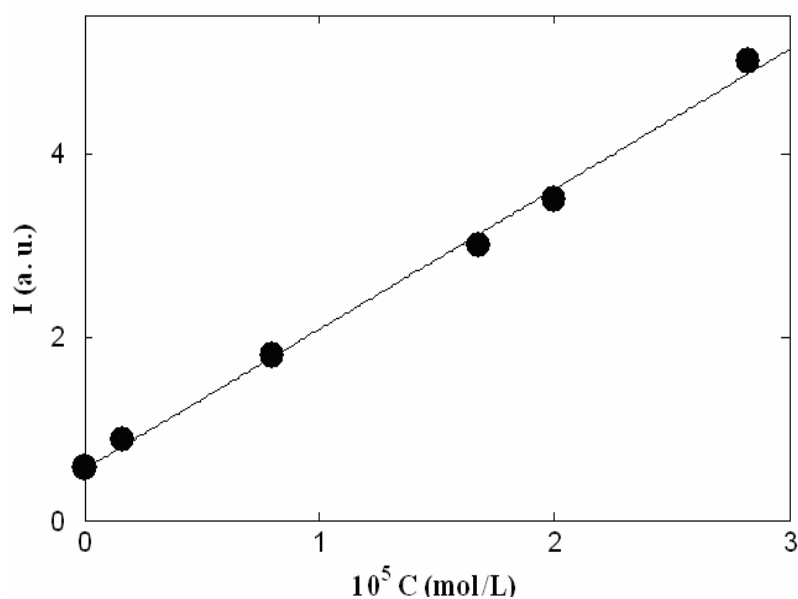


Figure S-2. Variation of the fluorescein emission intensity in function of the fluorescein concentration in the aqueous solution. Calibration solutions were introduced in a 200 μm wide and 90 μm high microchannel.

III Studies of recirculations inside droplets by introduction of fluorescent tracers

The visualization of the behavior of tracers (FluoSpheres sulfate fluorescent microspheres, 500 nm, Molecular Probes) reveals the structure recirculationg flow in the droplet during the formation stage.

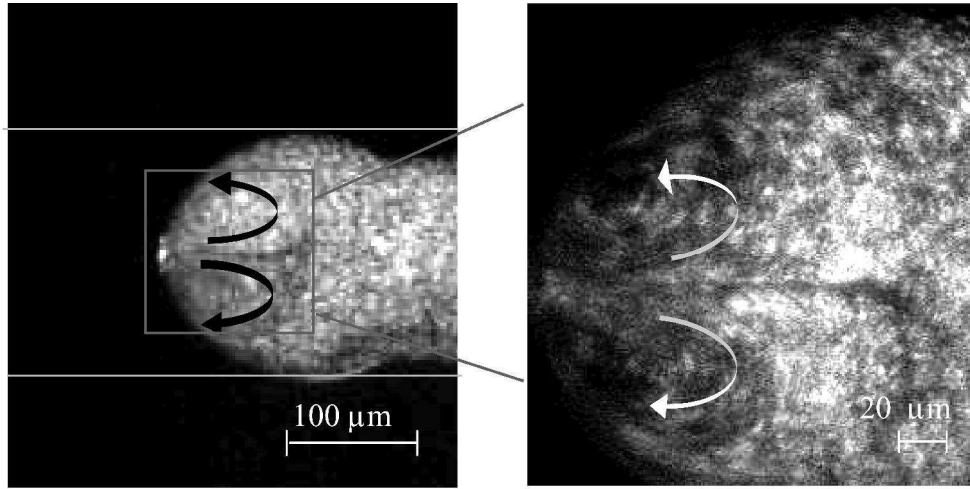


Figure S-3. Fluorescence images of a droplet filled with tracers during its formation in configuration A. The first image was taken with an objective 10X. The second image was obtained with an objective 40X

IV Numerical simulation of the evolution of the concentration inside the droplet

We studied two different boundary conditions: An external uniform concentration C_0 and a fixed concentration everywhere except close to the two saddle points. The second case is an approach of the depletion observed during the moving stage.

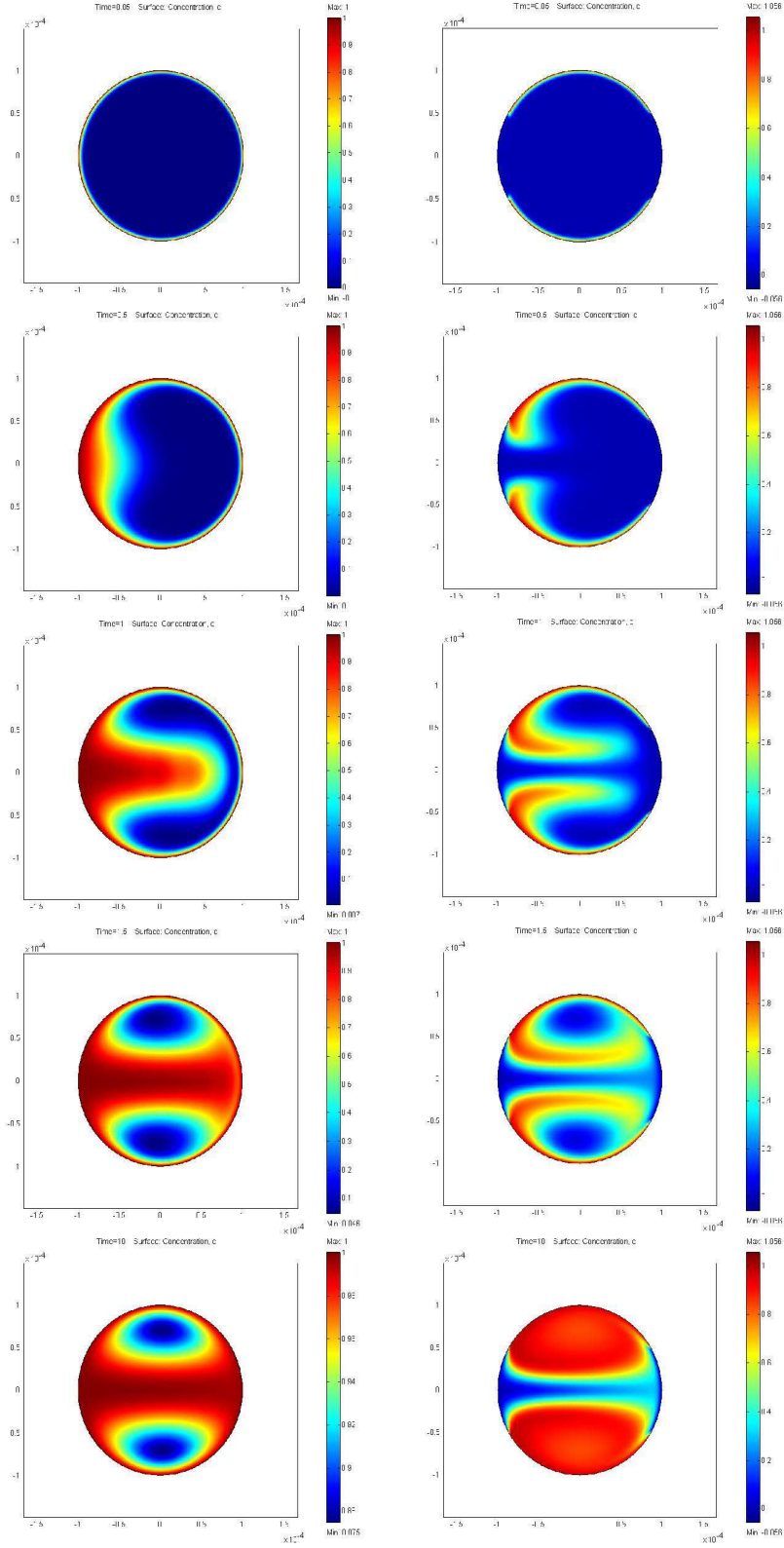
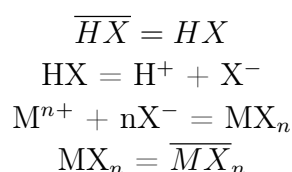


Figure S-4.: Constant contours of concentration at different times ($t = 0.05s, 0.5s, 1s, 1.5s, 10s$) for a uniform concentration outside the droplet (left plot) and a concentration null around the two saddle points (right plot) with $D = 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ and $U_{\max} = 3.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$. Droplets have a diameter equal to $200 \mu\text{m}$.

3.2 Extraction réactive du zinc suivi par fluorescence dans des gouttes

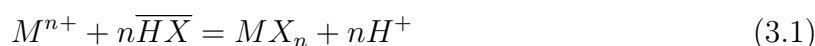
L'extraction liquide-liquide est une des techniques séparatives les plus courantes. L'hydrométallurgie représente son domaine de prédilection (extraction, purification, à partir du jus de lixiviation de minerais, de métaux ...); il faut également noter sa présence dans le domaine du nucléaire, de la pétrochimie et dans l'environnement.

Au-delà de l'extraction liquide-liquide par simple partage, *i.e.* le partage d'une molécule fondé uniquement sur la différence de solubilité du soluté entre la phase aqueuse et la phase organique, il existe d'autres possibilités d'extraction dites réactives. Ainsi, l'extraction de cations métalliques (M^{n+}) est fréquemment réalisée à l'aide d'un extractant chélatant et/ou acide (HX). L'extraction de M peut être formellement écrite suivant les différents équilibres ci-dessous (avec les barres correspondant à la phase organique) :



Il est possible de schématiser ce processus à travers une seule équation bilan si l'on considère que les espèces majoritaires sont M^{n+} , H^+ en phase aqueuse et $\overline{HX}$, $\overline{MX}_n$ en phase organique.

On obtient alors :

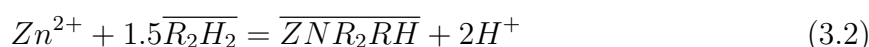


L'extractant se comporte comme un acide faible vis à vis du métal à extraire. De ce fait, le pH a une très forte influence sur l'extraction.

Les agents chélatants mettent en jeu deux liaisons avec le soluté extrait : une liée à l'échange cationique et une autre qui peut varier selon la catégorie d'extractant.

Ils forment donc un chélate avec le cation métallique par un échange cationique, mais aussi par l'intermédiaire d'un groupement donneur capable de former une liaison avec le centre métallique. La famille d'extractants dits organophosphorés, ont des performances extractives très bonnes vis à vis des cations métalliques.

Dans le cas du zinc sous forme ionique Zn^{2+} , l'acide di(2 - ethylhexyl)phosphorique ou D₂EHPA a été choisi comme extractant par l'EFCE (*European Foundation of Chemical Engineering*) en tant que système standard d'extraction réactive du zinc; ce choix a été motivé pour son prix, sa non toxicité et son utilisation déployée à large échelle. Le système test correspond aux composants $\{ZnSO_4, H_2SO_4$ en phase aqueuse et D₂EHPA dilué dans l'isododécane en phase organique $\}$ [Morais 2004]. La réaction d'extraction est décrite par l'équation 3.2 :



Le complexe formé issu du zinc et du D₂EHPA est représenté figure 3.1.

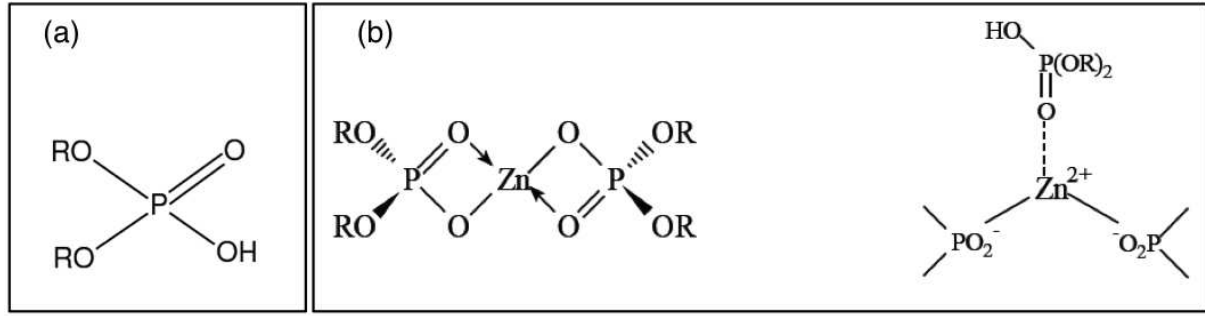


FIG. 3.1 – (a) Formule brute du D₂EHPA. (b) Interactions entre le groupement phosphoryl et l'atome de zinc dans le complexe Zn / D₂EHPA.

Le choix de l'extractant est un élément clé du procédé d'extraction : il se doit d'extraire bien, vite et d'être éventuellement sélectif vis à vis du soluté.

De nombreuses études de ce système, expérimentales ou théoriques ont été décrites en détail [Mörters 2003], [Morais 2004]. Cependant, les travaux se sont limités à des tailles macroscopiques, dimensions où le nombre de Reynolds est supérieur à 1. Enfin, les modèles décrivant les transferts de masse sont assimilés à une cinétique d'ordre 1 où la concentration en zinc dans la phase aqueuse est représentée par l'équation 3.3 :

$$[Zn^{2+}] = [Zn^{2+}]_{eq}(1 - \exp(-Kat)) \quad (3.3)$$

avec $[Zn^{2+}]_{eq}$ la concentration en zinc à l'équilibre, K un coefficient modélisant l'ensemble des phénomènes de transferts de masse (chimique, convectif et diffusif) et a la surface spécifique. Mörters *et al.* [Mörters 2003] soulignent l'importance des recirculations dans des transferts en gouttes, cette contribution est prise en compte dans le calcul de K .

La cinétique d'ordre 1 est une bonne approximation pour l'estimation des temps de transferts, cependant, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, elle néglige toutes les inhomogénéités de concentration lors du transfert. La miniaturisation de l'extraction du zinc dans les gouttes peut apporter un gain de temps considérable dans la cinétique. Quelques publications du domaine du génie chimique suggèrent l'utilisation de techniques de mesures des profils de concentration au cours de l'extraction par fluorescence [Mörters 2000], [Ohshima 2006]. Nous avons adopté cette technique pour étudier les transferts dans des gouttes générées dans un système microfluidique.

L'équation bilan de la réaction qui décrit l'extraction liquide-liquide se traduit par la libération de deux protons H^+ pour la formation d'un complexe ZnR_2RH . Le fluorophore éosine Yellowish (éosine Y), un dérivé de la fluorescéine (Aldrich, dye content 94 %), est pH dépendant : sa fluorescence dépend linéairement de la concentration en ions H^+ pour une gamme de pH comprise entre 1,5 et 3 (voir figure 3.2). Son ajout dans la phase aqueuse permet d'obtenir un suivi temps réel de la concentration en ions H^+ .

L'équilibre (représenté par le symbole "eq") de la réaction se traduit par l'équation 3.4 :

$$[Zn^{2+}]_{eq} = \frac{[H^+]_{eq} - [H^+]_{t=0}}{2} + [Zn^{2+}]_{t=0} \quad (3.4)$$

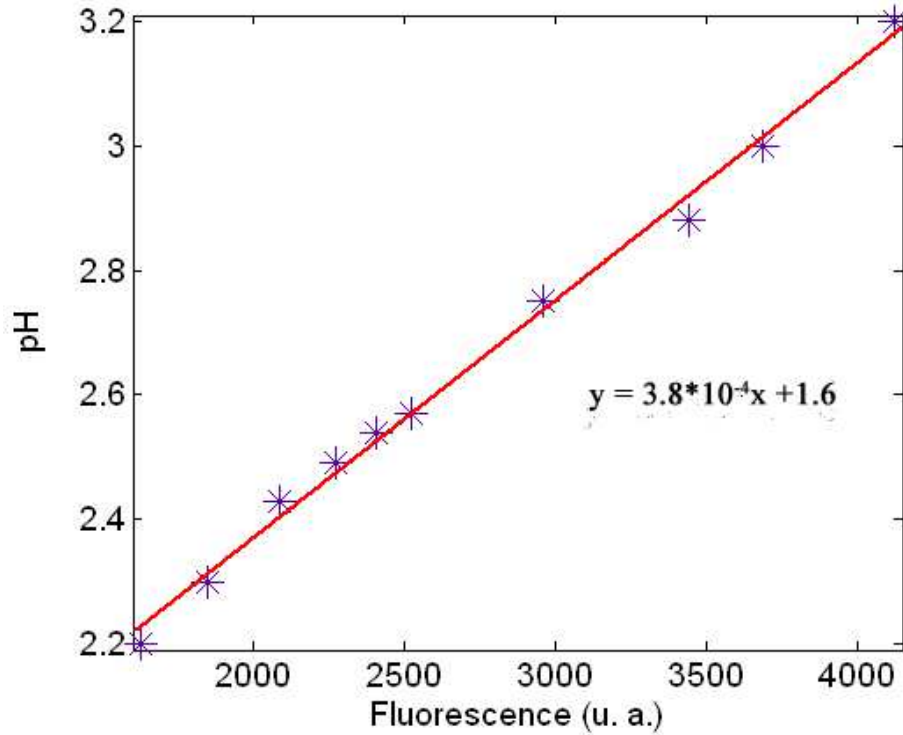


FIG. 3.2 – Etalonnage du pH d'une solution aqueuse en fonction de la fluorescence de l'éosine Y.

avec $[H^+]_{t=0}$ déduite de la concentration en acide sulfurique initiale $C(H_2SO_4)$:

$$[H^+]_{t=0} = 2C(H_2SO_4), \quad (3.5)$$

et $[H^+]_{eq}$ déterminée par l'équation de la droite de la régression linéaire entre la fluorescence de l'éosine Y à l'équilibre et le pH (figure 3.2).

Les systèmes microfluidiques sont conçus en PDMS, la génération des gouttes est assurée par une géométrie flow-focusing. Le système chimique considéré est représenté figure 3.3. La phase aqueuse constituant les gouttes est composée d'acide sulfurique à la concentration finale fixant le pH à 3,2, de sulfate de zinc et d'éosine Y à $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; la phase organique est constituée de D₂EHPA à la concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dilué dans du tétradécane. Le tétradécane a été choisi en remplacement de l'heptane et de l'isododécane car il est non toxique, permet de générer des gouttes aqueuses sans "gonfler" le PDMS sur les échelles de temps considérées, de l'ordre de l'heure (les alcanes sont d'autant plus absorbés par le PDMS que la chaîne carbonée est courte [Lee 2003]).

Aux concentrations choisies, l'influence de l'éosine Y comme tensioactif à l'interface eau-huile, est négligeable comparée au D₂EHPA.

Les courbes de cinétique de purification du zinc initialement présent dans les gouttes, sont représentées figure 3.4 pour trois concentrations différentes, 2,1, 3,2 et $6,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Lorsque le pH devient inférieur à 2, le signal de fluorescence émis par l'éosine Y

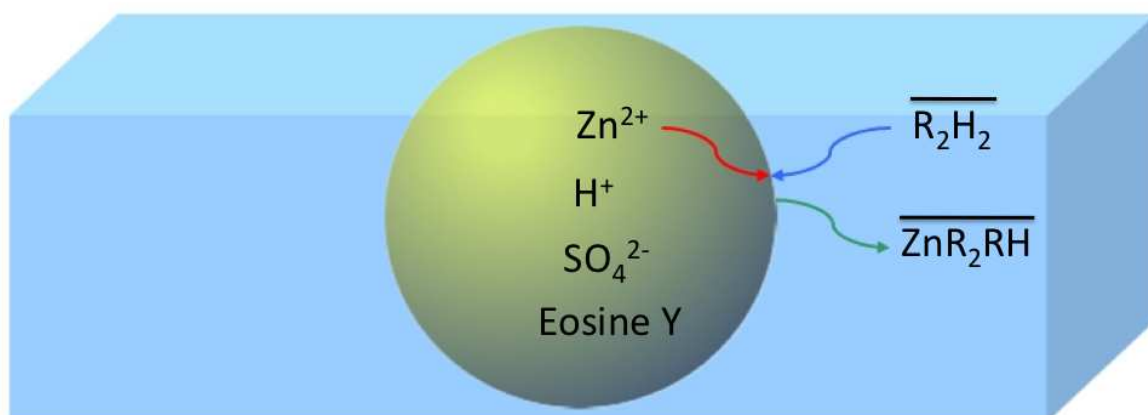


FIG. 3.3 – Système chimique considéré pour l'extraction du zinc. Le D₂EHPA vient former un complexe avec les ions Zn^{2+} à l'interface phase aqueuse/phase organique.

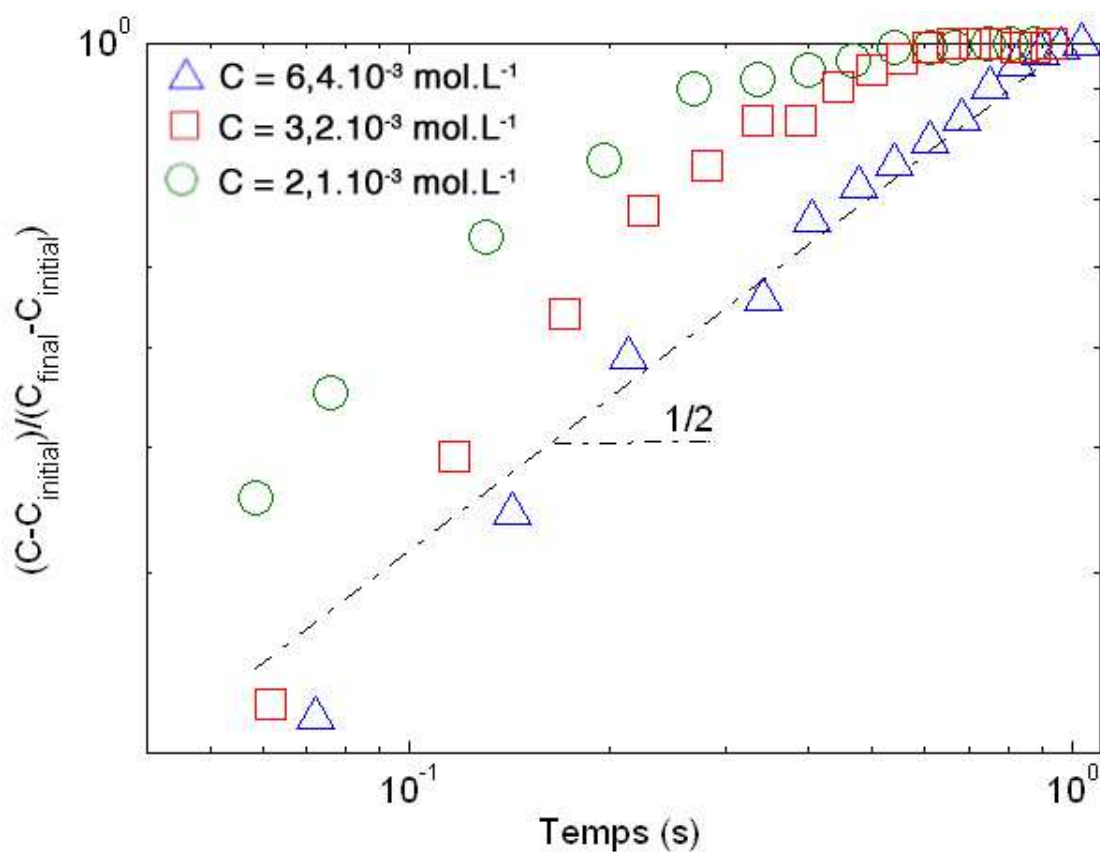


FIG. 3.4 – Concentration normalisée du zinc en fonction du temps après la formation de la goutte pour trois concentrations initiales.

atteint le seuil de sensibilité de la caméra aux temps de pose considérés (les temps de pose doivent être suffisamment faibles pour pouvoir imager des gouttes en mouvement à environ 1cm/s.). Les temps caractéristiques de l'extraction sont de l'ordre de la seconde ; ils sont bien inférieurs aux temps caractéristiques de ce même système chimique dans des gouttes millimétriques (d'après la référence [Mörters 2000], le temps caractéristique d'extraction pour une goutte de 2 mm est de l'ordre de 10 min). Par rapport à un système diffusif pur, les recirculations au sein de la goutte accélèrent considérablement les transferts de masse.

L'application décrite bénéficie d'atouts inhérents à la microfluidique en gouttes, à savoir le gain de temps et la possibilité de paralléliser, elle peut s'étendre à d'autres domaines tels que l'extraction de métaux précieux, la détection de substances dangereuses comme les métaux lourds ou les composés radioactifs.

L'extraction liquide-liquide est une technique également très utilisée en biologie moléculaire pour l'extraction/purification d'acides nucléiques. Le paragraphe suivant est consacré aux premiers pas de l'isolation de l'ARN dans des microgouttes.

3.3 Premières étapes de purification de l'ARN dans des gouttes

Il est nécessaire de fournir au système d'analyse des acides nucléiques dont la qualité est compatible avec les tests de biologie moléculaire à effectuer. Il n'existe pas de procédé universel et simple du spécimen : la méthode optimale est un compromis prenant en compte la nature de l'échantillon, celle de l'acide nucléique cible et la méthode d'analyse utilisée en aval. De plus, elle doit pouvoir garantir la sensibilité du test, ce qui est primordial dans les applications où l'on cherche à détecter des faibles concentrations d'acide nucléique.

L'extraction d'ARN est un sujet beaucoup plus complexe car les ribonucléotides sont des molécules très vulnérables et facilement dégradées. Elles sont très sensibles aux ribonucléases (RNAses) ce qui impose de prendre des précautions particulières aussi bien dans le recueil et la conservation des échantillons que dans la mise en oeuvre des procédés d'extraction. La microfluidique en gouttes apporte un double avantage :

- la possibilité d'étudier des unités cellulaires uniques et isolées,
- les analyses *in situ* possibles limitant les multiples manipulations et protégeant des sources de dégradation.

Chomczynski *et al.* [Chomczynski 1987] ont développé une technique de purification d'ARN basée sur l'extraction du phénol fréquemment utilisée dans les laboratoires de biologie ; le protocole a été republié en 2006 [Chomczynski 2006].

Nous avons adapté ce protocole dans des microgouttes où la phase dispersée contient du trizol nommé commercialement Tri Reagent LS (Sigma), une solution à base de phénol, de mercaptoéthanol, de thyocyanate de guanidium et d'acétate de sodium à pH 4. La phase continue est composée de 1-chloro 3-bromopropane (BCP, Aldrich), un substitut du chloroforme beaucoup moins nocif et compatible avec le PDMS.

La méthode de purification exploite, d'une part, une différence de solubilité entre les acides nucléiques et les protéines, d'autre part, une précipitation différentielle. Les agents dénaturants (le mercaptoéthanol et le thiocyanate de guanidium, un sel chaotropique) dénaturent les protéines par rupture des ponts disulfure. Le pH relativement acide assure la précipitation de l'ADN sans que l'ARN soit affecté. En effet les faibles différences entre ADN et ARN (nature du sucre, bases azotées, conformation simple ou double brin) suffisent à conduire à des comportements très différents en fonction du pH.

Le phénol présent initialement dans la phase dispersée est transféré dans la phase continue ; dans le protocole initial ce transfert accompagné d'une centrifugation sépare l'ARN présent dans la phase aqueuse des ADN et des protéines situés dans l'interphase. Dans notre cas, seules les recirculations dans les gouttes peuvent véhiculer ADN et protéines à l'interphase.

Génération de gouttes monodisperses. La présence initiale de phénol dans la phase continue contribue au mouillage partiel de la phase porteuse avec le PDMS. Il s'en suit une génération de gouttes polydisperses et des coalescences entre gouttes (cf. figure 3.5).

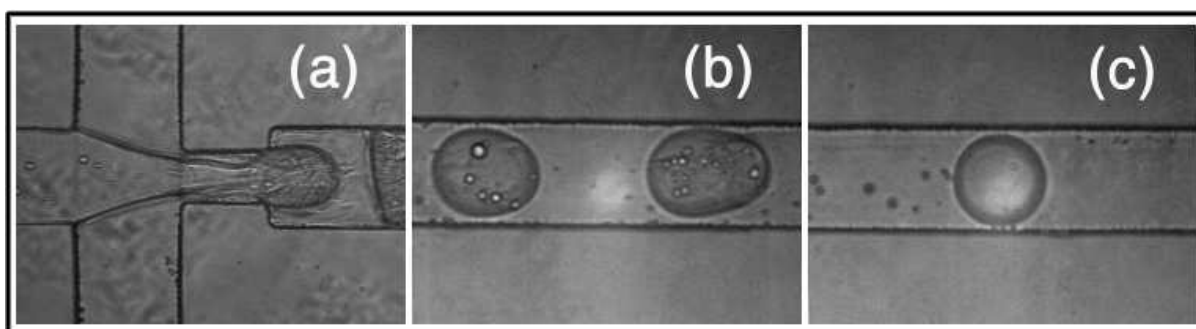


FIG. 3.5 – Formation d'une goutte dans des conditions de mouillage non favorables : la phase continue est le BCP, la phase dispersée est le trizol : (a) formation de la goutte, (b) le phénol est partiellement extrait et (c) l'extraction du phénol est achevée.

Après l'extraction de phénol, les conditions thermodynamiques sont de nouveau favorables à la génération de gouttes. La formation de la goutte et les premiers instants qui la succèdent nécessitent donc d'adapter le circuit microfluidique. La géométrie finale retenue est représentée figure 3.6(a). Les deux fluides se rencontrent à la jonction flow-focusing et forment un co-flow. Le co-flow est destabilisé par l'ouverture du canal dans la dimension verticale, à l'origine de la formation d'émulsions stables (voir figure 3.6(b)). La technique de détection par fluorescence demeure une des méthodes les plus sensibles, la difficulté majeure tient cependant du marquage des ARN. En effet ce dernier s'effectue par création d'un hybride ADN/ARN, qui précipite à pH acide. Nous nous sommes donc concentrés sur l'observation de l'ADN et des protéines.

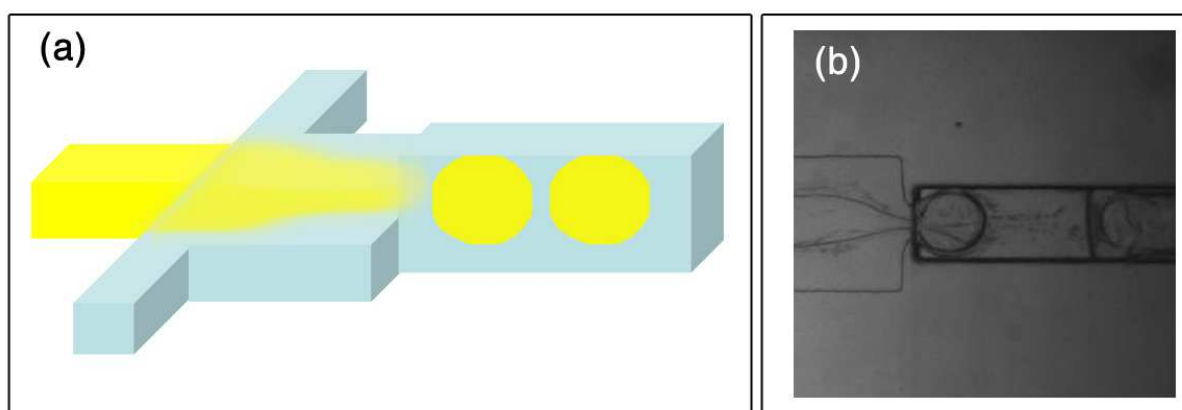


FIG. 3.6 – (a) Représentation schématique du circuit, (b) Formation d'une goutte à la "marche".

3.3.1 Transfert de l'ADN à l'interphase

L'ADN d'intérêt fait 40 pb, il est marqué par un groupement cyanine 3 (Cy3, maximum d'absorption 550 nm, d'émission 570 nm). Lorsqu'il est dilué dans le Trizol et sans contact avec la phase organique, aucune précipitation n'intervient et la fluorescence est homogène. Une fois les gouttes formées, le comportement de l'ADN diffère selon la concentration en ADN initiale. Trois concentrations ont été étudiées : $C_{ADN} = 10^{-7}$, 10^{-6} et $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Une accumulation de fluorescence à l'interface eau/BCP et dans la zone arrière du plug (terme employé pour désigner une goutte de forme ellipsoïde) apparaît pour la concentration la plus élevée (cf. figure 3.7). Ce comportement de l'ADN transféré à l'interphase est attendu, son apparition à partir d'une concentration critique peut correspondre à l'existence d'une constante d'équilibre de solubilité décrivant la précipitation de l'ADN.

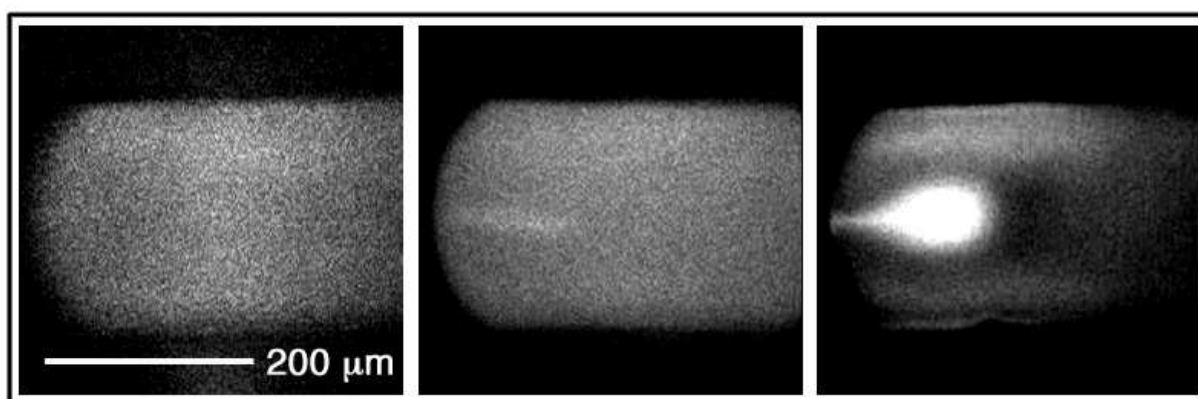


FIG. 3.7 – Images prises en fluorescence d'ADN marqué par Cy3 à trois concentrations différentes dans le trizol ; de gauche à droite : $C_{ADN} = 10^{-7}$, 10^{-6} et $2.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.3.2 Précipitation des protéines

Les protéines utilisées sont des phycobiliprotéines (R phycoérythrine, Molecular Probes), des protéines hydrosolubles que l'on trouve dans les cyanobactéries et certaines algues. Leur rôle biologique en tant que collecteur de lumière requiert une absorbance et une fluorescence maximale sans risque de *quenching*. Ainsi, la protéine étudiée a un rendement quantique de 0,82 et un coefficient d'extinction molaire égal à $1,96 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Elle possède trois maxima d'excitation (480, 546 et 565 nm) et un maximum d'émission à 578 nm. Ces longueurs d'ondes coïncident avec les longueurs d'ondes d'émission et d'absorption de la rhodamine B.

Les R-phycoérythrine sont dissoutes dans le trizol à $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. En présence de BCP, l'extraction du phénol provoque leur précipitation brutale sous la forme d'un agrégat (cf. figure 3.8) dans la solution aqueuse. Ces observations sur l'ADN et les protéines

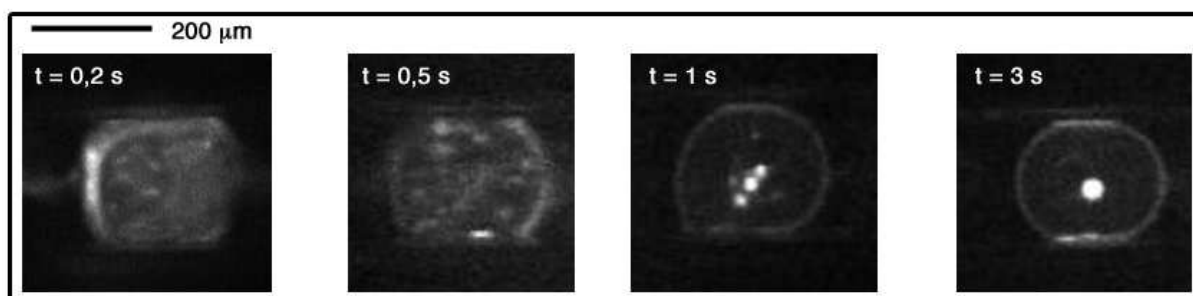


FIG. 3.8 – Images prises en fluorescence de protéines dans le trizol à la concentration $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ à quatre instants différents dans le canal.

sont prometteuses pour envisager la purification de l'ARN : la migration de l'ADN à l'interphase et la précipitation des protéines rendent l'ARN disponible dans la goutte. Une possible utilisation de ce système consisterait à récupérer chaque goutte formée dans un puits de plaque 96 puits, diluer les gouttes puis réaliser une RT-PCR sur chaque puits. Les applications visées concerne l'étude de bactéries à l'échelle unique ; la lyse de la double membrane plasmique (beaucoup plus résistante que la membrane plasmique d'une cellule eucaryote) de la bactérie est alors assurée par le trizol et l'ARN est présent seul dans le volume. Il reste cependant à démontrer que les ADN de la bactérie sont en quantité suffisante pour être transférés à l'interphase et qu'il est possible de diluer suffisamment le trizol pour qu'il n'interfère pas avec les enzymes de RT.

Génération contrôlée d'émulsions micrométriques pour la phagocytose

4.1 Introduction

La microfluidique autorise la formation d'émulsions simples mais également d'objets plus complexes, comme les émulsions doubles dont la stabilité thermodynamique a été étudiée en détail dans la référence [Pannacci 2008]. Les avantages inhérents à la génération de gouttes dans des microcanaux (taille et composition contrôlées) sont incontestablement un atout pour la vectorisation (*i.e.* le transport des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique) de substances tels que des médicaments ou des vaccins.

Dans le système immunitaire, des cellules appelées macrophages, issues de la différenciation de leucocytes sanguins, participent non seulement à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique mais sont également capables de participer à l'immunité adaptative. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes. La phagocytose est une forme spéciale de l'endocytose, consistant en l'ingestion de larges particules ou cellules *via* des vésicules endocytiques. Les macrophages sont ainsi nommés "professionnels" de la phagocytose et nous défendent par ce biais de l'infection.

Après avoir digéré un pathogène, un macrophage peut se comporter en cellule présentatrice d'antigènes, c'est-à-dire présenter un antigène de manière à stimuler un lymphocyte T spécifique. Ainsi, activer un macrophage par phagocytose d'un pathogène peut déclencher une réponse immunitaire à la manière d'un vaccin. Les principales capacités des macrophages consistent donc à capter les particules étrangères, informer et réguler le système immunitaire.

Les microgouttes générées en microfluidique sont des bons candidats pour transporter des substances actives et être phagocytées par les macrophages. La taille caractéristique de ces cellules est de 20 μm . Or, en microfluidique, les tailles généralement exploitées sont de l'ordre de 50 à 200 μm ; ces dimensions sont non acceptables pour envisager la phagocytose car elles risqueraient de conduire à l'intoxication et à la mort cellulaire. Le paragraphe suivant présente, sous forme d'article, la réalisation d'émulsions simples et multiples de taille caractéristique 1 à 5 μm et potentiellement phagocytées dans un temps de l'ordre de quelques heures. Les macrophages sont capables d'incorporer des gouttes de façon non spécifique et en très grande quantité, comme le montre la figure 4.1. L'article présente une variété de gouttes phagocytées, incluant des gouttelettes aqueuses encapsulées dans une goutte d'huile. Ces observations ouvrent ainsi la perspective de vectorisation de médicaments ou de vaccins, pour la plupart hydrosolubles. L'article proposé dans le

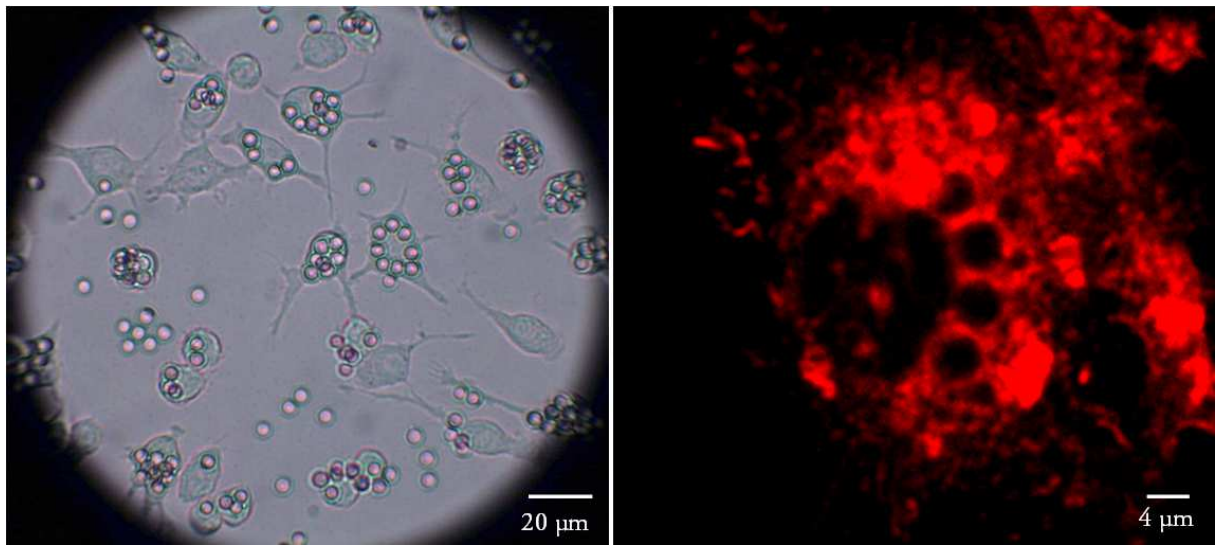


FIG. 4.1 – (a) Observation de macrophages incubés avec des gouttes d'huile fluorée (Fluorinert, FC 3283, 3M) en lumière blanche, (b) en microscopie confocale, les cellules sont marquées avec un fluorophore spécifique des vésicules (FM 4-64, Molecular Probes).

paragraphe suivant correspond à un travail collectif réalisé au laboratoire MMN sur la génération de gouttes colloïdales monodisperses générées à haut débit ; ma contribution principale concerne l'utilisation des gouttes micrométriques pour la phagocytose par des macrophages.

4.2 Article : *Monodisperse colloids generated with nanofluidic technology*

Monodisperse colloids generated with nanofluidic technology

N.Pannacci, F.Malloggi, R. Attia, F.Monti, P.Mary, H. Willaime, P.Tabeling

MMN, Gulliver, ESPCI 10 rue Vauquelin 75005 Paris, France

B. Cabane

PMMH, ESPCI 10 rue Vauquelin 75005 Paris, France

P.Poncet

Institut Pasteur, LECA, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Limitations in the methods for generating micrometric colloidal droplets hinder the emergence of important applications in the fields of material science and drug delivery. By using dedicated nanofluidic devices and taking advantage of a novel physical effect that we name "capillary focusing", we found a new method that circumvents these limitations. The nanofluidic devices we use here are made with soft materials and their fabrication relies on rapid inexpensive technologies. The objects we succeeded to generate are simple droplets, multiple droplets, particles and janus whose sizes pertain to the colloidal range, i.e between a fraction of micron and three micrometers. Our colloids are produced at extremely fast rates (hundred of kHz) and have unprecedented size monodispersity. The colloidal droplets are assembled on-chip under high throughput conditions into clusters of different sizes (dimers, trimers,...). We succeed to build, in a few seconds, large crystals of single, double and Janus droplets whose remarkable homogeneity allows them to crystallize, producing discrete diffraction patterns. We illustrate potential applications in the domain of drug delivery by demonstrating the ability of single, double and Janus droplets to be phagocytosed by murine macrophage-type cells.

Colloids are discrete particles with sizes in the range between a few nanometers and three

micrometers. Their large surface areas and small dimensions, along with the wide variety of volume and surface properties they offer, have generated an impressively large number of applications over the last decades. There exists now numerous reviews and textbooks on the subject [1][2]. Within this class of objects, micrometer liquid colloids (which can be gelled or hardened to become solid particles), play important roles in a number of fields. They are used in fields such as diagnostics [3], drug discovery [4], material sciences [5], food industry [6], vaccination [7], drug delivery [8] [9] and condensed matter physics [10]. Micrometer colloidal droplets are currently produced by ultrasound application [11], high-pressure homogenization [12], high shear Couette flow [13] or membrane emulsification [14]. With these techniques, the widths of the size distributions are substantial (unless special formulations are used) and the conditions of production of more complex structures (such as double droplets) are poorly controlled. These limitations prevent the use of colloids in applications where precise sizes or complex structures are required. An important example is the synthesis of materials based on colloidal self-assembly [15][16]. For such applications, the homogeneity and the morphology of the building blocks that are assembled are critical to obtain materials with interesting properties. In this area, despite considerable effort, the synthesis of omnidirectional photonic band gap materials [17] from which perfect mirrors, efficient sensors and novel types of optical sensors could be made [18] remains a formidable challenge. Other examples are colloidal lithography [19], an emerging technology dedicated to build 2D and 3D objects, and drug delivery, in which the synthesis of sophisticated colloids possessing several functionalities would reduce the side-effects of current administration methods [9]. Further examples that depend on large colloids with geometric control and substantial complexity can be taken in the domains of printing [19], condensed matter physics [20], biophysics [21] and biomaterials [22].

The challenges of devising a technique that would generate micrometric colloidal droplets, weakly dependent of the formulation, with a substantial throughput and a fine control of sizes and with a

variety of morphologies are formidable. Recently, several groups have used microfluidic technology, collecting satellite droplets [23] or exploiting tip streaming [24] to attempt to resolve limitations inherent to traditional technologies; nonetheless, the success of this approach relies on particular physico-chemical conditions, and it leads to modest monodispersities and extremely small throughputs. With nanofluidic technology, the channel dimensions appear well adapted to the sizes of the objects we wish to synthesize. Research along this line has been carried out by Kobayashi et al. [25], who succeeded to generate simple colloidal droplets in parallel, under large throughput conditions and without significant formulation constraints; nonetheless, the droplet size distributions that were reported ranged between 10-20%, which is not compatible with most of the applications mentioned above.

In the present paper, we show that by using novel nanofluidic geometries, we generate monodisperse colloidal droplets with finely controlled sizes and various morphologies, under large throughput conditions, independently of the formulation. The smallest droplets that we synthesise here are around one micrometer in diameter. They are typically generated at extremely high frequencies (up to 100 kHz) and have excellent monodispersity (2% approximately). We can synthesize simple droplets as well as with multiple emulsion droplets and janus particles, with sizes pertaining to the colloidal domain, and possessing unprecedented monodispersities. In our approach, we used soft materials (PolyDimethylSiloxane) and low-cost rapid technologies. We illustrate the potentialities of our approach in the domains of self-assembly and drug delivery. The applications that can be derived from our work are however not restricted to these fields; The experimental system we used is sketched on Figure 1A.

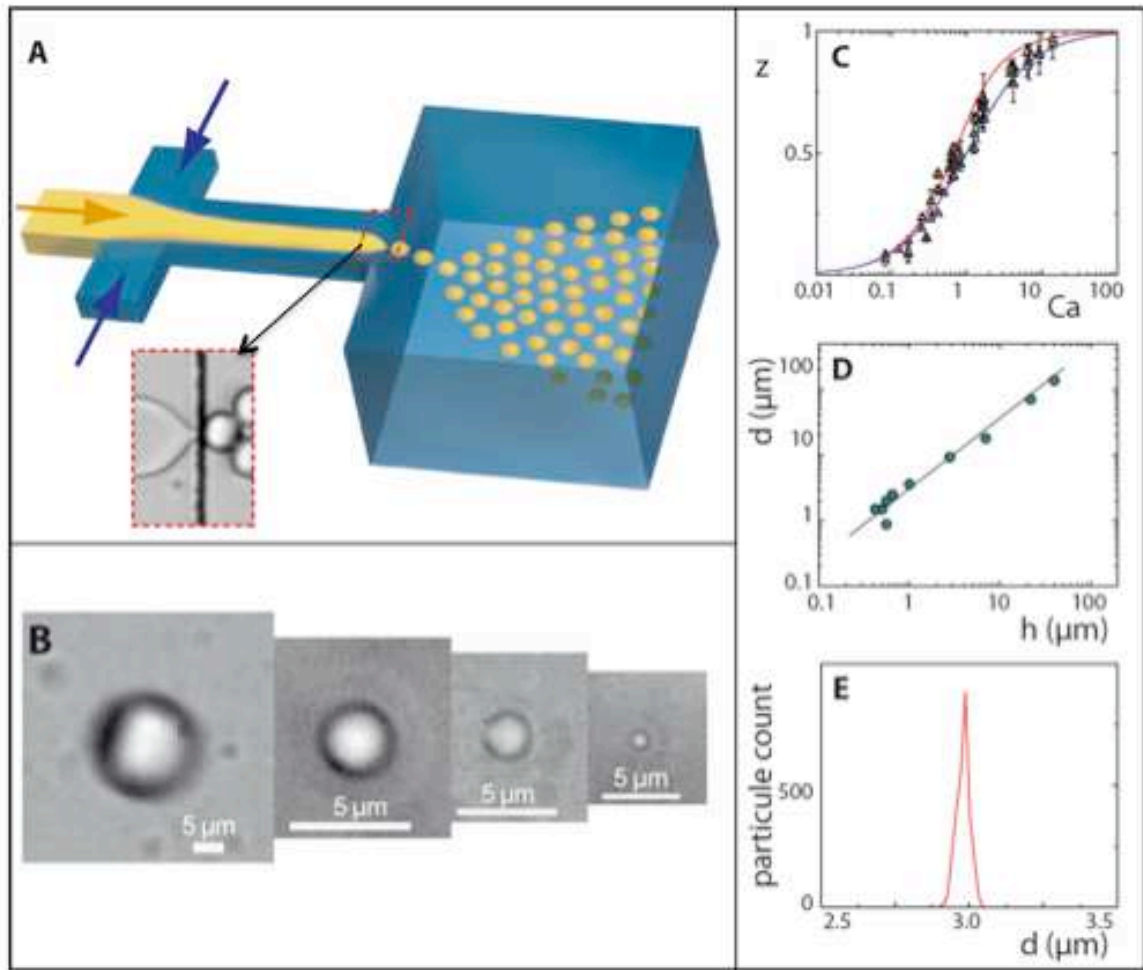


Fig. 1. (A) Sketch of the experiment showing the dispersed (yellow) and continuous phases (blue) flowing through the nanofluidic channel and forming droplets as they arrive into the reservoir. Prior reaching the reservoir, they form a tongue with a cusp-like tip. This is the capillary focusing effect we discuss in the paper. This self-focusing effect, not described in the literature yet, enables the controlled generation of monodisperse micrometric droplets. **(B)** Bright field pictures of individual droplets generated in the nanofluidic device of different heights h . Diameter of fluorinated oil droplet from left to right $d=18\mu\text{m}-3.6\mu\text{m}-2\mu\text{m}-900\text{nm}$ **(C)** Evolution of the relative width of the tongue z as a function of the Capillary number Ca

(see supplementary material B for the definition of these quantities). The symbols correspond to experimental data and full lines to the model (in which we impose $l_0 = 1.2 w$, where w is the channel width). Several channel heights h and viscosities μ were used to explore different ranges of Capillary number. (D) Evolution of the droplet size d as a function of the nanochannel height h . (E) Size distribution of a population of 5000 droplets, $d=2.98\mu\text{m}$ in diameter, showing a coefficient of variation CV (i.e the quantity $100 \sigma/d^*=0,73\%$ where σ is the standard deviation and d the average droplet diameter).

The devices, made in PDMS, include a nanofluidic section that comprises a cross-junction and shallow nanochannels; in this part, the channel depth varies between 450 nm and 1 μm . The nanofluidic section is separated from the microfluidic reservoir and the microfluidic inlets by sharp steps. The reservoir and the inlets are 10 μm in depth and between 40 and 100 μm in width. In the nanofluidic part, the dispersed phase (yellow) meets the continuous phase (blue) at the cross-junction. Beyond the junction, for the regimes we consider here, the two fluids flow side by side through a straight shallow nanochannel (the "terrace") and generate droplets as they arrive at the step [26]. Prior to arriving at the step, the interface between the two fluids takes shapes in the form of tongues that thin out in the streamwise direction. We will describe the shapes of these tongues in more detail below. At the step, the tongue breaks up, generating droplets that are further conveyed through the reservoir by the mean flow. The emission process is stationary. As shown in Figure 1B, the droplet sizes obtained in such a device range between two and three times the nanochannel depth h throughout a broad range of flow conditions. The droplet sizes are therefore primarily controlled by the nanochannel depth. By decreasing the nanochannel depth down to 400nm, we could generate droplets with diameters as small as 900nm. To produce more complex structures, such as colloidal Janus droplets or colloidal double emulsions, we used the geometry of Fig 1A but

modified the fluid entry conditions (see Supplementary material A). Throughout the work we used pressures in the range 0.5 to 5 bars and flow-rates between 1 and 10 $\mu\text{liter}/\text{mn}$.

We describe here the physical origin of the shape of the boundary that separates the two fluids as they flow over the terrace. The physical mechanism at work is the following: as the fluids flow side by side above the terrace (see Fig 1A), they are separated by a meniscus that induces a cross-stream pressure difference between the two fluids. This effect is particularly important in nanofluidic channels where meniscus curvatures are large. On the other hand, the two fluids are forced to balance their pressure when they arrive in the reservoir. To satisfy the two constraints, the inner fluid must move increasingly fast and the outer fluid must reduce its speed over the terrace. Because of mass conservation, this phenomenon forces the boundary between the two fluids to adopt a shape in form of a tongue that thins out along the mean flow. We propose to name this effect "capillary focusing effect" in order to distinguish with the "hydrodynamic focusing effect", which is well known in the microfluidic literature [27] and that is driven by hydrodynamic conservation constraints. We developed a quantitative theory of the capillary focusing effect. The theory (see supplementary material B) leads to the following formula for the tongue width δ at the step:

$$\delta = \frac{w}{2} \left(1 + Ca - \sqrt{(1 + Ca)^2 - 4Ca\beta} \right)$$

where Ca (capillary number) is defined by:

$$Ca = \frac{6\mu_2 U_{20} l_0}{\gamma h} = \frac{6\mu_1 U_{10} l_0}{\gamma h}$$

in which μ , U are the fluid viscosity and upstream velocity of the inner (index 1) or the outer (index 2) fluids, l_0 is a characteristic length comparable to the nanochannel width w , γ is the interfacial tension and h the nanochannel height. The theory uses Laplace's law and estimates pressures in the different fluid regions, assuming shallow channels. Figure 1 C shows a comparison between the theory and the experiment, for different fluids different heights and a variety of flow conditions. One obtains good agreement between the theory and the experiment. In practice, the capillary

focusing effect has a small amplitude in microfluidic channels and becomes particularly important in nanofluidic devices. This explains why it has not been reported thus far in the microfluidic literature. The study also shows that by decreasing the nanochannel height h , tongues tend to develop cusps at the step (see Supplementary Materials B). From the standpoint of droplet emission, this effect facilitates the generation of small droplets through the three-dimensional development of Rayleigh Plateau instability. The focusing effect also favors monodispersity by inhibiting the development of unstable wave-vectors in the crossstream direction.

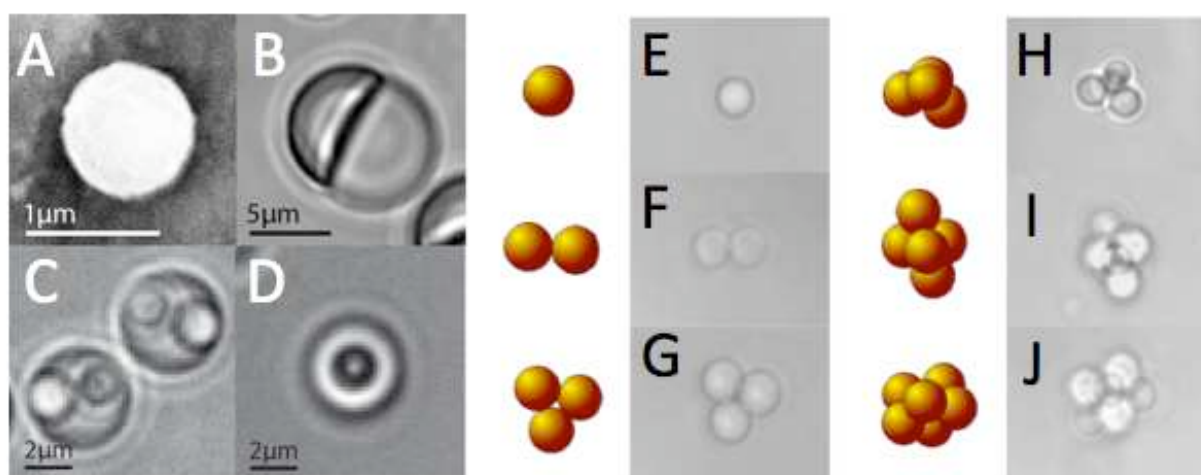


Fig. 2. Several colloidal objects synthesized in the nanofluidic device. (A) SEM picture of a Esacure 10% - TPGDA particle. (B) Janus droplet (Silicon oil - Rapeseed oil / water + Sodium Dodecyl Sulfate 1% wt). (C) Double droplet: complete engulfing (Silicon oil - Fluorinated oil / water + SDS 1% wt). (D) Multiple emulsion (Silicon oil - Fluorinated oil / water + SDS 1% wt). (E) Elementary clusters generated in the system and theoretical models [29].

By using our nanofluidic device in the conditions described above, we succeeded to synthesize droplets with diameters lying in the range 0.9 microns - 4 micrometers and above (See Fig 1C). The size dispersivity was measured by imaging the droplets with a fast camera, several milliseconds after they are generated and then processing the images. We obtained sharply peaked distributions (see Fig 1E). The diameter monodispersity we found under stationary emission conditions is equal to 2 % for all the droplets diameters we could generate. This result is one order of magnitude above the state of the art for this range of sizes.

Our technological approach is versatile. It makes it possible to synthesize colloidal particles by photocuring droplets composed of photosensitive monomers. An example of such particles, 1 μm in diameter, is shown in Fig 2A. We could also generate more complex structures, such as monodisperse Janus and multiple droplets with external diameters lying in the range 2- 4 microns (see Fig 2B-2D). We emphasize here that it had never been possible so far to synthesize liquid monodisperse Janus and multiple emulsions of such sizes.

We succeeded to assemble droplets into clusters directly in the device under large throughput conditions. To form clusters, we use an instability which breaks the periodicity of the droplet train formed at the step and leads to limited aggregation [28]. The cluster sizes depend on the flow-rates of the incoming fluids; consequently, they can be modified by changing the flow conditions. Using this approach, we could obtain the assemblies represented in Fig 2E that correspond well to theoretical models [29] (see Fig 2E). Synthesizing these clusters is a matter of seconds, while traditional techniques based on evaporation or individual colloidal manipulation takes hours [30]. The high throughput conditions we could achieve with our technology open a new pathway for synthesising novel colloid-based metamaterials.

Large populations of colloids self organize into patterns in a way similar to Ref [31] but with droplets of colloidal dimensions. The patterns indeed depend on the volumetric fraction of the dispersed phase. In our system, owing to mass conservation, the volumetric fraction of the dispersed

phase is entirely controlled by the flow-rate ratio of the incoming phases and therefore it can be easily varied. Figure 3A and 3B shows populations of millions of colloidal droplets stored in the reservoir for two different volumetric fractions of the dispersed phase.

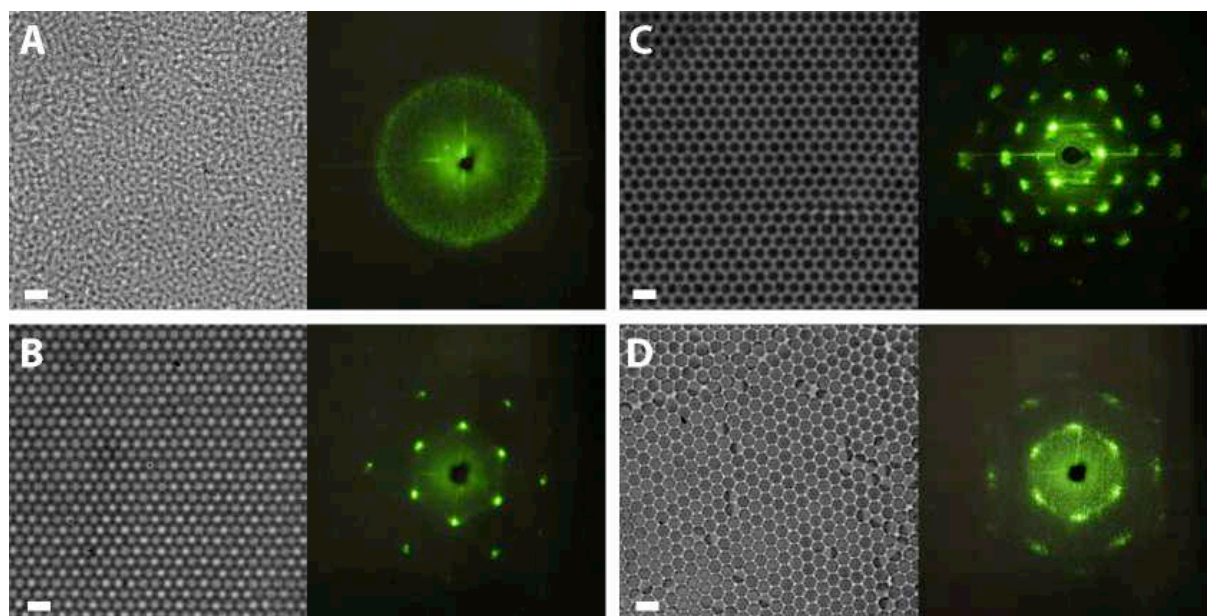


Fig. 3. Different large assemblies obtained in the nanofluidic device. (A) Liquid state (Fluorinated oil / water + SDS 1% wt). (B) Ordered phase (Fluorinated oil / water + SDS 1% wt). (C) Crystal of complete double emulsions (Silicon oil - Fluorinated oil / water + SDS 1% wt). (D) Crystal of Janus (Fluorinated oil - Rapeseed oil / water + Pluronic 1% wt). On the right of each figure, we show the corresponding diffraction pattern obtained under normal incidence with a green light laser ($\lambda = 532\text{nm}$) where the zero order has been removed. The scale bar corresponds to $5\text{ }\mu\text{m}$.

For a volumetric fraction $\varphi=0.5$, we obtained a liquid state (see Fig 3A). For a volumetric fraction around $\varphi=0.74$ we observed an hexagonal crystal structure (see the diffraction pattern of Fig 3B) corresponding to the close packing of monodisperse spheres, in agreement with the colloid literature. Ordered patterns were also obtained with doubly encapsulated and Janus droplets (Figs 3C and 3D). The coloured figures on the right sides of Fig 3 represent diffraction patterns that we

generated by illuminating droplet assemblies stored in the reservoir under normal incidence and with coherent light beams. As expected, one obtains a ring with the colloidal liquid case and discrete peaks with the colloidal solids. These diffraction patterns illustrate the fact that the structures generated in our nanofluidic device are monodisperse with sizes around the visible range. Remarkably, we found that the formation of a large crystal, containing millions of colloidal droplets, is extremely fast - a matter of seconds -. The high speed of formation of the ordered structures is favored by the fast emission of the droplets (several tens of kHz) and the epitaxial growth process we used, which precludes lengthy explorations of the phase space prior to equilibrium. The gain in the rate of crystal formation, three orders of magnitude, opens new pathways for optimizing material properties during the synthesis.

Since micrometric droplets generated with our nanofluidic technology can host all sorts of objects, they can be used as versatile cargos for vectorizing entities inside cells. We illustrate this feature on Figure 4 by incubating droplets of various structures with a murine macrophage-type cell line RAW 264.7 [33][34].

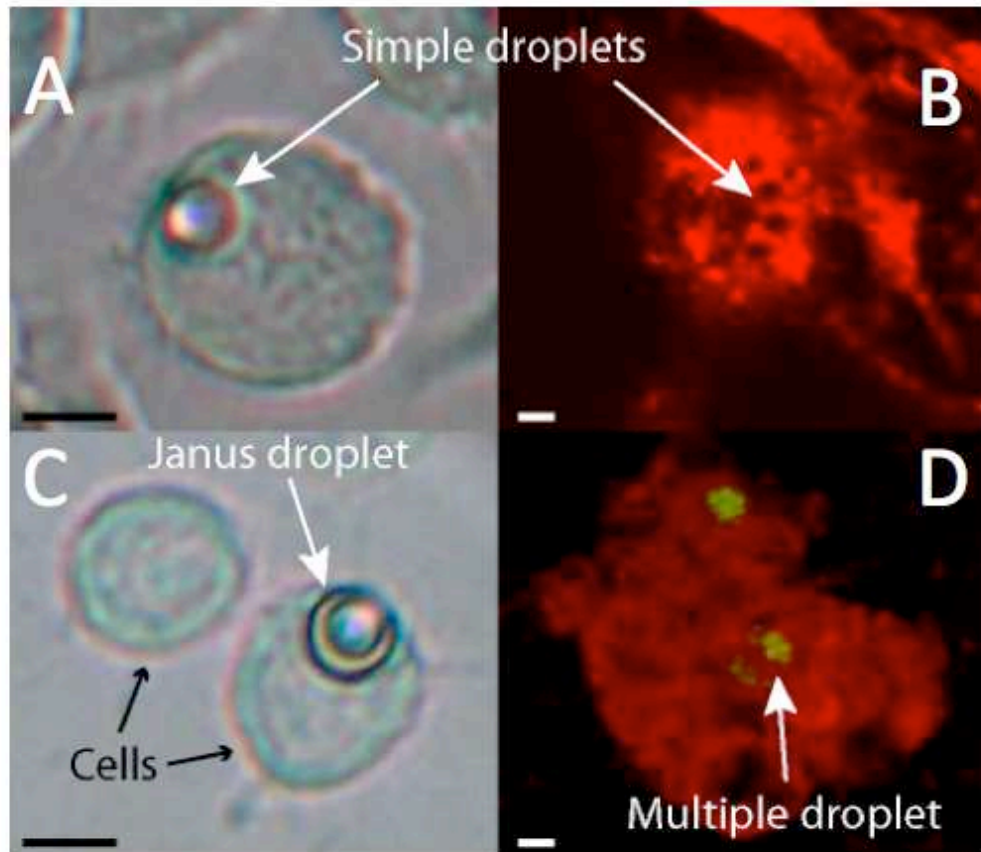


Figure 4: Colloidal droplets generated in our nanofluidic chip vectorizing different entities into macrophages. A: Confocal image of a macrophage with phagocytosed fluorettine oil droplets, 4 μm in diameters and vacuoles B : Macrophage with phagocytosed double droplet, 4 μm in diameter, in which tens of aqueous droplets, 1 μm in diameter, filled with fluorescein undergo brownian motion (see the movie in Supplementary Materials C). C : Macrophages with phagocytosed Janus droplet.

The experiments were performed with simple droplets, multiple droplets, and Janus produced in our nanofluidic device. The process proceeds in three steps: in the first hours, droplets come into contact with the cell membranes under the action of brownian motion and adhere to them. In a second step, cells engulf the droplets into the cytoplasm. Eventually, after one day or two,

lysosomal enzymes digest the droplets, leaving vacuoles inside the cell. Exocytosis, i.e. the release of the droplet containing phagosome could also occur. Fig 4A shows fluorinated droplets, 4 μm in diameter, a few hours after they have been endocytosed by the macrophage. The two figures 4B and 4C show that complex objects, such as multiple emulsions including fluorescent submicrometric droplets and droplets with two separate compartments (Janus) are vectorized into the macrophages. Supplementary materials C shows that the tiny fluorescent droplets of Fig 4B undergo brownian motion inside the cell until they are digested by the enzymes brought by the fusion of the lysosome and the phagosome. These experiments illustrate that droplets with complex structures can be internalized into the cells. The technology we developed here allows for example to synthesize cargos with different compartments, one carrying specific ligands to enhance or target the delivery to various specific cells and the other one transporting active molecules (drug, toxin, antigen, genetic information,...) for therapeutic treatments of pathophysiological status or vaccination.

To conclude, we have shown here that by using nanofluidic technology and exploiting a novel self focusing effect, we generate simple and multiple droplets, particles, janus and capsules whose minimal sizes pertain to the colloidal range, i.e between a fraction of micron and three micrometers.. We have assembled droplets, janus and multiple droplets into clusters or various size or large crystals that generated discrete diffraction patterns. Being smaller than an eukariotic cell, our droplets can be used as cargos for drug delivery. We demonstrated the ability of multiple droplets to be phagocytosed into macrophages, suggesting their use as non viral inert vectors for endocytosis-mediated antigen or drug delivery. Our approach resolves a number of limitations of the current technologies and opens new possibilities for colloids to be used in important applications.

REFERENCES

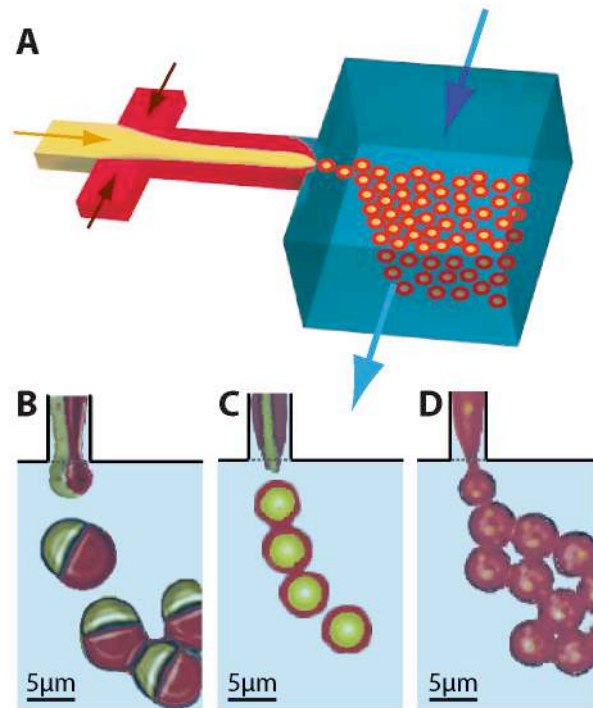
- [1] An example is RJ Hunter, *Foundations of colloid science*, Cambridge University Press (1989).
- [2] See for instance the review by Y Xia, B Gates, Y Yin, Y Lu, *Advanced Materials* **12**,10 (2000).
- [3] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 5, 631 (2002)
- [4] B.J. Battersby, G. A. Lawrie, A.P. Johnston, M.Trau, *Chem. Commun.*, 1435 - 1441 (2002)
- [5] C.J.Brinker, G.W.Scherer, *Sol-Gel Science*, Academic Science Inc., San Diego (1990).
- [6] S.M.Loveday, H. Singh, *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 12, 6
- [7] A.G.Coombes, S. Tasker, M. Lindblad, J. Holmgren, K. Hostec, V. Tonchevac, E. Schacht, M. C. Davies, L. Illum and S. S. Davis, *Biomaterials* **18**, 17, 1153 (1997).
- [8] P.Couvreur, C.Dubernet, F.Puisieux, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **41**, 1, 2 (1995).
- [9] R.H.Muller, *Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting: modification, characterization*, Taylor & Francis (1991).
- [10] J.K Dhont, *An introduction to dynamics of colloids* Amsterdam (1996).
- [11] K. Landfester, *Macromolecular Rapid Communications*, **22**, 12 (2001).
- [12] K. Meleson, S.Graves, T.G. Mason, T.G., *Soft Materials*, **2**, 2, 109 (2004).
- [13] R.G.Mason, J.Bibette, *Langmuir*, **13**, 17, 4600 (1997).
- [14] S.Joscelyne, G.Tragardh, *Journal of Membrane Science*, **169**, 1, 107 (2000).
- [15] G.M. Whitesides, B Grzybowski, *Science*, **295**, 5564, 2418 (2002).
- [16] V.N. Manoharan, D.J. Pine, *MRS Bulletin*, **91** (2004).
- [17] G. Subramanian, V.N. Manoharan, J.D. Thorne, D.J. Pine, *Adv.Mat.*, **11**, 15,1261 (1999).
- [18] C.M. Soukoulis *Photonic band gap materials*, NATO ASI Series, Kluwer (1996).
- [18] S.M. Yang, S.G. Jang, D.G. Choi, S.Kim, H.K. Yu, *Small*, 2006
- [19] B. Comiskey, J.D.Albert, H.Yoshizawa, J.Jacobson, *Nature* **394**, 6690, 253—255, 1998

- [20] E. Bianchi, E., J.Largo, J., P.Tartaglia, E.Zaccarelli, E., F.Sciortino, *Physical Review Letters*, **97**, 16, 168301 (2006).
- [21] J.C. Stachowiak, D.L. Richmond, T.H. Li, F. Brochard-Wyart, D.A. Fletcher, *Lab Chip* (2009)
DOI: 10.1039/b904984c
- [22] J.Jang, D.Dendukuri, T.A.Hatton.,E.L.Thomas,, P. Doyle., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1 (2007).
- [23] Y.Tan, A.P. Lee, *Lab Chip*, **5**, 1178–1183 (2005)
- [24] R.Suryo, O.A. Basaran, *Physics of Fluids*, **18**, 082102 (2006).
- [25] I. Kobayashi, K.Uemura, M.Nakajima, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **296**, 1, 285 (2007).
- [26] We also have situations where droplets are formed at the junction, in a way similar to the hydrodynamic focusing or in the jetting regimes described in the microfluidic literature. However, the domains of existence of such regimes are narrow and they do not deliver high throughput. We thus focused on the regimes where droplets are produced at the step.
- [27] P.Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press (2005).
- [28] T. Beatus, T.Tlusty, R.Bar-Ziv, *Nature Physics*, **2**, 11, 743 (2006).
- [29] N.J.A.Sloane, R.H.Hardin,T.D.S.Duff, J.H.Conway, *Discrete.Comput.Geom.*, **14**, 237 (2003)
- [30] J.P.Hoogenboom, C.Retif, E. de Bres, E., M.Van de Boer, A.K. van Langen-Suurling, J. Romijn, A.van Blaaderen, *Nano Letters*, **4**, 2, 205 (2004).
- [31] C. Priest,S. Herminghaus, R. Seemann; *Appl. Phys. Lett.*, **88**, 24106 (2006).
- [32] Ralph P, Nakoinz I. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.* 119: 950-954, 1977.
- [33] Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.

[34] We gratefully acknowledge ESPCI and CNRS for their support to this work. We benefited from fruitful discussions with P. Doyle, J.Prost, S. Quake, J. Lewiner, S. Granick, A. Colin, A. Viallat, A. Ajdari, J.L.Viovy.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

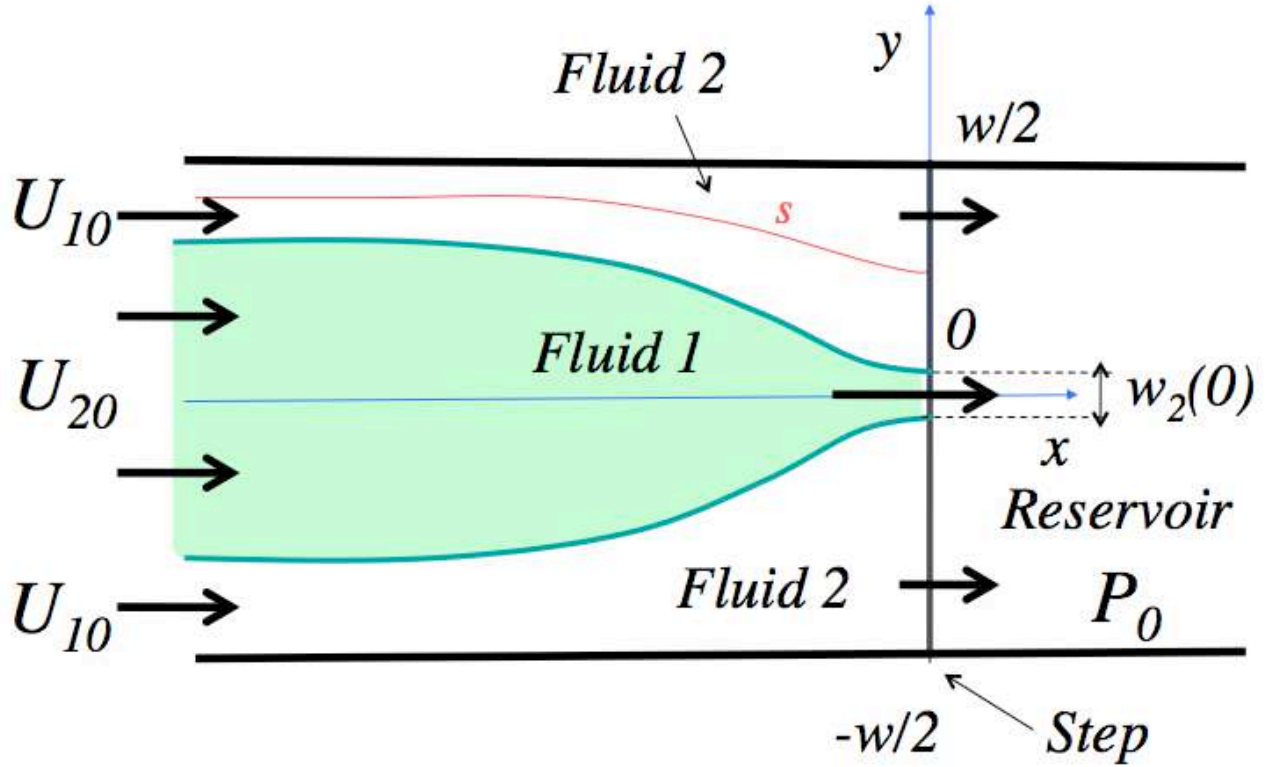
- A. Sketch of the device used for obtaining multiple droplets



(A) . Sketch of the double emulsion device showing the two dispersed phases (yellow and red) flowing through the nanofluidic channel and forming encapsulated droplets as they arrive into the reservoir of the continuous phase (blue). In most cases, a transverse flow is imposed across the reservoir in order to facilitate the collection of the emulsion. (B-C-D) . Pictures of double emulsions obtained in a 650nm nanochannel height. Colors are obtained by post-processing imaging. From left to right: partial engulfing (Janus) of Silicon oil - Rapeseed oil / water + SDS 1% wt; Complete engulfing of Silicon oil - Fluorinated oil / water + SDS 1% wt; Multiple encapsulation of Silicon oil - Fluorinated oil / water + SDS 1% wt. The encapsulated droplets (yellow continuous phase) are made at the flow focusing junction and encapsulated at the step (red intermediate phase).

B Theoretical description of the capillary focusing effect.

The geometry that is considered is shown below :



Fluids 1 and 2 flow from left to right, under the action of a pressure gradient. We assume shallow channels and use Hele Shaw approximation to describe the flow over the terrace, i.e in the region $x < 0$. The step is located at $x=0$ and the reservoir, held at fixed pressure P_0 , occupies the region $x > 0$.

Far upstream, i.e for x negative with a large modulus, we have the following condition:

$$P_{20} - P_{10} = \frac{2\gamma}{b}; \mu_1 U_{10} = \mu_2 U_{20}$$

Where P , μ and U are pressure, viscosities and velocity, and 1 and 2 correspond to fluids 1 and 2 respectively; the index zero means "upstream". Let us consider an arbitrary streamline (marked in red on the Figure), with s as the associated local curvilinear coordinate; s varies from $-\infty$ at the

channel entry to zero at the step. Using Hele Shaw approximation again, one obtains the following relations, for regions 1 and 2:

$$P_1(s) - P_0 = \int_s^0 \frac{\partial P_1}{\partial s} ds = \frac{12\mu_1}{h^2} \int_s^0 U_1(s) ds$$

$$P_2(s) - P_0 = \int_s^0 \frac{\partial P_2}{\partial s} ds = \frac{12\mu_2}{h^2} \int_s^0 U_2(s) ds$$

in which h is the channel height. Let us consider the streamline that is common to region 1 and 2 and which therefore defines the interface between the two fluids. For this particular streamline, by subtracting the above equations, and replacing s by $-\infty$, one obtains the following relation:

$$P_2(-\infty) - P_1(-\infty) = \frac{2\gamma}{b} = \frac{12}{b^2} \int_{-\infty}^0 (\mu_2 U_2(s) - \mu_1 U_1(s)) ds$$

In order to evaluate the integral of the right hand, we introduce a characteristic length l_0 defined by:

$$\int_{-\infty}^0 (\mu_2 U_2(s) - \mu_1 U_1(s)) ds = l_0 (\mu_2 U_2(0) - \mu_1 U_1(0))$$

l_0 measures the length over which pressure and velocities depart from the upstream conditions. The order of magnitude of l_0 is the channel width. By introducing such a length, one obtains :

$$\frac{\gamma b}{6l_0} = \mu_2 U_2(0) - \mu_1 U_1(0)$$

By applying mass flow consevation, one has the following relations:

$$U_{10} w_{10} = U_1(0) w_1(0)$$

$$U_{20} w_{20} = U_2(0) w_2(0)$$

Using the above relation, one finally obtains:

$$\frac{\gamma b}{6l_0} = \frac{\mu_2 U_{20} w_{20}}{w_2(0)} - \frac{\mu_1 U_{10} w_{10}}{w_1(0)}$$

It is useful at this stage to introduce dimensionless capillary numbers :

$$Ca = \frac{6\mu_2 U_{20} l_0}{\gamma b} = \frac{6\mu_1 U_{10} l_0}{\gamma b}; z = \frac{w_2(0)}{w}$$

Here z is the width of the "tongue" at the step, an important quantity we desire to estimate. In terms of dimensionless numbers, one obtains:

$$\frac{1}{Ca} = \frac{\beta}{z} - \frac{1-\beta}{1-z}$$

z is thus governed by the equation:

$$z^2 - (Ca + 1)z + \beta Ca = 0$$

The general solution is given by:

$$z = \frac{1}{2} \left(1 + Ca - \sqrt{(1 + Ca)^2 - 4Ca\beta} \right)$$

In the limit of large Capillary numbers, z should be a constant equal to:

$$z \approx \beta$$

whereas for small Capillary number, one has:

$$z \approx \beta Ca$$

which shows that as the Capillary number goes to zero, the tongue tend to develop a cusp at the step. The general solution has been used to compare theory and experiment on Fig 1.

C - Caption of the movie showing the phagocytose of a multiple droplet

Confocal microscopy movie showing two multiple emulsions of aqueous fluorescein droplets (diameter ~ 800 nm) contained within a fluorinated oil droplet (diameter ~ 5 μm) which are phagocytosed by a macrophage. Aqueous droplets perform Brownian motion. Cells are stained with the lipophilic dye FM 4-64 (Molecular Probes) .

D - Materials

Fluids Composition

In all experiments the continuous phase is composed of distilled water (Milli-Q) with 1% of SDS (Sigma) as surfactant, except for particles synthesized for cells experiments, where aqueous phase is composed of PBS + 1% Pluronic F-68, and for photopolymerized particles where an aqueous solution of glycerol (Sigma) 50% w/w is used.

Simple droplets are composed of fluorinated oil (FC3283 from 3M). Photopolymerized particles are composed of Tri Propylene Glycol diacrylate (TPGDA) with 10% of photoinitiator (Darocur 1173, Sigma)). Photopolymerization is performed in situ in the microchip, through the inverted microscope with a 4X objective (Leica DMIRB with a mercury lamp EBQ100). Janus particles are composed of silicone oil (CRC industries) with a viscosity $\mu = 20$ cP and rapeseed oil. Double droplets with a total encapsulation consist of fluorinated oil (internal phase) and silicon oil (external phase).

Microfluidic Devices

Microchannels were generated using standard procedures in soft lithography. Polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer (Sylgard 184, Dow Corning) was cured on a silicon wafer bearing channel

reliefs made using SU-8 photoresist (Microchem). The channels were cut out with a scalpel, a hole was punched at each inlet, and the channels were sealed to glass slides after plasma treatment. Flow was imposed with a constant pressure.

4.3 Vers des émulsions submicrométriques

Cette partie, consacrée à la génération de gouttellettes monodisperses de taille variant de 0.9 à 5 μm , explore le domaine de la nanofluidique de gouttes. Les phénomènes de "focalisation capillaire" induits par des nanocanaux facilitent une génération monodisperse et localisée de petites gouttes. La possibilité de générer des gouttes plus petites est uniquement limitée par les techniques de microfabrication ; ainsi une réalisation de nanocanaux inférieurs à 450 nm autoriserait la génération de gouttes inférieures à 900 nm.

La variété de colloïdes produits est large et inclut émulsions simples, janus et émulsions multiples. En particulier, les émulsions eau/huile/eau constituent des vecteurs inertes de substances hydrosolubles biologiquement actives.

Conclusion

Quelle que soit l'application, la microfluidique allie innovation technologique et découverte scientifique.

- S'appuyant sur la microfluidique des gouttes, nous avons présenté dans le chapitre 2 un microsystème dédié à l'étude de la cellule unique par la méthode de la RT-PCR temps réel, technique de référence pour les analyses quantitatives de l'expression génétique. Le développement, à l'état de l'art, ouvre les voies de la compréhension et de l'analyse de nombreux phénomènes biologiques, tels que l'étude de populations hétérogènes, les relations entre phénotypes particuliers et transcriptions. Nous travaillons actuellement sur une population de cellules épithéliales dont la dispersion de taille varie avec le nombre de divisions cellulaires et nous essayons de mettre en évidence une relation entre expression de gènes liés à l'adhésion cellulaire et taille des cellules. Une étape importante à franchir consiste à réaliser le prélèvement local des cellules au sein d'une population couplé à une analyse par RT-PCR. Le concept de microgouttes en tant que réservoir isolé possède des avantages incontestables vis à vis des travaux en écoulement monophasique ; il permet les analyses haut débit en un temps raisonnable et sans manipulation excessive.
- A l'échelle de la microfluidique, les phénomènes de turbulence ne peuvent être mis à profit pour accélérer le mélange ; cependant la convection couplée à la diffusion dans des gouttes d'une centaine de micromètres induisent des mélanges et des transferts de masse particulièrement rapides. L'étude menée au chapitre 3 a permis de déduire une loi d'échelle décrivant la cinétique des transferts de masse dans des gouttes. En pratique, les temps caractéristiques des transferts, que ce soit dans le cas d'une extraction réactive ou passive, sont de l'ordre de la seconde, une échelle de temps bien inférieure à celle des processus d'extraction liquide-liquide dans des systèmes conventionnels.
- Le chapitre 4 est une ouverture sur l'application des gouttes en tant que vecteurs ; la monodispersité associée à la génération haut débit d'émulsion dont la taille avoisine le micron, ouvrent des perspectives très intéressantes pour le véhiculage de principes actifs chez les macrophages. Nous cherchons actuellement à caractériser les potentiels impacts de la vectorisation en microémulsions dans le domaine de la médecine par une étude d'un système modèle destiné à déclencher une réponse immunitaire par phagocytose de la toxine tétanique.

La microfluidique, et particulièrement la microfluidique digitale, est un outil adapté aux études biologiques et vient compléter ou remplacer des protocoles lourds et entachés d'incertitude. L'intégration d'étapes requiert cependant un interfaçage entre le microsystème et le monde extérieur, souvent source de volumes morts ; un soin et une étude particuliers doivent être accordés au problème délicat de la connexion entre deux systèmes d'échelles très différentes.

Le début du XXI ème siècle est l'époque des multiples développements en microfluidique ; il convient néanmoins de prendre des précautions dans "l'intégration totale" et se poser les questions de son efficacité et de sa valeur ajoutée : la microfluidique doit rester un outil pour répondre à des questions scientifiques, la miniaturisation n'est pas une fin mais peut constituer une innovation pour sonder et regarder "de plus près" un phénomène.

Annexes

La polymérisation en chaîne avec transcription inverse.

Depuis la découverte de la PCR par Kary Mullis en 1986, qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1993, les techniques de PCR sont rapidement apparues comme des outils indispensables en biologie moléculaire. La quantification en temps réel fut proposée par Higuchi R en 1992 [Higuchi 1992] et connut un développement croissant ces dernières années.

La RT-PCR repose sur deux étapes bien distinctes : la transcription inverse de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification de cet ADN par PCR.

A.1 Transcription inverse

La transcription est la réaction de synthèse avec comme matrice un brin d'ADN ; la transcription inverse est la réaction inverse de cette opération, elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN. Cette réaction est catalysée par une enzyme, l'ADN polymérase, ARN dépendante ou rétrotranscriptase, qui incorpore les désoxynucléotides triphosphates complémentaires (dNTP). Cette enzyme, notamment très utilisée par les virus à ARN [Ong 2002] a besoin d'amorces possédant une extrémité 3'OH libre pour que la synthèse du brin d'ADN s'initie. Les amorces pour de l'ARNm provenant de cellules eucaryotes peuvent être soit une séquence polyT - dans ce cas tous les ARNm sont *a priori* copiés en ADNc, soit des amorces spécifiques de l'ARN étudié - dans ce cas l'ADNc obtenu est complémentaire du seul ARN d'intérêt (figure A.1).

A.2 Réaction de polymérisation en chaîne.

La PCR est une réaction catalysée par les ADN polymérases permettant d'amplifier un fragment d'ADN par cyclages thermiques répétitifs. La PCR nécessite la présence de dNTP et de deux brins d'ADN complémentaires d'une partie du fragment considéré appelés amorces. La position des amorces détermine le fragment d'ADN à amplifier.

La PCR repose sur deux principes :

- Les ADN polymérases, ADN dépendantes, thermostables, ont des propriétés de synthèse enzymatiques et d'initiation "ADN double brin spécifique". Elles incorporent les nucléotides complémentaires d'un simple brin dans le sens 5'-3' du brin en question.

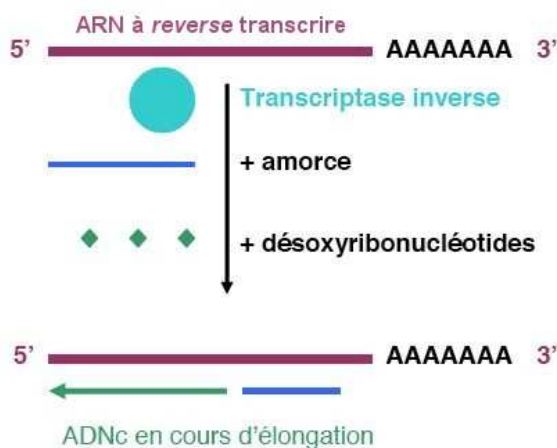


FIG. A.1 – RT réalisée avec amorces spécifiques.

- L'hybridation et la déshybridation des brins complémentaires d'ADN sont fonction de la température. La température est ainsi le contrôle de l'activité enzymatique des ADN polymérases.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (figure A.2) :

- La dénaturation consiste à déshybrider l'ADN double brin par déstabilisation des liaisons hydrogènes responsables de la formation de la double hélice. Elle se réalise à 95 °C.

- Un abaissement de température (jusqu'à 56 à 64 °C) conduit à la phase d'hybridation pendant laquelle les amorces se lient aux ADN matrices en raison d'une température thermodynamiquement favorable.

- Une fois les amorces appariées, la température est augmentée à 72 °C et l'ADN complémentaire est synthétisé par les polymérases à partir des dNTP libres dans le milieu réactionnel. Les étapes d'hybridation et d'élongation sont parfois réalisées à la même température (environ 60 °C).

Ainsi, après un cycle de PCR, la quantité initiale d'ADN est théoriquement multipliée par 2, après n cycles elle est multipliée par 2^n si chaque brin nouvellement créé sert de support à la synthèse d'un nouveau brin au cycle suivant. En réalité, le rendement n'est jamais de 100 % et la quantité d'ADN en fonction du nombre de cycles peut s'écrire :

$$Q = Q_0 E^N \quad (\text{A.1})$$

avec Q la quantité d'ADN, Q_0 la quantité d'ADN initiale, E l'efficacité de la PCR (compris entre 1, i.e. rendement nul, et 2, i.e. rendement de 100 %) et N le nombre de cycles.

Enzymes. Les premières enzymes utilisées pour la PCR sont des ADN polymérases sensibles à la chaleur et dénaturées irréversiblement lors de l'incubation aux hautes températures nécessaires pour la dénaturation de l'ADN. Pour amplifier, il fallait donc ajouter de l'enzyme après chaque cycle, ce qui rendait le protocole laborieux et exposait l'échantillon à de forts risques de contamination. En 1987, les premiers recours à une ADN

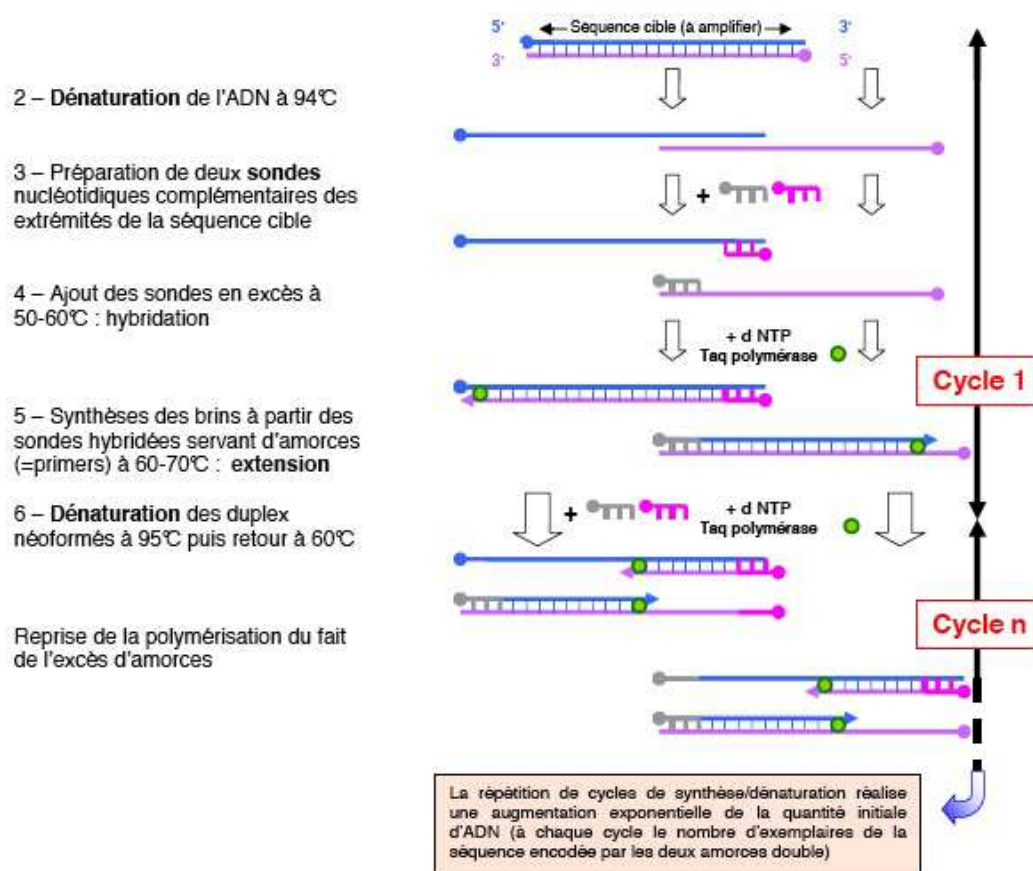


FIG. A.2 – Principe de la PCR.

polymérase thermostable obtenue à partir d'une eubactérie thermophile, *Thermus Aquaticus*, sont à l'origine du succès de cette méthode [Saiki 1985]. Cette enzyme, connue sous le nom de Taq polymérase, présente l'inconvénient de ne pas pouvoir corriger l'incorporation d'une base erronée par une excision suivie d'un remplacement par une base correcte. D'autres enzymes à activité exonucléase, capables de relire et le cas échéant modifier la séquence qu'elles créent ont, par la suite, été découvertes [Lundberg 1991]. La possibilité d'association d'enzymes laisse une latitude à l'utilisateur pour faire face à un grand nombre de situation. Les erreurs d'incorporation se font à un taux relativement bas (10^{-6} substitution par nucléotide pour Taq polymérase), rendant la méthode particulièrement efficace.

Notons enfin l'existence d'enzymes appelées Tth polymérases possédant une activité transcriptase inverse. Elles sont capables de catalyser deux types d'activité polymérase, ARN et ADN, ce qui a l'avantage de permettre de réaliser RT et PCR dans le même milieu réactionnel.

Protocoles de microfabrication

B.1 Microsystèmes en NOA

Cette méthode de fabrication s'inspire de techniques d'impression sous UV.

Les premières étapes sont communes à la réalisation de systèmes en PDMS : réalisation d'un moule microstructuré en résine négative (SU-8) sur un wafer en silicium par lithographie UV et réplication négative du moule en PDMS.

Cette réplique négative est passée au plasma à O_2 puis silanisée par voie vapeur (1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane, Aldrich) pour pouvoir recouler du PDMS sur les motifs et obtenir une réplique positive du moule en résine (appelée le "timbre").

Le timbre et un morceau de PDMS sans motif (appelé le "flat") sont placés dans une cloche à vide pour y être dégazés.

A partir de cette étape, la conception des microsystèmes commence (cf. image B.1) :

- Une goutte de NOA est déposée entre le timbre et le flat.
- Les bulles qui se sont formées à l'étape précédente sont absorbées par le PDMS préalablement dégazé.
- L'ensemble {timbre-flat-NOA} est exposé aux UV (longueur d'onde : 365 nm) une première fois, le polymère réticule, épousant la forme des canaux. La présence d'oxygène à l'interface PDMS/NOA assure la présence d'une fine couche non réticulée, et une non adhésion entre NOA et PDMS.
- Le timbre est décollé de la NOA et remplacé par une lame de verre préalablement percée avec une sableuse au niveau des entrées-sorties du circuit et alignée avec les motifs.
- L'ensemble est de nouveau réticulé pour assurer une bonne adhésion des canaux en NOA avec le verre et ainsi une bonne fermeture du circuit.

B.2 Réalisation des microvannes intégrées aux connectiques en PDMS

Les vannes sont réalisées par procédé multicouches, il faut donc réaliser deux lithographies, une pour les canaux fluidiques, une pour les vannes de contrôle. Les canaux de contrôle sont réalisés en résine négative (i.e. les zones soumises aux UV ne sont pas dissoutes par le développeur), ils ont une section caractéristique de 500 μm de large et de 70 μm de haut. Les canaux fluidiques sont réalisés à partir de résine positive (i.e. les

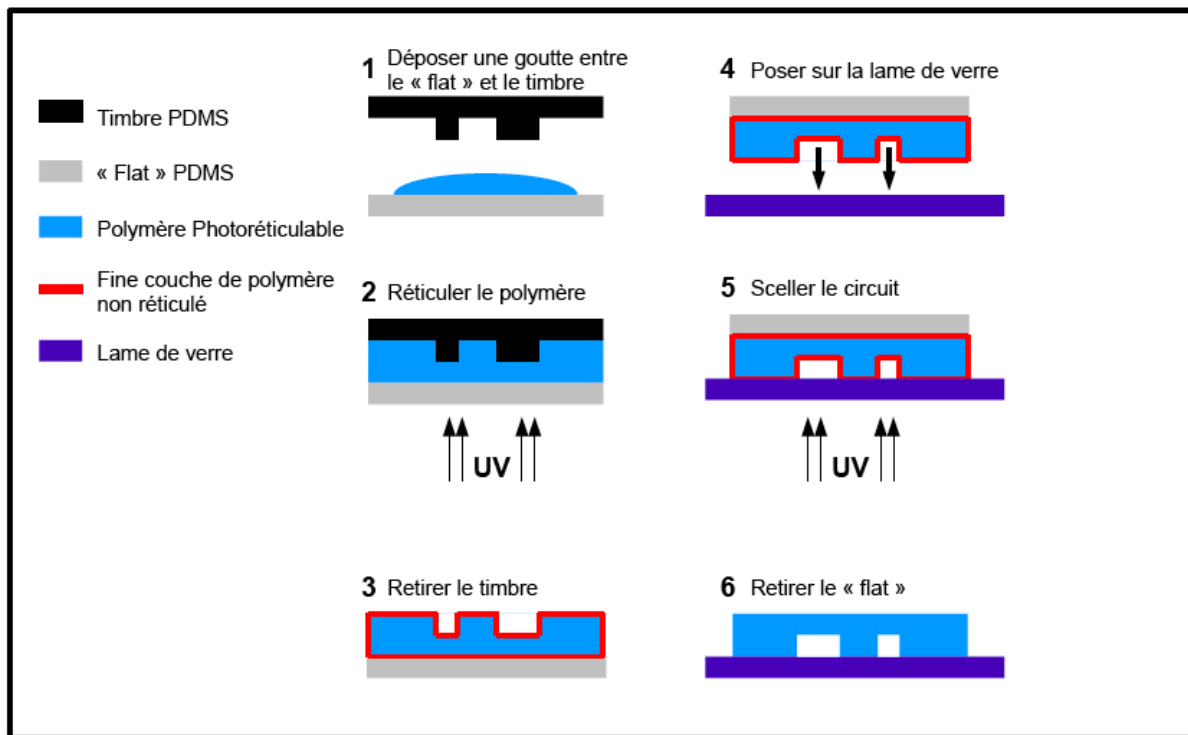


FIG. B.1 – Les différentes étapes de conception des microsystèmes en NOA. Schéma adapté de [Bartolo 2008].

zones soumises aux UV sont dissoutes par le développeur). Leur section caractéristique est de $500\ \mu\text{m}$ de large pour $40\ \mu\text{m}$ de haut. L'avantage de la résine positive réside dans la géométrie de canaux après recuit : la forme est parabolique, assurant une fermeture totale du passage des fluides par actuation du canal de contrôle.

Préparation du PDMS. Une fine membrane est réalisée par *spin coating* du PDMS sur le moule fluide. Sur le moule actuateur, le moulage réalisé est plus épais. Les canaux de contrôle sont collés sur la fine couche constituant les canaux fluidiques, par la méthode de gradient de concentration de l'agent réticulant et du polymère entre les deux couches.

- Etape 1 : on prépare deux mélanges de PDMS, un mélange avec un rapport massique de polymère/réticulant de 20 : 1, et un autre en quantité plus importante avec le rapport 5 : 1. Après dégazage des mélanges par centrifugation, la fine couche est réalisée par *spin coating* du PDMS 20 : 1 (750 tour/min pendant 30s assure une épaisseur d'environ $100\ \mu\text{m}$). La partie plus épaisse du système (5 mm avec le mélange 5 : 1) est coulée sur le moule actuateur.
- Etape 2 : les deux moulages sont mis au four à 70°C pendant 40 min.
- Etape 3 : Les trous de connexions pour les canaux d'actuation sont réalisés. Les canaux d'actuation sont alignés avec les canaux fluidiques. L'ensemble est remis au four pendant quelques heures pour assurer l'adhésion entre les deux couches.
- Etape 4 : Les vannes sont alors démoulées délicatement et les trous de connexions

fluidiques sont réalisés.

- Etape 5 : Les connectiques sont collées sur le système par plasma à O_2 . La figure B.2 résume l'ensemble des tâches.

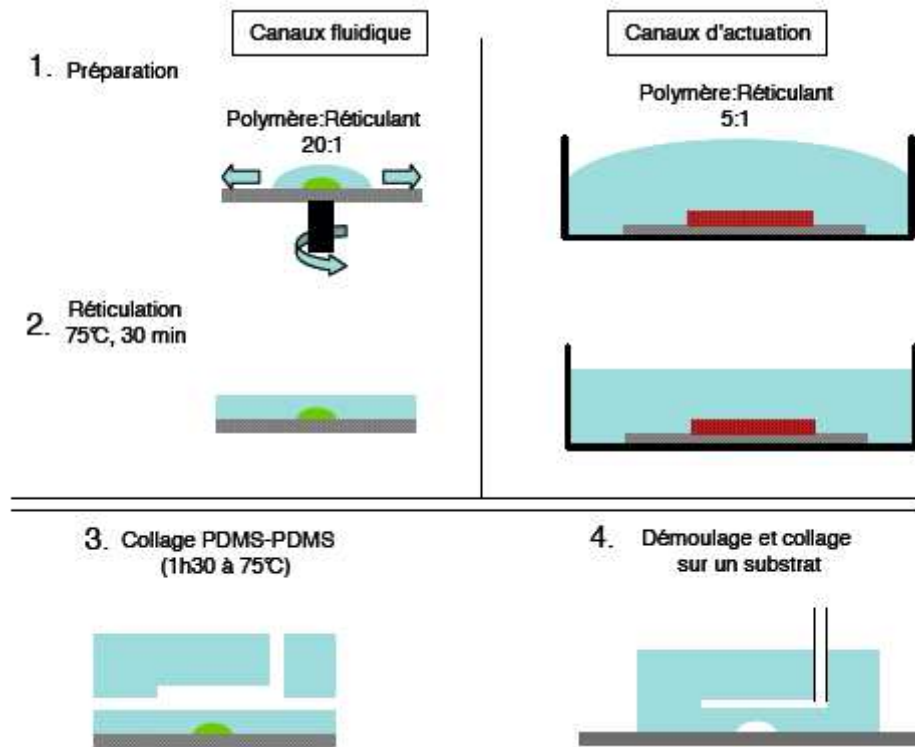


FIG. B.2 – Etapes de la fabrication pour la réalisation de microvannes. D'après [Goulpeau 2008].

Séquence des amorces et des sondes.

Actine B : Amorces gauches : ATGGTGGGAATGGGTCAG

Amorces droites : GGGTACTTCAGGGTCAGG

Amplicon : cctCtcTtgCtcTgggc

TBP : Amorces gauches : AGCTCTGGAATTGTACCG

Amorces droites : GCAATGGTCTTTAGGTCAAG

Amplicon : acaGccAagAttCacggt

Les symboles en majuscules dans l'amplicon correspondent aux positions des groupements LNA.

Culture et préparation des cellules.

Les cellules étudiées sont des hybridomes T de souris, résultat de fusion entre une cellule de myélome et une cellule lymphoïde T. Elles sont cultivées dans du RPMI (Lonza) complété avec 10 % (v/v) de serum fœtal de veau (Biowest), des acides aminés non essentiels (Gibco) et 1 % de pénicilline streptomycine (Gibco). Les cellules sont divisées tous les trois jours dans des conditions stériles et incubées à 37°C avec 5 % CO₂. Leur taille caractéristique est de 10 μm (figure D.1). La culture se fait en suspension dans des boîtes de culture à une densité variant de 10^6 à 5×10^6 cellules/mL. Avant toute expérience, elles sont centrifugées et lavées deux fois pendant sept minutes à 1000 tr/min et resuspendues dans du PBS stérile. La densité cellulaire est ajustée à la valeur voulue.

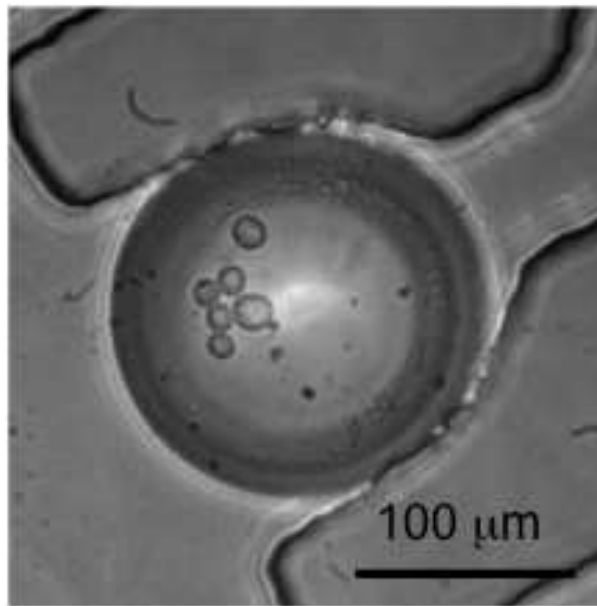


FIG. D.1 – Cellules encapsulées dans une goutte piégée dans un système microfluidique.

Kit de RT-PCRq en une étape.

Le kit utilisé est le "Lightcycler 480 RNA Master Hydrolysis Probe" de chez Roche Applied Sciences.

Pour un total de 20 μL , en **simplex**, la composition d'un mélange réactionnel est la suivante :

- 2.0 μL d'amorces gauches et d'amorces droites (concentration finale 0.5 μM),
- 0.2 μL de sondes (concentration finale 0.25 μM),
- 1.3 μL de "Activator",
- 7.4 μL de "LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes, 2.7X conc.",
- 1.0 μL de "Enhancer, 20X conc",
- 6.1 μL d'eau et de solution de cellules dans le PBS ou d'ARN dilué dans de l'eau.

Pour un total de 20 μL , en **duplex**, la composition d'un mélange réactionnel est la suivante :

- 2.0 μL d'amorces gauches et d'amorces droites pour chacun des gènes (concentration finale 0.5 μM),
- 0.2 μL de sondes pour chacun des gènes (concentration finale 0.25 μM),
- 1.3 μL de "Activator",
- 7.4 μL de "LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes, 2.7X conc.",
- 1.0 μL de "Enhancer, 20X conc",
- 1.0 μL d'enzyme (Tth DNA polymerase) soit 5 U,
- 0.9 μL d'eau et de solution de cellules dans le PBS ou d'ARN dilué dans de l'eau.

Traitement d'images de PCRq en temps réel.

L'objet de ce traitement d'images consiste à suivre l'intensité dans les gouttes en fonction du nombre de cycles.

Les images sont traitées par Matlab qui réalise les tâches suivantes sur chaque image :

1. soustraction de l'intensité liée au bruit de fond,
2. binarisation par seuillage dynamique,
3. ouverture morphologique de l'image (retire les pixels brillants en dehors des gouttes).
Une image typique obtenue à l'issue de ces étapes est représentée figure F.1,
4. segmentation et numérotation de chaque contour fermé,
5. multiplication, pixel par pixel, de l'image initiale avec l'image segmentée,
6. mesure de l'intensité moyennée pour chaque zone segmentée dont la taille se situe dans un intervalle fixé (on élimine les éventuelles zones non désirées qui n'auraient pas été éliminées par le traitement d'image et qui ont une taille différente d'une goutte),
7. normalisation des courbes d'amplification obtenues,
8. ajustement par une fonction sigmoïde.

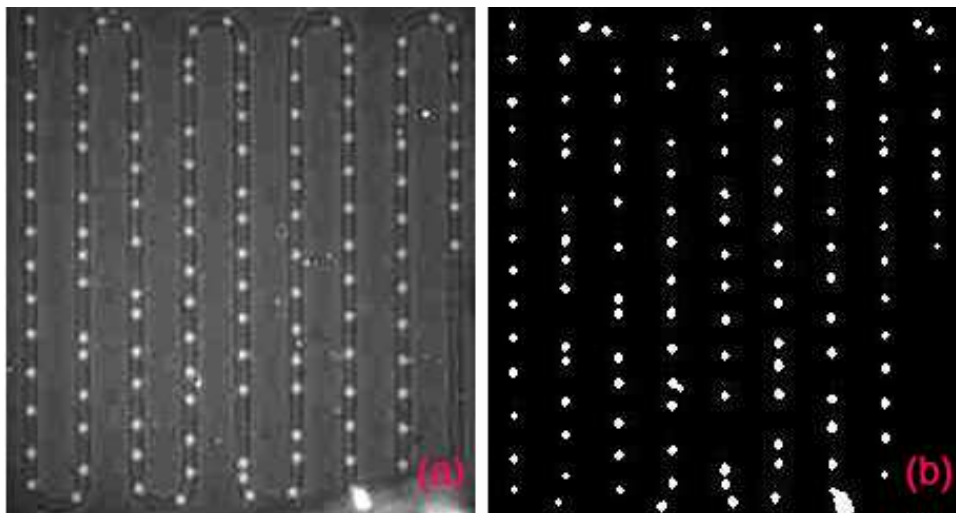


FIG. F.1 – (a) Image d'origine, (b) image binarisée.

Article sur l'optimisation de forme d'une source de chauffage pour des systèmes microfluidiques.

Cet article, accepté pour publication dans le journal *Microfluidics and Nanofluidics*, présente une optimisation de forme d'une source locale de température intégrée à un microsystème. Ma contribution dans ce travail, d'ordre expérimentale, se situe au niveau de l'application à la PCR et de la caractérisation de la réponse du système à des consignes périodiques.

Integration of a uniform and rapid heating source into microfluidic systems

Bertrand Selva · Pascaline Mary ·
Marie-Caroline Jullien

Received: 26 June 2009 / Accepted: 16 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The purpose of this study has been to demonstrate the possibilities of uniform heating of a cavity, with great accuracy, by means of an integrated resistor built with the same dimensions as the cavity, i.e., with a high level of integration. For application purposes, a compact resistor allows increasing the number of cavities in which temperature can be independently controlled on the same substrate, which can prove critical for high-throughput screening applications. Potential applications lie in the field of biology or chemistry. In order to achieve the desired result, an optimization procedure was performed on the shape of the resistor. The heater size reduction enables a high level of integration with a reduced heating source surface area. Resistor shape has been optimized to reduce the influence of boundary effects, using improvements introduced in genetic algorithms. An experimental validation of the temperature profile inside the cavity has been carried out using a dye whose fluorescence depends on temperature, i.e., Rhodamine B, it will be shown herein that the optimized resistor allows for temperature cycling, e.g., for PCR applications.

Keywords Uniform temperature · Integration · PCR · Shape optimization · NSGAI · Resistor

1 Introduction

Controlling temperature in a lab-on-a-chip device, especially locally, constitutes a major constraint for chemical and biochemical applications (Ross et al. 2001). We are proposing a method to control heat within a microfluidic cavity (of the microreactor type) using a heating resistance whose size is comparable to that of the cavity. Most of the reported results in the literature involve either whole system heating (Ke et al. 2006; Goulpeau et al. 2005) or a heating zone of size much larger than the interest zone (Liao et al. 2005). Approaches to accurate temperature control within microfluidic systems have been proposed. De Mello et al. (2004) demonstrated controlled ohmic heating of ionic liquids in a co-running channel that was external to the main fluidic system. However, precise control of Joule heating for large variations of temperatures remains difficult regarding the conductivity of ionic liquid proposed. Moreover, this method does not lead to uniformity due to boundary effects. Note that in the study of Hsieh et al. (2009) the authors developed a judicious architecture to generate a homogeneous temperature over a zone 5 mm × 5 mm area; however, in this article, we propose a tool able to downscale by two orders of magnitude the interest area using shape optimization. The interest here is twofold: shape optimization for the heating resistance allows leaving space on the substrate for other potential surface functionalizations; and a decrease in resistor surface area results in lowering the required heating power. This second advantage enables increasing the autonomy of the portable system and facilitates temperature stabilization over the long term. In order to achieve this goal, we are proposing a tool intended to optimize a resistor pattern capable of generating constant temperature along the cavity. In a previous study, we have reported such optimization

B. Selva (✉)
SATIE, ENS-Cachan Bretagne, CNRS, UEB, av Robert
Schuman, Bruz 35170, France
e-mail: selva@bretagne.ens-cachan.fr

P. Mary · M.-C. Jullien
MMN, CNRS, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin,
Paris 75005, France
e-mail: pascaline.mary@espci.fr

M.-C. Jullien
e-mail: marie-caroline.jullien@espci.fr

to generate a linear temperature profile (Selva et al. 2009) in a 2D case using COMSOL, while in this article, we extend such approach to the thermal response evaluated in a 3D configuration using a superposition method.

In this study, minimizing the area occupied by the resistors was the first of our two main concerns, the second being the generation of a homogeneous, i.e., spatially constant, temperature inside a cavity. Indeed, decreasing the resistor area leads to an increase of the boundary effects; for this reason resistor shape optimization aims at compensating this effect.

A diagram of the proposed work program is shown in Fig. 1. In an initial step, the experimental set-up characteristics are described to establish the physical parameters (e.g., dimensions of the various system layers, heat conductance of the materials, heat flux at the interfaces) subsequently used for the optimization procedure. This optimization approach is indeed aimed at determining just a single parameter, namely resistor geometry, while keeping all other parameters fixed. The resistor is composed of parallel wires connected in parallel (see solution on Fig. 1). The local wire width imposes thermal losses, and with it the local heat density flux. The parameters to be optimized consist of (Fig. 2) the initial width, and five local slopes for each half-wire. Symmetry along the two main axes is imposed, as depicted in Fig. 2, given the axisymmetric nature of heat diffusion problems for such a geometry. Resistor pattern optimization is achieved using a genetic algorithm that proposes geometrical configurations for the resistors (see Fig. 3 for the corresponding flowchart).

The thermal response is evaluated for each suggested configuration by applying a superposition method. This optimization step is followed by an experimental analysis during which the temperature profile is measured over all the locations in the cavity. The thermal response is measured through use of a temperature-sensitive fluorescent dye, Rhodamine B, commonly introduced to measure temperature within microfluidic systems (Ross et al. 2001; Erickson et al. 2003). After calibration and an image processing sequence, it becomes possible to extract the temperature profile along the cavity. The temperature profile

inside the cavity for an optimized resistor can then be compared, both numerically and experimentally, with a constant heat flux profile. Finally, the miniaturization of biological protocols offers valuable insight, especially as regards portability, the small quantity of reagent needed, a decrease in the number of contaminations (Goulpeau et al. 2005), and fast heat transfers. These advantages have been utilized over the past several years for purposes of amplifying nucleic acids on chips (polymerase chain reaction, PCR) (Ke et al. 2006; Liao et al. 2005). Mahjoob et al. (2008) have proposed the insertion of a porous matrix to increase heating/cooling rates due a very large surface area for a given volume, which is a key parameter in heat transfer processes. Although, elegant and efficient, this approach requires a precise control of many parameters, such as exchanger geometry, flow rate, conductive plate, and the porous matrix material, which decrease the flexibility of this method. Accelerated PCR production represents one of the leading motivations behind the development of chip-based PCR; a critical feature in generating such speed is the ability to integrate the heating device, which offers the possibility of short thermal responses coupled with high heating/cooling speeds. The device presented in this article constitutes a thermal cyclers of potential value for PCR applications. Easily parallelized, this setup combines the advantages of a quick, sensitive, and homogeneous control function operable over the entire heating zone.

2 Numerical part: determination of an experimental configuration

2.1 Experimental set-up characteristics

The experimental setup will be presented in this section. Knowledge of each geometrical parameter (i.e., thickness of each layer), as well as the physical properties of each layer, serves to numerically calculate the thermal response of the entire system. This calculation will be performed by considering the superposition of single resistor elements

Fig. 1 Analysis path diagram showing interdependence of the experimental setup (indicating experimental characteristics in terms of heat transfer), the optimization algorithm (indicating a resistor pattern), and the COMSOL finite element computation code (indicating the thermal response of the system, in taking both experimental parameters and resistor geometry into account)

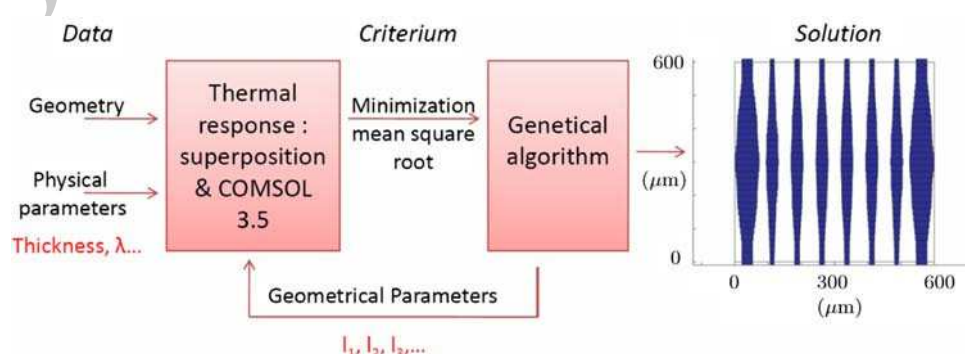


Fig. 2 Parameterization of the optimization procedure for defining local slopes and showing the considered symmetries

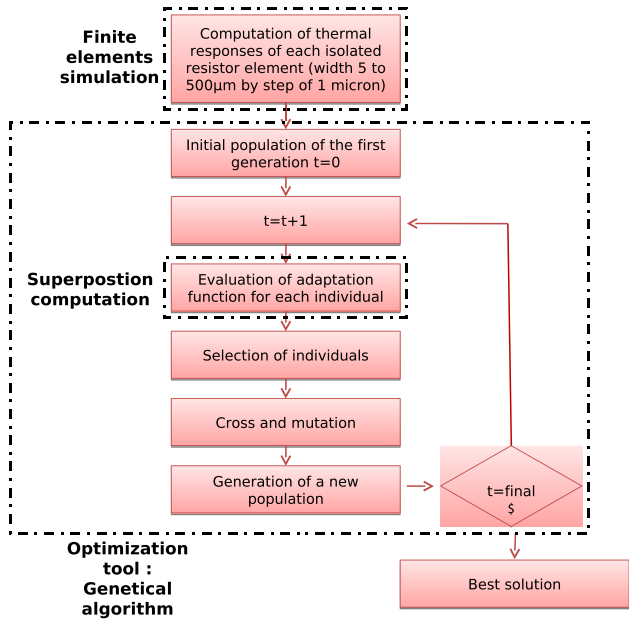
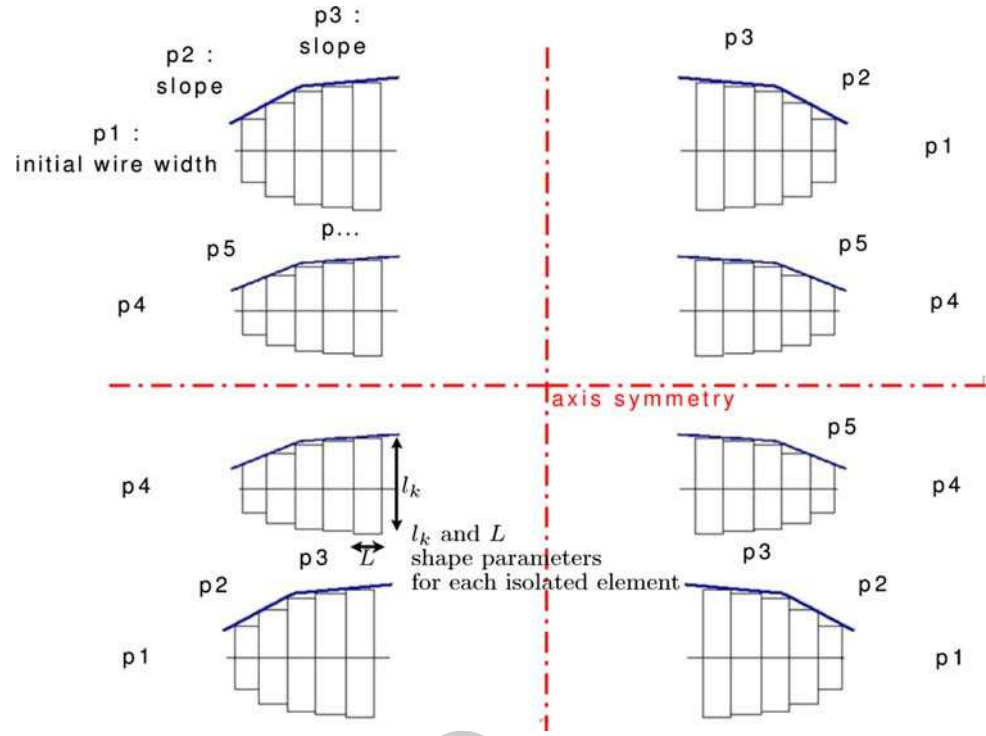


Fig. 3 Flow chart of the optimization procedure

generated by spatial discretization of the complete resistor. Each single element corresponds to one of the rectangles shown in Fig. 2. This means that each wire is composed of rectangles (of width to be determined by the optimization) placed in series. The thermal response associated with each element is then calculated using COMSOL (details will be provided in Sect. 2.2.2), giving rise to a database used for the superposition procedure.

The full setup has been sketched in Fig. 4, and a cross-sectional view is shown in Fig. 5.

A 100-µm thick SU8 2100 layer has been spin-coated onto a silicon substrate 500 µm thick. The electrical resistor was manufactured by evaporating chromium (30 nm) and gold (150 nm) on the SU8 layer (see Fig. 5). We thus use S1818 Photoresist to protect metal zones to keep on the wafer, while parts without resistors are etched after S1818 exposure to UV through a mask. The etching process comprises two steps: (i) the first generates a connection between the heating wires composing the resistor and the power supply (in gold: high electrical conduction with a negligible Joule effect); and (ii) the second step builds the optimized resistor. The cavity is electrically isolated from the resistor by means of spin-coating a 25 µm thick PDMS layer. The cavity has been produced according to a standard process for PDMS microsystems (Xia and Whitesides 1998). The micro-channels and cavity are both in PDMS (RTV 615 at a 1:10 rate) and 25 µm thick. The mold has been fabricated using SU8 2025. In order to minimize temperature rise on the wafer far from the heater location, an aluminum block has been added to play the role of a heat sink. The complete microfluidic system is fastened onto the aluminum block so as to dissipate heat and avoid an increase in mean temperature over time (Fig. 6). The heat sink used is of the CPU PC Pentium4 type. Figure 4 displays the entire device along with the connector and forced convection fan (Table 1).

Fig. 4 **a** General sketch of the experimental device, where x , y , and z denote the longitudinal, transverse, and vertical directions, respectively; **b** Photograph of the experimental device, including the aluminum part and the fan leading to forced convection

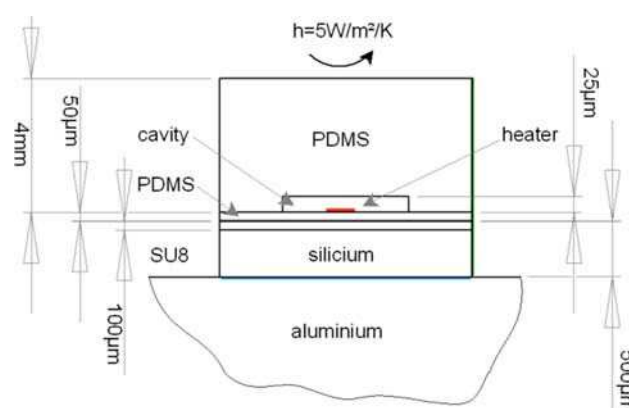
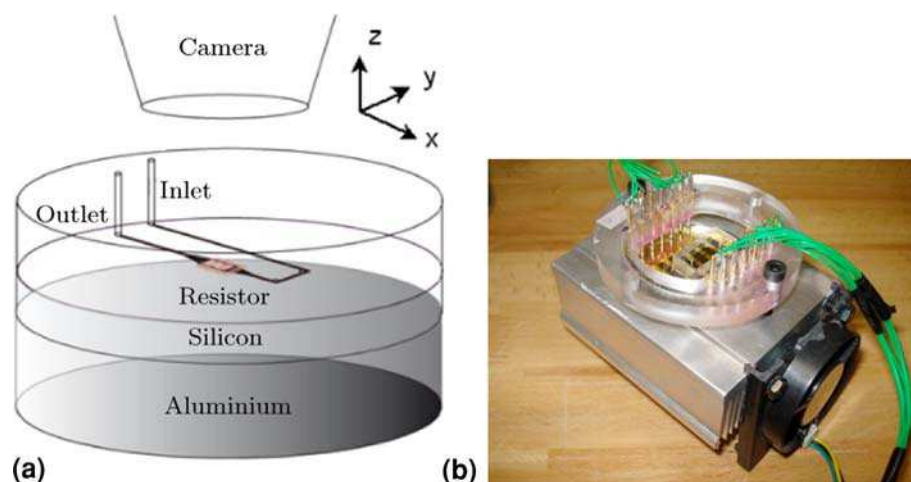


Fig. 5 Boundary conditions implemented within the thermal response calculation for each isolated heater element—green line: isolated surface, blue line: constant temperature, red line: heat flux

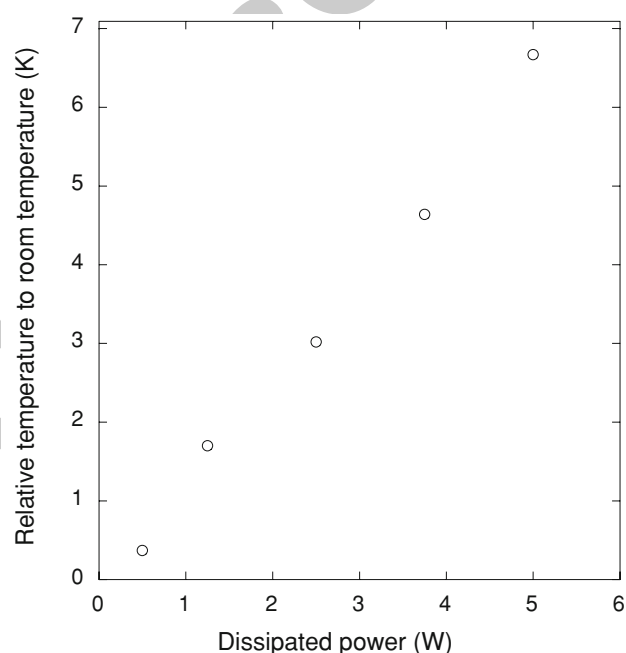


Fig. 6 Relative temperature in the aluminum part vs. dissipated power

Table 1 Material's heat conductivity

Material	Material's heat conductivity λ (W m ⁻¹ K ⁻¹)
Silicon	148
PDMS	0.2
SU8	0.2
Liquid	0.6

contribution of all the single-resistor elements composing the resistor. The time necessary to achieve optimization becomes critical; for this reason, superposition has been adopted, since this principle lowers computing time by two orders of magnitude. It is in fact necessary, during the

200
201
202
203
204

optimization procedure, to evaluate each individual several times. The full thermal response of the resistor is obtained by summing the local contributions of each isolated element (i.e., the superposition method), with each individual being calculated as a matrix sum. The thermal response at the cavity surface of each single resistor element is determined as a function of its own width (which varies from 5 to 500 microns with a 1-micron step) by means of finite element computations. The thermal response of all the single-resistor elements is then stored; this set of results yields a database, which is calculated prior to the optimization process. The benefit herein is to compute a heat diffusion problem in the 3D case for a complex geometry without having to directly use a finite element method, as this would raise some serious computing time constraints.

The optimization procedure starts with eight parallel wires; each wire is discretized into 33 elements of the same length, with local widths being determined through optimization. An additional gold layer is then deposited on the connecting zone, which serves to avoid any heat buildup in comparison with the resistor, composed solely of chromium. The algorithm is based on the following parameter optimization criterion: the spatial standard deviation of temperature rescaled by the mean temperature inside the cavity must be minimized. The objective of the algorithm is to output a set of parameters that minimize this criterion. Local widths are determined by the local slope, with the initial width as a given. Five slopes are associated with each half-wire.

2.2.1 Genetic algorithm

The algorithm used for this optimization process is a genetic one based on Darwin's evolution theory (Deb et al. 2002). It relates to a global approach that calls for sweeping the entire optimization field to locate the optimum. The algorithm sequence has been depicted in Fig. 1, while Fig. 3 displays the optimization flowchart. As a first step, an initial population is created by choosing individuals in the variable optimization field (the initial width of wires is bounded between 5 μm and 500 μm , and the local slope varies from 0 to 0.3) according to a uniform distribution. Each individual constitutes a solution defined by 24 parameters, and a generation is a group of individuals; in this setup, each generation is composed of 250 individuals. Each individual within the population can then be evaluated by calculating the objective, in the aim of establishing a ranking of the various individuals composing this population. The next step consists of selecting the best individuals extracted from the ranking. Two main stages are subsequently conducted; these yield the genetic characteristic of the optimization procedure. Pairs of individuals chosen after the ranking stage can then be formed, and each

individual can either endure a genetic mutation (i.e., involving some of the 24 parametric values defining each individual) (Deb 2002), or be coupled with another individual. In the latter case, these two individuals are crossed to create two other individuals. The randomness of these two stages enables avoiding all the local optima. As a last stage, the resultant population is once again evaluated and then ranked, with the best individuals chosen to create the new generation. This cycle is repeated until a predefined number of generations has been obtained, which in our case forms a 1000 generation loop. These (shape) parameters are: the local width of resistor wires, as given by five local slopes for each half-length wire (in considering the symmetry shown in Fig. 3). The individuals are evaluated by the following criterion: $C = \sigma/\bar{T}$, which is the temperature standard deviation divided by the mean relative temperature (with respect to room temperature) inside the cavity. The main differences with the optimisation reported in Selva et al. (2009), despite the fact that the aimed applications are utterly different, is the geometrical characteristics defining the individuals and the 3D feature of the optimized problem of this study. This feature prevents from a direct numerical calculation using finite elements in the context of an optimization (time of calculation). For this reason, a superposition method is used to provide such estimation.

2.2.2 Method of calculation over each individual, finite element study and superposition

Once the shape parameters have been set for an individual, the thermal response of such a configuration is evaluated using a superposition method applied to the thermal response of each discretized resistor element.

Finite element study of the thermal response of each single discretized element composing the resistor. The temperature is calculated by superposing the response of rectangular sources determined from the discretization of the resistor shape. The thermal response associated with all these sources of constant length but of varying width are evaluated using a finite element method previously to the optimization. All the possible widths are calculated in steps of one micron. The thermal response of each element is then stored in a data base and is further used to calculate the temperature response of the whole resistor.

Figure 5 shows the boundary conditions corresponding to a cross section of the system described in Sect. 2.1 as regards dimensions, material heat conduction and heat transfer at the interfaces. The calculation is carried out for a 3D geometry; it is thus assumed that the temperature is uniform inside the aluminum part (reminder: heat conduction is very high in aluminum). The silicon wafer is coated by a thermal paste to be thermally connected to the

aluminum part; moreover, it is possible to set the temperature below the glass wafer to that of aluminum, i.e., at room temperature, since the heat power level does not lead to any significant temperature rise in the aluminum part (see Fig. 6). The boundary conditions associated with boundary edges located far from the resistor imply a conduction heat flux equal to zero, i.e.,:

$$\frac{\partial T}{\partial x} = 0 \quad (1)$$

The convective heat flux density on the upper part of the system is modeled by the following flux:

$$\phi_c = h(T - T_\infty) \quad (2)$$

where T_∞ is the room temperature and $h=5 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$ the thermal exchange coefficient at the upper interface between PDMS and air. The boundary conditions between each solid part of the entire system is a continuous temperature and heat flux, except for the single discretized element heat losses of which are modeled by a local density flux (the thermal response is determined during the superposition calculation). The set of each element calculation constitutes the database used subsequently for superposition:

$$R_k = \frac{\rho L}{e l_k}; \quad I = U / \sum_{k=1}^m R_k \quad (3)$$

$$\phi_r = \frac{R_k I^2}{l_k L} = \frac{\rho I^2}{l_k^2 e} \quad (4)$$

where ϕ_r is the heat flux density associated with the Joule effect for a single resistor element defined by L , l_k and e , i.e., the length, respectively along the y and x axes, and the z direction; U is the applied voltage and m the number of single elements composing the resistor. This flux depends on the geometrical cross section. More specifically, the metal thickness e is a constant, which means that flux depends on the width of the resistive element l_k , $\phi_r \sim l_k^{-2}$.

2.2.3 Calculation output

The final solution is presented in the right of the Fig. 1; this geometry is associated with a standard deviation rescaled by the mean temperature, i.e., a criterion C equal to 0.02. As could be expected, the heat flux must be higher at the edges to compensate for edge effects; for this reason, the wires are wider at the edges. All the wires are submitted to the optimization. In order to understand such output shape, note that since the elements are placed in series along a single wire, they are submitted to the same electrical current along the wire. This means that a thinner element generate a higher thermal loss (Joule effect) along this wire. The fact that the elements are thicker at the middle means that the thermal losses are lowered at the middle.

However, the wires are placed in parallel, so that each wire is submitted to the same electrical potential. The corresponding thermal loss thus leads to a higher thermal loss for a globally thicker wire. All these considerations lead to a higher heat at the four edges and a lower heat at the center (to reduce the edge effects). The table in Sect. 2.1 summarizes all the physical parameter values of each material/part used in the simulation. The calculation of each individual output yields the temperature distribution over the entire cavity bottom. We have focused on temperature along the bottom surface of the cavity.

3 Experimental validation

3.1 Temperature measurement procedure

Let us now examine the experimental part, which is mandatory to validate the shape of the above resistor for deriving a constant temperature.

3.1.1 Calibration

Temperature is measured considering the sensitivity of Rhodamine B fluorescence to temperature. Indeed, the increase in temperature leads to a decrease in Rhodamine fluorescence (Ross et al. 2001), i.e., heat quenches the fluorescence. This dye offers the advantages of: simplicity, an extensive and accessible range of temperature measurements, fast response time, good spatial resolution, and great sensitivity.

Temperature is measured according to an optical technique (Ross et al. 2001; Mao et al. 2001). The cavity is filled with a solution of Rhodamine B diluted in DI water at a concentration of 0.1 mM, in which a carbonate buffer solution at pH 9.6 is diluted to 0.25 M. In order to calibrate the thermal response of Rhodamine B with temperature, the system is placed above an aluminum block using a thermal paste. Water at a preset temperature is able to flow into a helical pipe drilled into the block; such a configuration allows establishing the temperature of both the block and flow into the cavity. This flow is pumped in a closed circuit between a thermostat and the aluminum part. Presetting the water temperature entails heating the water in the thermostat (temperature is measured using a K-type thermocouple). Later on, the temperature is assumed to be constant for flow entering the aluminum block and into the cavity. On a microscope (the Olympus BX60), a set of filters allows for light excitation around 550 nm (close to the maximum Rhodamine B absorption) with a high-pass filter above 580 nm (Ross et al. 2001; Erickson et al. 2003; Mao et al. 2001). Images are stored using the NIH

technique via a COHU video camera and Scion Corporation's FG-3 Frame Grabber, which displays images with 256-grayscale intensity.

The procedure for calibrating thermal response is as follows: (1) Prior to each measurement, the cavity solution is updated. (2) The microscope diaphragm is below saturation. (3) An image is recorded at room temperature (22 °C). (4) The water assigned to aluminum block thermalization is warmed and the pump switched on; (5) Once the temperature of both the aluminum block and cavity has reached the steady state, the microscope light is turned on during image acquisition. and (6) The loop restarts from step (4) for subsequent data acquisition. Once the temperature range has been respected, warming is stopped and a final image taken at room temperature, i.e., 22 °C. Consequently, two "cold" images are included to allow verifying that Rhodamine B photobleaching is indeed negligible.

The resulting intensity is shown in Fig. 7 as a function of temperature (normalized by the intensity at 22 °C) for the two considered image regions, i.e., wires and slits. Each dot actually corresponds to an average of the intensity value over two 50 × 50-pixel regions recorded above either the resistor wires or the slits between them. A third-order polynomial fit leads to the two following relations: (i) for the region above the slits and between wires:

$$T = 54i^3 - 99i^2 - 66i + 132, \quad (5)$$

and ii) for the region above the wires:

$$T = 26i^3 - 13i^2 - 156i + 165, \quad (6)$$

where T is the temperature and i the fluorescence intensity normalized by its value at 22 °C. The intensity variation with temperature is reversible; this feature was verified during the calibration step (for new acquisition at 22 °C after all the measurements). The standard deviation extracted from the polynomial fit provides an estimate of temperature measurement accuracy, i.e., approximately 0.65 K for calibration from Eq. 5 and 0.3 K from Eq. 6.

Note that the illumination source has to be well characterized to make sure there are no bias on the measure. For example, Lavieille et al. (2001) propose a technique to measure temperature while droplets are moving and evaporating. For single phase liquids, Natrajan and Christensen (2009) proposed the use of two fluorophores; the fluorescent ratio of each fluorophore allows a high accuracy on the measure (± 0.2 K). In our system, in a single phase liquid with the use of a single fluorophore, the temperature accuracy is about ± 0.7 K by comparing two pictures: before and after heating.

We have identified three phenomena that could skew the calibration: (1) adsorption of Rhodamine B into the PDMS surface cavity; (2) top wall shrinkage under its own weight since the geometry is a Hele Shaw cell (i.e., displaying a high aspect ratio); and (3) deformation of PDMS under thermal stress. Concerning the first phenomenon, a series of measurements was carried out at a given power level, i.e., at a fixed temperature over various times, ranging up to a few hours, subsequent to initial cavity filling. It could be observed that the measured temperature was substantially constant, thereby leading to the conclusion that adsorption of Rhodamine B was negligible. In order to exclude bias from top wall shrinkage, we analyzed the deformation of a cavity $24 \times 1500 \times 2500 \mu\text{m}$ when loaded. We were actually able to show that temperature measurement is not biased by cavity deformations. It is indeed possible to measure cavity deformation as a function of loading (i.e., applied pressure) using Rhodamine B fluorescence. The light intensity ratio indicates the ratio of cavity heights before and after loading which then provides an estimate of the maximum deformation at the center of the cavity versus loading pressure. It is also possible to make such estimation by means of finite element calculation (using COMSOL 3.4) with a Young's modulus equal to 1.45 MPa and a Poisson's ratio of 0.45, as measured (for the Young's modulus) using elongation under tension for a PDMS RTV 615 test tube 5 mm in diameter with a curing agent ratio of 1:10. For these values, good agreement was found between the calculated and experimental data. It is thus possible to study cavity deformation under its own weight without loading, by use of the finite element method. Our experiments applied no pressure, and hence, the weight of the

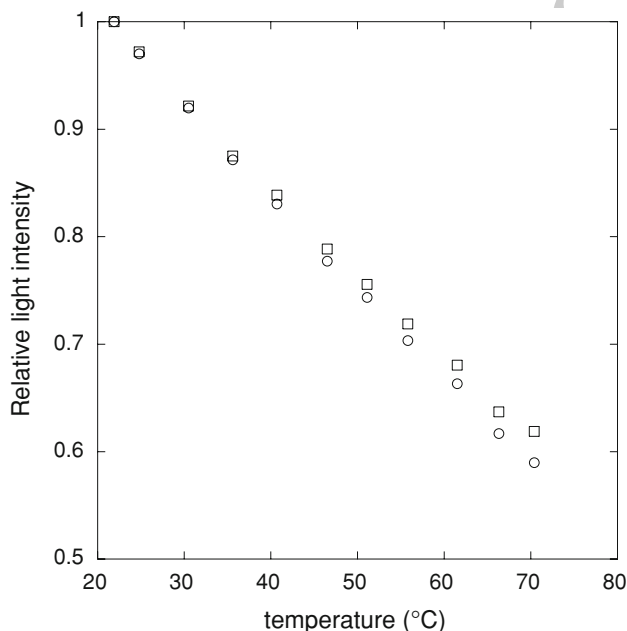


Fig. 7 Fluorescence intensity of Rhodamine B rescaled by light intensity, given at room temperature, vs. temperature—squares: over the wires, circles: over the slits

PDMS portion only deforms a fraction of a micrometer. Finally, regarding PDMS deformation under thermal stress, in the vertical (or z) direction, the deformation induced by temperature increase can be written as follows: $\delta L = \alpha e \delta T$, where α is the dilation coefficient of PDMS, e the cavity height, and δT a typical relative temperature recorded at the cavity extremities. Considering the following numerical values $\alpha = 10^{-5} \text{K}^{-1}$, $e = 25 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ and $\delta T = 40 \text{ K}$ leads to: $\delta L = 25 \times 4 \times 10 \times 10^{-6} \times 10^{-5} = 10^{-8} \text{ m}$. This very small value makes it possible to neglect such a phenomenon.

3.1.2 Experimental results

Using the previous calibration results, it is possible to measure the thermal response of the optimized resistor. Image processing calls for comparing two series of pictures, one taken before heating the other recorded after the transient stage when temperature is constant, i.e., after 10 s, with the asymptotic regime reached after $2.2 \pm 0.1 \text{ s}$ (see Fig. 8).

The solution is refreshed between each measurement as in the case of the calibration stage. Using the calibration given in Eqs. 5 and 6, the temperature profile is extracted from the light intensity image under the same experimental conditions as those described at the beginning of Sect. 3.1. These images are compared to the initial image before warming, which corresponds to a constant temperature of 22°C , thus yielding a relative temperature. Figure 9 depicts the distribution of temperature in two cases: Fig. 9a in the optimized case, and Fig. 9b in the case where the resistor is composed of eight parallel wires of a single constant width. For both cases, the mean temperature equals approximately 50°C . It should be pointed out that in the optimized case, the temperature is more homogeneous. Note that temperature is not calculated on the black lines indicated on the images since these lines correspond to the slit-wire connections. Removing the connecting zone

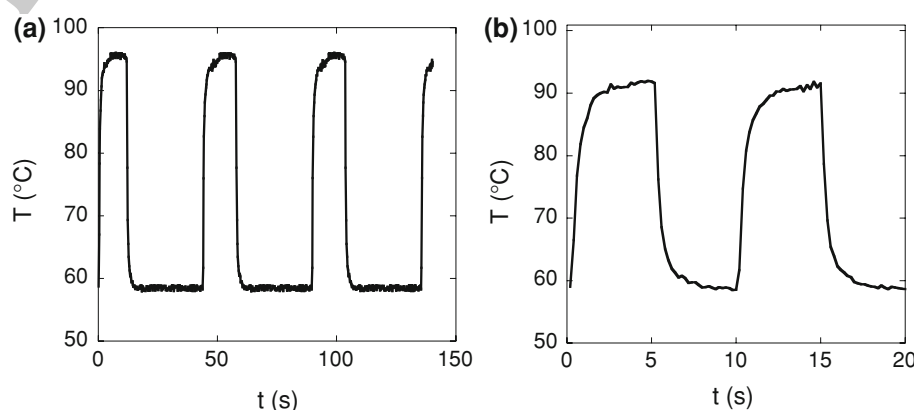
prevents artifacts from affecting measurements in this area. The images provide a high enough resolution so that removing the connecting part would not significantly degrade temperature distribution statistics. It is noteworthy from Fig. 9 that the spatial influence of the heating zone extends about $350 \mu\text{m}$ further on the heating zone. This is possible thanks to the aluminium block which temperature is set constant. This allows us to introduce a temperature pollution about $350 \mu\text{m}$ from the heating zone.

In order to quantify the benefit of this optimization exercise, the images are processed on each pixel to derive the probability density function (PDF) of temperature, $\mathcal{P}(T)$, as measured over the entire cavity. Figure 10 presents the PDF for both the optimized (corresponding to the geometry of 9a) and non-optimized cases (corresponding to the geometry of 9b). While the PDF in the non-optimized case indicates nearly an equal probability distribution within the $45\text{--}56^\circ \text{C}$ range, the optimized case is distinctly centered around its mean value, thereby underscoring the accuracy of our approach. In addition, the standard deviation is four times smaller in the optimized case than in the non-optimized, meaning greater temperature uniformity. The PDF standard deviation for the temperature profile given in the optimized case must be compared to that for the profile obtained while heating is turned off, i.e., the noise standard deviation. The noise contribution has been valued at 0.33 K , which is comparable to the standard deviation of the optimized distribution, i.e., 0.85 K .

The applied power supply ranges from 100 to 300 mW, revealing the potential to achieve uniform temperature with a relatively weak power supply. Furthermore, Fig. 11 shows that temperature, as a function of power supply, follows a linear trend, as would be expected.

For biological considerations, this system ensures that 82% of the surface area is heated at $37.5^\circ \text{C} \pm 0.6^\circ \text{C}$. Experimental results in the optimized system lead to a standard deviation, which rescaled by the mean temperature equals 0.04, i.e., twice the result output by the

Fig. 8 Experimental mean temperature vs. time for an acquisition frequency of 25 Hz. The transient state lasts approx. 2 s— **a** PCR temperature cycle with a period of 54 s and a duty cycle of approx. 0.27; **b** Cycle with a 10-s period



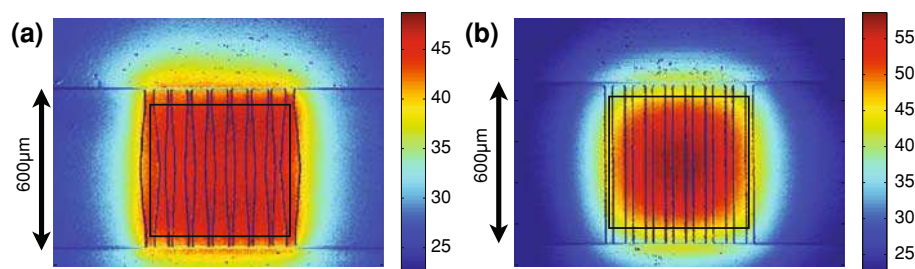


Fig. 9 **a** Experimental temperature distribution resulting from the optimized resistor, providing a mean temperature in the cavity of 49 °C; **b** Experimental temperature distribution in the non-optimized

case (i.e., with constant-width elements), for a mean temperature into the cavity of 51 °C

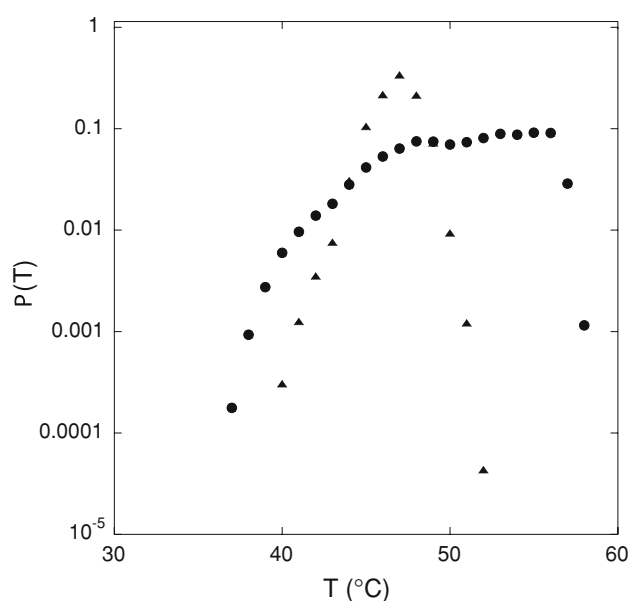


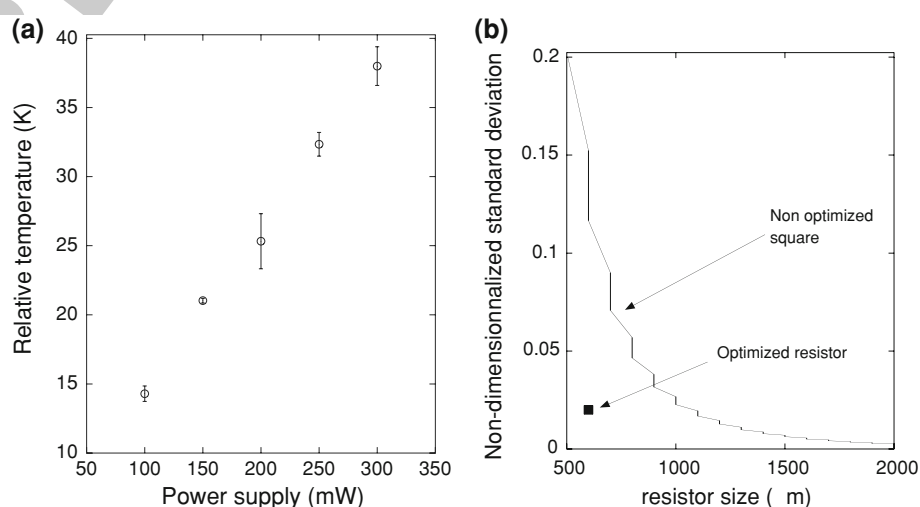
Fig. 10 Probability density function of temperature for the non-optimized, circles, and optimized resistors, triangles, (mean temperatures in the cavity equal 51 °C and 49 °C, respectively)

numerical simulation ($C = 0.02$). The noise distribution associated with this measurement may explain this discrepancy.

The transient experimental regime requires 2.2 ± 0.1 s to reach an asymptotic state, although 90% of the asymptotic value is reached within about 1 s, which is much faster than a Peltier heater. Moreover, thermal disturbance of the resistor on the system is negligible beyond a distance of 0.35 mm from the cavity edge.

Finally, we have shown that this experimental device offers potential applications for PCR by means of thermal cycling. The optimized thermal protocol for a PCR using the 480 Real-Time PCR System LightCycler (Roche Applied Science) begins with a denaturation step of 30 s at 55 °C followed by 40 cycles, with one cycle consisting of denaturation (10 s at 95 °C) and annealing/extension (30 s at 60 °C). Since the PCR stages are short, the duration of a PCR with a commercially available thermal cycler is limited by heating/cooling rates. Figure 8a displays the thermal response of the system corresponding to three cycles of a PCR with Rhodamine B. The transient state between the two states with constant temperature lasts 2.2 ± 0.1 s. As such, this device constitutes an efficient thermal control

Fig. 11 **a** Mean relative temperature (with respect to room temperature) in the cavity vs. power supply. **b** Root mean-square temperature for the optimized and non-optimized cases vs. resistor size



tool for performing a PCR for quantities in the range 0.1–10 nL, with these values lying below what a pipette would be capable of extracting. The lack of edge effects allows foreseeing integration onto a chip that combines two biological stages requiring independent thermal control, i.e., a thermal control and a thermal lysis coupled with reverse transcription.

4 Discussion on system performance

Within the context of temperature control in microfluidic cavities, this resistor design offers a major size reduction on the surface wafer. Moreover, ensuring in situ heating is much more convenient, compared to a system with external temperature control. Reducing heater size lowers the required heating power. We have measured the temperature rise in the aluminum block as a function of power supply, and Fig. 6 shows that this temperature increases linearly. For example, heating a cavity at 37 °C when room temperature equals 21 °C necessitates a power supply of just 126 mW. In order to minimize temperature increase on the wafer far from the heater location, an aluminum block is added to play the role of heat sink. A key element of this entire device is the aluminum block, which serves to maintain the temperature increase near the heating zone. Without this sink, temperature of the full wafer would be uniform, thus preventing the possibility of setting various temperatures on the same wafer.

Figure 11 illustrates dependence of the temperature standard deviation on the heated surface area, which has been rescaled by the mean temperature according to resistor size. The continuous curve presents such data in the case of heat generated by a square resistor, while the black dot indicates the result obtained by the optimization protocol. It is worth noting that a same rescaled standard deviation requires a resistor area 3.36 times larger in a non-optimized case; otherwise, a similar resistor size leads to a standard deviation ratio of roughly 8, and this improvement is significant.

Figure 8 exhibits temperature rise in the transient state and reveals that thermal accommodation time does not exceed 2.2 s. It should also be pointed out that this short transient state may prove very advantageous for applications requiring rapid temperature changes (e.g., PCR applications (Liao et al. 2005; Neuzil et al. 2006; Ke et al. 2006)).

5 Conclusion

We have developed an optimized resistor pattern for the purpose of achieving uniform temperature inside a

microfluidic cavity; this tool may offer potential benefits for both biological and chemical topics. This resistor pattern allows reducing heater size by a factor of four for the same thermal performance, in terms of temperature uniformity, and requires little power consumption. These two aspects are critical in promoting improved integration. The device proposed in this article has been optimized by considering the physical and geometrical parameters inputted. This method can obviously be adapted to any other problem that requires thermal uniformity as long as the corresponding parameters are included in the optimization procedure (number of wires, thermal conductivity of each part, geometrical properties, etc.). Considering the fact that the heater zone is roughly the size of the cavity, we can conclude that compaction occurs to a great extent. The advantages of this compaction are low energy consumption and smaller resistor surface area, two features that are critical to pursuing higher integration rates (i.e., integration of several resistors at different temperatures on the same system due to thermal pollution, which is negligible above 0.35 mm) as well as for portable purposes given that external thermalization is not compatible with miniaturization. Moreover, building such a system can ensure a short transient state and a relatively low power supply, the features that have advantageous potential in the case of a system requiring rapid temperature cycling at controlled temperatures (e.g., PCR applications).

Acknowledgments The authors wish to thank the SETE team from the SATIE laboratory for lending all the measurement equipment, and for the fruitful discussions held concerning genetic algorithms. The authors are also grateful to CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), and to Rennes Metropole for their financial support.

References

- de Mello AJ, Habgood M, Lancaster NL, Welton T, Wootton RCR (2004) Precise temperature control in microfluidic devices using Joule heating of ionic liquids. *Lab Chip* 5(4):417–419
- Deb K (2002) Multi-objective optimization using evolutionary algorithms. John Wiley and Sons LTD, ISBN 0-471-87339-X
- Deb K, Pratap A, Agarwal S, Meyarivan T (2002) A fast and elitist multiobjective Genetic algorithm: NSGAII. *IEEE Trans Evol Comput* 6:2
- Erickson D, Sinton D, Li D (2003) Joule heating and heat transfer in poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Lab Chip* 3:141–149
- Goulpeau J, Le Clerre D, Richard F, Talini L, Trouchet D, Tabeling P (2005) High-throughput real time measurements of DNA hybridization in a double layer PDMS microsystem. *Proc MicroTAS BOSTON, USA*
- Hsieh T-M, Luo C-H, Wang J-H, Lin J-L, Lien K-Y, Lee G-B (2009) A two-dimensional, self-compensated, microthermal cyclers for one-step reverse transcription polymerase chain reaction applications. *Microfluid Nanofluidics* 6:797–809
- Ke C, Kelleher A-M, Berney H, Sheehan M, Mathewson A (2006) Single step cell lysis/PCR detection of *Escherichia coli* in an

- 676 independently controllable silicon microreactor. *Sens Actuators*
677 *B Chem* 120:538–544
- 678 Lavieille P, Lemoine F, Lavergne G, Lebouché M (2001) Evaporating
679 and combusting droplet temperature measurements using two-
680 color laser-induced fluorescence. *Exp Fluids* 31:45–55
- 681 Liao C, Lee G, Liu H, Hsieh T, Luo C (2005) Miniature RT-PCR
682 system for diagnosis of RNA-based viruses. *Nucleic Acids Res*
683 33(18):e156
- 684 Mahjoob S, Vafai K, Beer NR (2008) Rapid microfluidic thermal
685 cyclers for polymerase chain reaction nucleic acid amplification.
686 *Int J Heat Mass Trans* 51(9–10):2109–2122
- 687 Mao H, Yang T, Cremer P, S (2001) A microfluidic device with a
688 linear temperature gradient for parallel and combinatorial
689 measurements. *J Am Chem Soc* 124(16):4432–4435
- Natrajan VK, Christensen KT (2009) Two-color laser-induced
690 fluorescent thermometry for microfluidic systems. *Meas Sci*
691 *Technol* 20:015401
- Neuzil P, Zhang C, Pipper J, Oh S, Zhuo L (2006) Ultra fast
692 miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes.
693 *Nucleic Acids Res* 34(11):e77
- Ross D, Gaitan M, Locascio LE (2001) Temperature measurement in
694 microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent
695 dye. *Anal Chem* 73:4117–4123
- Selva B, Marchalot J, Jullien M-C (2009) Optimized resistor pattern
696 for temperature gradient control in microfluidics. *J Micromech*
697 *Microeng* 19:065002
- Xia Y, Whitesides GM (1998) Soft lithography. *Annu Rev Mater Sci*
698 28:153–184
- 699
700
701
702
703
704

UNCORRECTED PROOF

Bibliographie

- [Anna 2003] S. L. Anna, N. Bontoux et H. A. Stone. *Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels*. Applied Physics Letters, vol. 82, no. 3, pages 364–366, 2003. [14](#)
- [B. T. Kelly 2007] V. Taly B. T. Kelly J-C. Baret et A. D. Griffiths. *Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets*. Chem. Comm., pages 1773 – 1788, 2007. [17](#)
- [Bancroft 1913] W. D. Bancroft. *Theory of emulsification*. Journal of Physical Chemistry, vol. 17, pages 501–519, 1913. [15](#)
- [Baroud 2007] Charles N. Baroud, Jean-Pierre Delville, François Gallaire et Régis Wunenburger. *Thermocapillary valve for droplet production and sorting*. Physical Review E, vol. 75, no. 4, page 046302, 2007. [16](#)
- [Bartolo 2008] D. Bartolo, G. Degre, P. Nghe et V. Studer. *Microfluidic stickers*. Lab on a Chip, vol. 8, no. 2, pages 274–279, 2008. [20](#), [108](#)
- [Beer 2008] N. R. Beer, E. K. Wheeler, L. Lee-Houghton, N. Watkins, S. Nasarabadi, N. Hebert, P. Leung, D. W. Arnold, C. G. Bailey et B. W. Colston. *On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets*. Analytical Chemistry, vol. 80, no. 6, pages 1854–1858, 2008. [9](#)
- [Beer 2009] Neil Reginald Beer, Klint Aaron Rose et Ian M. Kennedy. *Monodisperse droplet generation and rapid trapping for single molecule detection and reaction kinetics measurement*. Lab on a Chip, vol. 9, no. 6, pages 841 – 844, 2009. [16](#)
- [Bengtsson 2005] M. Bengtsson, A. Stahlberg, P. Rorsman et M. Kubista. *Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels*. Genome Research, vol. 15, no. 10, pages 1388–1392, 2005. [42](#)
- [Bontoux 2008] N. Bontoux, L. Dauphinot, T. Vitalis, V. Studer, Y. Chen, J. Rossier et M-C. Potier. *Integrating whole transcriptome assays on a lab-on-a-chip for single cell gene profiling*. Lab on a Chip, vol. 8, no. 3, pages 443–450, 2008. [10](#), [35](#)
- [Boukellal 2009] Hakim Boukellal, Seila Selimovic, Yanwei Jia, Galder Cristobal et Seth Fraden. *Simple, robust storage of drops and fluids in a microfluidic device*. Lab on a Chip, vol. 9, no. 2, pages 331–338, 2009. [17](#)
- [Brady 2000] G. Brady. *Expression profiling of single mammalian cells - small is beautiful*. YEAST, vol. 17, no. 3, pages 211–217, 2000. [4](#)
- [Bremond 2008] Nicolas Bremond, Abdou R. Thiam et Jérôme Bibette. *Decompressing Emulsion Droplets Favors Coalescence*. Physical Review Letters, vol. 100, no. 2, 2008. [15](#)
- [Breslauer D.N. 2006] Lee L.P. Breslauer D.N. Lee P.J. *Microfluidics-based systems biology*. Mol. Biosyst., vol. 2, no. 2, pages 97–112, 2006. [17](#)

- [Chabert 2007] Max Chabert. *Microfluidique de gouttes pour les analyses biologiques*. PhD thesis, Université Paris VI, 2007. 8
- [Chabert 2008] Max Chabert et Jean-Louis Viovy. *Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105, no. 9, pages 3191–3196, 2008. 16
- [Cho 2003] S. K. Cho, H. Moon et C. J. Kim. *Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits*. Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 12, no. 1, pages 70–80, 2003. 16
- [Choi 2005] Sungyoung Choi et Je-Kyun Park. *Microfluidic system for dielectrophoretic separation based on a trapezoidal electrode array*. Lab on a Chip, vol. 5, no. 10, pages 1161–1167, 2005. 16
- [Chomczynski 1987] P. Chomczynski et N. Sacchi. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, vol. 162, no. 1, pages 156–159, April 1987. 51, 69
- [Chomczynski 2006] P. Chomczynski et N. Sacchi. *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction : twenty-something years on*. Nature Protocols, vol. 1, no. 2, pages 581–585, 2006. 69
- [Clausell-Tormos 2008] Jenifer Clausell-Tormos, Diana Lieber, Jean-Christophe Baret, Abdeslam El-Harrak, Oliver J. Miller, Lucas Frenz, Joshua Blouwolff, Katherine J. Humphry, Sarah Köster, Honey Duan, Christian Holtze, David A. Weitz, Andrew D. Griffiths et Christoph A. Merten. *Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms*. Chemistry Biology, vol. 15, no. 5, pages 427–437, 2008. 40
- [de Mello 2001] A. J. de Mello. *DNA amplification : does small really mean efficient ?* Lab on a Chip, no. 1, pages 24–29, 2001. 8
- [Di Carlo 003] D Di Carlo, KH Jeong et LP Lee. *Reagentless mechanical cell lysis by nanoscale barbs in microchannels for sample preparation*. LAB ON A CHIP, vol. 3, no. 4, pages 287–291, 2003. 11
- [Dodge 2004] A. Dodge, G. Turcatti, I. Lawrence, N. F. de Rooij et E. Verpoorte. *A microfluidic platform using molecular beacon-based temperature calibration for thermal dehybridization of surface-bound DNA*. Analytical Chemistry, vol. 76, no. 6, pages 1778–1787, 2004. 28
- [Dreyfus 2003] R. Dreyfus, P. Tabeling et H. Willaime. *Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*. Phys. Rev. Lett., vol. 90, no. 14, page 144505, 2003. 13
- [Duffy 1998] D.C. Duffy, J. C. McDonald, O.J. A. Schueller et G.M. Whitesides. *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, vol. 70, no. 23, pages 4974–4984, 1998. 1
- [Edd 2008] J.F. Edd, D. Di Carlo, K.J. Humphry, S. Köster, D. Irimia, D.. Weitz et M. Toner. *Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops*. Lab on a chip, vol. 8, no. 8, page 1262, 2008. 40

- [Edd 2009] J. F. Edd, K. J. Humphry, D. Irimia, D. A. Weitz et M. Toner. *Nucleation and solidification in static arrays of monodisperse drops*. Lab on a Chip, pages –, 2009. 16, 21
- [Eggleton 2001] C.D. Eggleton, T-M. Tsai et K.J. Stebe. *Tip streaming from a drop in the presence of surfactants*. Phys. Rev. Lett., vol. 87, no. 4, page 048302, 2001. 42
- [El-Ali 2005] Jamil El-Ali, Suzanne Gaudet, Axel Gunther, Peter K. Sorger et Klavs F. Jensen. *Cell Stimulus and Lysis in a Microfluidic Device with Segmented Gas Liquid Flow*. Analytical Chemistry, vol. 77, no. 11, pages 3629–3636, 2005. 11
- [Fidalgo 2007] Luis M. Fidalgo, Chris Abell et Wilhelm T. S. Huck. *Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices*. Lab on a Chip, vol. 7, no. 8, pages 984–986, 2007. 15
- [Galas 2009] Jean-Christophe Galas, Denis Bartolo et Vincent Studer. *Active connectors for microfluidic drops on demand*. New Journal of Physics, vol. accepted, 2009. 22
- [Garstecki 2006] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone et G. M. Whitesides. *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up*. Lab on a Chip, vol. 6, no. 3, pages 437–446, 2006. 13
- [Goulpeau 2005] J. Goulpeau, D. Trouchet, A. Ajdari et P. Tabeling. *Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic micropumps*. Journal of Applied Physics, vol. 98, no. 4, page 044914, 2005. 22
- [Goulpeau 2008] J. Goulpeau. *Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluidique*. PhD thesis, Université Paris VI., 2008. 109
- [Hartshorn 2005] C. Hartshorn, A. Anshelevich et L. Wangh. *Rapid, single-tube method for quantitative preparation and analysis of RNA and DNA in samples as small as one cell*. BMC Biotechnology, vol. 5, no. 1, page 2, 2005. 5
- [He 2005] Mingyan He, J. Scott Edgar, Gavin D. M. Jeffries, Robert M. Lorenz, J. Patrick Shelby et Daniel T. Chiu. *Selective Encapsulation of Single Cells and Subcellular Organelles into Picoliter- and Femtoliter-Volume Droplets*. Analytical Chemistry, vol. 77, no. 6, pages 1539–1544, 2005. 12
- [Hestroni 1980] G. Hestroni. Handbook on multiphase flows. Clarendon Press, 1980. 12
- [Higuchi 1992] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh et R. Griffith. *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), vol. 10, no. 4, pages 413–417, April 1992. 30, 103
- [Hinkle 2003] D. A. Hinkle et J. H. Eberwine. *Single-cell molecular biology : implications for diagnosis and treatment of neurologic disease*. Biological Psychiatry, vol. 54, no. 4, pages 413 – 417, 2003. 5
- [Holland 1991] P M Holland, R D Abramson, R Watson et D H Gelfand. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 16, pages 7276–7280, 1991. 31

- [Huang 2007] Y. Huang, P. Castrataro, C-C. Lee et S. R. Quake. *Solvent resistant microfluidic DNA synthesizer*. *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 1, pages 24–26, 2007. 7, 20
- [Huebner 2009] A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. Demello, C. Abell et F. Hollfelder. *Static microdroplet arrays : a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays*. *Lab on a Chip*, vol. 9, pages 692–698, 2009. 16, 21
- [Jo 2000] B. H. Jo, L. M. Van Lerberghe, K. M. Motsegood et D. J. Beebe. *Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer*. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, vol. 9, no. 1, pages 76–81, 2000. 22
- [Kim 2009] H. Kim, S. Dixit, C. J. Green et G. W. Faris. *Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating*. *Opt. Express*, vol. 17, no. 1, pages 218–227, 2009. 9
- [Kiss 2008] M.M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N. R. Beer, J. Warner, C.G. Bailey, B.W. Colston, J.M. Rothberg, D.R. Link et J.H. Leamon. *High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets*. *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 23, pages 8975–8981, 2008. 8
- [Klein 2002] C. A. Klein, T. J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, N. H. Stoecklein et G. Riethmüller. *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. *Lancet*, vol. 360, no. 9334, pages 683–689, August 2002. 5
- [Koster 2008] Sarah Koster, Francesco E. Angile, Honey Duan, Jeremy J. Agresti, Anton Wintner, Christian Schmitz, Amy C. Rowat, Christoph A. Merten, Dario Pisignano, Andrew D. Griffiths et David A. Weitz. *Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells*. *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 7, pages 1110–1115, 2008. 41
- [Kralj 2009] Jason G. Kralj, Audrey Player, Hope Sedrick, Matthew S. Munson, David Petersen, Samuel P. Forry, Paul Meltzer, Ernest Kawasaki et Laurie E. Locascio. *T7-based linear amplification of low concentration mRNA samples using beads and microfluidics for global gene expression measurements*. *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 7, pages 917–924, 2009. 10, 11
- [Kricka 2003] L. J. Kricka et P. Wilding. *Microchip PCR*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, no. 5, pages 820–825, 2003. 8
- [Köster 2008] S. Köster, F.E. Angilè, H. Duan, J.J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A.C. Rowat, C.A. Merten, D. Pisignano, A.D. Griffiths et D.A. Weitz. *Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells*. *Lab Chip*, vol. 8, no. 7, pages 1110–5, 2008. 40
- [Leclerc 2004] Eric Leclerc, Yasuyuki Sakai et Teruo Fujii. *Microfluidic PDMS (Polydimethylsiloxane) Bioreactor for Large-Scale Culture of Hepatocytes*. *Biotechnology Progress*, vol. 20, no. 3, pages 750–755, 2004. 19

- [Lee 1999] Sang-Wook Lee et Yu-Chong Tai. *A micro cell lysis device*. Sensors and Actuators A : Physical, vol. 73, no. 1-2, pages 74 – 79, 1999. 11
- [Lee 2003] J. N. Lee, C. Park et G. M. Whitesides. *Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices*. Anal. Chem., vol. 75, no. 23, pages 6544–6554, 2003. 67
- [Levsky 2003] J. M. Levsky et R. H. Singer. *Gene expression and the myth of the average cell*. Trends in Cell Biology, vol. 13, no. 1, pages 4 – 6, 2003. 4
- [Li 1988] HH Li, UB Gyllensten, XF Cui, RK Saiki, HA Erlich et N Arnheim. *Amplification and analysis of DNA-sequences in single human-sperm and diploid-cells*. Nature, vol. 335, no. 6189, pages 414–417, 1988. 5
- [Li 2006] Liang Li, Debarshi Mustafi, Qiang Fu, Valentina Tereshko, Delai L. Chen, Joshua D. Tice et Rustem F. Ismagilov. *Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 103, no. 51, pages 19243–19248, 2006. 16
- [Link 2004] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz et H. A. Stone. *Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices*. Phys. Rev. Lett., vol. 92, no. 5, page 054503, Feb 2004. 16
- [Liss 2002] B. Liss. *Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells*. Nucl. Acids Res., vol. 30, no. 17, pages e89–, 2002. 5
- [Liu 2007] Kan Liu, Huijiang Ding, Yong Chen et Xing-Zhong Zhao. *Droplet-based synthetic method using microflow focusing and droplet fusion*. Microfluidics and Nanofluidics, vol. 3, no. 2, pages 239–243, 2007. 15
- [Livak 1995] K J Livak, S J Flood, J Marmaro, W Giusti et K Deetz. *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. Genome Research, vol. 4, no. 6, pages 357–362, 1995. 31
- [Lundberg 1991] K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge et E.J. Mathur. *High-fidelity amplification using a thermostable DNA-polymerase isolated from pyrococcus-furiosus*. Gene, vol. 108, no. 1, pages 1–6, 1991. 105
- [Makino 2003] S. Makino et H. Cheun. *Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores*. Journal of Microbiological Methods, vol. 53, no. 2, pages 141 – 147, 2003. 5
- [Manz 1990] A. Manz, N. Graber et H.M. Widmer. *Miniaturized total chemical analysis systems : a novel concept for chemical sensing*. Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 1, no. 1-6, pages 244 – 248, 1990. 1
- [Marcus 2006a] J. S. Marcus, W. F. Anderson et S. R. Quake. *Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics*. Analytical Chemistry, vol. 78, no. 3, pages 956–958, 2006. 19

- [Marcus 2006b] J.S. Marcus, W.F. Anderson et S.R. Quake. *Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis*. Analytical Chemistry, vol. 78, no. 9, pages 3084–3089, 2006. 9
- [McClain 2003] Maxine A. McClain, Christopher T. Culbertson, Stephen C. Jacobson, Nancy L. Allbritton, Christopher E. Sims et J. Michael Ramsey. *Microfluidic Devices for the High-Throughput Chemical Analysis of Cells*. Analytical Chemistry, vol. 75, no. 21, pages 5646–5655, 2003. 11
- [Ménétrier-Deremble 2006] Laure Ménétrier-Deremble et Patrick Tabeling. *Droplet breakup in microfluidic junctions of arbitrary angles*. Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics), vol. 74, no. 3, page 035303, 2006. 16
- [Morais 2004] Breno S. Morais et Marcelo B. Mansur. *Characterisation of the reactive test system $ZnSO_4/D2EHPA$ in *n*-heptane*. Hydrometallurgy, vol. 74, no. 1-2, pages 11 – 18, 2004. 65, 66
- [Mörters 2000] M. Mörters et H. J. Bart. *Fluorescence-indicated mass transfer in reactive extraction*. Chemical Engineering Technology, vol. 23, no. 4, pages 1–7, 2000. 66, 69
- [Mörters 2003] M. Mörters et H. J. Bart. *Mass transfer into droplets undergoing reactive extraction*. Chemical Engineering and Processing, vol. 42, no. 10, pages 801 – 809, 2003. 66
- [Mukhopadhyay 2007] R. Mukhopadhyay. *When PDMS isn't the best*. Analytical Chemistry, vol. 79, no. 9, pages 3248–3253, 2007. 19, 20
- [Nisisako 2002] T. Nisisako, T. Torii et T. Higuchi. *Droplet formation in a microchannel network*. Lab on a chip, vol. 2, pages 24–26, 2002. 13
- [Northrup 1993] Ching M.T. White R.M. Watson R.T. Northrup M.A. *DNA amplification in a microfabricated reaction chamber*. Transducer'93, seventh international conference on solid state sens actuators, Yokohama, Japan, pages 924–926, 1993. 8
- [Ohshima 2006] Norio Ohshima. *Engineering approaches to the microcirculation studies*. Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol. 34, no. 1, pages 27 –34, 2006. 66
- [Ong 2002] Yong-Lee Ong et Alexandra Irvine. *Quantitative real-time PCR : a critique of method and practical considerations*. Hematology, vol. 7, no. 1, pages 59–67, 2002. 103
- [Pannacci 2008] Nicolas Pannacci, Henrik Bruus, Denis Bartolo, Isabelle Etchart, Thibaut Lockhart, Yves Hennequin, Herve Willaime et Patrick Tabeling. *Equilibrium and Nonequilibrium States in Microfluidic Double Emulsions*. Physical Review Letters, vol. 101, no. 16, pages 164502–164506, 2008. 73
- [Paulsson 2004] J. Paulsson. *Summing up the noise in gene networks*. Nature, no. 427, pages 415–418, 2004. 4
- [Prakash 2006] A. Ranjit Prakash, S. Adamia, V. Sieben, P. Pilarski, L.M. Pilarski et C.J. Backhouse. *Small volume PCR in PDMS biochips with integrated fluid control and*

- vapour barrier*. Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 113, no. 1, pages 398 – 409, 2006. 20
- [Rolland 2004] J. P. Rolland, E. C. Hagberg, G. M. Denison, K. R. Carter et J. M. De Simone. *High-resolution soft lithography : enabling materials for nanotechnologies*. Angewandte Chemie International Edition, vol. 43, no. 43, pages 5796–5799, 2004. 20
- [Roper 2007] M. G. Roper, C. J. Easley, L. A. Legendre, J. A. C. Humphrey et J. P. Landers. *Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips*. Analytical Chemistry, vol. 79, no. 4, pages 1294–1300, 2007. 9, 28
- [Saiki 1985] R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich et N. Arnheim. *Ezymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia*. Science, vol. 230, no. 4732, pages 1350–1354, 1985. 105
- [Schmitz 2009] Christian H. J. Schmitz, Amy C. Rowat, Sarah Koster et David A. Weitz. *Drospots : a picoliter array in a microfluidic device*. Lab on a Chip, vol. 9, no. 1, pages 44–49, 2009. 16, 17
- [Shim 2007] J-U. Shim, G. Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, Y. Jia, K. Piattelli et S. Fraden. *Control and measurement of the phase behavior of aqueous solutions using microfluidics*. Journal of the American Chemical Society, vol. 129, no. 28, pages 8825–8835, 2007. 16, 19, 21
- [Silvy 2006] M. Silvy, G. Pic, J. Gabert et C. Picard. *Improvement of gene expression analysis by RQ-PCR technology : addition of BSA*. Leukemia, vol. 18, no. 5, pages 1022–1025, 2006. 36
- [Singh 2007] Pushpendra Singh et Nadine Aubry. *Transport and deformation of droplets in a microdevice using dielectrophoresis*. Electrophoresis, vol. 28, no. 4, pages 644–657, 2007. 15
- [Song 1995] L. Song, E.J. Hennink, I.T. Young et H.J. Tanke. *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. Biophysical Journal, vol. 68, no. 6, pages 2588–2600, 1995. 36
- [Song 2003] H. Song, J. D. Tice et R. F. Ismagilov. *A microfluidic system for controlling reaction networks in time*. Angewandte Chemie International Edition, vol. 42, no. 7, pages 768–772, 2003. 16
- [Stahlberg 2004] A. Stahlberg, J. Hakansson, X. Xian, H. Semb et M. Kubista. *Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification*. Clin Chem, vol. 50, no. 3, pages 509–515, 2004. 35
- [Studer 2004] V. Studer, G. Hang, A. Pandolfi, M. Ortiz, W. F. Anderson et S. R. Quake. *Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve*. Journal of Applied Physics, vol. 95, no. 1, pages 393–398, 2004. 22
- [Tabeling 2003] P. Tabeling. Introduction à la microfluidique. Belin, 2003.

- [Taniguchi 2009] Kiyomi Taniguchi, Tomoharu Kajiyama et Hideki Kambara. *Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR*. Nature Methods, vol. 75, no. 6, pages 503–509, 2009. 5, 6
- [Thorsen 2001] T. Thorsen, R.W. Roberts, F. H. Arnold et S. R. Quake. *Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device*. Phys. Rev. Lett., vol. 86, no. 18, pages 4163–4166, 2001. 13
- [Ting 2006] Teck Hui Ting, Yit Fatt Yap, Nam-Trung Nguyen, Teck Neng Wong, John Chee Kiong Chai et Levent Yobas. *Thermally mediated breakup of drops in microchannels*. Applied Physics Letters, vol. 89, no. 23, page 234101, 2006. 16
- [Tse 2003] C. Tse et J. Capeau. *Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel*. Annale de Biologie Clinique, vol. 61, pages 279–293, 2003. 32, 34
- [Tyagi 1996] S. Tyagi et F. R. Kramer. *Molecular Beacons : Probes that Fluoresce upon Hybridization*. Nature Biotechnology, vol. 14, no. 3, pages 303–308, 1996. 31
- [Unger 2000] M. A. Unger, H-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer et S. R. Quake. *Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*. Science, vol. 288, no. 5463, pages 113–116, 2000. 22
- [Utada 2007] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone et D. A. Weitz. *Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams*. Phys. Rev. Lett., vol. 99, no. 9, page 094502, 2007. 14
- [Wang 2006] W. Wang, H.B. Wang, Z.X. Li et Z.Y. Guo. *Silicon inhibition effects on the polymerase chain reaction : a real-time detection approach*. J Biomed Mater Res A, vol. 77, no. 1, pages 28–34, 2006. 15, 36
- [Warren 2008] L. A. Warren. *Single-cell gene-expression analysis by quantitative RT-PCR*. PhD thesis, California Institute of Technology Pasadena, California, 2008. 42
- [Whitesides 2006] G. M. Whitesides. *The origin and the future of microfluidics*. Nature, vol. 442, no. 7101, pages 368–373, 2006. 1
- [Williams 2006] R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik et A. D. Griffiths. *Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR*. Nature Methods, vol. 3, no. 7, pages 545–550, 2006. 35, 36
- [Yager 2006] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, T. Kjel, M. R. Tam et B. H. Weigl. *Microfluidic diagnostic technologies for global public health*. Nature, vol. 442, pages 412–418, 2006. 17
- [Yamamoto 2002] T. Yamamoto, T. Fujii et T. Nojima. *PDMS/glass hybrid microreactor array with embedded temperature control device. Application to cell-free protein synthesis*. Lab on a Chip, vol. 2, pages 197 – 202, 2002. 28
- [Yan 2002] L. Yan, G. Kaczorowski et M. Kohler. *One-tube protocol for single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Analytical Biochemistry, vol. 304, no. 2, pages 267 – 270, 2002. 35

-
- [Zhang 2006] C. Zhang, J. Xu, W. Ma et W. Zheng. *PCR microfluidic devices for DNA amplification*. Biotechnology advances, vol. 24, no. 3, pages 243–284, 2006. [8](#)

Liste des abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ARNt : acide ribonucléique de transfert

BET : bromure d'éthidium

Ct : cycle seuil d'une courbe de PCR temps réel ; le CT est un paramètre de quantification de l'expression des gènes.

D₂EHPA : acide di(éthyl-2 hexyl) phosphorique

dNTP : désoxyribonucléotide

FRET : de l'anglais *Fluorescence Resonance Energy Transfer* soit littéralement, transfert résonant d'énergie de fluorescence

NOA : colle photoréticulable fabriquée par Norland

PBS : tampon phosphate salin. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate trisodique et du phosphate de potassium.

PCRq : réaction de polymérisation en chaîne quantitative

TS-PCR : réaction de polymérisation en chaîne dite "template switching". Les ADNc (synthétisés à partir des ARNm de la cellule) sont amplifiés globalement à l'aide d'une unique amorce de PCR, dont la séquence ne possède pas de complémentaire dans le génome.

PDMS : polydiméthylsiloxane

ppm : partie par million. Au sens large, une ppm correspond à milligramme par litre.

RT : transcription inverse

SG : intercalant fluorescent *sybr green*

UV : ultraviolet

Résumé : La génération contrôlée et à haut débit de gouttes de volume caractéristique un nanolitre dans des canaux microfluidiques permet le suivi simultané de réactions dans des centaines de microréacteurs. En particulier, l'encapsulation d'une cellule par goutte ouvre la voie de l'étude de populations hétérogènes d'organismes biologiques au niveau de la cellule unique.

Cette thèse décrit, dans une première partie, le développement d'un microsystème dédié à la mesure haut débit de l'expression de gènes d'intérêt de cellules individuelles isolées dans des gouttes, par la méthode de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne en temps réel.

Dans une deuxième partie, la technologie de gouttes est mise à profit pour une étude fondamentale originale des transferts de masse entre une phase dispersée et une phase porteuse. Nous illustrons ce chapitre par deux applications de l'extraction liquide-liquide dans des microgouttes : la première concerne l'extraction du zinc sous forme ionique, la deuxième présente les premières étapes de la purification de l'ARN.

Enfin, la dernière partie constitue une ouverture sur les applications potentielles de la génération d'émulsions micrométriques complexes pour la vectorisation de médicaments ou de vaccins par phagocytose.

Mots clés : microfluidique, gouttes, transcription inverse, PCR temps réel, cellules, extraction liquide-liquide, phagocytose.

Abstract : High-throughput generation of nanoliter-sized droplets in microfluidic channels enables simultaneous monitoring of hundreds of reactions. Encapsulation of a single cell in these droplets opens the way to a better understanding of the heterogeneity present in biological organisms.

This thesis first describes the development of a novel microfluidic technology dedicated to a high-throughput gene expression measurement of individual cells isolated in droplets and aims at refining the method of reverse transcription followed by a real-time polymerase chain reaction.

In the second part, the droplet technology is used to study mass transfers between the dispersed and the continuous phase, illustrated by two applications of liquid-liquid extraction : one concerning the extraction of zinc, the other dealing with the purification of RNA in a cell.

The last part is an introduction to a possible vectorization of active substances by means of phagocytosis using complex micrometer-sized emulsions generated in microsystems.

Keywords : microfluidics, droplets, reverse transcription, real time PCR, liquid-liquid extraction, phagocytosis.
