



Pervaporation microfluidique pour le criblage et mesures de concentration in situ

Annick Marin

► To cite this version:

Annick Marin. Pervaporation microfluidique pour le criblage et mesures de concentration in situ. Dynamique des Fluides [physics.flu-dyn]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . pastel-00555545

HAL Id: pastel-00555545

<https://pastel.hal.science/pastel-00555545>

Submitted on 13 Jan 2011

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.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physique

Présentée par Annick MARIN MOUMEN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Pervaporation microfluidique pour le criblage et mesures de concentration *in situ*

Soutenue le 1^{er} octobre 2009

Composition du jury :

Mme Valérie CABUIL	Examineur
Mme Annie COLIN	Examineur
Mme Anne-Marie GUE	Rapporteur
M. Patrick MAESTRO	Invité
M. Philippe RENAUD	Rapporteur
M. Patrick TABELING	Directeur de thèse
Mme Annie VIALLAT	Examineur

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not Eureka! (I found it!) but 'That's funny...'

Isaac Asimov

Remerciements

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Valérie Cabuil, Annie Colin, Martin Gijs, Anne-Marie Gué, Philippe Renaud et Annie Viallat qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Je tiens également à remercier mes deux directeurs de thèses, Patrick Tabeling et Mathieu Joanicot, qui m'ont fait confiance et m'ont entouré de leurs conseils tout au long de ces recherches.

Mes pensées vont ensuite au LOF et à Rhodia, le soutien industriel de ce travail : à Patrick Maestro qui en a repris la direction il y a environ un an, suite au départ de Mathieu Joanicot, ainsi qu'à Jacques, Jean-Baptiste et Patrick pour leurs explications, leurs conseils avisés et leurs "coups d'œil" d'experts sur mes expériences.

Aux membres du MMN, passés et présents, pour tous les cafés partagés, les rires et les discussions scientifiques : Jacques, Laure, Guillaume, Philippe, Nicolas, Denis, Pascaline, Yves, Boris, Marc, Florent, Emmanuel, Rafaële, Avin, Caroline, Fabrice et Hervé.

Je remercie aussi Samson Edmond et Elisabeth Dufour-Gergam (IEF, Université Paris Sud) pour l'aide apportée lors de la microfabrication par lithographie dure ainsi que Anita Lewit-Bentley (BSAI, Institut Pasteur de Paris) pour ses conseils indispensables sur les problématiques de cristallisation de protéines.

Enfin, à Mejdi, sans qui ces années parisiennes n'auraient pas été les mêmes.

Table des matières

LA MICROFLUIDIQUE ET LE CRIBLAGE.....	9
1.1. GÉNÉRALITÉS	9
1.2. QUELQUES NOTIONS UTILES DANS LE CADRE DE CETTE THÈSE SUR LA MICROFLUIDIQUE.....	10
1.2.1. <i>L'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds</i>	11
1.2.2. <i>Le transport des fluides</i>	11
1.3. CRIBLAGE DANS DES MICROCHAMBRES	12
1.3.1. <i>Les microvannes intégrées</i>	12
1.3.2. <i>Le multiplexeur</i>	13
1.3.3. <i>Un exemple de criblage microfluidique : la cristallisation de protéines</i>	14
1.4. CRIBLAGE DANS DES GOUTTES	19
1.4.1. <i>La microfluidique digitale appliquée au criblage</i>	19
1.4.2. <i>Les systèmes de criblage mis en œuvre par la microfluidique digitale</i>	20
1.5. CRIBLAGE PAR PERVAPORATION	23
1.5.1. <i>Principe de la pervaporation</i>	23
1.5.2. <i>La pervaporation microfluidique</i>	27
1.5.3. <i>Le criblage dans des doigts</i>	28
1.5.4. <i>Le criblage couplant gouttes et pervaporation</i>	31
1.6. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE.....	33
LE SYSTÈME EXPÉRIMENTAL.....	35
2.1. CONCEPTION D'UN OUTIL DE CRIBLAGE MICROFLUIDIQUE.....	35
2.1.1. <i>La formation de gradients de concentration dans les microsystèmes</i>	36
2.2. LE DIMENSIONNEMENT DU SYSTÈME DE CRIBLAGE	40
2.2.1. <i>Définition de la hauteur des canaux de travail</i>	40
2.2.2. <i>Définition de la membrane</i>	40
2.2.3. <i>Caractérisation des chambres de pervaporation</i>	41
2.2.4. <i>Dimensionnement des vannes étanches</i>	43
2.2.5. <i>Le réseau de formation du gradient</i>	44
2.2.6. <i>Conception du microsystème de criblage</i>	45
2.3. LA MICROFABRICATION	46
2.3.1. <i>Les méthodes de fabrications employées lors de cette thèse</i>	46
2.3.2. <i>Les procédés de lithographie douce</i>	46
2.3.3. <i>Le protocole de gravure humide sur silicium</i>	51
2.3.4. <i>Le moulage du PDMS</i>	52
2.4. PROTOCOLE D'UNE EXPÉRIENCE DE CRIBLAGE PAR PERVAPORATION	54
2.4.1. <i>Le remplissage du microsystème</i>	54
2.4.2. <i>Le démarrage de la pervaporation</i>	55
2.5. EXPÉRIENCES DE CARACTÉRISATION	55
2.5.1. <i>Caractérisation des états de surface des parois des canaux</i>	55

2.5.2.	Mesure de la vitesse de pervaporation et validation du microsysteme	57
LE RÉFRACTOMÈTRE INTÉGRÉ		59
3.1.	INTRODUCTION	59
3.2.	LES MÉTHODES DE MESURE DE CONCENTRATION DANS DES MICROSYSTÈMES	59
3.2.1.	Mesure de la concentration à l'aide de traceurs fluorescents en solution.....	59
3.2.2.	Mesure de la concentration d'une solution dans un capillaire par réfractométrie.....	60
3.2.3.	Estimation de la concentration dans un microcanal par diffraction d'un laser	61
3.2.4.	Système de mesure de la concentration à l'aide d'une puce MEMS.....	62
3.3.	MESURES DE LA CONCENTRATION <i>IN SITU</i> EN TEMPS RÉEL : LE PRINCIPE DU RÉFRACTOMÈTRE INTÉGRÉ	63
3.4.	MODÈLE THÉORIQUE SIMPLIFIÉ DU RÉFRACTOMÈTRE INTÉGRÉ.....	65
3.5.	LES INSTRUMENTS OPTIQUES DE VISUALISATION UTILISÉS	67
3.5.1.	La loupe binoculaire	67
3.5.2.	Le microscope.....	69
3.5.3.	Le macroscopie	70
3.5.4.	Résumé des caractéristiques des appareils.....	71
3.6.	MODÉLISATION NUMÉRIQUE DU RÉFRACTOMÈTRE INTÉGRÉ.....	71
3.6.1.	Description du programme de modélisation numérique	71
3.6.2.	Variation de contraste simulé pour une loupe binoculaire	74
3.6.3.	Variation de contraste simulé pour un microscope ou un macroscopie	74
3.7.	MESURE PRATIQUE DU CONTRASTE DES IMAGES OBSERVÉES	75
3.8.	EVALUATION DE LA CONCENTRATION D'UNE SOLUTION À PARTIR D'UNE MESURE DE CONTRASTE.....	77
3.9.	COMPARAISON ENTRE LA THÉORIE, LA MODÉLISATION NUMÉRIQUE ET L'EXPÉRIENCE	78
3.9.1.	Expériences effectuées sur un canal à parois obliques avec différents instruments optiques	78
3.9.2.	Etude de la forme des parois d'un canal sur le signal de réfractométrie.....	79
3.10.	UNE APPLICATION DU RÉFRACTOMÈTRE : MESURE DU MÉLANGE ET DE LA DIFFUSION DANS UN CANAL TRAPÉZOÏDAL.....	80
3.10.1.	Mélange de glycérol avec de l'eau.....	80
3.11.	CONCLUSION	82
APPLICATIONS AU CRIBLAGE DE DIFFÉRENTS SYSTÈMES		83
4.1.	ETUDES DE SURSATURATION DE SOLUTIONS IONIQUES.....	83
4.1.1.	Expériences avec une solution binaire : NaCl et H ₂ O.....	83
4.1.2.	Sursaturation et vitesse de pervaporation.....	86
4.1.3.	Diagramme de phase d'une solution ternaire : NaCl, NH ₄ Br et H ₂ O.....	87
4.2.	ETUDES DE FLUIDES COMPLEXES.....	89
4.2.1.	Solution ternaire composée d'un polymère et un sel : PEG ₂₀₀ , PEG ₃₃₅₀ , (NH ₄) ₂ SO ₄ et H ₂ O.....	89
4.2.2.	Etudes d'une solution binaire avec un surfactant : AOT et H ₂ O.....	92
4.3.	LE CRIBLAGE DE PROTÉINES	94
4.4.	CONCLUSION	97
CONCLUSION		99
ANNEXES		101
AI.	DONNÉES NUMÉRIQUES POUR LA LOUPE BINOCULAIRE	101
AII.	DONNÉES NUMÉRIQUES POUR LE MACROSCOPE	102
AIII.	MODÉLISATION NUMÉRIQUE : CODE SOURCE MATLAB.....	103
AIV.	LECTURE D'UN DIAGRAMME DE PHASE TERNAIRE.....	107
BIBLIOGRAPHIE		108

Chapitre 1

La microfluidique et le criblage

1.1. Généralités

Le développement des microsystèmes fluidiques ces dernières années, avec leurs capacités d'intégration, de contrôle, de réduction des volumes consommés et d'accélération des mélanges ont apporté de réelles contributions dans le domaine du criblage et plus particulièrement des macromolécules biologiques comme les protéines, de la formulation de microvannes en polymère ou d'émulsions de taille contrôlée [1-3].

Le criblage est une méthode d'investigation mettant en jeu des milliers d'échantillons et autant de processus physico-chimiques visant à découvrir une molécule ou optimiser un processus. Elle est un enjeu industriel dans des domaines aussi divers que la fabrication de produits cosmétiques, médicaments, peintures ou matières plastiques. Nous pouvons citer comme exemple : la détermination des conditions favorables de cristallisation. Afin de réaliser cette caractérisation, un grand nombre d'essais sur des paramètres comme la température, la concentration des composants, la cinétique, le pH ou le temps est nécessaire. Cependant, avec des méthodes conventionnelles, une étude de diagramme de phase est une opération relativement longue (généralement plusieurs mois) et demande, pour des méthodes dites classiques comme le microbatch, la diffusion en phase vapeur ou la dialyse une grande consommation de produits [4, 5]. Ces trois techniques sont présentées à la figure 1.1. Même si à l'heure actuelle le criblage peut être robotisé, la méthode reste néanmoins extrêmement coûteuse. En outre, le multi-pipetage d'un robot augmente les risques de contamination d'un test à l'autre [6].

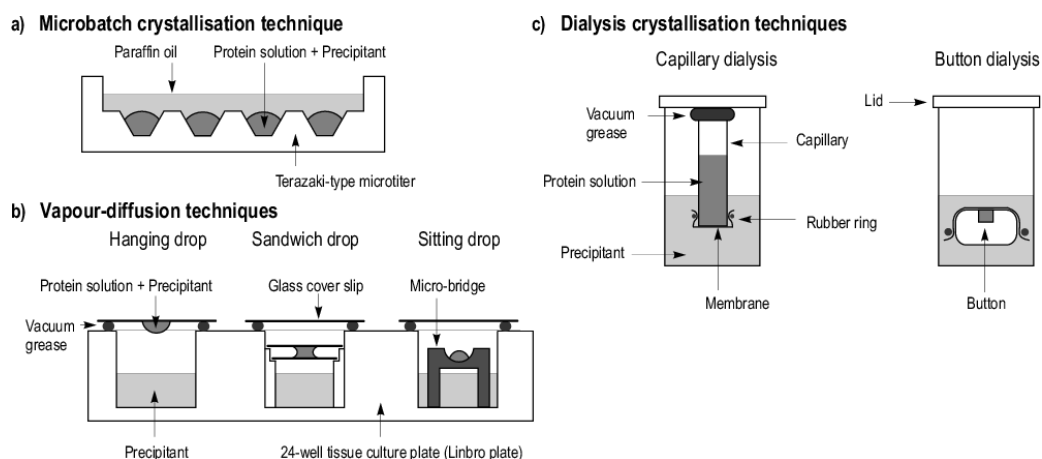


FIG 1.1 – Schémas des techniques classiques de cristallisation d'après [7]. (a) Par microbatch. (b) Par diffusion en phase vapeur. (c) Par dialyse.

En opérant dans des microcanaux, il est possible de réduire les volumes de produits utilisés de deux ordres de grandeur. Il est alors possible d'augmenter le nombre de tests effectués sur un même système, tout en consommant une quantité réduite de réactifs. De plus, les temps de mélange sont plus faibles que dans les systèmes traditionnels, du fait de la diminution du temps de diffusion résultant de la réduction de taille du système. Cela conduit, si les cinétiques en jeu ne sont pas trop lentes, à une réduction importante du temps de réponse du système d'analyse microfluidique.

Actuellement, il existe deux grandes approches basées sur la technologie microfluidique : le criblage dans des microchambres ou le criblage dans des microgouttes. Elles impliquent une architecture souvent sophistiquée du microsystème ; elles possèdent chacune leurs avantages et leurs inconvénients selon les molécules ou matériaux à cribler [8, 9].

Dans le cadre de cette introduction, nous rappelons ici quelques notions sur la microfluidique et les techniques de fabrication.

1.2. Quelques notions utiles dans le cadre de cette thèse sur la microfluidique

La microfluidique est une science relativement récente dont l'engouement est allé crescendo ces quinze dernières années. Elle s'intéresse aux écoulements de fluides à petite échelle (typiquement inférieure à 300µm) et généralement en petites quantités (de 10^{-9} à 10^{-18} L). Cette définition n'est aujourd'hui pas suffisante pour exprimer toute la diversité de la microfluidique. Autant science que technologie, elle englobe l'étude des phénomènes à l'échelle micrométrique et le développement de nouvelles méthodes de microfabrication ou de systèmes d'analyse pour la biologie ou la chimie. On peut d'ailleurs citer ici quelques innovations liées à la microfluidique comme les têtes d'imprimantes à jet d'encre, les refroidisseurs des microprocesseurs ou les puces pour analyse d'enzymes ou d'ADN [10].

1.2.1. L'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds

Les écoulements dans les conduites utilisées en microfluidique sont caractérisés par des petites dimensions et des vitesses faibles. A ces échelles, les effets de viscosité deviennent prépondérants sur les effets inertiels. On quantifie cette situation en introduisant le nombre de Reynolds.

$$Re = \frac{\text{Forces d'inertie}}{\text{Forces de viscosité}} = \frac{\rho U l}{\mu} \quad (1.1)$$

U et l représentent la vitesse et la longueur typique de l'écoulement, ρ et μ sont respectivement la masse volumique et la viscosité du fluide. Ce nombre adimensionnel est petit dans les microsystèmes fluidiques (de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-4}). On se trouve alors dans un régime d'écoulement laminaire et l'équilibre entre les forces de frottement visqueux et le gradient de pression va déterminer le profil d'écoulement. Dans ce cadre, l'équation de Navier-Stokes pour un fluide newtonien incompressible est de la forme :

$$-\vec{\nabla} p + \mu \Delta \vec{u} + \vec{f}_v = 0 \quad (1.2)$$

Avec $\vec{f}_v$ les forces appliquées au fluide en volume. Pour des géométries simples comme un canal rectangulaire à fort rapport d'aspect (la hauteur h beaucoup plus petite que la largeur w) et en négligeant les effets de bords, le profil de vitesse est parabolique et dépend du gradient de pression ($\frac{\partial p}{\partial x}$) le long du canal.

$$v_x(y) = -y(y-h) \frac{1}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (1.3)$$

Avec x la coordonnée le long du gradient de pression et y la coordonnée parallèle à la hauteur h . Le débit s'écrit alors :

$$Q = -\frac{h^3 w}{12\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (1.4)$$

En microfluidique, du fait que les écoulements sont dominés par les forces visqueuses, il n'y a pas de phénomènes turbulents. Cela peut parfois poser des problèmes ou au contraire être un atout [11].

1.2.2. Le transport des fluides

Le nombre de Péclet, autre nombre sans dimension, permet de rendre compte de l'importance des phénomènes d'advection par rapport aux phénomènes de diffusion.

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

Avec U la vitesse du fluide et D son coefficient de diffusion. Ce nombre vaut en pratique entre 0.1 et 100. Le coefficient de diffusion d'une molécule de rayon R peut être estimé à 30% près par la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi R\mu} \quad (1.6)$$

Pour le cas du canal de la figure 1.2, on montre que le temps de mélange τ des deux fluides circulant côte à côte vaut :

$$\tau = \frac{h^2}{4D} \quad (1.7)$$

La longueur minimum de mélange l_d pour un fluide est définie par :

$$l_d = \tau U \quad (1.8)$$

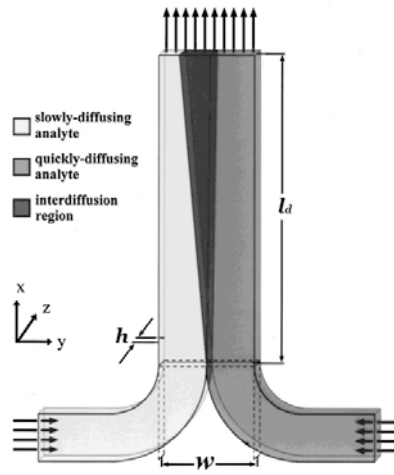


FIG 1.2 – Jonction en T de deux canaux d'après [12]. La longueur de mélange de chaque espèce dépend de son coefficient de diffusion et de la vitesse du fluide dans le canal.

Très concrètement, ces relations permettent de déterminer les longueurs de canaux nécessaires pour le mélange de deux fluides, une information importante comme nous le verrons par la suite.

1.3. Criblage dans des microchambres

Réaliser une expérience de criblage signifie remplir chaque chambre avec des concentrations variées et contrôlées de solutions. Cela exige un réseau de canaux d'alimentation dont la complexité est à la hauteur du nombre de microchambres. Afin de paralléliser et de réduire au maximum le nombre de canaux, quelques avancées technologiques ont été nécessaires (microvannes intégrées et multiplexeur). La contribution du groupe de Stephen Quake de l'Université de Stanford est d'avoir résolu les structures tridimensionnelles de certaines protéines que les méthodes classiques ne parvenaient pas à cristalliser [13].

1.3.1. Les microvannes intégrées

Une méthode pour réaliser une vanne dans un microsystème est d'exploiter la flexibilité d'un matériau comme le PDMS (module de Young environ 1MPa). Le principe, présenté figure 1.3, est le suivant : deux microcanaux se croisent à deux niveaux différents et sont séparés par une fine

membrane de quelques dizaines de microns d'épaisseur. Le premier canal est celui d'actionnement. En augmentant suffisamment la pression, la membrane souple défléchit et vient obstruer le second canal fluïdique et ainsi bloquer les flux qui y circulent [14].

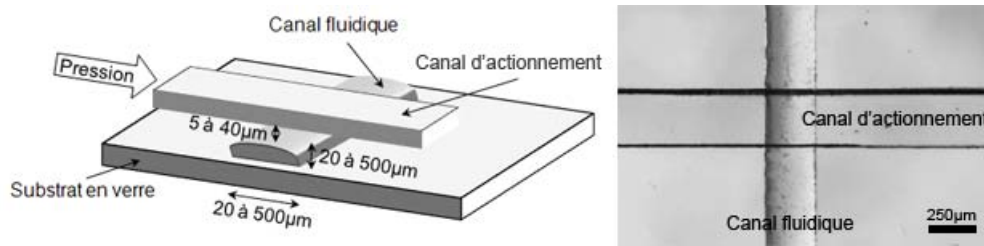


FIG 1.3 – Schéma et photo d'une vanne intégrée. Lorsque le canal d'actionnement est mis sous pression (typiquement 1bar), la membrane au croisement des deux canaux se déforme et vient pincer le canal fluïdique de travail. Sur la photo, la membrane a une surface de $250 \times 250 \mu\text{m}$ pour une épaisseur de $40 \mu\text{m}$ et ferme un canal de $30 \mu\text{m}$ de haut.

Pour réaliser une vanne étanche, il est indispensable que le canal fluïdique soit arrondi à l'endroit de la vanne et présente une surface de membrane suffisamment conséquente (parfois la largeur du canal fluïdique doit être agrandie à l'endroit de l'écrasement). Ce détail implique des étapes supplémentaires lors de la fabrication d'un microsystème en plus de la conception sur deux niveaux de canaux. Mises en séries comme dans la figure 1.4a, ces vannes peuvent servir de pompes péristaltiques pour faire avancer des fluïdes dans un microcanal [15]. Mises en parallèles (FIG 1.4b), elles peuvent adresser un canal particulier lors d'un embranchement multiple.

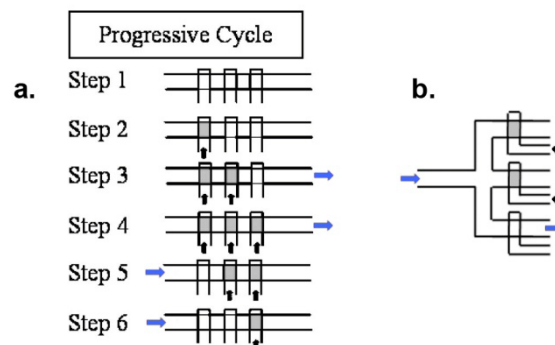


FIG 1.4 – (a) Cycle d'une pompe péristaltique selon [15]. (b) Adressage sur trois canaux. Les vannes en gris sont closes et donc sous pression. Les flèches bleues représentent les entrées et les sorties des flux.

1.3.2. Le multiplexeur

Lorsque l'on désire remplir indépendamment une centaine de microchambres en contrôlant chacun de volumes et des concentrations impliqués comme c'est le cas pour une expérience de criblage, il n'y a qu'une méthode possible : adresser chaque chambre à l'aide de vannes. Il est donc nécessaire pour une centaine de chambres d'avoir un nombre équivalent de vannes ce qui est déraisonnable du point de vue de la conception et la fabrication du microsystème.

C'est pour simplifier ce problème et rendre réalisable ce type de microsystème compliqué qu'intervient le multiplexeur. L'astuce présentée consiste à grouper chaque vanne indépendante avec certaines de ses voisines et de les contrôler ensemble. Par exemple, la figure 1.5 présente un adressage

de 8 canaux par 6 vannes. Les vannes sont représentées par un large canal rouge et reliées horizontalement par des canaux plus fins. Lorsque le canal d'activation est mis sous pression, seule les zones où la membrane est suffisamment large parviennent à obstruer le canal fluide en dessous. Lorsqu'une vanne est fermée (ainsi que toutes celles qui lui sont reliées), elle est indiquée par une croix noire. En les mettant en série, on obtient un réseau qui permet l'adressage d'un canal particulier selon une combinaison unique de fermeture des vannes. Toujours sur la figure 1.5, seul le canal 3 est ouvert [16].

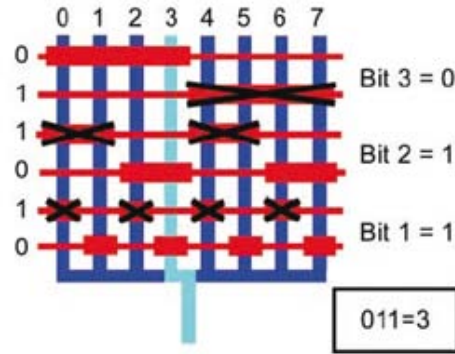


FIG 1.5 – Principe d'adressage du multiplexeur d'après [16]. Les lignes bleues représentent les canaux d'intérêt contenant les fluides. Les lignes rouges indiquent les vannes qui peuvent être fermées (X croix noire) par contrôle hydraulique en écrasant le canal juste en dessous. Chaque combinaison de vannes ouvertes et fermées détermine l'accès à un unique canal. Dans ce schéma, tous les canaux sont fermés sauf le canal 3, en bleu clair, adressé par la combinaison 011.

On calcule le nombre minimal de vannes en divisant le nombre de canaux N par dichotomie et en multipliant par 2 le résultat puisque les vannes sont adressées par paire (Bit sur la figure 1.5). Lorsque le nombre de canaux N est une puissance de deux, on peut écrire la relation suivante avec V le nombre de vannes :

$$N = 2^k \rightarrow V = 2k \quad (1.9)$$

$$N = 2^{V/2} \text{ et donc } \log_2(N) = \frac{V}{2} \quad (1.10)$$

Au lieu de remplir indépendamment N chambres grâce à N vannes de contrôle en les activant une à une, il n'y a plus que $2 \cdot \log_2(N)$ vannes soit concrètement 16 vannes à commander pour adresser, par exemple, 256 chambres.

1.3.3. Un exemple de criblage microfluidique : la cristallisation de protéines

Le diagramme de phase d'une protéine et de son agent cristallisant

Cristalliser une protéine est difficile car il n'existe pas de méthode pour prédire les conditions de cristallisation. Déterminer l'agent cristallisant le plus adapté (du point de vue de la viscosité, tension de surface, force ionique ou pH) est la première étape que réalise un microsystème baptisé "formulateur" [17]. Ensuite, il faut affiner ces conditions jusqu'à obtenir le cristal recherché. C'est le rôle d'un microsystème basé sur le principe de la diffusion libre de l'interface [18]. Quand les

conditions de criblage les plus favorables sont finalement déterminées (plus d'un millier de tests et d'essais), on les applique dans un troisième microsystème qui permet de reproduire l'expérience en obtenant des cristaux de plus grande taille directement utilisables sous les rayons X pour en déterminer leur structure tridimensionnelle [19].

La figure 1.6 présente un diagramme de phase typique avec en abscisse la concentration en agent cristallisant et en ordonnée la concentration en protéines. Du point de vue de la physique, la zone de cristallisation d'une protéine est divisée en plusieurs régions. Au delà de la solubilité se trouve l'état métastable qui est favorable à une croissance cristalline lente et de grande qualité mais où l'événement de nucléation y est rare. Il y a ensuite l'état labile qui permet de réaliser rapidement des nucléis mais des cristaux de faible qualité (car pas suffisamment ordonnés) et enfin un état de précipitation où l'on obtient un gel [1].

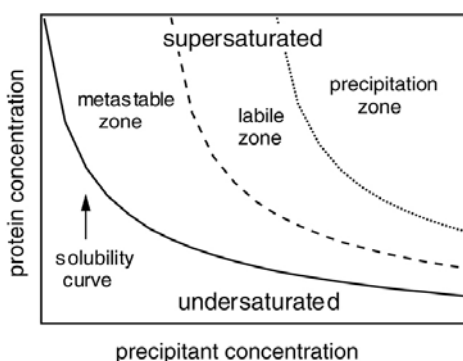


FIG 1.6 – Diagramme de phase schématisant la solubilité d'une protéine en solution en fonction de la concentration de son agent cristallisant selon [1].

Première phase de criblage par le "formulateur"

Le rôle de ce microsystème est de réaliser de manière rapide et systématique un maximum de tests impliquant une protéine, un agent cristallisant potentiel et un tampon pour ensuite réaliser une étude plus détaillée. Il permet à l'aide de pompes péristaltiques et de mélangeurs circulaires intégrés de contrôler les proportions et d'accélérer le mélange des solutions (FIG 1.7). Evidemment cette manière de créer des mélanges rend la procédure d'injection relativement complexe et doit être automatisée [20].

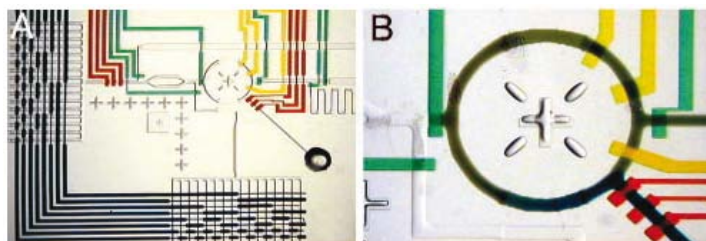


FIG 1.7 – Photo du formulateur d'après [17]. (A) Vue d'ensemble avec en bas et à gauche deux multiplexeurs qui adressent les chambres d'observations (canaux en noir). (B) Détail du mélangeur rotatif de 1.5mm de diamètre. On remarque, en couleur, des vannes couplées parfois par trois pour former des pompes qui entraînent, entre autres, le liquide dans le cercle de mélange (jaune).

Les solutions d'intérêt sont celles qui font agréger et précipiter la protéine. En visualisant le système, il est possible de construire un premier diagramme de phase (protéine, surfactant, tampon) qui met en évidence l'état soluble ou insoluble (agrégats) de la protéine pour réaliser par la suite une étude plus approfondie [13]. La figure 1.8 présente le diagramme de phase de cinq protéines et de leurs agents cristallisants correspondant. La zone de précipitation est indiquée par des points clairs et la zone soluble par des points sombres.

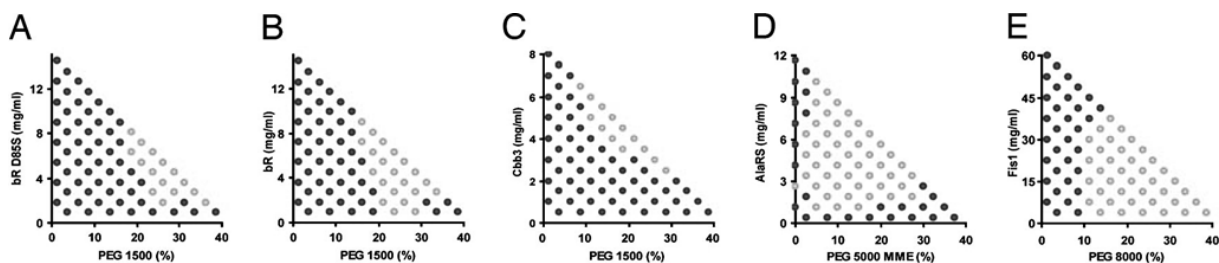


FIG 1.8 – Diagramme de phase de 5 protéines mettant en évidence la zone de précipitation (points clairs) et la zone soluble (points sombres) selon [13]. (A) Bactériorhodopsine mutante D85S (bR D85S) avec $0.125M$ d'acétate de potassium, $0.1M$ de citrate de sodium (pH 6.5) et PEG₁₅₀₀. (B) Bactériorhodopsine (bR) avec $0.125M$ de chlorure d'ammonium, $0.1M$ d'acétate de sodium (pH 4.5) et PEG₁₅₀₀. (C) Cytochrome Cbb3 (Cbb3) avec $0.075M$ d'acétate de sodium, $0.1M$ de citrate de sodium (pH 6.5) et PEG₁₅₀₀. (D) Alanyl-tRNA synthétase (AlaRS) avec $0.1M$ de sulfate de magnésium, $0.1M$ de citrate de sodium (pH 5.5) et PEG₅₀₀₀ MME. (E) Fis1 (Fis1) avec $0.1M$ d'acétate d'ammonium, $0.1M$ Tris·HCl (pH 8.5) et PEG₈₀₀₀.

Deuxième phase de criblage : le mélangeur diffusif

Suite à l'étude préliminaire, les conditions de cristallisation sont encore affinées par ce nouveau dispositif microfluidique qui utilise la diffusion passive pour faire varier lentement les proportions des deux constituants (la protéine et son agent cristallisant). Pour cela, il est indispensable de jouer sur les volumes de chaque composé. Comme présenté à la figure 1.9, deux chambres de volumes variables et contrôlés sont remplies indépendamment par chacune des solutions et sont isolées l'une de l'autre par une vanne (vanne centrale en jaune sur l'image 1.9b). Au moment de réunir les deux composés, on ouvre la vanne et le mélange se fait uniquement par diffusion (FIG 1.9c). Le remplissage du microsystème est simplifié car il est possible d'avoir une infinité de ratio avec les deux mêmes solutions de départ et donc au minimum deux entrées et deux vannes. Pour plus de liberté, il est possible de grouper les chambres par trois ou cinq avec une entrée correspondante et il est alors même envisageable de faire varier les solutions d'entrée sur une même puce [8].

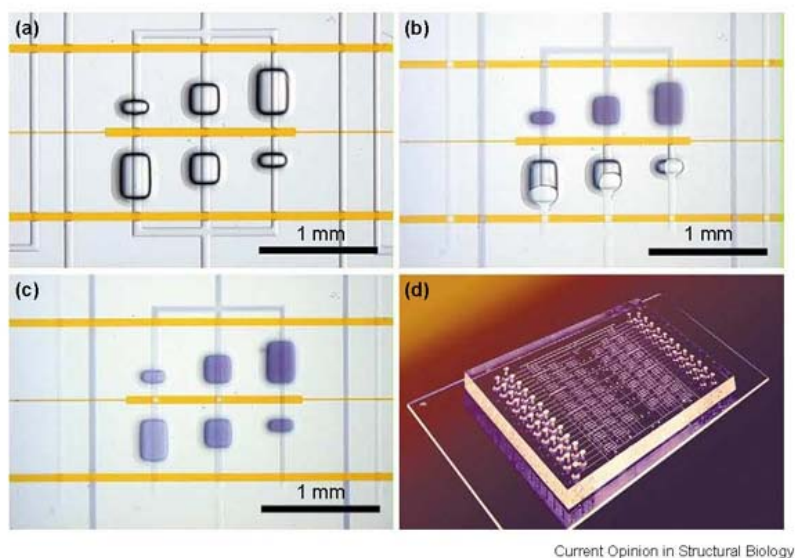


FIG 1.9 – Le mélangeur diffusif selon [8]. **(a)** Fonctionnement d’une unité de mélange avec trois ratios possibles $1:4$, $1:1$, $4:1$ pour un volume total de mélange de $25nL$, les vannes sont en jaune. **(b)** La vanne centrale est fermée et les chambres sont remplies en haut et en bas avec chacune leur solution, forçant l’air contenu à diffuser dans le PDMS. **(c)** Les vannes du haut et du bas sont fermées pour isoler chaque couple de chambre. La vanne centrale est ensuite ouverte pour permettre le mélange par diffusion. **(d)** Photo d’une puce microfluidique de 144 chambres et 432 vannes contrôlées uniquement par deux canaux d’activation.

Ce microsystème a permis entre autres de cristalliser et résoudre la structure tridimensionnelle d’une protéine qui contrôle la topologie de l’ADN (la topoisomérase de type II) qui avait résisté aux méthodes classiques de criblage. L’atout de la microfluidique lors d’une telle expérience, en plus du faible volume consommé, est l’évolution de la concentration jusqu’à l’équilibre. Comme sur la figure 1.10, selon la théorie de la diffusion libre de l’interface, trois chambres de concentration $1:4$, $1:1$ et $4:1$ parcourent chacune un chemin cinétique de concentration spécifique [21]. Les trois points d’équilibre sont placés respectivement en I, II et III. On remarque pour la chambre III que le chemin parcouru est favorable à une cristallisation puisqu’il traverse successivement la zone labile, puis la zone métastable. Cette méthode de cristallisation n’est pas un choix très populaire chez les cristallographes car elle requiert traditionnellement de grands volumes de solutions. De plus, en éprouvette, ses effets se confondent avec la gravité. Les cristaux produits proches de l’interface tombent par gravité en s’éloignant des conditions favorable de cristallisation. Avec la microfluidique, nous rappelons que la gravité n’est plus un problème pas plus que les grands volumes.

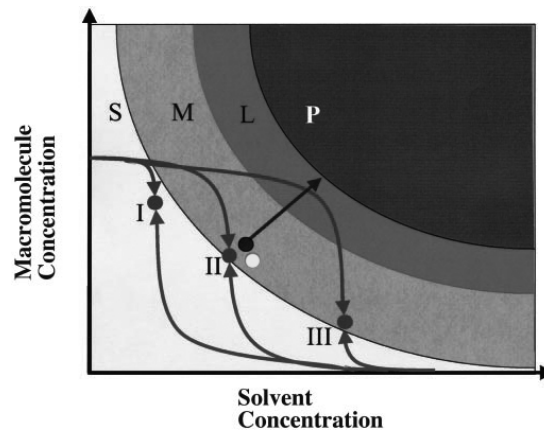


FIG 1.10 – Diagramme de phase d’une protéine tiré de [18]. Les zones de solubilité (S), métastable (M), labile (L) et de précipitation (P) sont représentées. Le point noir et la flèche représentent une expérience en goutte pendante où la concentration augmente au cours du temps avant de s’équilibrer. Le point blanc indique une expérience de microbatch où la concentration reste constante tout au long de l’expérience. Les flèches grises montrent l’évolution de la concentration dans les trois chambres de la protéine et de son cristallisant avec un ratio 1 :4, 1 :1 et 4 :1. Les concentrations peuvent traverser plusieurs zones avant de s’équilibrer en I, II et III.

Cette puce microfluidique exploite donc le passage de la zone labile pour une nucléation rapide à la zone métastable pour une croissance lente. Les temps de diffusion varient généralement de 8 à 24h et la concentration en protéine s’équilibre en augmentant du côté du solvant et en diminuant du côté de la protéine au cours du temps. La croissance, elle, peut prendre quelques semaines [18].

Troisième phase de criblage : vers des cristaux de plus grande taille

Il est rapidement apparu que des chambres closes en PDMS d’un volume de quelques nanolitres du mélangeur diffusif n’étaient pas adaptées pour analyser les cristaux obtenus sous rayon X. Même si la méthode a permis quelques avancées dans le domaine de la cristallographie, il est nécessaire d’avoir un exemplaire plus conséquent en taille et surtout plus facile d’accès. Après avoir sélectionné le solvant et le tampon adaptés, déterminé la zone de précipitation et affiné les paramètres de la cinétique, l’échantillon prometteur est prêt pour une ultime cristallisation.

Le principe est de reproduire à plus grand échelle l’expérience effectuée à l’aide du mélangeur diffusif. On utilise alors deux réservoirs de 150µL reliés par un microcanal de longueur variable dont l’ouverture est commandée par une vanne intégrée et séparés d’un bain osmotique par une membrane semi-perméable (FIG 1.11). Varier la force du bain osmotique et la longueur du microcanal permet d’optimiser le temps de mélange que l’on peut faire varier d’un facteur 8. En outre, il est possible de stopper la diffusion en fermant la vanne de liaison entre les deux puits [19].

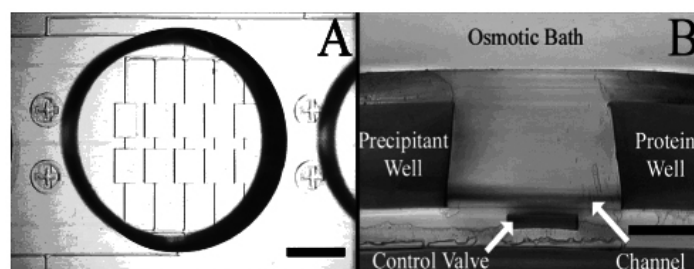


FIG 1.11 – Réacteur μ FID (free interface diffusion) selon [19]. (A) Le site de réaction est situé sous une membrane de $250\mu\text{m}$ d'épaisseur et au fond du réservoir, un canal relie les deux réacteurs. La barre d'échelle mesure $2000\mu\text{m}$. (B) Coupe du microsystème. La barre d'échelle fait $150\mu\text{m}$.

Plus le canal est long, moins il y a d'événements de nucléation et plus les cristaux sont grands. Maintenant il est possible d'intervenir plus finement en fermant la vanne de manière alternative et cyclique. Ces résultats sont illustrés à la figure 1.12. Le graphique A représente le nombre de cristaux par puits pour trois protéines en fonction de la longueur du canal : plus il est long et moins il y a de cristaux. Les photos en B illustrent les divers résultats obtenus. Le canal de liaison est deux fois plus court sur les photos du haut que celles du bas. Les cristaux de droite ont été obtenus avec des cycles d'ouverture court par rapport au temps de fermeture du canal de liaison. Le bain osmotique peut aussi être changé au milieu d'une expérience sans perturber les réactions de cristallisations.

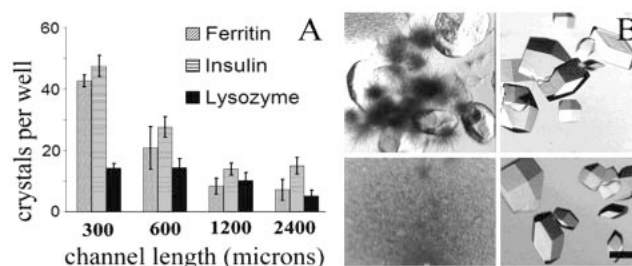


FIG 1.12 – Résultats obtenus avec le μ FID d'après [19]. (A) Graphique du nombre de cristaux par puits en fonction de la longueur du canal pour trois protéines différentes : la ferritine, l'insuline et le lysozyme. (B) Résultats de cristallisation (cristaux multiples ou agrégation) à 4°C pour le lysozyme en faisant varier les paramètres. Pour les photos du haut, le canal de liaison fait $300\mu\text{m}$ et pour celui du bas $600\mu\text{m}$ de long. A gauche, la vanne est toujours ouverte et à droite elle reste 15min ouverte pour 2h fermée. La barre d'échelle mesure $100\mu\text{m}$.

Pour observer l'apparition d'un cristal, il faut patienter parfois plusieurs dizaines d'heures voire plusieurs semaines. Si ces microsystèmes ont permis de résoudre la structure de protéines encore inconnues, ils restent très complexes à réaliser et tout autant à utiliser. Dans tous les cas les cristaux doivent être extraits du microsystème et cryogénisés afin de conserver le cristal de protéine généralement composé à plus de 40% d'eau avant d'en étudier la diffraction sous rayons X.

1.4. Criblage dans des gouttes

1.4.1. La microfluidique digitale appliquée au criblage

Il existe deux méthodes pour fabriquer des gouttes dans un microsystème, par focalisation hydrodynamique [22] ou avec une jonction en T. Cette thèse n'évoquera que la deuxième méthode de génération de gouttes car il s'agit de la plus utilisée dans le domaine du criblage par microgouttes [23].

Le procédé est présenté à la figure 1.13a. Deux canaux se rencontrent à un angle contrôlé. Si l'on injecte deux liquides immiscibles comme de l'huile et de l'eau, il va se former des gouttes de taille reproductible¹ (FIG 1.13b). La phase continue doit mouiller les parois, la phase dispersée doit avoir une affinité limitée avec les murs. Sans traitement de surface, le PDMS est un matériau hydrophobe et donc une jonction en T formera naturellement des gouttes d'eau dans de l'huile. Selon la référence [24] :

$$\frac{L}{w} = 1 + \alpha \frac{Q_{in}}{Q_{out}} \quad (1.11)$$

Avec L la longueur des gouttes, w la largeur du canal, Q_{in} le débit de la phase dispersée, Q_{out} le débit de sortie et α une constante dépendant de la géométrie de la jonction.

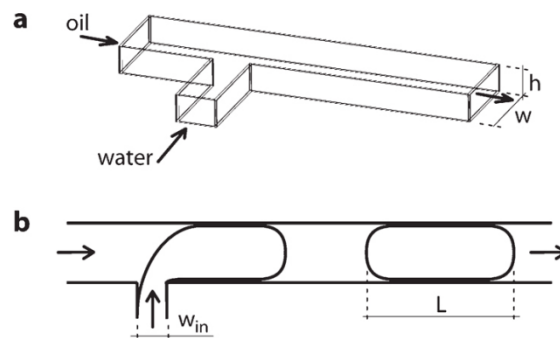


FIG 1.13 – Illustration d'une jonction en T d'après [24]. (a) Les canaux sont dans le même plan et ont tous la même hauteur h . (b) Vue de dessus de la jonction, la phase continue (ici de l'huile) est injectée par la gauche. La phase dispersée (de l'eau) arrive par le canal perpendiculaire de largeur w_{in} .

Chaque goutte peut être considérée comme un réacteur indépendant où l'on peut donc tester et déterminer les conditions favorables à la cristallisation.

1.4.2. Les systèmes de criblage mis en œuvre par la microfluidique digitale

Le criblage de protéines

Le premier microsystème présenté est issu des recherches du groupe de Rustem Ismagilov à Chicago. Comme on peut le voir à la figure 1.14, le microsystème consiste en deux jonctions en T. La première (i) forme des gouttes en série de concentration variable en protéine et précipitant. Ensuite, on stocke ces gouttes pour permettre la nucléation (ii). La génération de nucléis peut prendre quelques secondes, quelques jours ou même quelques semaines et dépend de la protéine. Chaque goutte est ensuite diluée dans une deuxième jonction en T (iii) par une solution contrôlée de précipitant et protéine afin de favoriser la croissance des cristaux² [9].

¹ La taille des gouttes dépend des débits dans les microcanaux.

² Passage de la zone labile à la zone métastable dans le diagramme de phase.

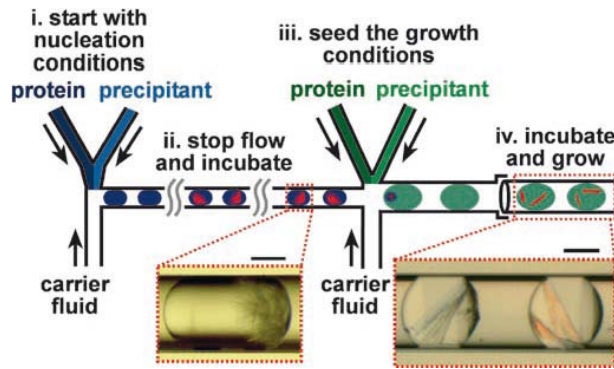


FIG 1.14 – Schéma du microsysteme de criblage selon [9]. **(i)** la protéine et son précipitant forment des gouttes à forte concentration. **(ii)** Le flux est arrêté pour permettre l'apparition de nucléis. **(iii)** Les gouttes sont diluées pour favoriser la croissance de cristaux. **(iv)** Les gouttes sont stockées dans un capillaire. Les deux photos montrent la protéine SARS (SARS nucléocapside) d'abord dans un état supersaturé puis cristallisé. Les barres d'échelle mesurent $100\mu\text{m}$.

Finalement, les gouttes sont stockées dans un capillaire en téflon comme on peut le voir sur la figure 1.15a-c. L'évaporation des gouttes peut être contrôlée et même stoppée en plongeant le capillaire dans un tube en verre contenant la phase continue (FIG 1.15d). Sorties du capillaire une à une, les gouttes d'intérêt peuvent être analysées sous rayons X [25].

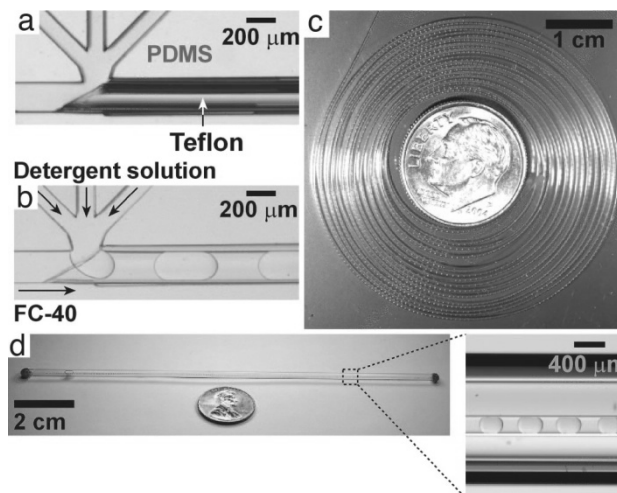


FIG 1.15 – Photos du microsysteme de criblage et du capillaire de stockage d'après [25]. **(a)** Photo de la deuxième jonction en T à vide et du couplage avec le capillaire en téflon. **(b)** Formation de gouttes. **(c)** 1000 gouttes dans 1 mètre de capillaire enroulé autour d'une pièce. **(d)** Capillaire en téflon stocké dans un tube en verre rempli de phase continue.

Utiliser la microfluidique digitale permet de réaliser des expériences de criblage à l'aide d'un microsysteme relativement simple. D'ailleurs, la structure tridimensionnelle de plusieurs protéines a pu être résolue comme celle de la SARS nucléocapside ou de l'oligoendopeptidase F. Il faut tout de même souligner que la fabrication des gouttes est contrôlée par un programme permettant de faire varier automatiquement les vitesses des flux d'injections qui a évidemment demandé un certain nombre d'heures de développement. De plus, il reste quelques points sur lesquels se pencher comme l'extraction des gouttes du capillaire. Cette étape demande deux jours de travail car il faut le faire individuellement pour chaque goutte que l'on veut étudier plus en détail.

Un microsystème sous rayons X

Dans un microsystème dédié au criblage, la phase très délicate de cristallisation concentre toutes les attentions et la procédure d'extraction est souvent négligée. Le procédé peut durer plusieurs heures comme pour les systèmes en gouttes [25], ou peut nécessiter la destruction du microsystème comme pour la plupart des systèmes en chambres [19]. Sortir un cristal de protéine de son environnement implique forcément une étape de cryogénisation afin de conserver intacte la structure tridimensionnelle dont on veut étudier la diffraction par rayons X. Dans la suite des microsystèmes de criblage en gouttes, un groupe s'est intéressé au problème de récupération des gouttes et a développé un outil baptisé la CrystalCard comme on peut le voir à la figure 1.16.

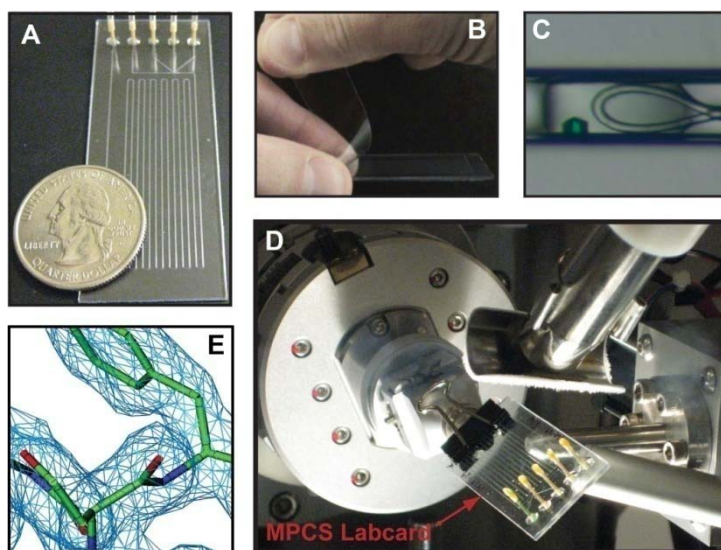


FIG 1.16 – Détails de la CrystalCard selon [26]. (A) Photo de la CrystalCard. (B) Pelage du film protecteur de la CrystalCard en PDMS, les gouttes et les cristaux restent dans les canaux. (C) Extraction d'un cristal de méthionine à l'aide d'un cryoloop. (D) CrystalCard en PDMS/téflon montée sur la tête du goniomètre d'une source de rayons X. E) Portion d'une carte tridimensionnelle de la densité d'électrons d'un cristal de lysozyme.

Ce microsystème est dédié au stockage, à l'incubation, à l'extraction et à l'analyse des gouttes et se présente sous la forme d'un long microcanal (a). Dans sa version tout en PDMS, il faut retirer la mince pellicule de protection (b) et utiliser un "cryoloop" pour déplacer les cristaux qui seront ensuite cryogénisés et analysés (c). Dans sa version PDMS/téflon, il est possible de le mettre directement sous rayons X (d) sans aucune étape supplémentaire sur les gouttes ou les cristaux (sachant que les matériaux absorbent 19% des rayons) [26].

Un autre exemple de microsystème, le criblage en concentration et température

Si les microsystèmes dédiés au criblage dans des gouttes ont prouvé leur potentiel avec comme principal atout leur simplicité de conception, aucun système ne pouvait alors analyser un diagramme de phase bidimensionnel. L'outil présenté ici a été développé au LOF de Rhodia à Bordeaux et son but est de pouvoir réaliser et quantifier rapidement le criblage d'une solution.

Comme précédemment, la concentration des gouttes varie au cours du temps. Comme on peut le voir sur la figure 1.17a, les gouttes sont réalisées en haut de l'image et injectées ligne par ligne. A chaque changement de rangée, la concentration change et crée ainsi un gradient vertical. Le microsysteme est ensuite entièrement refroidi pour induire une cristallisation. Finalement, il est réchauffé à l'aide de deux modules Peltier placés sous le microsysteme qui le soumettent horizontalement à un gradient en température. Seuls les cristaux contenus dans les gouttes avec une concentration au dessous de la solubilité vont se dissoudre et la courbe de solubilité est directement lisible comme sur la figure 1.17c [27].

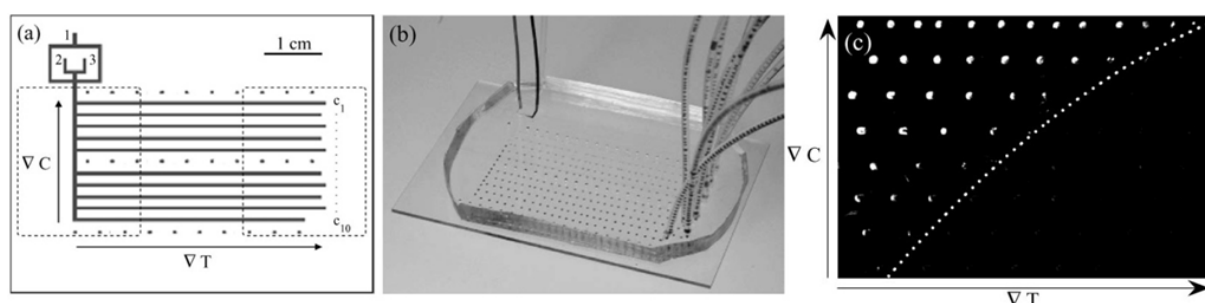


FIG 1.17 – Détails du microsysteme de criblage en concentration et température d'après [27]. (a) Schéma du microsysteme. La phase continue d'huile est injectée en 1 et les solutions aqueuses en 2 et 3. Les deux zones en pointillés montrent la position des deux modules Peltier. Les trois lignes de points indiquent les endroits des mesures de température. (b) Photos du microsysteme posé sur du verre pour la transparence (normalement on utilise du silicium pour des raisons de conductivité thermique). (c) Exemple de lecture directe d'un diagramme de solubilité. Les gouttes contiennent une solution organique (acide adipique). La ligne en pointillés donne une estimation de la limite de solubilité.

1.5. Criblage par pervaporation

1.5.1. Principe de la pervaporation

La pervaporation est un principe de séparation chimique des mélanges liquide-liquide à travers une membrane semi-perméable. Elle est basée sur l'affinité de l'un des composants de la solution (le composant à extraire) avec la membrane et implique plusieurs étapes successives. Comme on peut le voir sur la figure 1.18, le composé noir traverse la membrane préférentiellement. Si le principe est assez simple, les phénomènes mis en jeu sont relativement complexes. Tout d'abord, le constituant minoritaire à extraire est adsorbé, puis diffuse à travers l'épaisseur de la membrane qui gonfle sous son contenu et finalement se vaporise sur la face de droite maintenue en dépression par rapport à la face de gauche où le liquide est en contact. Ce changement d'état est particulier au procédé de pervaporation.

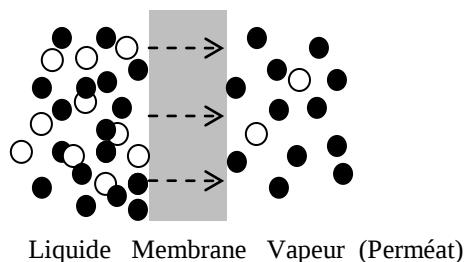


FIG 1.18 – Schéma descriptif de la pervaporation. Le composé noir, à extraire, traverse la membrane et se vaporise ensuite pour être éliminé.

L’historique

Les premières observations mettant en évidence le transfert d’hydrocarbures et d’alcool à travers une membrane constituée d’une mince feuille de caoutchouc sont réalisées par Kahlenberg en 1906 [28]. Il faudra attendre les travaux de Koebel en 1917 pour que le terme de pervaporation et le concept soient mis en avant [29]. A cette époque, les flux observés étaient si faibles que le principe a longtemps été considéré uniquement comme un outil de laboratoire. En effet, tant qu’il était techniquement impossible de réaliser des films de polymères de quelques microns d’épaisseur, l’utilisation à grande échelle du procédé était fortement compromise.

Ce n’est qu’à partir des années soixante, suite à la mise au point d’un protocole de fabrication de membranes en cellulose permettant de plus grands transferts de flux, que les recherches sont relancées dans le domaine [30]. En France, l’équipe du professeur Néel va établir l’intérêt économique de la pervaporation et clairement démontrer qu’elle peut être associée à la distillation pour séparer des mélanges de liquides. Dans certains cas, elle peut même remplacer avantageusement ce procédé de séparation [31, 32]. Les premières installations industrielles datent du milieu des années 1980 au Brésil. Ces unités avaient pour but de corroborer les prévisions concernant le bas coût énergétique (et donc économique) de la technique. Elles étaient utilisées pour déshydrater de l’éthanol, déjà rectifié par distillation [33].

A l’heure actuelle, on couple la pervaporation à la perméation en phase vapeur ou la distillation pour réaliser deux types d’applications industrielles : la déshydratation de solutions organiques ou l’extraction de solvants organiques en solution dans l’eau. On l’utilise donc essentiellement dans l’industrie chimique, pétrochimique et pharmaceutique [34].

Les membranes utilisées

Une unité de pervaporation est caractérisée par la sélectivité de sa membrane qui mesurait quelques mètres carrés dans la précédente décennie et qui peuvent actuellement atteindre de plusieurs centaines à plusieurs milliers de mètres carrés pour les installations les plus modernes. Barrière semi-perméable donnant lieu à un transfert préférentiel, une membrane doit rester stable et résister au milieu même à des températures élevées. Dans l’industrie, les membranes sont souvent composites, alternant les régions denses et poreuses. Elles gardent une affinité préférentielle pour l’un des constituants du mélange aqueux à séparer. Les membranes organiques sont essentiellement de deux types : hydrophiles ou organophiles.

Les membranes hydrophiles ont une affinité pour l'eau qui les traverse bien plus facilement que les matières organiques qui sont retenues. Elles sont donc utilisées pour déshydrater des solvants organiques et sont fabriquées en polymères comme par exemple le polyacétate de vinyle (PVA) ou les polyimides (PI) [35, 36].

Les membranes organophiles ont une affinité avec les molécules organiques bien plus forte que pour l'eau qui est dans ce cas majoritairement retenue. On les utilise pour extraire des composés organiques dilués des milieux aqueux comme par exemple désalcooliser des boissons, extraire des arômes de milieux biologiques ou traiter des eaux usées contaminées [37]. Ces membranes sont souvent en polydiméthyl siloxane (PDMS) ou en polyoctylméthyl siloxane (POMS) [38].

Malgré une grande variabilité de matières organiques disponibles, un intérêt croissant pour les membranes inorganiques s'est développé il y a une dizaine d'années. En effet, pour des applications à hautes températures, pour des environnements extrêmement agressifs ou pour des questions de gonflement et de stabilité mécanique des matériaux, les silices microporeuses deviennent très intéressantes pour réaliser des membranes en céramique [39]. Si les membranes sont souvent encore de formes planes, des réacteurs à enroulement spiralé ou tubulaires creux ont été développés : bien que de fabrication relativement complexe, leur principal intérêt est d'augmenter la densité surfacique et donc le rendement [40]. En règle générale, chaque type de membrane trouve ses domaines respectifs d'applications.

La modélisation du transport à travers les membranes

Les phénomènes de transfert à travers une membrane peuvent avoir plusieurs origines : un gradient de température, de pression, de concentration ou un potentiel électrique. On introduit ces forces motrices comme un gradient de potentiel chimique à travers la membrane [41]. Pour chaque constituant, ce gradient peut s'écrire sous la forme :

$$\Delta\mu_i = RTd \ln(\gamma_i c_i) + V_i dp \quad (1.12)$$

Avec $\gamma_i c_i$ l'activité du constituant i dans la membrane, V_i le volume molaire et dp le gradient de pression entre la face amont et la face aval de la membrane. On admet que cette formule s'applique au cas des liquides et des membranes.

Dans la littérature, deux modèles sont considérés pour décrire la perméation à travers une membrane et tient compte de la nature de cette dernière : poreuse ou dense. Comme dans ce travail nous nous sommes intéressés au cas du PDMS qui forme des membranes denses, nous avons fait le choix de détailler uniquement le modèle de solution-diffusion qui est généralement utilisé pour ce genre de membrane [42].

Dans le cas du modèle de solution-diffusion, on admet l'hypothèse que les fluides, de part et d'autre de la membrane, sont à l'équilibre avec le matériau membranaire à l'interface. En d'autres termes, il existe un gradient de potentiel chimique continu³ comme on peut le voir sur la figure 1.19. De plus, la pression interne de la membrane est supposée comme uniforme et le gradient de potentiel chimique est exprimé uniquement par un gradient de concentration [43].

³ Cela implique que le taux d'adsorption et de désorption aux interfaces est beaucoup plus conséquent que le taux de diffusion à travers la membrane.

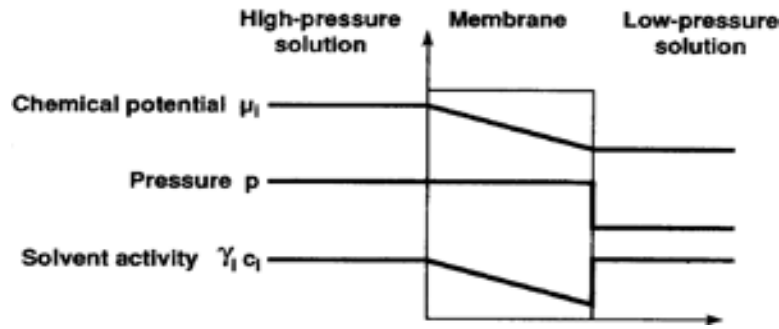


FIG 1.19 – Modèle de solution diffusion selon [43]. Le potentiel chimique varie d'un coté à l'autre de la membrane et la pression est supposée constante dans le matériau avant de décroître brutalement à la sortie procédé.

Toujours d'après ce modèle, le flux J d'un constituant traversant une membrane d'épaisseur l peut être exprimé selon la loi de Fick:

$$J = -D\vec{\nabla}C = \frac{D(c_0 - c_l)}{l} \quad (1.13)$$

Où c_0 et c_l sont les concentrations du constituant respectivement avant et après la membrane et D le coefficient de diffusion du composé à travers le matériau de la membrane.

Pour le procédé de pervaporation, le modèle est un peu plus complexe. En effet, même si un seul composé traverse la membrane de manière significative, cette dernière est en contact avec plusieurs constituants. On quantifie cette capacité de séparation par la sélectivité α_{ij} qui est le rapport des perméabilités de deux composants. La sélectivité donne une indication sur l'efficacité de la membrane. La perméabilité est définie comme suit :

$$P_i = D_i S_i \quad (1.14)$$

Elle dépend du coefficient de diffusion D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) et de la solubilité S ($\text{cm}^3(\text{STP}) \text{cm}^{-3} \text{atm}^{-1}$) qui est le rapport direct de la différence de concentration d'un composé avant et après la membrane par la différence de pression. La sélectivité et la perméabilité sont de bons indicateurs des performances générales de séparation d'un matériau [44]. D'ailleurs, le PDMS est perméable plus facilement aux solvants qu'aux gaz rares comme il est montré à la figure 1.20. Il faut préciser que la perméabilité ne dépend pas uniquement de la taille de molécules, mais aussi de leur densité volumique ou de leur température critique [45].

Liquid permeability and sorption of organic solvents through silicone rubber

	Permeability (barrer)	Sorption (g/100 g)
Nitrogen	280	0.011 @1atm
Oxygen	600	0.026
Methane	940	0.034
Carbon dioxide	3,200	0.282
Water	23,000	0.38
Ethanol	45,000	6.5
Methylene chloride	165,000	154
Chloroform	283,000	207
Carbontetrachloride	180,000	241
1,2-Dichloroethane	248,000	58
1,1,1-Trichloroethane	247,000	193
Trichloroethylene	614,000	235
Toluene	1,460,000	115

Temperature: 40°C; 1 barrer = $1 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 \text{ (STP) } \cdot \text{cm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg})$.

FIG 1.20 – Perméabilité et caractéristiques d'absorption du PDMS à une température de 40°C tiré de [46]. On exprime généralement la perméabilité en barrer. Un barrer représente la quantité molaire d'un composé sur son volume réel (à température et pression standard calculé via la loi des gaz parfaits).

Dans l'industrie, les membranes en PDMS sont hydrophobes et servent principalement à concentrer des solvants organiques comme l'éthanol.

1.5.2. La pervaporation microfluidique

En microfluidique, la pervaporation à travers des membranes en PDMS a un but différent. La miniaturisation maximise la surface de contact et permet des échanges suffisamment rapide pour étudier directement des solutions (concentration contrôlée d'un milieu, transitions de phases ou criblage) [47, 48] ou pour déplacer des liquides dans des microcanaux (pompe par pervaporation) [49, 50].

Dans le premier cas, on s'arrange généralement que de tous les composés mis en solution, seules les molécules choisies soient capables de traverser la membrane. Les autres constituants incapables de la franchir s'accumulent et augmentent localement la concentration de la solution parfois jusqu'à la transition de phase (nucléation des cristaux, précipitation, apparition de gels ou de phases complexes). L'étude de ces phases permet le criblage et par conséquent la reconstruction du diagramme de phase [51]. De récentes observations ont montré que si les molécules d'eau peuvent traverser une membrane en PDMS, les sels et les protéines, au contraire, en sont incapables [52]. Cet état de fait est illustré à la figure 1.21. Dans cette coupe d'un microsystème fluidique, seules les molécules sombres traversent la membrane, les autres molécules s'accumulent à l'interface. Le procédé de pervaporation induit un flux dans le canal d'amenée. Le débit dans le canal est le même que celui de la pervaporation.

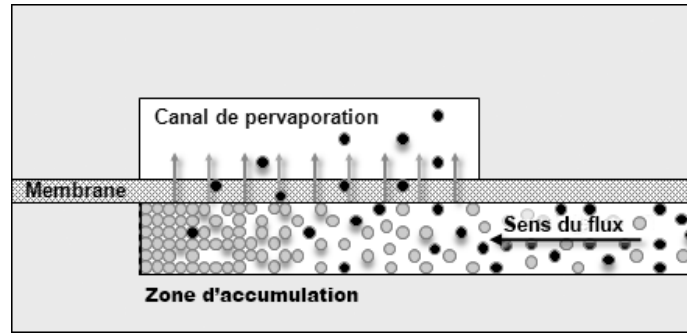


FIG 1.21 – Coupe d'un système microfluidique permettant la pervaporation. Le canal du bas est le canal de travail. Seules les molécules les plus foncées peuvent traverser la membrane et induisent un flux, les autres s'accumulent à sa surface. Les épaisseurs de membranes varient entre 10 et $50\mu\text{m}$, les canaux entre 20 et $100\mu\text{m}$ voire plus pour le canal de pervaporation.

Il existe plusieurs méthodes pour inclure des membranes dans des microsystèmes. Généralement la technique la plus accessible est de choisir un matériau avec les propriétés qui nous intéressent (une membrane commercialisée par exemple) et de l'inclure dans le circuit en la pinçant ou en la collant. Il existe aussi des possibilités de la fabriquer en même temps que le microsystème (technologie des semi-conducteurs) ou directement dans des microcanaux (réaction in situ de polymérisation déclenchée par contact de deux réactifs, laser, etc.). La dernière méthode consiste à utiliser un matériau dont les propriétés membranaires sont déjà intéressantes pour réaliser le circuit et ainsi d'en exploiter les propriétés. Dans ce cas, le procédé est simple et élégant et ne requiert pas d'étape supplémentaire à la fabrication. Par contre, il limite les matériaux accessibles puisqu'il est nécessaire de maîtriser la technologie de fabrication correspondante [44].

1.5.3. Le criblage dans des doigts

Ce travail de criblage a été inspiré par des observations réalisées précédemment sur des microsystèmes en PDMS. L'eau qui traverse la membrane induit des flux capables de concentrer des colloïdes [48]. Suivant cette idée, l'analyse de ces flux permet de déduire les concentrations in situ et donc de reconstruire le diagramme de phase d'un composé. Les doigts ou canaux sont constamment connectés à un réservoir comme on peut le voir sur la figure 1.22 [51]. La membrane de pervaporation recouvre l'extrémité du canal où se concentre le soluté.

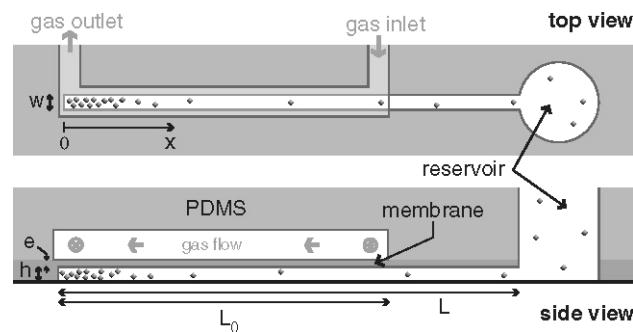


FIG 1.22 – Schéma vu de haut et de profil d'un microévaporateur avec une géométrie en doigt d'après [13]. Les dimensions caractéristiques sont $e=10\mu\text{m}$, $h=20\mu\text{m}$, $w=200\mu\text{m}$ et $L_0=10\text{mm}$.

Une solution se concentre localement seulement si la vitesse de diffusion est inférieure à la vitesse de pervaporation. De plus, la vitesse v des particules dépend de leur position x sous la membrane de pervaporation selon l'équation :

$$v(x) = -v_e \frac{x}{h} \quad (1.15)$$

v_e est la vitesse de pervaporation (mesurée avec des traceurs à 50nm/s pour une membrane de $e=10\mu m$) et h la hauteur du canal fluide. Lorsque $x=0$, la vitesse en bout de doigt est nulle, et lorsque $x=L_0$, la vitesse est maximale. On suppose qu'il n'y a pas d'évaporation en dehors de cette zone puisque l'épaisseur du PDMS est importante. Cette considération n'a pas été démontrée comme parfaitement exacte mais néanmoins l'évaporation à travers la masse du matériau est complètement négligeable pour les échelles de temps et les températures considérées (quelques heures à quelques jours à $25 \pm 2^\circ C$) [53]. La taille de la zone d'accumulation p varie en fonction du coefficient de diffusion.

$$p = \left(D \frac{h}{v_e} \right)^{\frac{1}{2}} = (D \tau_e)^{\frac{1}{2}} \quad (1.16)$$

A des distances supérieures à p , la diffusion devient négligeable. La solution est uniquement concentrée par l'eau pervaporée à un flux constant $c(x)v(x)=c_0v_0$. Suivant le calcul effectué par Armand Ajdari dans la référence [51], la concentration peut être approximée par une courbe gaussienne qui s'accroît au court du temps puisque alimentée par une rampe hyperbolique stable délivrant un courant $J_0=c_0v_0$.

$$c(x, t) \cong c_0 v_0 t \sqrt{\frac{2}{\pi p^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2p^2}\right) + c_0 R(x) \quad (1.17)$$

Avec $R(x) \cong L_0/x$ pour $p < x < L_0$. Le graphique 1.23a confronte la théorie et l'expérience en mesurant le contraste des traceurs fluorescents en fonction de leur position dans le canal. La courbe de fit correspond à la modélisation. Sur la figure 1.23b, on observe la taille de la zone d'accumulation qui dépend de la diffusion (et donc de la taille des particules).

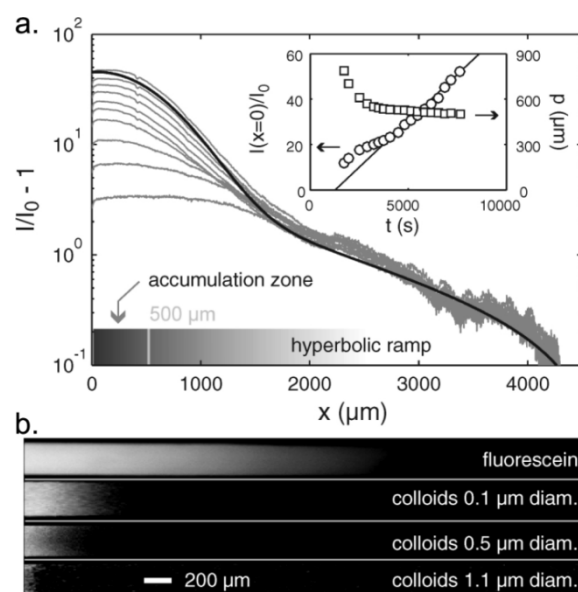


FIG 1.23 – Résultats d’expériences avec de la fluorescéine et des colloïdes d’après [51]. **(a)** Traçage de l’intensité lumineuse le long d’un doigt rempli d’une solution aqueuse contenant de la fluorescéine. La courbe de fit correspond à une simulation. **(b)** Quatre doigts concentrés dans les mêmes conditions montrent que la taille de la zone d’accumulation p est liée au coefficient de diffusion D qui dépend de la taille des particules.

Cette idée très simple en apparence peut s’avérer complexe du point de vue du criblage. Lorsque le matériau change de phase, il peut exister une période de transition (plus ou moins longue en fonction du coefficient de diffusion) et plusieurs phases alors peuvent alors cohabiter. Il sera alors difficile de repérer les fronts de propagation. Avec de telles variations, il devient difficile de cribler un matériau. Néanmoins, quelques observations intéressantes appuyées par une simulation numérique ont pu être réalisées sur du sodium bis-2-éthylhexylsulfosuccinate (appelé aussi AOT) dont le diagramme de phase est connu et présenté figure 1.25 [54]. Lorsque l’on concentre une solution aqueuse d’AOT à température ambiante, on traverse successivement trois phases : une structure lamellaire (15 à 75%w/w d’AOT), cubique (autour de 80%w/w) et hexagonale (85 à 100%w/w).

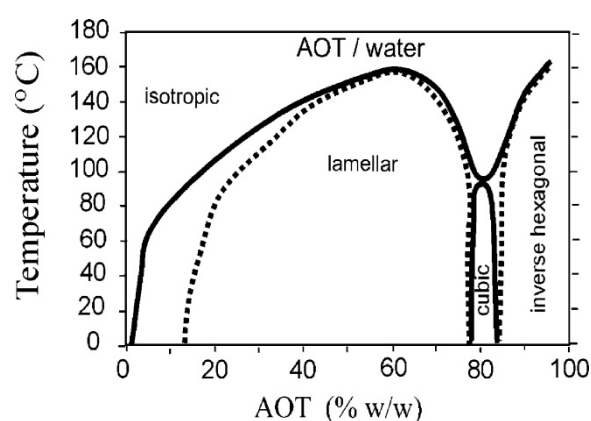


FIG 1.24 – Diagramme de phase AOT et H₂O en fonction de la température d’après [54]. A température ambiante, lorsque l’on part d’une solution diluée et qu’on la concentre, on traverse successivement plusieurs phases : lamellaire, cubique et hexagonale.

Afin de faire varier la cinétique de réaction, plusieurs doigts se concentrent en parallèle avec une longueur de pervaporation variant pour chacun d'eux (et donc une vitesse de flux dans le canal). Chaque phase apparaît l'une après l'autre pendant que la solution continue de se concentrer et que la cristallisation se propage le long du doigt (FIG 1.25a). Les concentrations d'apparition (évaluées avec la vitesse de pervaporation v_e) correspondent aux concentrations de transitions du diagramme de phase. Ces phases successives sont représentées sur les 6 images de droite de la figure 1.25. Chaque phase repérée est ensuite confirmée par une vue sous polariseurs croisés (FIG 1.26). En effet les phases lamellaire et hexagonale sont biréfringentes alors que la phase cubique ne l'est pas [55].

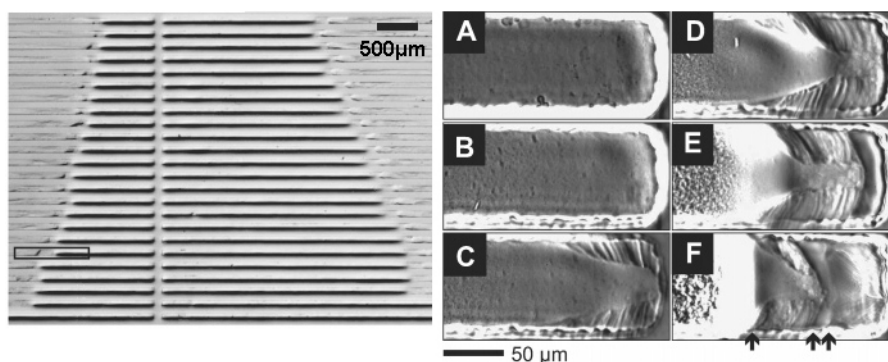


FIG 1.25 – Résultats des expériences avec l'AOT d'après [55]. Image de gauche : vue d'ensemble des doigts en parallèle, les flux viennent de gauche et de droite et la transition de phase apparaît d'abord au bout du canal (centre de l'image) avant de se propager. (A-B-C-D-E-F) Evolution temporelle d'un doigt avec apparition successive de différentes phases.

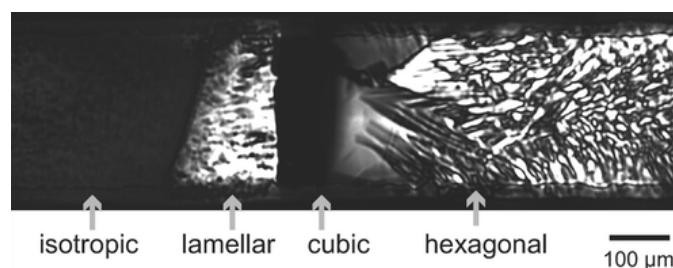


FIG 1.26 – Identification des phases de l'AOT dans un microcanal sous polariseurs croisés d'après [55]. Les phases hexagonales et lamellaires sont biréfringentes. Le bout du canal est à droite et la transition de phase se propage vers la gauche. Pour confirmer définitivement la structure, une mesure sous rayons X est nécessaire.

1.5.4. Le criblage couplant gouttes et pervaporation

Le second travail de criblage par pervaporation présenté dans cette thèse a tenté de réunir les avantages du criblage en gouttes (réalisation simple et facile, peu de solutions consommées, gouttes indépendantes) et de la pervaporation (possibilité de concentrer ou de diluer finement en fonction de la solution en contact avec la membrane ; contrôle de la concentration d'une solution en fonction du volume de la goutte). Le microsystème a été développé par le groupe de Seth Fraden de l'Université de Brandeis (Massachusetts).

Le premier problème qui a dû être résolu concernait l'immobilisation d'une centaine de gouttes, chacune sous leur membrane de pervaporation. Ici, l'innovation consiste à exploiter les forces de tension de surface : lorsqu'une goutte passe d'un endroit confiné à un endroit qui l'est moins

(comme on peut le voir à la figure 1.27c), elle va changer de forme pour s'approcher d'une forme sphérique qui va minimiser l'énergie de surface du système. En répartissant le long du canal de transport des puits plus profonds, les gouttes vont s'y engouffrer et rester piégées. De plus, l'occupation d'un puits oblige les gouttes suivantes à continuer leur chemin [53].

Si les puits sont connectés à un canal de pervaporation à travers une membrane (illustré à la figure 1.27d), il est possible de faire varier la concentration des gouttes (précipitation et dilution) en faisant varier les fluides traversant le canal (air, eau, eau salée par exemple).

La figure 1.27a présente le microsystème dans son ensemble. Le canal de fabrication et de stockage des gouttes est représenté en vert. Les gouttes (en bleu) sont piégées sur les cotés du canal. L'autre niveau de canaux est représenté en orange. On peut observer le canal de pervaporation (verticalement).

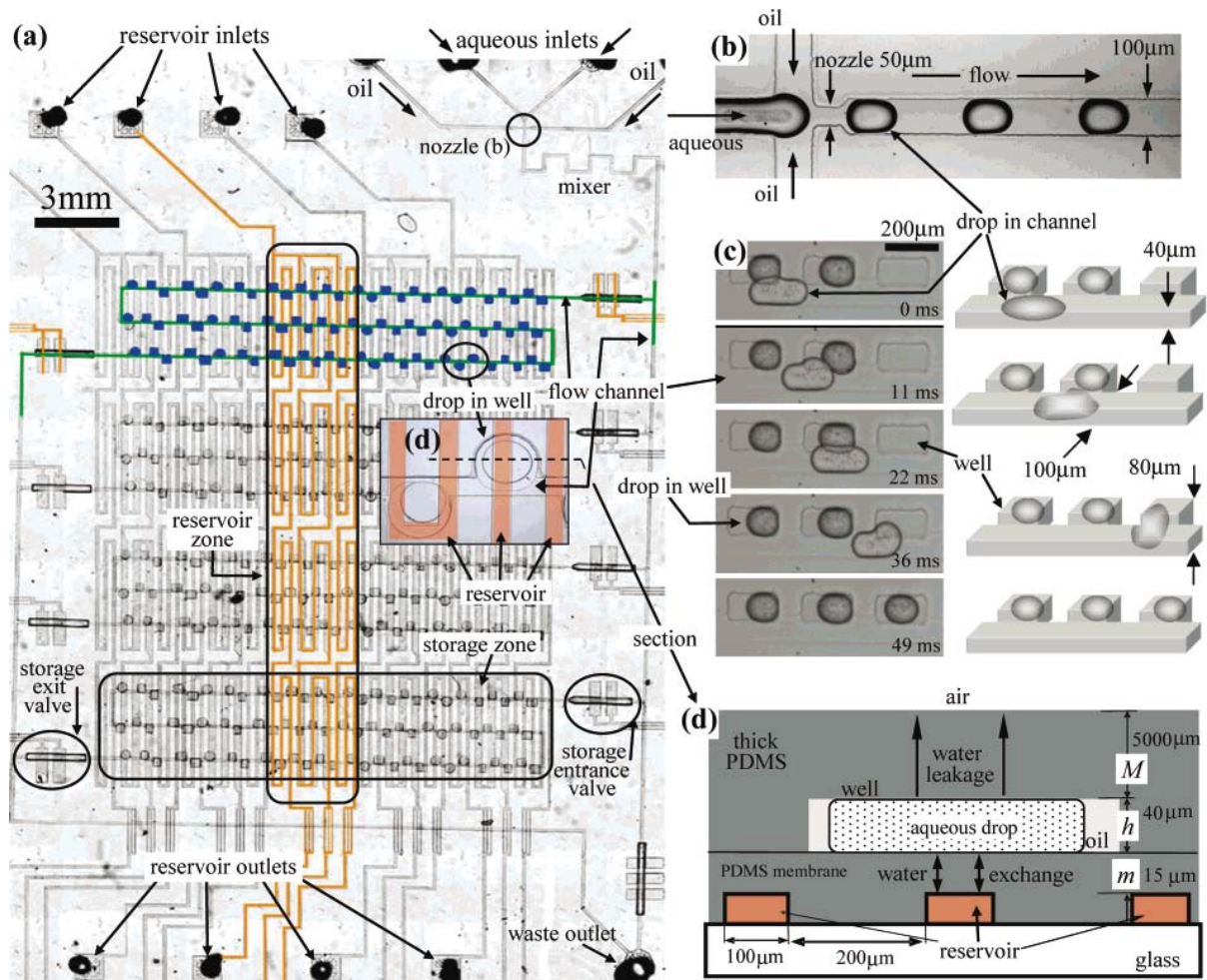


FIG 1.27 – Système fluide de pervaporation en gouttes d'après [53]. (a) Vue du dessus du microsystème. Verticalement les canaux de pervaporation (en orange, niveau 1). Horizontalement les canaux de travail (en vert, niveau 2) avec les puits pour les gouttes (en bleu, niveau 2). (b) Formation de gouttes contrôlée par flow focusing. (c) Evolution d'une goutte dans le canal et piégeage dans un puits (photos vues de dessus et simulation). (d) Section verticale d'une goutte piégée et séparée par une membrane de 15µm du réservoir de pervaporation.

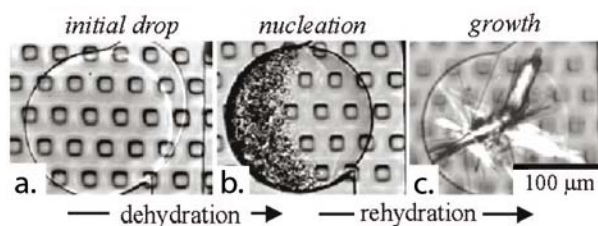


FIG 1.28 – Evolution d’une goutte contenant une solution de protéine xynalase d’après [52]. **(a)** Goutte piégée dans un puits. **(b)** Déshydratation et précipitation de la protéine à l’aide d’une solution aqueuse de NaCl 5M dans le canal de pervaporation. **(c)** Réhydratation et croissance du cristal, l’eau salée a été remplacée par de l’eau pure.

Les potentialités de cette méthode ont été démontrées en cristallisant la protéine xynalase comme montré à la figure 1.28. Néanmoins il reste à souligner quelques complications. Si les puits sont très pratiques pour le stockage de gouttes, comment récupérer les cristaux pour des analyse plus détaillées? De plus, la déshydratation en soufflant de l’air sec dans le canal de pervaporation est relativement rapide ce qui peut être un inconvénient pour une simple goutte. A l’opposé, réhydrater une goutte peut prendre quelques dizaines d’heures. Si les constantes de temps sont adaptées aux protéines, l’expérience peut devenir fastidieuse pour d’autres types de solutions (sels, surfactants, ...).

1.6. Objectifs du travail de thèse

L’objectif de la thèse est de progresser dans les méthodes de criblage de réactions chimiques en développant un outil microfluidique utilisant la pervaporation comme moteur de l’exploration de diagrammes de phases. Ces nouvelles méthodologies sont destinées à être utilisées par Rhodia pour caractériser, modifier et optimiser les propriétés physico-chimiques de nouveaux composants en vue de leur production à une échelle industrielle.

Dans ce contexte, Rhodia utilise actuellement la technologie microfluidique pour le criblage de réactions chimiques dans des microgouttes [27]. Nous avons décidé de nous concentrer plutôt sur le criblage de propriétés physico-chimiques de systèmes binaires et ternaires en considérant dans un premier temps des systèmes connus, comme un simple sel, un surfactant en solution ou une protéine modèle en présence d’un agent cristallisant. Ces systèmes constituent des étapes nécessaires de validation de la méthodologie proposée.

Des expériences préliminaires ont déjà été effectuées au laboratoire. Le processus de pervaporation a été étudié d’un point de vue théorique et expérimental dans des géométries linéaires [51]. A partir de ce point de départ, nous avons développé une nouvelle architecture originale pour l’exploration des propriétés de systèmes binaires et ternaires et nous avons choisi d’opérer dans des géométries nouvelles (des chambres plutôt que des doigts). De plus, nous avons inclus dans notre travail la perspective d’une parallélisation à grande échelle de manière à produire un criblage dense du diagramme de phase.

Cette thèse se présente en trois parties :

- La première concerne le système expérimental, de son développement en laboratoire à son utilisation. Les protocoles de fabrication permettant de réaliser des canaux de très grande hauteur sont détaillés ainsi que les techniques de fabrication par lithographie molle.

- La deuxième partie se concentre sur l'étude de réfractomètres intégrés et sur les mesures de concentrations *in situ* en temps réel, paramètre essentiel du criblage. Notre manière originale de procéder a permis de mettre en évidence les sursaturations observées dans les microsystemes confinés.
- La troisième partie est dédiée aux applications. Des expériences de criblages sont réalisées pour mieux comprendre le procédé de pervaporation. Les cinétiques mises en jeu sont exposées ainsi que les perspectives pour la continuité du projet.

Chapitre 2

Le Système expérimental

2.1. Conception d'un outil de criblage microfluidique

Concevoir un microsystème n'est pas toujours une chose aisée de prime abord. Il faut toujours avoir en tête les développements futurs comme dans notre cas le criblage à plus grande échelle. Il est nécessaire de connaître les limites des matériaux et les techniques de mises en forme afin de dimensionner correctement le microsystème et de simplifier l'utilisation en fonction du cahier des charges. En règle générale, chaque complication du système apporte nécessairement des contraintes supplémentaires dans sa fabrication.

Il existe toutes sortes de matériaux pour réaliser des microsystèmes fluidiques comme les verres, les polymères ou les colles photoréticulables [56]. Néanmoins, des matériaux polymères comme le PDMS semblent, ces dernières années, recueillir le plus de suffrages pour une réalisation rapide et présentent des particularités qui peuvent être utilisées avantageusement comme sa porosité aux gaz, aux solvants et sa flexibilité pour réaliser des membranes souples. D'ailleurs, cette élasticité devient essentielle pour la réalisation de vannes intégrées commandées en pression [57]. Nous avons choisi d'utiliser ce matériau dont la mise en œuvre est bien connue au laboratoire.

Ayant une expérience assez limitée dans les systèmes microfluidiques complexes, nous avons décidé de restreindre un nombre de chambres à six afin de bien maîtriser la fabrication avant de multiplier leur nombre. Le microsystème devra être conçu de telle manière à pouvoir évoluer par la suite. En outre, la pervaporation implique immédiatement un système sur deux niveaux de canaux et complique la procédure de fabrication.

Nous avons vu que pour certaines solutions comme les protéines, le criblage pouvait durer plusieurs jours. Avec des temps de référence aussi longs, il serait évidemment intéressant de pouvoir remplir le système facilement avec des concentrations variées pour ensuite isoler chaque zone de pervaporation. Cela nécessite un élément actif comme une vanne afin de pouvoir bloquer certains canaux et des réservoirs indépendants pour compenser l'évaporation générée.

Pour la partie pervaporation, nous avons opté pour des chambres au lieu de doigts. En effet, dans un doigt, la vitesse du flux dans le canal d'amenée varie en fonction de la position sous la

membrane. Nous avons voulu nous affranchir de cette contrainte avec un système gouverné dans la chambre par la diffusion (concentration constante au cours du temps) et dans les canaux d'amenée par l'advection (grand nombre de Péclet). En jouant avec la vitesse de pervaporation et en la diminuant (en soufflant de l'air humide dans le canal de pervaporation par exemple) on peut toutefois devenir dépendant de la diffusion et donc des volumes des solutions que l'on ne concentre plus localement.

Le microsystème va donc se diviser en deux parties. La première s'occupe du remplissage et de la formation d'un gradient de concentration stable. La seconde concerne l'isolation des chambres et de leur réservoir afin de pouvoir observer les transitions de phases même sur des durées de plusieurs heures sans risquer une contamination d'une chambre à l'autre.

2.1.1. La formation de gradients de concentration dans les microsystèmes

Dans la littérature, il existe plusieurs moyens pour réaliser des gradients de concentration dans des microsystèmes. De manière globale, tous exploitent la laminarité étendue des écoulements et peuvent être plus ou moins faciles à réaliser ou à contrôler. Quelques méthodes sont complètement passives comme le gradient par microtunnel [58] ou le réseau inventé par Georges Whitesides à l'Université de Harvard [59]. Certaines nécessitent une vanne comme le gradient longitudinal [60]. D'autres encore demandent deux niveaux de canaux comme le distributeur de flux [61]

Le gradient longitudinal

La formation de ce gradient de concentration se base sur la longueur de dispersion lorsque deux fluides se rencontrent dans un canal. En coupant cette diffusion à l'aide de vannes successives, il est possible de réaliser très rapidement (quelques secondes au maximum) un gradient de concentration [60]. On peut voir sur la figure 2.1a le schéma du microsystème avec le canal d'actionnement en forme de serpentin qui compartimente le canal de travail. La séquence de fermeture est présentée à la figure 2.1b-c-d-e et l'intensité en fluorescence de chaque chambre est présentée sur le graphique 2.1f.

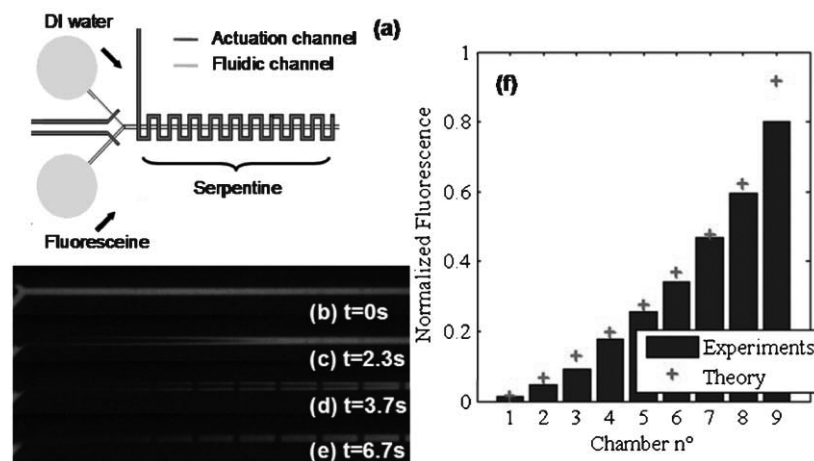


FIG 2.1 – Système de gradient longitudinal selon [60]. (a) Schéma du microsystème avec le canal d'actionnement en serpentin pour isoler chaque gradient. (b-e) Séquence de la formation du gradient avec dans l'ordre: injection de la fluorescéine, injection de l'eau, fermeture de la vanne et observation du gradient. (f) Graphique de la fluorescence observée dans chaque chambre.

Cette méthode, intéressante par sa rapidité, ne permet pas de récupérer le contenu de chaque chambre pour alimenter un système de pervaporation. De plus, chaque changement de mélange demande de refaire les calculs des vitesses d'injection et de temps de fermeture pour réaliser un gradient contrôlé et n'est donc pas forcément adapté pour l'usage que nous voulons en faire.

Le gradient à l'aide de microtunnels reliant deux canaux

Cette technique passive a pour avantage de pouvoir réaliser des gradients non linéaires en flux continu. Elle exploite la diffusion d'une solution depuis un canal principal vers un second à travers des microtunnels ou plutôt des microjonctions successives de longueurs variables [58]. Le schéma du microsystème est présenté sur la figure 2.2 à droite et le gradient est mesuré dans les cavités en bas du système (ligne en pointillés). En variant la longueur des microjonctions, il est possible de réaliser des gradient de forme convexe ou concave (FIG 2.2B-C).

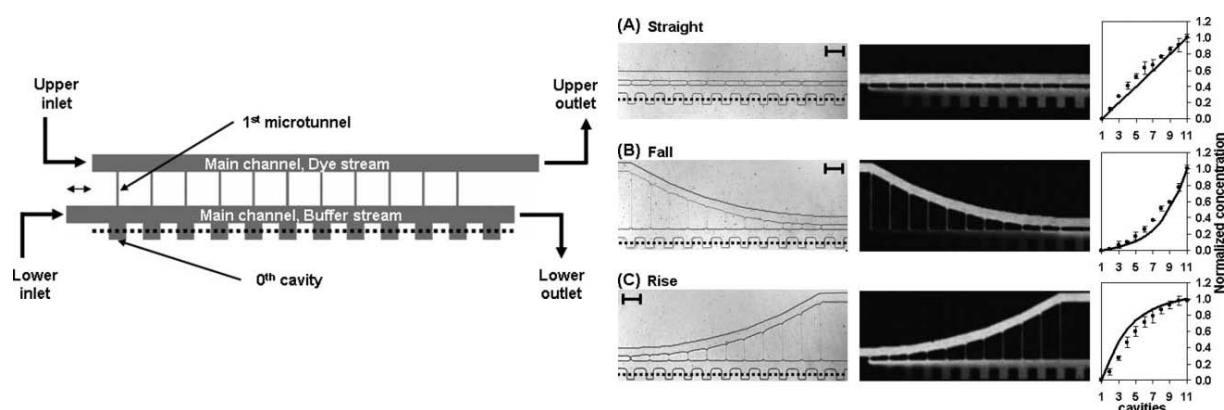


FIG 2.2 – Système de gradient par microtunnel d'après [58]. A gauche : Schéma du microsystème avec le canal d'entrée (en haut) séparé par 11 microtunnels du canal de travail et des cavités (en bas). A droite : Photo des microsystèmes de trois gradients différents et visualisation en fluorescence des profils de concentration reportés dans les graphiques de droite : (A) linéaire, (B) concave, (C) convexe. La barre d'échelle mesure $200\mu\text{m}$.

Si les microtunnels opposent déjà une forte résistance à l'écoulement de par leur petite taille ($20 \times 4\mu\text{m}$ contre $200 \times 20\mu\text{m}$ pour les canaux principaux), il n'est pas certain qu'ils soient utilisables avec des fluides plus visqueux. De plus, si ce gradient produit en continu est facile à mettre en œuvre pour baigner des cellules dans une cavité, il ne peut en aucun cas alimenter plusieurs canaux, ce qui le rend obsolète pour notre dispositif.

Le distributeur de flux : un microsystème à deux niveaux

Le distributeur de flux est un moyen élégant de réaliser un gradient de concentration car le résultat est indépendant du débit d'injection. Le principe est le suivant (FIG 2.3a) : deux canaux d'entrée de part et d'autre du système amènent les fluides au même débit dans des canaux fins et parallèles. A différentes distances des canaux d'entrée, on prélève ponctuellement le fluide. Le rapport des longueurs parcourues par chaque solution d'entrée dans le canal fin donne directement le rapport final du mélange en sortie.

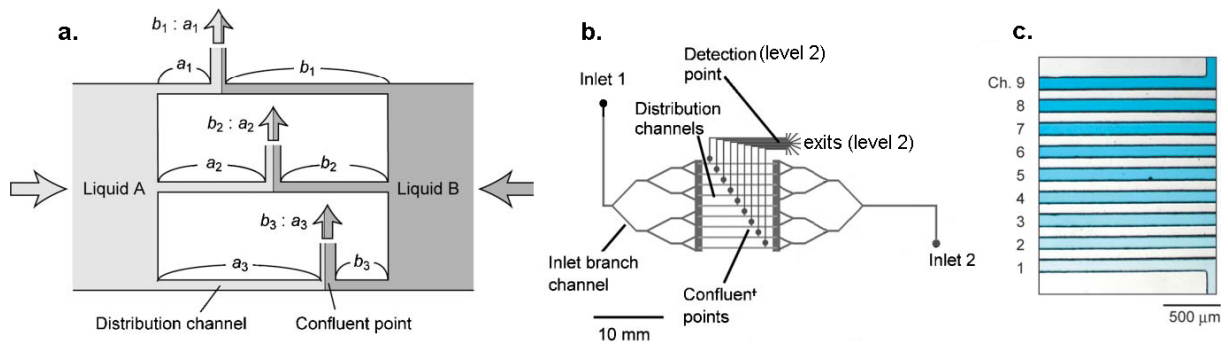


FIG 2.3 – Système de gradient par distribution de flux d'après [61]. (a) Principe de la formation du gradient. Le rapport des concentrations dans le canal après le point de confluence est égal au rapport des longueurs a - b du canal de distribution. (b) Schéma du gradient complet. Pour prélever le fluide et le distribuer plus loin, la géométrie oblige le système à se développer sur un second niveau. (c) Photo d'un gradient linéaire de bleu de méthylène dans de l'eau au point de détection.

Malheureusement, il est assez peu stable dans le temps selon les essais préliminaires que nous avons effectués et possède quelques contraintes de fabrication ainsi que d'utilisation qui le rendent peu probant pour notre fonction. D'après notre expérience, une petite variation sur les flux d'injection déséquilibre instantanément le gradient en sortie. De plus, sa géométrie nécessite de travailler sur deux niveaux de canaux indépendamment des membranes de pervaporation et alourdirait singulièrement la fabrication.

Le gradient formé par un réseau de canaux

La méthode du réseau est bientôt vieille de dix ans et possède encore aujourd'hui de nombreux adeptes [62]. Elle a pour avantage d'être très souple en fonction du gradient que l'on veut réaliser et permet de faire autant des gradients linéaires que logarithmiques en variant les longueurs des canaux [63]. Le réseau est formé un peu comme un arbre (FIG 2.4a). Comme présenté à la figure 2.4b-c, il possède plusieurs entrées (deux ou plus) et sépare et recombine les flux en prenant soin qu'ils aient le temps de diffuser l'un dans l'autre avant toute séparation. A chaque niveau, un canal supplémentaire est ajouté et les flux redistribués.

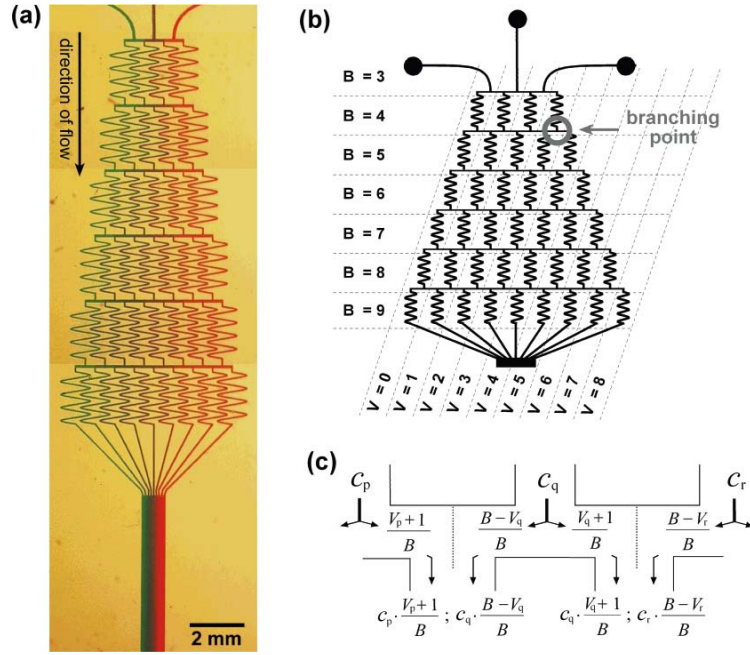


FIG 2.4 – Système de gradient par réseau selon [64]. (a) Photo d'un gradient de colorant d'un réseau à 3 entrées, 9 sorties et 6 niveaux. (b) Schéma du gradient et détail de la nomenclature utilisée pour caractériser les débits et les concentrations dans chaque branche du réseau. (c) Détail d'un embranchement et formules de calcul pour les concentrations de chaque niveau.

Si le débit d'entrée est connu ainsi que les concentrations, il est possible de les évaluer en sortie et de définir une longueur minimale de diffusion nécessaire dans les canaux verticaux. Pour 2 entrées et N sorties, il faut $N-2$ niveaux du réseau de distribution ce qui implique un grand nombre de canaux et un encombrement qui peut devenir conséquent. Afin de limiter la place nécessaire à la formation d'un gradient en réseau, il est envisageable d'enrouler l'arbre, comme on peut le voir à la figure 2.5. Si les canaux horizontaux sont suffisamment courts par rapport à ceux de diffusion, ils sont négligeables dans les calculs et la distribution est la même que pour un réseau en longueur [65].

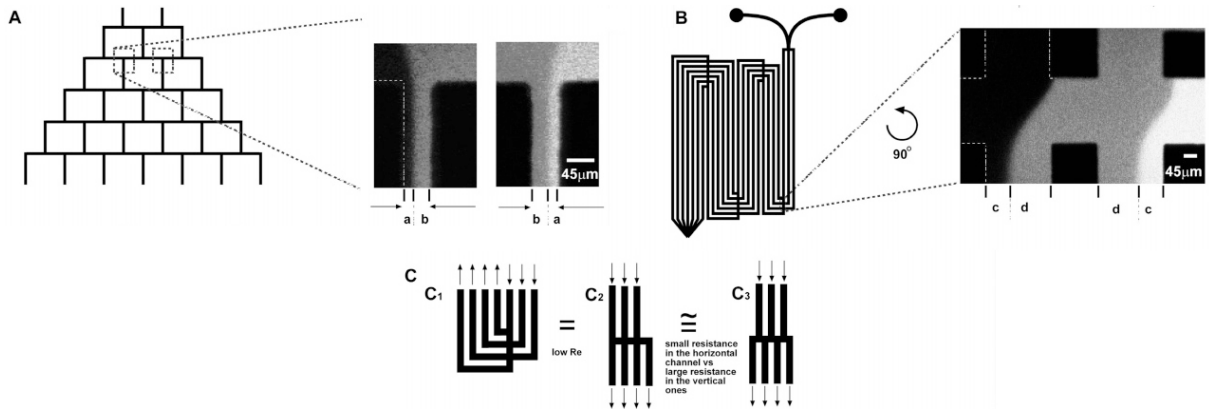


FIG 2.5 – Système du gradient par réseau compact selon [65]. (a-b) Comparaison des deux systèmes en observant les rapports de concentrations en sortie. (c) Schéma d'équivalence entre les deux conceptions. L'égalité est valable pour des écoulements à bas nombre de Reynolds et pour des résistances horizontales négligeables. Les flèches indiquent les entrées et sorties des flux.

Concevoir un gradient de cette façon comporte quelques avantages comme sa simplicité, sa souplesse au niveau des gradients envisagés ou sa stabilité dans le temps par rapport à d'autres méthodes exposées précédemment. Par contre, son utilisation est limitée dans une gamme de débit prédéfinie. Un changement de solutions et donc de coefficients de diffusion peut impliquer une modification du design sauf si les canaux verticaux ont été conçus suffisamment longs pour que les solutions aient le temps de diffuser. Néanmoins, chaque sortie supplémentaire implique un niveau additionnel de canaux et le réseau peut vite devenir dense. Malgré tout, cette méthode semble la plus appropriée pour remplir nos systèmes de pervaporation en une fois et très simplement avec seulement deux entrées et un encombrement qui peut être légèrement limité.

2.2. Le dimensionnement du système de criblage

2.2.1. Définition de la hauteur des canaux de travail

Inclure une vanne étanche dans un microsystème implique forcément un microcanal arrondi qui est réalisable avec une résine positive, comme nous allons le détailler dans la partie fabrication. Ce type de résine est généralement très fluide et est principalement destiné à des masquages d'un ou deux microns d'épaisseur dans les techniques classiques de fabrication. Utiliser une telle résine sur des hauteurs de plusieurs dizaines de microns demande un savoir-faire particulier. En raison de cette vanne, nous avons limité la hauteur générale des canaux de travail à $h=20\mu m$. De plus, une faible hauteur est aussi un avantage pour l'homogénéité de la chambre lors de la pervaporation.

2.2.2. Définition de la membrane

La vitesse de pervaporation a été définie dans des travaux précédents pour des membranes en PDMS d'épaisseur $e=10\mu m$ et une vitesse de pervaporation associée de $v_e=50nm/s$ [55]. Nous avons choisi de travailler avec une membrane plus épaisse afin de diminuer un peu la vitesse de pervaporation. Comme nous allons le voir par la suite, la cinétique est déjà particulièrement rapide. On fixe l'épaisseur de notre membrane à $e=20\mu m$. La vitesse de pervaporation se définit théoriquement comme suit [52] :

$$J = \frac{Dc_{sol}}{e} = v_e c_{H_2O} \quad (2.1)$$

On en tire :

$$v_e = \frac{D}{e} \frac{c_{sol}}{c_{H_2O}} \quad (2.2)$$

Avec $D=10^{-9}cm^2/s$ le coefficient de diffusion de l'eau dans le PDMS, $c_{sol}=30mol/m^3$ la solubilité de l'eau dans le PDMS et $c_{H_2O}=1kg/L=55.56 \cdot 10^3 mol/m^3$ la concentration de l'espèce à pervaporer (nous avons ici 100% de H_2O pour le calcul). On estime la vitesse de pervaporation pour notre microsystème à $v_e=27nm/s$, valeur parfaitement cohérente avec la littérature.

Afin de contrôler en tout point l'épaisseur de la membrane pour que la pervaporation soit homogène, nous avons pris la décision de la fabriquer indépendamment des deux niveaux de canaux. Cette décision améliorera le contrôle sur la pervaporation mais va limiter les développements futurs du système en arrêtant à deux le nombre total de niveaux de canaux réalisables (FIG 2.6).

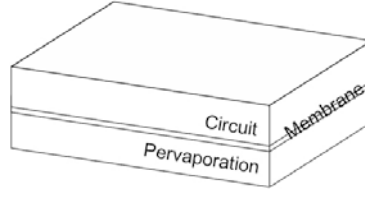


FIG 2.6 – Schéma de la structure du microsystème avec ses trois couches de PDMS correspondantes.

2.2.3. Caractérisation des chambres de pervaporation

La géométrie que nous avons utilisée comprend des chambres à l'intérieur desquelles la pervaporation se fait et des canaux entièrement dédiés au transport du soluté. Cette géométrie présente deux avantages : elle est facilement parallélisable et la concentration des solutés peut se faire dans des conditions homogènes. Ce dernier point nous distingue de la géométrie en doigt qui met en œuvre des champs de concentration inhomogène qui rendent l'interprétation difficile [66]. D'un point de vue opérationnel, le système doit être conçu de telle manière à ce que le nombre de Péclet dans la chambre soit bien inférieur à 1 (dominé par la diffusion en considérant des échelles de temps supérieures à la diffusion) alors que le nombre de Péclet dans le canal doit être bien supérieur à 1 (pour favoriser le transport). En pratique, nous avons imposé un rapport 10 : 1 entre la largeur d'une chambre et celle du canal, soit $l_{ch}=500\mu m$ et $l_{ca}=50\mu m$. (FIG 2.7).

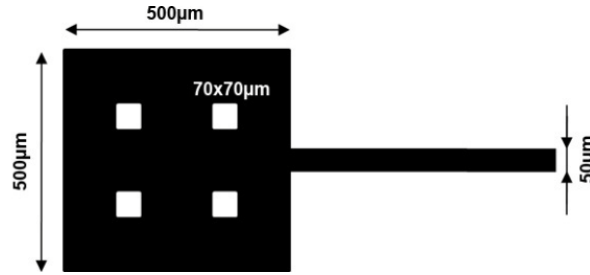


FIG 2.7 – Dimensions d'une chambre de pervaporation et son canal d'alimentation. Les zones blanches à l'intérieur de la chambre sont des piliers de soutien pour la membrane.

Pour fixer des ordres de grandeur, considérons une expérience de concentration de fluorescéine. Le coefficient de diffusion vaut $D=3\cdot 10^{-6}cm^2/s$. En connaissant le débit moyen de pervaporation dans la chambre ($v_e=27nm/s$), on peut aisément estimer le temps t_2 nécessaire pour doubler la concentration initiale, c'est-à-dire pervaporer le volume entier de la chambre :

$$t_2 = \frac{h}{v_e} = 740s = 12 \text{ min } 20s \quad (2.3)$$

Avec $h=20\mu m$ la hauteur de la chambre. Estimons maintenant le temps τ_D de diffusion dans la moitié de la chambre :

$$\tau_D = \frac{l_{ch}^2}{8D} = 1 \text{ min } 45s \quad (2.4)$$

On voit que pour cette expérience, on a $\tau_D < t_2$. On peut donc considérer que la concentration est homogène pendant la pervaporation. Ce résultat peut être exprimé en utilisant les nombres de Péclet. La condition $\tau_D < t_2$ revient à dire que le nombre de Péclet dans la chambre doit être largement inférieur à 1. Effectivement, on trouve :

$$Pe_{ch} = \frac{v_e l_{ch}^2}{8Dh} = 0.141 \quad (2.5)$$

Regardons maintenant le canal d'amenée. En considérant que le débit dans le canal Q_{ca} induit par la pervaporation est égal au débit de la pervaporation Q_e , on estime la vitesse dans le canal avec surface de la chambre $S_{ch}=500 \times 500 \mu m^2$ et celle du canal $S_{ca}=h \cdot l_{ca}=20 \times 50 \mu m^2$:

$$Q_e = v_e S_{ch} = v_{ca} S_{ca} = Q_{ca} \quad (2.6)$$

On trouve, pour cette expérience, $v_{canal}=6.75 \cdot 10^3 \text{ nm/s}$. Introduisons le nombre de Péclet dans le canal, définit par :

$$Pe_{ca} = \frac{v_{ca} l_{ca}}{D} = 1.125 \quad (2.7)$$

Le fait que nous trouvons $Pe_{ca} > 1$ indique que le transport domine face à la diffusion et donc que le canal d'amené est principalement dédié au transport. En conclusion, on peut considérer la solution comme homogène dans la chambre où la diffusion prend le pas sur l'advection. L'inverse se produit dans le canal. Ce qui apparaît ici pour la fluorescéine s'est trouvé vrai aussi pour les solutés que nous avons utilisés au cours de cette thèse, sauf pour le cas de l'AOT que nous discuterons ultérieurement.

Comment maintenant ces deux zones se raccordent ? Commençons par définir une chambre à la concentration C_1 et son canal d'amenée à la concentration C_0 en supposant le système dans un état quasi stationnaire. La figure 2.7 présente les longueurs et concentrations de référence de ce calcul.

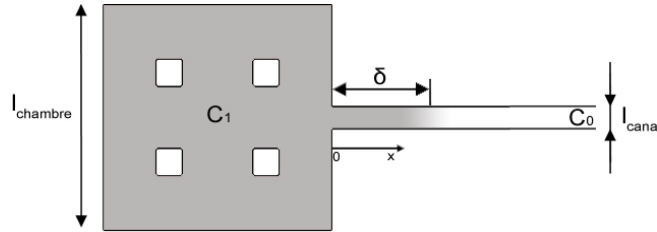


FIG 2.8 – Longueurs et concentrations de référence lorsqu'une chambre de concentration C_1 diffuse dans le canal de concentration C_0 ($C_1 > C_0$) selon l'axe x .

On peut calculer que le profil de concentration a pour expression:

$$C(x) = C_0 + (C_1 - C_0) e^{-\frac{xv_{ca}}{D}} \quad (2.8)$$

Posons δ , la longueur de diffusion :

$$\frac{\delta}{l_{ca}} = \frac{D}{v_{ca} l_{ca}} = \frac{1}{Pe_{ca}} \quad (2.9)$$

On trouve $\delta=44 \mu m$ qui représente la longueur suivant laquelle le soluté contenu dans la chambre diffuse dans le canal d'amenée. Cette valeur correspond à la photo de la figure 2.9 pour l'expérience avec la fluorescéine où l'on peut voir que δ est de l'ordre de grandeur de la largeur du canal.

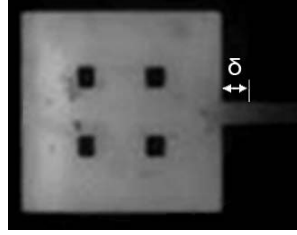


FIG 2.9 – Expérience de concentration de fluorescéine par pervaporation. La longueur de diffusion dans le canal d'amenée est de l'ordre de grandeur de la largeur du canal.

Pour prendre en compte cet effet, considérons la quantité de matière contenue dans δ :

$$M = \int_{-L}^0 C(x) dx = C_0 L + \int_{-L}^0 (C_1 - C_0) e^{\frac{xU}{D}} dx = C_0 L w + \frac{D}{U} (C_1 - C_0) w \quad (2.10)$$

Et on peut définir une surface efficace par l'expression:

$$S_{eff} = l_{chambre}^2 + \frac{l_{canal}^2}{Pe_{canal}} \left(1 - \frac{C_0}{C_1} \right) \quad (2.11)$$

Cette surface représente la surface "réelle" de la chambre⁴. En pratique, on opère dans des conditions telles que cette surface efficace est proche de la surface de la chambre.

Nous pouvons donc valider les dimensions du système de pervaporation reportées à la figure 2.7. Remarquons que nous avons ajouté des piliers afin de garantir la planéité de la membrane lors de la pervaporation.

Considérons maintenant le canal de pervaporation. De manière à optimiser la surface de pervaporation, le canal de pervaporation passera exactement au dessus des chambres et aura donc la même largeur. De plus, pour diminuer la pression sur la membrane, le canal de pervaporation devra être le plus haut possible. A l'heure actuelle, les canaux ne dépassent pas $500\mu m$ de haut car les résines ne sont pas adaptées pour de si grandes hauteurs [67]. Nous verrons par la suite qu'il est possible d'aller encore plus haut suivant quelques astuces de fabrication.

2.2.4. Dimensionnement des vannes étanches

Pour réaliser une vanne étanche, il faut respecter deux contraintes. Le canal de travail doit être arrondi et la zone de déflexion suffisamment grande pour que la membrane vienne obstruer correctement la zone concernée. Selon les dimensions définies précédemment nous avons un canal de largeur $w=50\mu m$ et de hauteur $h=20\mu m$ à fermer à l'aide d'une membrane en PDMS d'épaisseur $e=20\mu m$.

Selon [57], la zone de déflexion de la vanne doit être dix fois supérieure à sa hauteur. En fonction de ce critère, nous calculons une surface de membrane l_v^2 avec $l_v=200\mu m$. Il sera donc nécessaire d'élargir le canal à l'endroit exact de la vanne. De plus, nous définissons la largeur du canal d'activation à $300\mu m$. Sachant que ce canal va être fabriqué en même temps que celui de

⁴ Une analyse comparable peut être faite avec les canaux reliant la chambre aux vannes, mais nous ne la développons pas ici.

pervaporation, il sera par conséquent de même hauteur ($>500\mu m$) et un rapport d'aspect trop faible rend les moules trop fragile.

2.2.5. Le réseau de formation du gradient

Nous avons choisi de commencer nos expériences avec un nombre de chambres limité à 6. Selon la méthode de calcul présentée dans [64], nous avons calculé les débits et les concentrations de chaque branche d'un réseau à deux entrées et donc 4 niveaux. Les résultats sont présentés à la figure 2.10 avec les rapports de concentration pour chaque branche (en bleu la solution A et en vert la solution B) et les débits pour chaque niveau (en gris en bas).

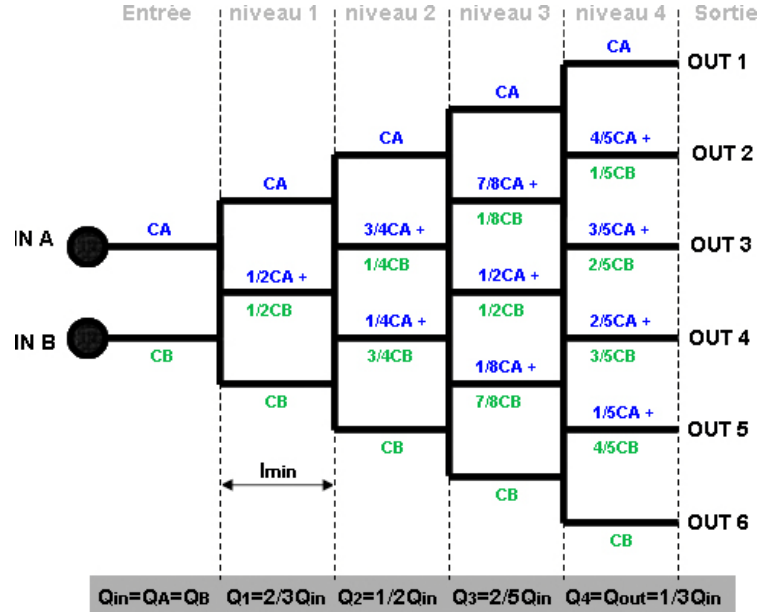


FIG 2.10 – Système de gradient à 2 entrées et 6 sorties. Les débits de tous les canaux de chaque niveau sont dans le cadre gris. Les rapports de concentration des solutions A et B de chaque branche sont présentés en bleu et vert et les rapports en sortie sont de : $out_1=100\% C_A$, $out_2=80\%C_A+20\%C_B$, $out_3=60\%C_A+40\%C_B$, $out_4=40\%C_A+60\%C_B$, $out_5=20\%C_A+80\%C_B$ et $out_6=100\% C_B$.

De plus, nous avons défini une longueur minimale de mélange qui correspond à la branche de diffusion avec le plus fort débit. Pour des débits d'injection classique de l'ordre d'une dizaine de microlitres par minute, la vitesse moyenne U_1 dans la branche de niveau 1 sera de :

$$U_1 = \frac{Q_1}{hw} = \frac{2}{3} \frac{Q_{in}}{hw} \quad (2.12)$$

Et la longueur minimale l_{min} est définie par :

$$l_{min} = \tau U_1 = \frac{h}{2D} \frac{Q_{in}}{3w} \quad (2.13)$$

Avec $h=20\mu m$, $w= 50\mu m$, $Q_{in}=15\mu L/min$ et $D=3\cdot 10^{-6} cm^2/s$, la vitesse de diffusion de la fluorescéine, on obtient une longueur minimale de $l_{min}=5.56cm$. Nous allons donc fixer une même longueur pour tous les niveaux de $l=6cm$, afin de pouvoir utiliser le microsystème avec différentes solutions aux vitesses de diffusions plus petites comme les sels ou plus grandes comme les protéines

sachant que nous avons aussi la possibilité de diminuer le débit d'entrée si nécessaire. Les coefficients de diffusions des principales particules utilisées lors de cette thèse sont référencés dans la figure 2.11.

Systèmes	D (cm ² /s)
eau	10 ⁻⁵
glycérol	1.06·10 ⁻⁵
sel	2·10 ⁻⁵
fluorescéine	3·10 ⁻⁶
lysozyme	5·10 ⁻⁶

FIG 2.11 – Tableau présentant quelques ordres de grandeurs des coefficients de diffusion à 20°C pour des molécules diffusant dans l'eau, tiré de [10] et de [68] pour le coefficient de la protéine.

Afin de maintenir l'équilibre du gradient de concentration, il est essentiel que toutes les sorties aient la même résistance, c'est-à-dire la même longueur de canaux. Nous avons aussi choisi de limiter l'encombrement pour des développements futurs en enroulant le réseau.

2.2.6. Conception du microsysteme de criblage

Nous présentons à la figure 2.12, le schéma final du microsysteme défini par les contraintes imposées par la microfabrication, la pervaporation et les choix que nous avons fait. Le remplissage se fait par les deux entrées A et B de la gauche vers la droite. Une fois le systeme rempli, on ferme la vanne centrale pour isoler les chambres. L'alimentation de la pervaporation se fait alors par les sorties, de droite vers la gauche.

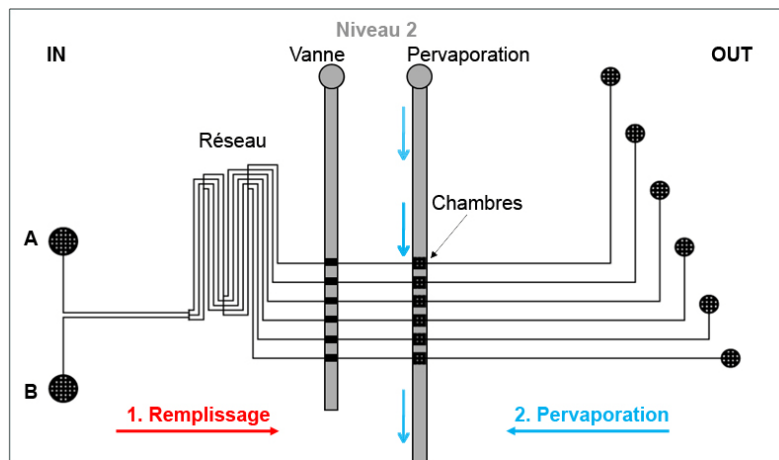


FIG 2.12 – Schéma général du microsysteme. On reconnaît les deux étages de canaux (le deuxième niveau est en gris). Dans un premier temps, on remplit le microsysteme. Ensuite, on ferme la vanne et l'étape de pervaporation débute en soufflant de l'air sec ou humide dans le canal correspondant.

Par cette méthode astucieuse, on remplit pour chaque chambre, via le systeme de réseau, un réservoir individuel que l'on utilisera en deuxième partie d'expérience comme représenté à droite de la figure 2.13. La vanne est fermée et le systeme chambre/réservoir est donc isolé. Les dimensions précédemment calculées des canaux (en microns) sont aussi rappelées sur ce schéma.

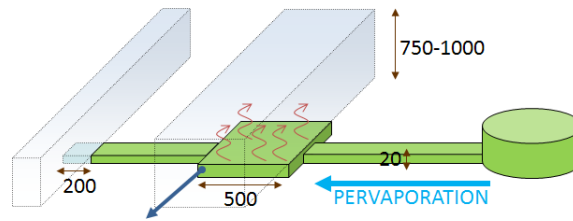


FIG 2.13 – Schéma d'une chambre de pervaporation lorsque la vanne est fermée. La chambre est isolée des autres et reliée à son propre réservoir d'alimentation. Lorsque la pervaporation est enclenchée, la chambre se concentre sous la membrane. Les dimensions du système sont exprimées en microns.

2.3. La microfabrication

2.3.1. Les méthodes de fabrications employées lors de cette thèse

A l'origine, les techniques de fabrication en microfluidiques se sont apparentées à la microélectronique avec des technologies de mise en œuvre nécessitant des investissements importants et réservées à des laboratoires bien équipés. Ces méthodes de fabrication sont qualifiées de "dures" et font références aux matériaux utilisés : le verre et le silicium. Les techniques de fabrication dites "douces", en référence à la mise en œuvre des élastomères ou des plastiques, ont permis de démocratiser petit à petit la microfabrication. Elles demandent toutefois un espace de travail propre et nécessitent, pour la fabrication des moules, une salle blanche équipée d'un éclairage inactinique. Dans ce travail, nous avons été amenés à travailler principalement avec les techniques douces. Ce sont ces dernières que nous allons détailler par la suite. Néanmoins, nous parlerons brièvement de la technique de gravure humide sur silicium qui nous a permis de réaliser un microsystème modèle avec un contrôle sur les parois des canaux que nous n'aurions jamais pu réaliser avec une méthode douce.

2.3.2. Les procédés de lithographie douce

Description brève du procédé

La méthode de lithographie douce est couramment utilisée dans le laboratoire pour réaliser entre autre des systèmes en PDMS. Le matériau est transparent, peu fluorescent et se moule avec une grande précision (environ $100nm$). De plus, ses propriétés élastomériques facilitent les connectiques puisqu'il joue naturellement le rôle de joint [69].

Les étapes de fabrication d'un microsystème fluide en PDMS sont les suivantes. Pour commencer, on dessine à échelle réelle le microsystème qui va être reproduit sur un masque transparent. Ensuite, on fabrique un moule où les canaux sont en relief sur un substrat en silicium. Le PDMS liquide est ensuite coulé, puis réticulé sur le moule. Finalement vient une étape de perçage des connectiques pour accéder aux canaux microfluidiques et de collage du microsystème sur un substrat de verre ou de PDMS pour fermer les canaux.

La réalisation des masques

Il y a plusieurs méthodes pour fabriquer des masques qui vont déterminer la qualité finale du microsystème. Chaque conception de microsystème commence par un dessin à l'échelle des canaux (L-Edit, Illustrator). La plus rapide (quelques heures de réalisation) et la moins coûteuse (~10€) est une impression à l'encre noire de ce dessin sur un film transparent à l'aide d'une imprimante à haute définition (>3600dpi, technique d'impression par "flashage"). Avec une telle méthode, il peut être délicat de descendre à des largeurs de canaux inférieurs à $20\mu\text{m}$ et les parois ne sont pas complètement perpendiculaires par rapport au substrat. Avec un masque en chrome, la définition est grandement améliorée, les parois sont pratiquement perpendiculaires mais le coût (~300€) et les délais de fabrication (2-3 semaines) deviennent conséquents [70]. Les deux types de masques pour un même microsystème sont présentés à la figure 2.14 ainsi que le résultat des canaux en PDMS (à droite). Les canaux sont mieux dessinés et les profils sont plus verticaux avec un masque en chrome (FIG 2.14c).

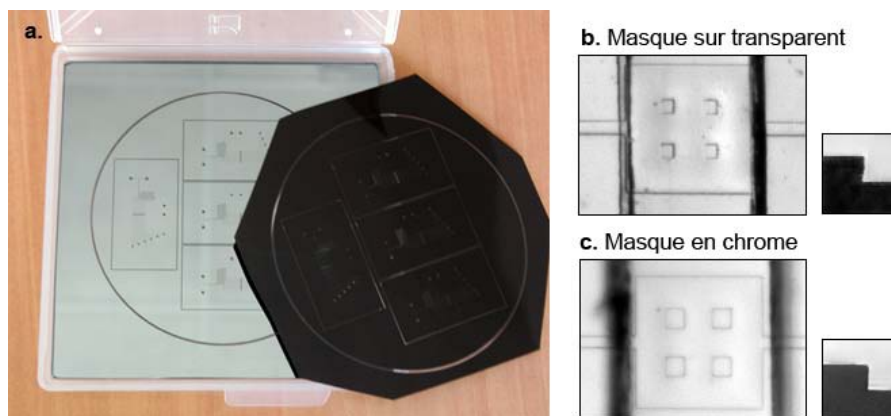


FIG 2.14 – (a) Photo de deux types de masques du même motif : à gauche le masque en chrome, à droite le masque sur film transparent. (b) Chambre de pervaporation en PDMS réalisée avec le masque sur transparent. Le profil de la paroi est légèrement incliné (photo de droite). (c) Même chambre de pervaporation en PDMS réalisée avec un masque en chrome. Les piliers au centre de la chambre sont mieux dessinés et la paroi est presque perpendiculaire (photo de droite). Pour rappel : les chambres font $500 \times 500 \mu\text{m}$ et la hauteur de la paroi est de $20 \mu\text{m}$.

La fabrication des moules

Les moules sont réalisés par une photolithographie classique dans une salle blanche et sous éclairage inactinique. Une couche de résine photosensible d'épaisseur contrôlée est d'abord étalée sur un wafer en verre ou en silicium. Ensuite, on illumine le wafer avec une source UV à travers le masque. Les zones insolées dans le cas des résines positives ou non insolées pour les résines négatives seront éliminées lors de l'étape de gravure. Il ne reste, au final, que les structures en relief qui forment ainsi le moule du microsystème [71]. Il faut compter entre une heure et un jour de travail en fonction de la hauteur finale de résine et de la complexité du moule.

Mise en œuvre de la résine négative

Les résines négatives utilisées au laboratoire sont de la gamme SU8 (Microtech Corporation) et sont traditionnellement faites pour être étalées sur des hauteurs variant entre 1 et $100 \mu\text{m}$. Elles contiennent un catalyseur photo-actif qui permet la réticulation de la résine par chauffage de celle-ci après illumination sous UV. Les structures obtenues sont celles qui ont été insolées et elles sont de section rectangulaire. Le procédé est illustré à la figure 2.15 et détaillé par la suite.

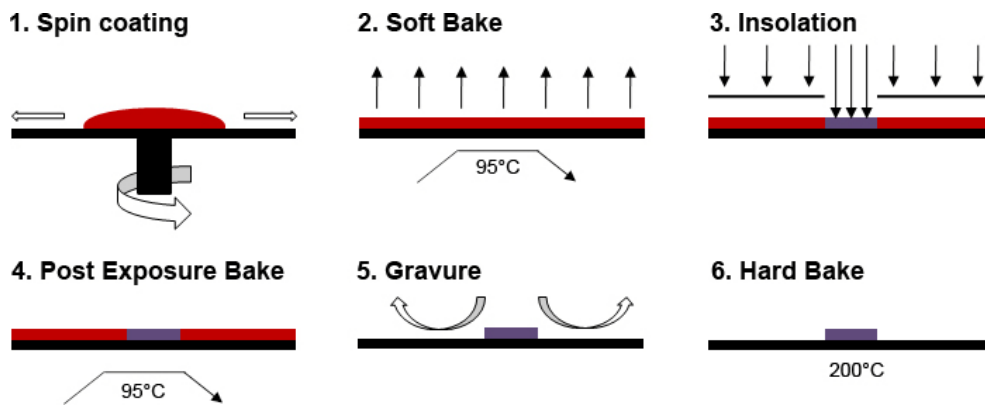


FIG 2.15 – Etapes de fabrication d'un moule avec de la résine négative.

- 1. Nettoyage du wafer en silicium :** on commence le procédé de fabrication par nettoyer le wafer aux solvants (acétone, toluène, éthanol) avant de le mettre pendant quelques minutes à 200°C pour le déshydrater. Cette étape, bien que facultative, permet une meilleur adhérence de la résine.
- 2. Spin coating de la résine :** la résine est déposée sur environ 50 à 70% de la surface du wafer que l'on fait tourner 40s entre 1000 et 3000 *tr/min*. L'épaisseur finale dépend de la viscosité de la résine utilisée (qui varie fortement avec la température) et de la vitesse de rotation. Il est fondamental de réguler la température pour avoir un protocole reproductible.
- 3. Soft bake :** le wafer est immédiatement chauffé pendant un temps dépendant de son épaisseur (de 2min à 15min environ) afin de faire évaporer le solvant et avoir une couche solide. Cette étape nécessite quelques précautions car la résine ne supporte pas les chocs thermiques. Soit le wafer est placé sur une rampe en température, soit il est amené avec un premier palier à 65°C, puis à 95°C afin de minimiser les contraintes mécaniques.
- 4. Insolation de la résine :** le wafer est ensuite illuminé par une source UV (20mW/cm²) à travers le masque (de quelques secondes à plusieurs dizaines de secondes en fonction de la hauteur de résine). Les zones insolées libèrent un acide fort qui va permettre ensuite la réticulation. Il existe aussi des filtres qui améliorent le rendement de la lampe sur la résine. Par contre, il est utile de les utiliser uniquement avec des masques de bonne qualité car les défauts se transfèrent avec netteté sur la résine.
- 5. Post exposure bake :** cette étape de chauffage est réalisée avec le même soin et environ la même durée que précédemment. Le chauffage à 95°C démarre la réaction de réticulation sur les zones insolées.
- 6. Gravure :** le wafer est plongé dans un développeur qui va graver les zones non réticulées. Plus les structures sont fines et hautes et plus il faut du temps (traditionnellement jusqu'à 10min). Un rinçage à l'isopropanol permet de stopper le processus de développement et de visualiser la résine résiduelle par des trainées blanches.
- 7. Hard bake :** un chauffage final à 200°C pendant environ 15-20min permet de consolider la résine et améliore son adhérence sur le wafer.

Protocole pour des épaisseurs de 750µm à 1mm (résine négative)

Comme expliqué précédemment, les canaux de pervaporation nécessitent des hauteurs nettement supérieures aux fabrications traditionnelles de moule en résine négative. La mise en œuvre est inspirées d'un procédé sur 500µm mis au point par Rhodia et nécessite de répéter plusieurs fois le processus de spin coating et de soft bake [67].

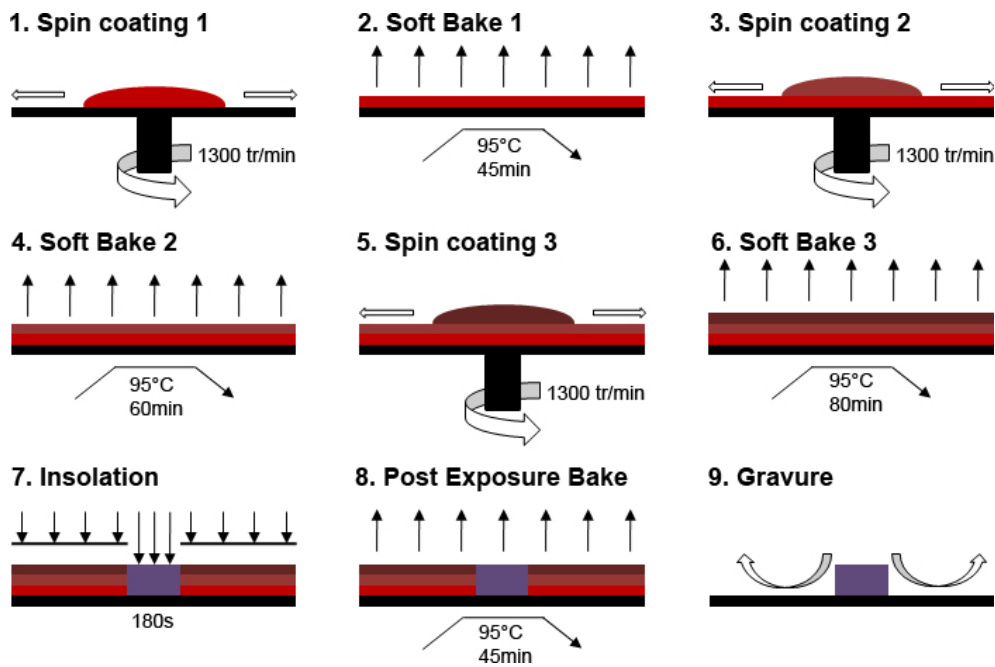


FIG 2.16 – Protocole de fabrication d'un moule triple couches de résine négative SU8 2100.

- 1- 6. **Spin coating et soft bake en trois fois** : la résine SU8 2100 (Microtech Corporation), très visqueuse, est traditionnellement utilisée pour des épaisseurs de $100\mu m$. Ici, en ralentissant la vitesse de rotation à 1300 tr/min du spincoater, on réalise des couches de 250 à $320\mu m$. Pour arriver à $750\mu m-1mm$ de hauteur, on alterne une étape de spin coating et de soft bake avec un temps d'évaporation à chaque fois plus conséquent. Il est nécessaire que le wafer soit bien à plat lors de ces étapes car les temps sont suffisamment longs pour que la résine coule et que la couche finale ne soit pas droite.
7. **Insolation** : afin d'insoler la résine en profondeur, il est important de laisser le wafer au moins dix fois plus longtemps sous une lampe UV ($20mW/cm^2$) que lors d'un procédé classique. Cette étape nécessite d'être attentif aux masques utilisés car ceux de basse qualité (masque sur transparent) ont tendance au bout d'environ $150s$ de laisser passer quelques rayons. Ces derniers vont venir créer une fine couche réticulée en surface très difficile à retirer lors de la gravure.
8. **Post exposure bake** : cette étape qui permet la réticulation est identique à celle utilisée lors d'un procédé classique mais simplement plus longue à cause de la hauteur de résine.
9. **Gravure** : la gravure d'un tel moule demande de rester minimum $15-25min$ dans le bain de développeur.

Le moule obtenu est assez délicat. En effet, il est très sensible aux variations de température et ne supporte généralement pas les étapes de séchage avec un gaz inerte ou un hard bake. Il permet de réaliser que deux ou trois moulages avant que les canaux ne commencent à se décoller. Afin de pouvoir malgré tout fabriquer un grand nombre de microsystemes sans devoir réaliser presque à chaque fois un moule, nous effectuons, immédiatement après fabrication, un contre-moulage en PDMS à partir duquel nous allons pouvoir dupliquer un grand nombre de fois le moule, mais cette fois en PDMS. Cette méthode est parfaitement adaptée pour des structures de largeur supérieure à $50\mu m$ comme le canal de pervaporation ou le canal d'activation que nous avons défini [72].

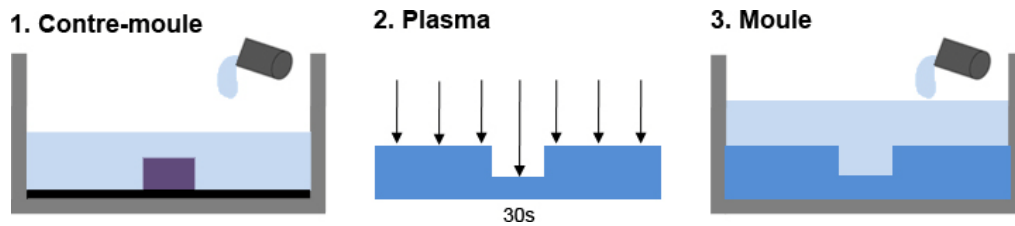


FIG 2.17 – Protocole de réplcation d'un moule.

- 1. Fabrication du contre-moule** : à partir du moule en silicium et résine, on coule un contre-moule en PDMS que l'on fait réticuler 30min à 71°C.
- 2. Activation de la surface** : le contre-moule est exposé pendant 30s à un plasma d'oxygène afin de modifier la surface et empêcher l'adhérence du PDMS liquide lors de la prochaine étape.
- 3. Fabrication du moule en PDMS** : le moulage PDMS-PDMS est réalisé. On coule le PDMS directement sur le contre-moule. Après réticulation, il faut délicatement séparer les deux couches. Le moule est directement utilisable pour réaliser des canaux en PDMS après une étape sous plasma.

Procédé de fabrication pour la résine positive

La résine positive comme la SPR220-7 (Shipley) est une résine conçue pour des opérations de masquage d'épaisseur inférieure à $10\mu m$. Ici, on l'utilise sur une hauteur de $20\mu m$ en détournant légèrement le protocole de fabrication classique. Cette résine a pour avantage de pouvoir réaliser des canaux de forme arrondie qui sont indispensables dans le procédé de fabrication d'une vanne. Contrairement à la résine négative, les photons initient une cascade de réactions chimiques qui dégradent la résine. Les structures obtenues sont celles qui n'ont pas été insolées et elles sont de section parabolique.

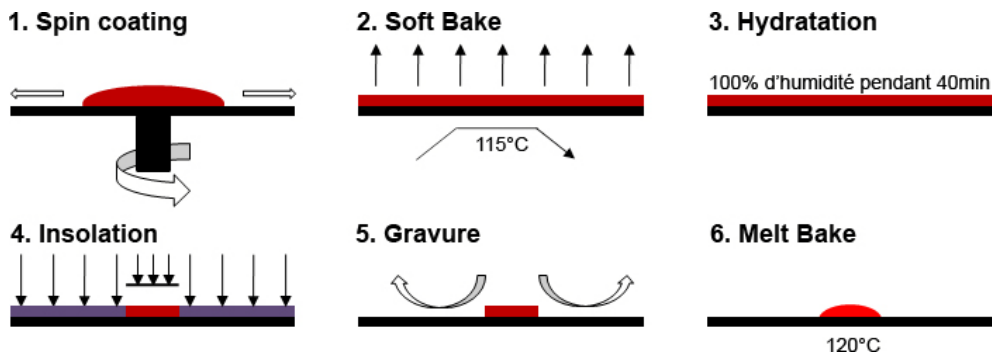


FIG 2.18 – Etapes de fabrication d'un moule avec de la résine positive.

- 1. Préparation du wafer en silicium** : après nettoyage aux solvants et déshydratation du wafer, on étale de l'hexaméthylsiloxane (ou HDMS) à 3000tr/min pendant 30s afin de faciliter l'adhérence de la résine sur le wafer.
- 2. Spin coating de la résine** : la résine est déposée sur environ 50 à 70% de la surface du wafer. Comme elle est très peu visqueuse, il est nécessaire de réaliser un spin-coating rapide (10s à environ 1000tr/min) afin de garantir la hauteur finale. Il est ensuite indispensable de laisser reposer 5min la résine avant l'étape suivante.
- 3. Soft bake** : le wafer est ensuite chauffé d'abord rapidement à 65°C, ensuite à 115°C pendant un temps dépendant de son épaisseur (quelques minutes environ) afin de faire évaporer le solvant et avoir une couche solide. Comme précédemment, il faut éviter les chocs thermiques.

4. **Mesure de l'épaisseur** : sur un coin du wafer, on gratte la résine afin de connaître sa hauteur réelle à l'aide d'un profilomètre. Cette indication est nécessaire pour calculer le temps d'illumination sous la lampe UV.
5. **Hydratation** : la résine doit être hydratée dans une enceinte humide pendant 40min avant insolation. Les UV déclenchent une réaction chimique qui consomme de l'eau. Une bonne hydratation garantit le rendement de l'insolation
6. **Insolation de la résine** : le wafer est ensuite illuminé par une source UV (20mW/cm^2) munie d'un filtre G (436nm). La quantité d'énergie nécessaire est de l'ordre de 110mJ/cm^2 pour $1\mu\text{m}$ de résine. Afin d'éviter la surchauffe de la résine, l'insolation se fait en plusieurs étapes en respectant un temps de pose de 30s entre chacune. Si la résine s'assombrit nettement, elle a surchauffé. Si au contraire des bulles apparaissent, elle manque d'hydratation.
7. **Gravure** : le wafer est plongé dans un développeur qui va graver les zones exposées aux UV. Le rinçage se fait à l'eau déionisée (DI) car la résine positive ne supporte aucun solvant. Le moule doit être nettoyé après chaque fabrication à l'eau.
8. **Melt bake** : un chauffage final à 120°C de quelques minutes permet de faire fluier la résine positive car c'est un polymère à l'état vitreux. Le résultat final est de forme parabolique.

2.3.3. Le protocole de gravure humide sur silicium

La gravure humide fait partie des procédés de lithographie dure et concerne toute les protocoles d'attaques chimiques en phase liquide. Dans le cadre de cette thèse, nous avons été amenés à réaliser le moule d'un canal trapézoïdal contrôlé de $20\mu\text{m}$ de profondeur à l'Institut d'Electronique Fondamentale de l'Université Paris Sud. Pour cette réalisation, nous avons utilisé le masque en chrome d'un canal droit et un wafer en silicium orienté $\langle 100 \rangle$. Le procédé de gravure à l'hydroxyde de potassium (KOH) est anisotrope et n'a donc pas la même vitesse d'attaque selon la densité des différents plans cristallins. Comme on peut le voir sur la figure 2.19, la gravure est plus rapide verticalement ($400 : 1$) et crée un plan de biais d'un angle de 54.7° caractéristique au silicium selon la direction cristalline $\langle 111 \rangle$ [73].

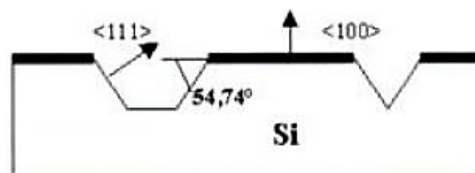


FIG 2.19 – Géométrie d'une gravure anisotrope d'un wafer en silicium orienté $\langle 100 \rangle$ selon [73].

Les étapes du protocole de fabrication d'un tel moule sont les suivantes :

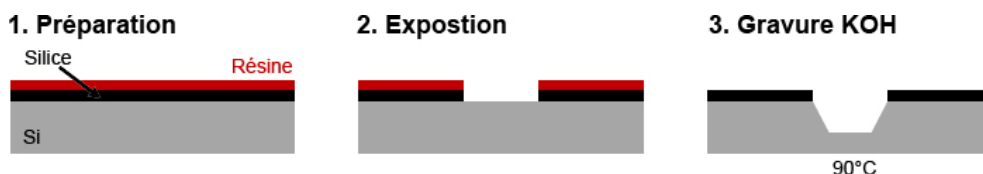


FIG 2.20 – Etapes de fabrication d'un moule en silicium avec gravure anisotrope.

1. **Préparation du wafer** : le wafer est mis sous oxydation thermique humide à 1000°C pendant 50min afin de créer une couche épaisse de silice (SiO_2).
2. **Spin coating d'une résine négative** : on dépose ensuite une fine couche de résine S1813 (Shipley) de $1.3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à 4000tr/min qui va servir de masque pour graver la silice.
3. **Gravure des couches protectrices** : on insole la résine comme pour le protocole présenté précédemment à travers un masque en chrome en s'alignant sur les plans cristallins grâce aux méplats du wafer. Ensuite, on développe pour mettre à nu les parties de silice que l'on va éliminer par gravure RIE (Reactive Ion Etching) pendant 3min . Cette gravure sèche attaque uniquement la silice et la résine sert à son tour de masque.
4. **Gravure humide au KOH** : le wafer est plongé dans de l'acide fluorhydrique (HF) $1 : 9$ pendant 5s pour supprimer la résine résiduelle puis immergé pour 12min (temps de gravure pour une hauteur de $20\mu\text{m}$) dans un bain de KOH à 90°C .
5. **Réplication du moule** : finalement, on coule du PDMS sur le wafer pour créer un moule en relief de forme trapézoïdale.

2.3.4. Le moulage du PDMS

La dernière étape de fabrication d'un microsystème est la réalisation de ce dernier en faisant réticuler le PDMS sur les moules soigneusement préparés. Les différentes parties sont ensuite assemblées et des trous sont percés pour accéder aux canaux. Concernant le collage des divers morceaux du microsystème, il existe plusieurs méthodes qui vont influencer la fabrication. Il est possible de réaliser des collages PDMS-verre ou PDMS-PDMS de manière réversible ou irréversible.

Il existe deux types de PDMS au laboratoire, le RTV 615 (General Electric) et le Sylgard 184 (Corning) qui se présentent sous la forme de deux bidons: d'un côté le PDMS contenant les fonctions chimiques pouvant réticuler et de l'autre un agent réticulant. Le mélange énergique des deux constituants déclenche la réticulation qui peut avoir lieu à température ambiante (une nuit) ou accélérée dans une étuve à 71°C (une heure).

Parmi les adhérences réversibles, le PDMS réticulé est simplement nettoyé à l'éthanol et posé sur une lamelle de verre ou de PDMS propre puis laissé une heure à l'étuve. Ce collage permet de résister à des pressions allant jusqu'à 1bar et le microsystème est facilement séparable. Dans le cas d'un système nécessitant des canaux devant résister à des pressions proche de 1bar comme c'est le cas du canal d'actionnement d'une vanne, il est nécessaire de réaliser un collage plus solide. Nous utilisons deux méthodes au laboratoire. Le collage par plasma d'oxygène active les surfaces à mettre en contact. L'adhérence est immédiate, la technique très rapide (30s à 1min sous plasma) mais irréversible. Elle empêche donc tout alignement de deux couches de PDMS. La seconde méthode est la technique par gradient de réticulant. Elle nécessite un contrôle précis du temps de réticulation de la résine (environ 40min en moyenne) afin que les deux couches ne soient pas complètement réticulées. Lors de la mise en contact, il est possible de redécoller les couches et de les réaligner tant que le microsystème n'est pas repassé à l'étuve. Par cette méthode, la réticulation se fait aussi entre les deux couches. Lorsqu'en plus on varie la proportion classique de PDMS et de son réticulant pour chaque partie ($10 : 1$ contre $20 : 1$ et $1 : 5$), on favorise ces échanges et on solidifie le collage. Pour ce type d'adhérence, notre expérience a montré que les microsystèmes pouvaient résister jusqu'à 4bar de pression [74]. Nous allons donc utiliser la technique par gradient de réticulant pour fabriquer le microsystème.

Protocole de fabrication du microsystème en PDMS

A partir d'un moule sur silicium pour les canaux de travail exécuté avec des parties arrondies pour les vannes, d'un moule en PDMS pour les canaux de grande hauteur et d'un simple wafer en silicium pour réaliser la membrane, nous allons fabriquer un microsystème tout en PDMS avec deux niveaux de canaux séparés par une fine membrane et assemblés par gradient de réticulant. Il faut compter 4h de travail pour réaliser une série de quatre microsystèmes.

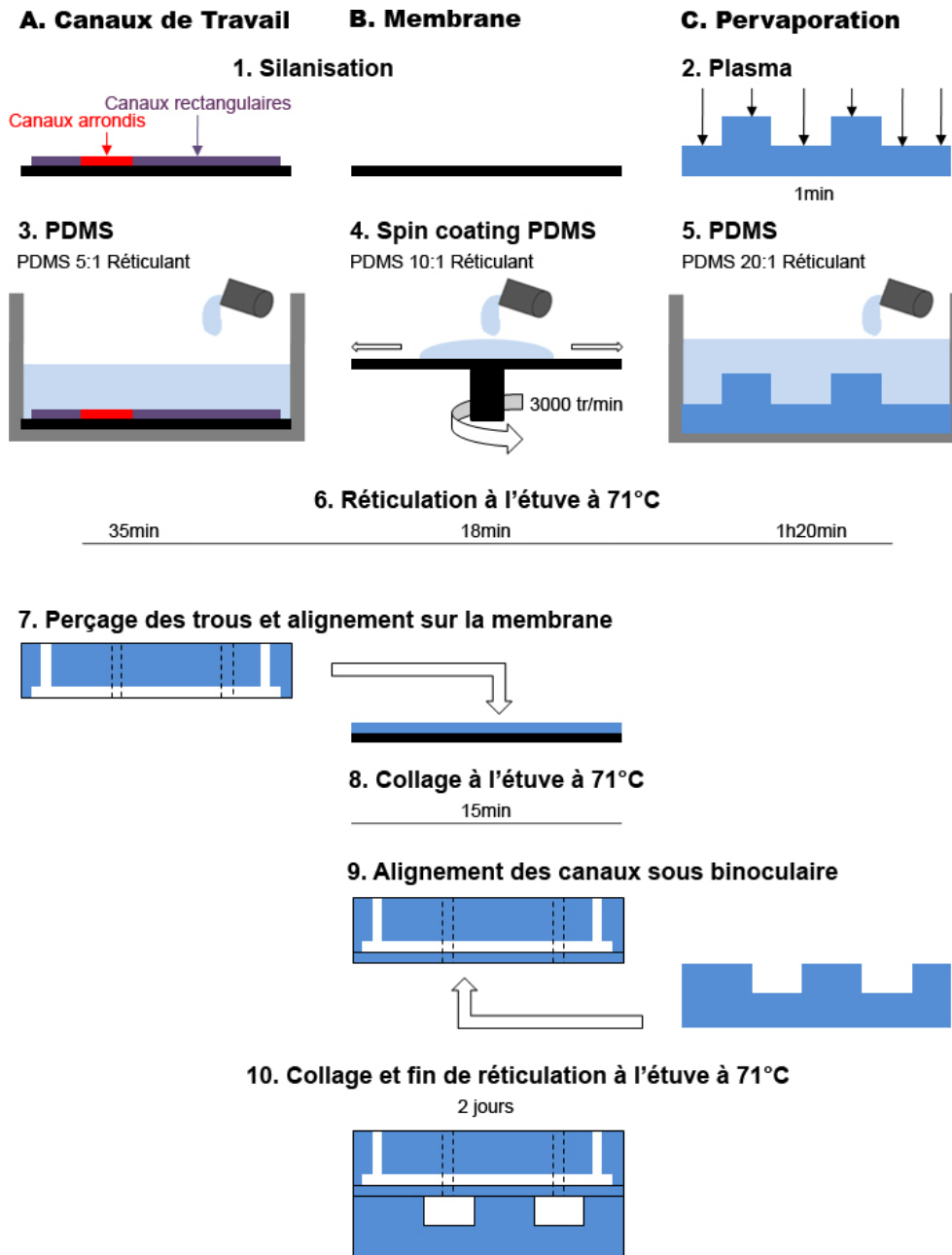


FIG 2.21 – Etapes de fabrication d'un microsystème dédié au criblage par pervaporation.

- 1. Préparation des moules :** les deux moules en silicium sont silanisés par un dépôt de HDMS en phase vapeur afin de permettre le démoulage. En parallèle, le moule en PDMS est exposé pendant 1min à un plasma d'oxygène pour la même raison.
- 2. Préparation du PDMS :** on prépare trois mélanges de PDMS (RTV 615). Une petite quantité (10g) avec un rapport de polymère et de réticulant de 10 :1 que l'on va centrifuger à

3000tr/min afin de réaliser une membrane de $20\mu\text{m}$. Deux plus grandes quantités (40g) avec un ratio de 1 :5 pour les canaux de travail et un ratio de 1 :20 pour les canaux de grande hauteur vont être coulées directement sur les moules. Afin de limiter les bulles d'air, le PDMS est préalablement centrifugé pendant 1min à 3000tr/min et les moules sont ensuite mis sous une cloche à vide pendant 30min après écoulement du PDMS autour des structures.

3. **Réticulation du PDMS** : les trois moules sont déposés à plat dans une étuve à 71°C pendant un temps correspondant à la hauteur de PDMS à réticuler et au dosage en agent réticulant (entre 18 et 45min). Cette étape nécessite une attention particulière. En effet, le PDMS doit être tout juste réticulé pour garantir une bonne adhérence entre les couches mais pas trop non plus car les structures démoulées ne doivent pas s'écrouler.
4. **Préparation des connectiques et premier collage** : on démoule délicatement le PDMS avec l'empreinte des canaux de travail. Le système est détourné et les trous de connexion fluide sont percés. Les surfaces de collage doivent rester parfaitement nettes et ne doivent pas être touchées. Le tout est délicatement posé sur la membrane et son wafer puis mis à l'étuve à 71°C pour 15min afin de solidifier suffisamment le collage. Après cette étape, nous allons pouvoir décoller ensemble les deux couches de PDMS.
5. **Deuxième collage avec alignement** : la dernière couche de PDMS avec les canaux de pervaporation et d'activation de la membrane est démoulée et détournée. Les trous destinés à connecter cette couche sont allongés en perçant la membrane aux endroits correspondants. On procède ensuite au collage en s'aidant d'une loupe binoculaire. Bien que l'œil permette d'aligner jusqu'à $50\mu\text{m}$ de précision, l'épaisseur du PDMS rend la tâche difficile à vérifier avec précision.
6. **Réticulation finale** : le microsystème est posé temporairement sur une lamelle de microscope pour lui servir de support pendant la phase finale de réticulation. Il est nécessaire de le laisser au moins deux jours à l'étuve pour garantir la totale réticulation du PDMS et éviter d'éventuels collages irréversibles de membranes au niveau des vannes. Le microsystème de criblage est maintenant opérationnel.

2.4. Protocole d'une expérience de criblage par pervaporation

Tout comme le microsystème est en deux parties, les expériences se déroulent en deux étapes : une première étape de remplissage et une seconde de pervaporation. La température ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) et l'humidité (30 à 40% environ) sont dictés par la pièce. Les produits proviennent en général de chez Sigma Aldrich. Lorsque cela ne sera pas le cas, nous le préciserons. Il est possible de faire varier la température localement à l'aide d'une platine chauffante Peletier inversée (Linkam PE94 de -5°C à 100°C) et de souffler de l'air sec ou humide dans le canal de pervaporation avec un banc de génération d'humidité (Calibrage, modèle BGH, de 0% à 90%). L'utilisation de ces appareils sera précisée ultérieurement à chaque fois que nous y avons eu recours.

2.4.1. Le remplissage du microsystème

Le microsystème est préalablement dégazé pendant 30min dans une cloche à vide afin de faciliter le remplissage des canaux et diminuer les risques de bulles d'air par un effet de pompage passif. Ainsi le caractère hydrophobe du PDMS ne pose pas de problèmes [75]. On remplit le canal d'activation des vannes avec un tube souple contenant de l'eau DI et relié à une source de pression. Le tube souple est en tygon et a un diamètre intérieur de 0.51mm . Comme on peut le voir sur le schéma

2.22, il est emmanché de force sur un tube en inox (diamètre extérieur de 0.64mm , longueur 15mm , Phymep). Les trous réalisés dans le PDMS avec un emporte pièce de 0.72mm se rétrécissent au cours de la réticulation. Le tube en inox est donc aussi emmanché de force dans le microsysteme. Ce type de connectique très rapide peut tenir facilement jusqu'à 4bar de pression.

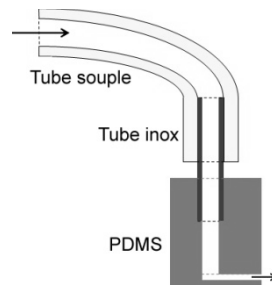


FIG 2.22 – Schéma d'une connectique avec un tube inox.

On prépare, ensuite, une seringue (SGE, 1mL) de solution de notre choix pour chaque entrée (A et B) que l'on relie de la même façon que précédemment à notre microsysteme. Chaque seringue est alors posée sur un pousse-seringue (Harvard Apparatus PHD 2000) qui contrôle le débit d'injection ($\mu\text{L}/\text{min}$). Tant qu'il y a de l'air dans le microsysteme, le gradient de concentration n'est pas stabilisé et les solutions éliminées en sortie. Cet équilibre est vérifiable à l'aide d'une loupe binoculaire ou un microscope en changeant l'angle d'éclairage, par biréfringence ou en fluorescence selon les produits utilisés.

Lorsque le gradient est équilibré, on connecte chaque réservoir aux sorties. Les réservoirs sont en fait des tubes en polyéthylène d'un diamètre intérieur de 0.38mm emmanchés à nouveau dans un tube inox et d'une longueur de 25cm (volume total : $115\mu\text{L}$). On attend alors que le microsysteme se remplisse.

2.4.2. Le démarrage de la pervaporation

Lorsque les réservoirs sont pleins, on pressurise rapidement le canal d'activation de la vanne à 0.6bar et on stoppe l'injection des deux pousse-syringes. On connecte ensuite le tube de pervaporation au microsysteme, toujours par la même méthode, et on commence à souffler l'air commandé par une source de pression (2mbar) pour débiter la pervaporation contrôlée. L'expérience peut durer d'une heure à plusieurs jours. Le microsysteme est posé pendant toute la durée de l'expérience sous une loupe binoculaire, un macroscope ou un microscope relié à une caméra CCD sensible noir et blanc (Hamamatsu ORCA-AG, deep cooled digital camera 12 bit). Une image est réalisée à temps régulier (toutes les 15s à 30min par le programme HiPic). Finalement, le stack d'images est analysé par le programme Image J et/ou monté en film.

2.5. Expériences de caractérisation

2.5.1. Caractérisation des états de surface des parois des canaux

Nous avons voulu caractériser l'état de surface des canaux et le profil des parois pour les méthodes de microfabrication décrites précédemment. Ces données vont être importantes pour la suite de ce travail. Les trois types de microsystemes obtenus, tous de $20\mu\text{m}$ de haut sont les suivants :

- microfabrication avec un masque sur film transparent et résine négative pour des parois peu lisses et légèrement de biais.
- microfabrication avec un masque en chrome et résine négative pour des parois lisses et droites et un canal rectangulaire.
- microfabrication à partir d'un moule en silicium gravé par KOH pour des canaux de forme trapézoïdale.

Afin de les caractériser, nous avons tout d'abord mesuré le profil des canaux au microscope en coupant le système PDMS en tranches avec une lame de rasoir. La coupe du circuit fluide ne déforme pas le profil car le rapport d'aspect des canaux mesuré ne varie pas. Ensuite, nous avons vérifié l'état de surface général par microscopie électronique à balayage (MEB) en métallisant préalablement le PDMS. Nous avons pu constater que les profils correspondent à nos prévisions mais seul le moule trapézoïdal garantit la reproductibilité car le procédé de gravure est très contrôlé. Concernant les états de surface, les observations montrent des surfaces lisses sauf pour le moule réalisé en résine négative avec un masque transparent. Pour ce dernier, on observe une surface irrégulière et gaufrée à intervalle d'environ $1\mu\text{m}$ comme on peut le voir sur la photo 2.23a. Au contraire, on observe sur la photo 2.23b des parois lisses obtenues avec un masque en chrome.

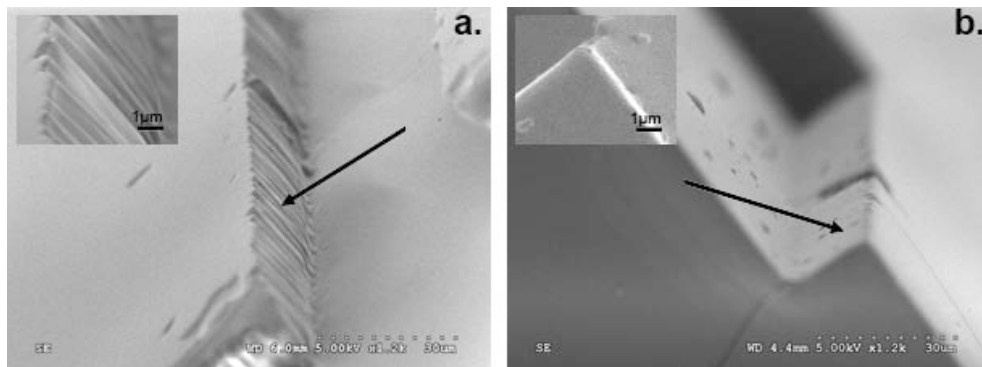


FIG 2.23 – Photos prises au MEB pour montrer la rugosité des parois en PDMS, la barre d'échelle est de $30\mu\text{m}$. Comparaison entre un système réalisé avec un masque sur film transparent avec paroi irrégulière (a) et un masque en chrome avec une paroi lisse (b). Les flèches indiquent la position des parois. Deux agrandissements ont aussi été réalisés (coin haut gauche).

Les résultats de ces observations sont résumés dans le tableau suivant :

Profil du microsystème	Photo et profil (microscope)	Etat de surfaces (MEB)
Canal droit, masque sur film transparent	 Profil non droit dû à la qualité du moule.	gaufré et peu régulier
Canal droit, masque en chrome	 Profil perpendiculaire à la surface	lisse
Canal trapézoïdal, fabrication par gravure humide du silicium	 Profil contrôlé par la structure du silicium	lisse

FIG 2.24 – Tableau résumé des profils et états de surface des parois des microsystèmes.

On constate que la méthode la moins coûteuse et la plus rapide (masque transparent, résine négative) fournit les états de surface les plus rugueux et les profils les moins réguliers au contraire des autres méthodes de fabrication d'un microsystème fluide.

2.5.2. Mesure de la vitesse de pervaporation et validation du microsystème

Afin de valider le procédé de pervaporation, nous avons effectué des expériences avec de la fluorescéine éclairée sous lumière UV. Nous avons réalisé une solution aqueuse de fluorescéine $30\mu M$ tamponnée avec du PBS (1x), pH 7.4. Pour les concentrations observées et à pH constant, l'intensité lumineuse reste proportionnelle à la concentration en fluorescéine.

Nous avons réalisé un gradient de concentration en fluorescéine sur les six chambres de notre microsystème et suivi l'évolution de l'intensité lumineuse en fonction du temps à température de la pièce ($25\pm 2^\circ C$). Dans la première chambre, la concentration initiale de fluorescéine est de $30\mu M$. À l'opposé, la sixième chambre ne contient que la solution tamponnée. La concentration en fluorescéine des quatre chambres intermédiaires est le résultat d'un gradient linéaire entre ces deux solutions (respectivement 24, 18, 12 et $6\mu M$).

Lorsque nous avons commencé à pervaporer dans les microchambres (pression de l'air sec dans le canal de pervaporation : $2mbar$), nous avons pu observer au cours du temps une augmentation localisée de la fluorescence. Nous voyons à la figure 2.25, l'évolution au cours du temps de la quatrième chambre. Ces premières observations nous confirment le fonctionnement du procédé de pervaporation.

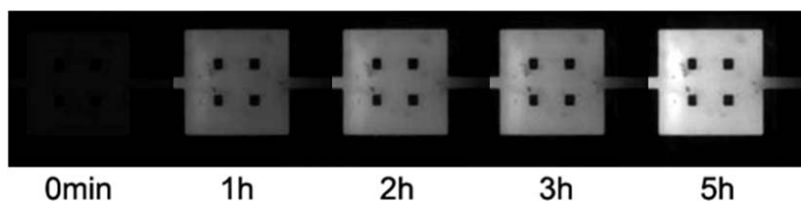


FIG 2.25 – Evolution de l'intensité d'une chambre au cours du temps sous pervaporation (air sec, pression dans le canal de $2mbar$). La concentration d'origine est une solution aqueuse de fluorescéine $12\mu M$, tamponnée avec du PBS (1x), pH 7.4.

Nous avons relevé périodiquement l'intensité lumineuse de chaque chambre pendant la durée de l'expérience. Ces résultats sont reportés sur le graphique 2.26. Nous constatons que l'évolution de l'intensité des chambres est linéaire dans le temps, ce qui signifie que la vitesse de pervaporation est la même pour toutes les chambres. Nous pouvons donc aussi affirmer que la concentration évolue aussi de manière constante en fonction de la concentration de départ de chaque chambre.

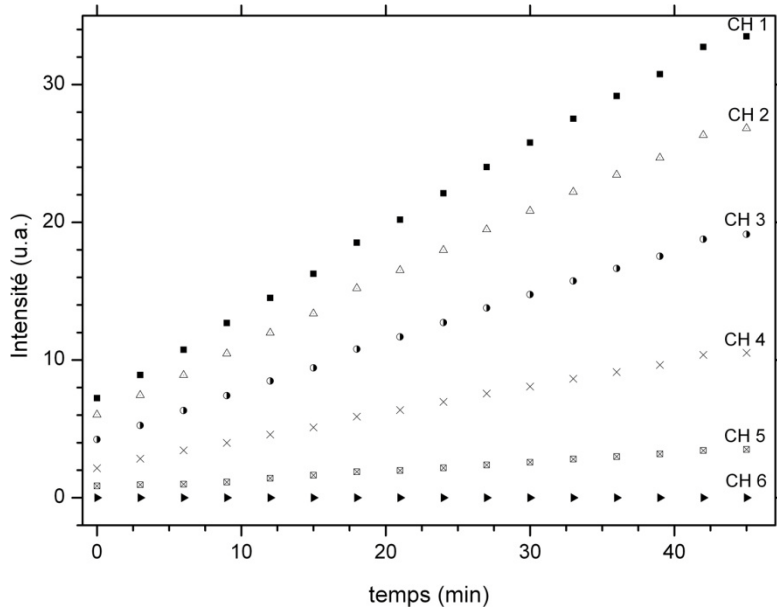


FIG 2.26 – Intensités des chambres au cours du temps sous pervaporation (air sec, pression dans le canal de 2mbar).

Sur le graphique 2.20, nous pouvons directement mesurer la vitesse de pervaporation en observant la pente de l'évolution de chaque chambre au cours du temps. Nous évaluons le temps t_2 pour doubler la concentration d'une chambre à 14min. Et donc une vitesse de pervaporation v_e de :

$$v_e = \frac{h}{t_2} = 23.8 \text{ nm/s} \quad (2.14)$$

Avec $h=20\mu\text{m}$ la hauteur du système. Ces valeurs sont cohérentes avec celles trouvées par calcul aux équations 2.2 et 2.3 ($v_e=27\text{nm/s}$ et $t_2=12\text{min}20\text{s}$).

De plus, notre réseau de formation du gradient fonctionne correctement d'après l'intensité lumineuse de chaque chambre au début de l'expérience. Cette expérience nous permet aussi de vérifier l'étanchéité des vannes et donc l'isolation de chaque microsystème chambre/réservoir pendant la pervaporation. La linéarité de l'évolution de l'intensité lumineuse de chaque chambre permet de dire qu'il n'y a pas de contamination et que chaque chambre évolue de manière indépendante lorsque les vannes sont fermées.

Chapitre 3

Le réfractomètre intégré

3.1. Introduction

Ces dernières années, la recherche microfluidique s'est principalement intéressée aux moyens pour mélanger deux fluides dans un microsystème [20, 76, 77] et beaucoup moins sur les moyens pour obtenir des données quantitatives sur la concentration. Il existe des méthodes intrusives comme l'ajout de traceurs fluorescents pour suivre l'évolution de la concentration sous écoulement [78] ou encore des procédés qui introduisent un capteur, des électrodes, une fibre optique ou un réfractomètre dans le microsystème [79-82]. Nous allons détailler quelques unes de ces méthodes du point de vue de la mise en œuvre et de la sensibilité de la détection. Cela permettra de positionner notre propre instrument de mesure, un réfractomètre intégré que nous avons développé.

3.2. Les méthodes de mesure de concentration dans des microsystèmes

3.2.1. Mesure de la concentration à l'aide de traceurs fluorescents en solution

Le principe de mesure de concentration *in situ* en solution par traceurs fluorescents repose sur l'excitation de ces derniers par une source laser et sur la mesure de la quantité de photons émise. L'intensité émise I_f donne une information sur leur densité et donc sur la concentration du liquide porteur [78]. Elle est exprimée par :

$$I_f = I_e \Phi \epsilon_e c \quad (3.1)$$

Avec I_e l'intensité d'excitation, Φ le rendement quantique, ϵ_e le coefficient d'absorption molaire de la source d'excitation laser et c la concentration en particules fluorescentes. La méthode généralement choisie en microfluidique pour l'illumination de l'échantillon est de délivrer la lumière d'excitation à travers la lentille de l'objectif (FIG 3.1a). Sur le schéma, à gauche, la lumière excite les

particules contenues dans le canal. A droite, les fluorophores émettent de la lumière qui est captée par l'objectif.

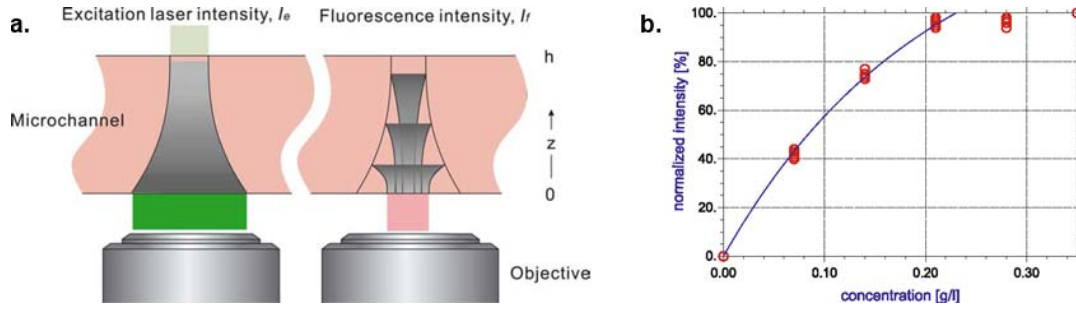


FIG 3.1 – Schéma du principe de mesure et graphique de calibration selon [78]. (a) La lumière produite par une source laser excite les particules fluorescentes qui vont émettre à leur tour des photons captés par l'objectif. (b) Graphique de l'intensité de fluorescence captée en fonction de la concentration en Rhodamine (fluorophore). Chaque cercle rouge correspond à une mesure. L'émission sature à 0.20g/l de traceurs, ce qui peut poser problème pour mesurer des concentrations qui croissent avec le temps.

Cette analyse nécessite un accès optique au microcanal, des matériaux insensibles à la lumière dans les longueurs d'ondes d'intérêts (excitation et émission) et des liquides optiquement transparents. De plus, l'intensité émise par les traceurs fluorescents varie avec le pH d'une solution, la température et le photobleaching. Il est nécessaire de calibrer au préalable le procédé en étudiant l'émission du traceur comme présenté à la figure 3.1b. Sur le graphique, le fluorophore sature et marque ainsi la limite de détection en intensité. Selon [78], ce type de mesure permet d'évaluer la concentration d'une solution à environ $\pm 4\%$ mais, elle a le désavantage d'être une technique intrusive.

3.2.2. Mesure de la concentration d'une solution dans un capillaire par réfractométrie

Ce réfractomètre propose de mesurer l'indice de concentration dans un capillaire en silice à l'aide de deux fibres optiques. Le principe est d'illuminer le capillaire par une source laser (He-Ne) et de mesurer à distance fixe l'intensité lumineuse collectée (FIG 3.2a). Selon [81], le capillaire est considéré comme une lentille dont la distance focale f change avec l'indice de la solution selon l'équation :

$$\frac{1}{f} = (n_l - n_m) \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad (3.2)$$

Avec n_l l'indice variable de la lentille, n_m l'indice du milieu ($n_m=1.41$ si c'est du PDMS) et $r_1=-r_2$ le rayon de courbure du capillaire. Lorsque l'indice de réfraction de la lentille est inférieur à celui du milieu, la lentille est vue comme un élément négatif et le cône de sortie diverge. Quand les deux indices ont la même valeur, la distance focale est très grande et le cône de sortie reste constant. A partir du moment où l'indice du milieu est plus petit que celui de la lentille, celle-ci est vue comme un élément positif et le cône de sortie converge. Les variations du cône lumineux modifient l'intensité collectée par la seconde fibre optique. La figure 3.2b présente une simulation de la variation du cône lumineux après diffraction en fonction de l'indice de la solution.

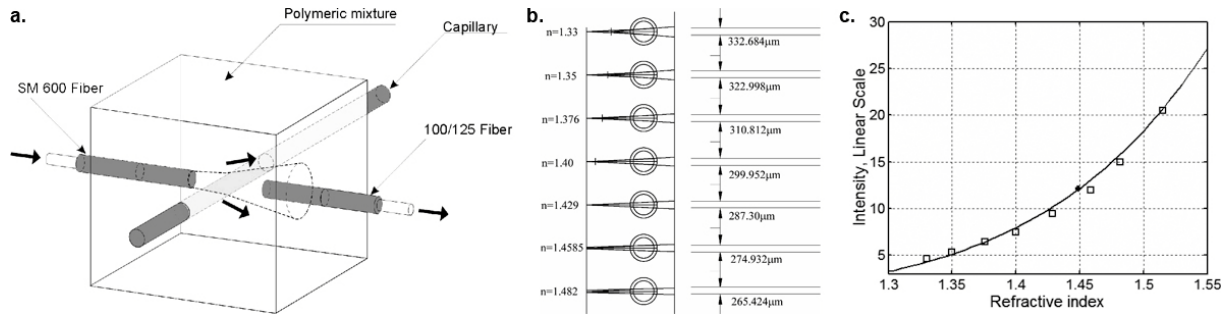


FIG 3.2 – Schéma du réfractomètre, simulation et graphique d'après [81]. (a) La lumière du laser traverse le capillaire et est captée par une seconde fibre. (b) Simulation de la largeur du cône de sortie en fonction de l'indice de la solution contenue dans le capillaire. (c) Graphique de calibration de l'intensité lumineuse collectée en fonction de l'indice de réfraction du liquide.

Ce réfractomètre demande un alignement précis des fibres optiques et du capillaire ainsi qu'une calibration de chaque nouvel instrument (FIG 3.2c). Même si sa précision de mesure est de 0.6% (selon [81]), il n'est pas intégrable dans un microsystème fluide complexe. De plus, il ne permet pas de suivre l'évolution d'une concentration sous écoulement. Néanmoins, son concept est simple et peu coûteux à mettre en œuvre.

3.2.3. Estimation de la concentration dans un microcanal par diffraction d'un laser

Cette méthode propose de mesurer l'indice de réfraction en temps réel d'une solution dans un microcanal en observant le déphasage du laser par le microsystème. Grâce à cette approche, il est possible de caractériser la densité optique du fluide de travail (diminution de l'amplitude en fonction de l'absorbance de la solution) [82]. Le microsystème consiste en une série de canaux parallèles en PDMS fermés par du verre et éclairés par un laser He-Ne (FIG 3.3A). La lumière qui traverse le réseau de canaux est périodiquement diffractée par l'interface formée par le PDMS et le verre. La période du réseau détermine la position angulaire des franges de diffraction tandis que la profondeur des canaux et les propriétés optiques de la solution en déterminent l'intensité. Avec le modèle de diffraction produit par le réseau de canaux, on peut caractériser les propriétés optiques de la solution. Le principe est schématisé à la figure 3.3B.

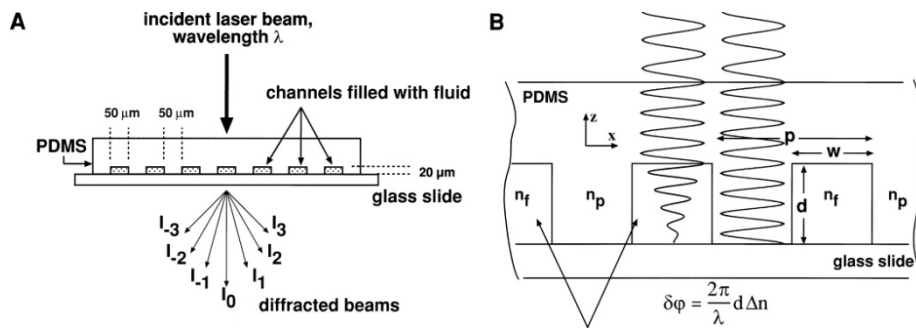


FIG 3.3 – Microsystème fluide d'après [82]. (A) La lumière du laser traverse le microsystème et est diffractée par le liquide qui remplit le réseau de canaux. (B) Paramètres du système. Lorsque la solution est non-absorbante, seule la phase de la lumière est affectée par le changement d'indice de réfraction. Si la solution absorbe la lumière, la phase et l'amplitude de la lumière changent.

Le modèle de diffraction fait intervenir la transformée de Fourier de la fonction de transmission $\tau(x)$:

$$\tau(x) = \begin{cases} \sqrt{T} e^{i\delta\varphi} & kp < x < kp + w, \quad k \text{ entier} \\ 1 & \text{ailleurs} \end{cases} \quad (3.3)$$

Avec T la transmittance du fluide, $\delta\varphi$ la différence de phase entre la lumière qui traverse un canal et celle qui traverse uniquement le PDMS, w la largeur des canaux, p la période du réseau de canaux. La modulation de phase peut être exprimée comme :

$$\delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} d \Delta n \quad (3.4)$$

Avec λ la longueur d'onde de la lumière, d la profondeur des canaux et Δn la différence entre l'indice du PDMS et l'indice de la solution. Lorsque ces deux indices sont égaux, le microsystème transmet la lumière sans la diffracter. Notons que lorsqu'on augmente la profondeur des canaux, le système devient plus sensible à une variation d'indice, comme présenté dans la figure 3.4A.

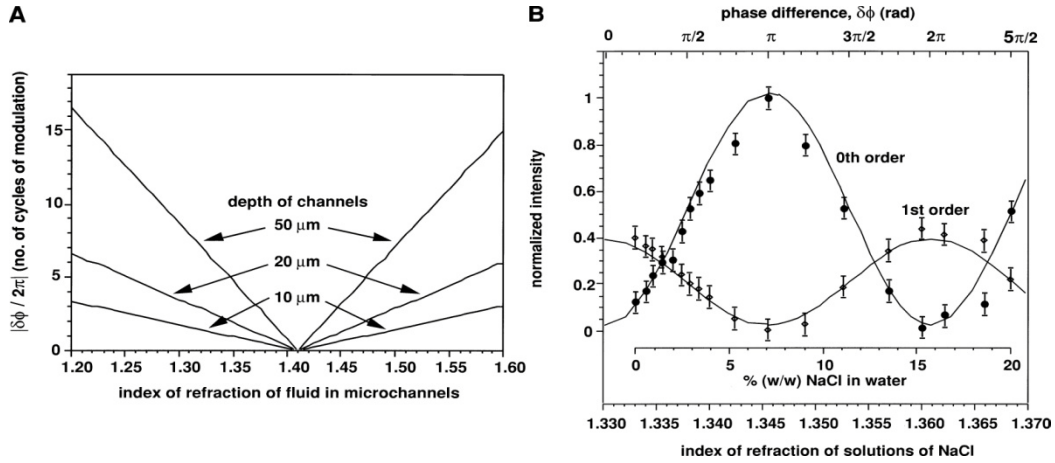


FIG 3.4 – Graphiques selon [82]. (A) Modulation de la différence de phase en fonction de l'indice de réfraction. Lorsque $n=1.41$, l'indice de la solution est le même que celui du PDMS et la lumière transmise n'est pas déphasée. (B) Variation des intensités du 0^{ème} et 1^{er} ordre du réseau de diffraction microfluidique : expérience et théorie.

Afin de mesurer les capacités de cet interféromètre, des mesures ont été réalisées avec des solutions salines d'indices connus dans la référence [82]. On observe dans le graphique 3.4B que le modèle de diffraction est en bon accord avec l'expérience à 5% près pour l'ordre zéro et le 1^{er} ordre. Il est possible de diminuer cette erreur en choisissant un laser plus performant et en augmentant la profondeur des canaux. Selon [82], elle pourrait être réduite aux environs de 1%. On reste dans le même ordre de grandeur des sensibilités présentées précédemment mais l'encombrement d'un tel dispositif n'est pas indiqué pour des mesures de concentrations dans un microsystème complexe.

3.2.4. Système de mesure de la concentration à l'aide d'une puce MEMS

En dehors des méthodes compatibles avec les techniques douces de fabrication, il existe des solutions plus proches de la lithographie dure. Ici nous mentionnons, selon [79], un capteur de débit

massique basé sur la force de Coriolis. On mesure alors la densité du fluide. Comme le montre la figure 3.5a, il est composé d'une cavité sous vide dans laquelle un tube creux en silicium sert de résonateur. Ce tube est en forme de U, comme on peut le voir en noir sur la figure 3.5b. A l'intérieur circule la solution à analyser.

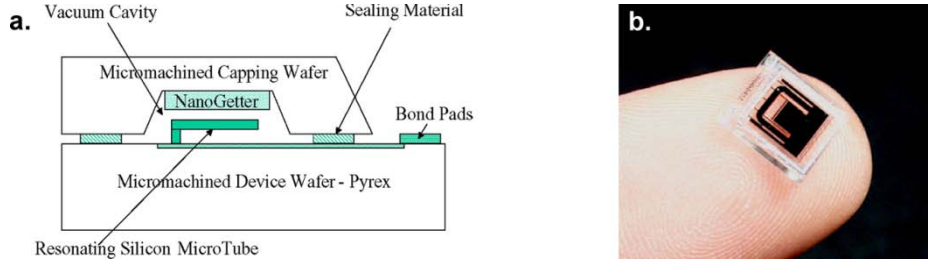


FIG 3.5 – Schéma et photo selon [79]. (a) Schéma du microsysteme dans sa cavité sous vide. Le tube résonant est en turquoise, au centre. La solution de remplissage arrive par le bas. (b) Photo du microsysteme avant encapsulation, le tube résonant en forme de U apparait en noir.

La relation entre la fréquence de résonance f et la densité du liquide ρ est donnée par l'expression :

$$\rho = \frac{1}{V \left(\frac{k_t}{4\pi^2 f^2} - m_t \right)} \quad (3.5)$$

Avec V le volume interne du tube, k_t la constante d'élasticité du silicium et m_t la masse du tube. Dans la référence [79], les auteurs ont obtenu un bon accord entre cette formule et l'expérience en trouvant une sensibilité de 0.001% . Ce système demande une microfabrication relativement lourde car en plus des procédés de gravure sur silicium et la réalisation d'électrodes, il faut encapsuler le tube et le connecter. Le temps de mesure (environ une minute pour équilibrer la fréquence) ne permet pas une mesure en temps réel mais la sensibilité est un atout par rapport aux systèmes fluidiques présentés précédemment.

3.3. Mesures de la concentration *in situ* en temps réel : le principe du réfractomètre intégré

L'idée générale de cet outil est d'utiliser les parois déjà existantes d'un système microfluidique en PDMS directement comme élément optique de notre réfractomètre sans apporter aucune modification à la conception du microsysteme. Les parois forment une interface entre la solution et le matériau du microsysteme à travers lesquelles existe, la plupart du temps, un gradient d'indice optique.

L'optique géométrique permet de calculer l'angle réfracté par une interface en fonction des indices optiques des milieux et de l'angle d'incidence. Nous avons, selon la formule de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (3.6)$$

Avec n_1 , n_2 les indices des milieux correspondant, θ_1 l'angle incident et θ_2 l'angle réfracté. Cette formule nous sera nécessaire pour modéliser le système par la suite.

Comme on peut le voir sur la figure 3.6, le microscope est symbolisé par une simple lentille qui va collecter les rayons de la lampe sur un plan image (qui correspond au capteur de la caméra). Au niveau de l'interface, les rayons sont réfractés en fonction de l'indice de la solution. Lorsqu'ils ne sont que légèrement déviés, ils sont tous collectés par la lentille et viennent se recombinaer sur le plan image. Dans ce cas, l'intensité observée sur le plan image est constante et on n'observe aucun contraste au niveau de l'interface, comme montré sur le graphique de droite (FIG 3.6).

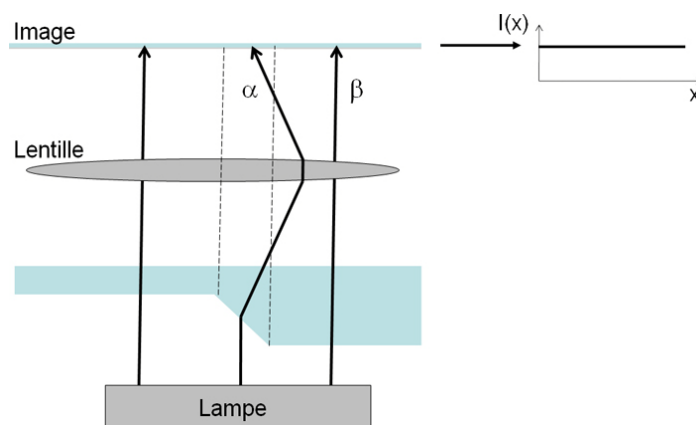


FIG 3.6 – Chemin optique des rayons émis par la lampe lorsqu'ils sont tous collectés par la lentille. Le graphique de droite représente l'intensité observée sur le plan image.

Lorsque l'indice de la solution varie, les rayons peuvent être suffisamment réfractés pour ne plus être collectés par la lentille (FIG 3.7). Dans ce cas, les rayons au niveau de l'interface sont perdus sur le plan image et la zone apparaît comme sombre (graphique de droite).

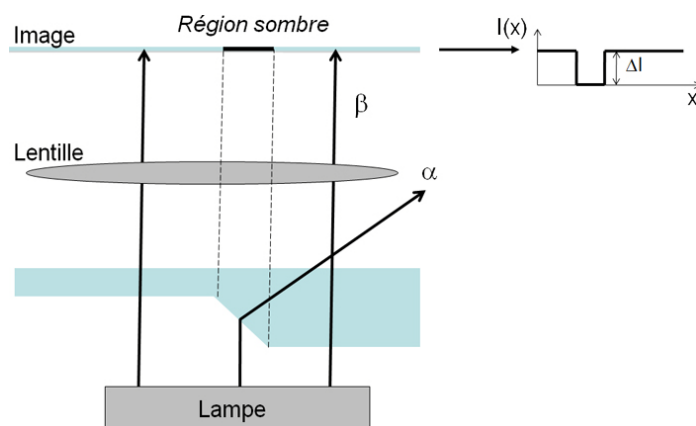


FIG 3.7 – Chemin optique des rayons émis par la lampe lorsque les rayons réfractés à l'interface sont perdus par la lentille. Le graphique de droite représente l'intensité observée sur le plan image.

Plus l'indice de la chambre s'éloigne de l'indice du PDMS, plus les rayons sont réfractés et donc plus il y a de rayons perdus dans le plan image occupé par la caméra. En conséquence, plus l'interface apparaît contrastée sur l'image de la caméra. Inversement, lorsque l'indice de la solution est très proche de l'indice du matériau, les rayons sont très peu déviés par réfraction et sont tous collectés. L'interface disparaît alors au niveau du plan image. La figure 3.8 illustre cet état de fait en présentant la photo du même microcanal en PDMS ($n_m=1.41$) rempli par des solutions d'indices variables.

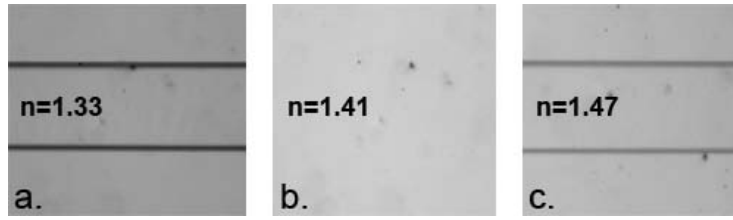


FIG 3.8 – Variation du contraste de la paroi d’un microcanal en fonction de l’indice optique. **(a)** $n_{sol}=1.33$, **(b)** $n_{sol}=1.41=n_{PDMS}$ **(c)** $n_{sol}=1.47$

Notre approche consiste à mesurer le contraste entre la région de la paroi et le fond constitué par le PDMS. Pour compléter cette mesure, nous avons besoin de la relation entre l’indice de réfraction de la solution n_s en fonction de la concentration en soluté d’une solution C_s . Ces informations sont disponibles dans des tables où peuvent être mesurées indépendamment.

Dans des situations classiques, les gradients de concentration internes à une solution s’écoulant dans un microcanal sont faibles. Ainsi, les informations que l’on peut recueillir au voisinage des parois (en considérant aussi l’évolution spatiale et temporelle de la concentration) permettent de caractériser l’état général d’une solution dans un microsystème.

3.4. Modèle théorique simplifié du réfractomètre intégré

La théorie simplifiée basée sur l’optique géométrique et les caractéristiques des appareils optiques utilisés permet de mieux comprendre le fonctionnement du réfractomètre. Nous modélisons maintenant notre réfractomètre selon un modèle bidimensionnel représenté à la figure 3.9.

On suppose une interface plane avec une zone inclinée d’angle θ_p , avec n_a l’indice de l’air, n_s l’indice de la solution et n_m l’indice du matériau. De plus, nous faisons les hypothèses suivantes :

- L’optique du microscope se réduit à une lentille idéale infiniment mince.
- Les dimensions horizontales du microsystème sont très petites par rapport à la distance verticale de travail. On peut donc négliger dans nos calculs les effets de bords de la lampe.
- L’indice du matériau et de la solution sont proches.
- La lampe est considérée comme un réseau de sources ponctuelles dont chaque point produit un cône lumineux d’angle 2ϕ .

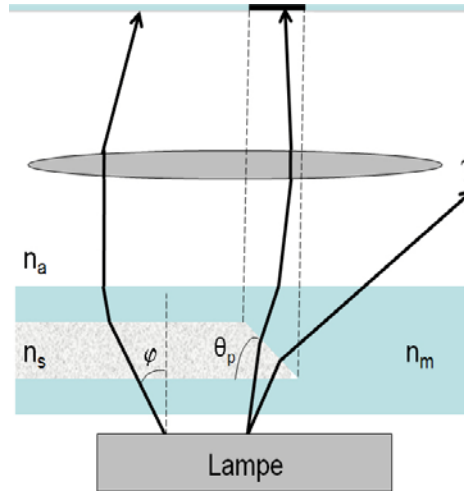


FIG 3.9– Schéma du modèle théorique simplifié.

Nous allons caractériser la zone sombre de l'interface par son contraste C_w défini par :

$$C_w = \frac{I_m - I_w}{I_m} = \frac{\Delta I}{I_m} \quad (3.7)$$

Avec I_m et I_w les intensités de la lampe collectées sur l'image, respectivement dans le matériau et au niveau de l'interface.

Avec de telles hypothèses, le calcul de l'intensité lumineuse perçue sur l'image peut être effectué selon la loi Snell-Descartes. Nous présentons le cas où l'angle d'ouverture numérique de la lampe θ_{NA} est supérieur à l'angle de divergence de la lampe φ , une hypothèse compatible avec les conditions expérimentales. La relation entre le contraste C_w et l'indice de réfraction n_s est donnée par la formule suivante :

$$\begin{aligned} C_w &= 1 \quad \text{pour} \quad n_s < n_1 \\ C_w &= \frac{\theta_{NA} - \varphi}{2 \operatorname{tg} \theta_p} \left(\frac{n_m - n_s}{\Delta n} - 1 \right) \quad \text{pour} \quad n_1 < n_s < n_2 \\ C_w &= 0 \quad \text{pour} \quad n_2 < n_s < n_m \end{aligned} \quad (3.8)$$

Dans laquelle nous avons :

$$\Delta n = \frac{\theta_{NA} - \varphi}{\operatorname{tg} \theta_p} n_a, \quad n_1 = n_m - \frac{\theta_{NA} + \varphi}{\operatorname{tg} \theta_p} n_a \quad \text{et} \quad n_2 = n_m - \frac{\theta_{NA} - \varphi}{\operatorname{tg} \theta_p} n_a \quad (3.9)$$

Nous obtenons des expressions similaires dans le cas où la divergence de la lampe φ est plus grande que l'angle d'ouverture numérique θ_{NA} . La fonction est présentée à la figure 3.10. C_w est symétrique par rapport à la ligne verticale $n_s = n_m$.

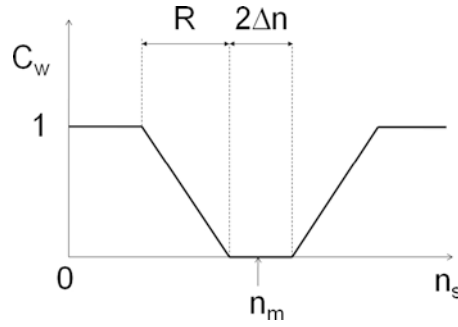


FIG 3.10 – Variation du contraste en fonction de l'indice calculé selon le modèle théorique 2D.

Il est intéressant de faire deux remarques :

- La plage de mesure R montrée sur la figure 3.10 est définie par l'expression suivante :

$$R = \frac{2\varphi n_m}{\operatorname{tg} \theta_p} \quad (3.10)$$

Lorsque la lampe est collimatée ($\varphi=0$) ou que l'interface est verticale ($\theta_p=\pi/2$), la plage de mesure R est réduite à zéro. Les mesures de réfractométrie que nous proposons demandent des parois inclinées et un éclairage non collimaté.

- L'écart Δn est défini par :
$$\Delta n = \frac{\theta_{NA} - \varphi}{\operatorname{tg} \theta_p} n_a \quad (3.11)$$

Dans cet intervalle, tous les rayons sont collectés par la lentille et il n'y a donc pas de contraste ni de mesure possible. Cet intervalle peut être supprimé en utilisant des objectifs et une lampe pour lesquels l'angle de divergence φ et l'angle d'ouverture numérique θ_{NA} sont égaux.

Nous rappelons que cette relation entre le contraste à la paroi et l'indice de réfraction connu, il est possible de déterminer, à partir d'une mesure de contraste C_w , l'indice de réfraction de la solution au niveau de la paroi. Ce calcul va nous permettre, dans la suite de cette thèse, de confronter les résultats obtenus lors d'expériences pratiques.

3.5. Les instruments optiques de visualisation utilisés

3.5.1. La loupe binoculaire

La loupe binoculaire MZFLIII que nous avons utilisée est un appareil de chez Leica comportant deux oculaires et un seul objectif (PANAPLO 1x) qui corrige les déformations de la vision stéréoscopique (FIG 3.11). Elle possède une lampe blanche qui permet de travailler en transparence et une lampe UV pour travailler par réflexion. Les agrandissements réalisés sont de l'ordre de 10 à 80x pour ce type d'outil.

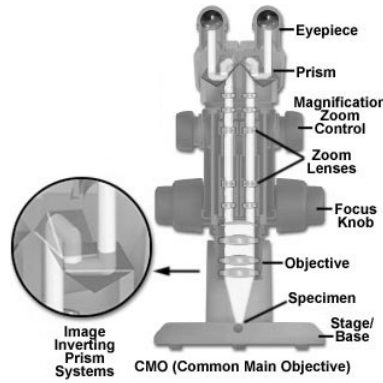


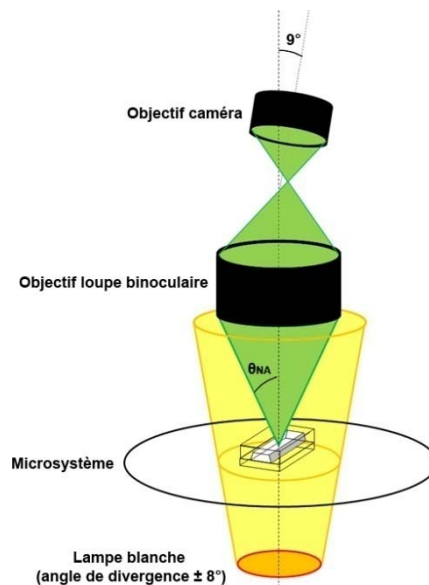
FIG 3.11 – Schéma d’une loupe binoculaire avec un seul objectif d’après [83].

La figure 3.12 présente un schéma simplifié du fonctionnement de la loupe binoculaire. Certaines données ont été mesurées et d’autres sont directement fournies par le fabricant. La lampe blanche que nous utilisons diverge avec un angle de $\pm 8^\circ$ (mesuré) et vient éclairer un microsystème (en jaune). Les rayons captés par la loupe binoculaire dépendent de l’ouverture numérique (NA). Elle définit l’angle limite que peut avoir un rayon collecté selon la formule :

$$NA = n \sin \theta_{NA} \quad (3.6)$$

L’ouverture numérique change en fonction de l’agrandissement. Les données fournies par le fabricant sont présentées dans l’annexe I. Nous avons travaillé avec un agrandissement de 5x et de 1,25x. Les angles d’ouverture limite correspondants sont de 5.8° et 2.1° .

Lorsqu’on ajoute une caméra numérique, elle remplace l’oculaire de droite et visualise l’objet avec un angle de 9° par rapport à l’axe optique⁵. Les deux parois ne vont donc pas être observées de manière symétrique et les contrastes des murs des canaux vont être modifiés. Le chemin optique est représenté en vert, sur la figure 3.12.



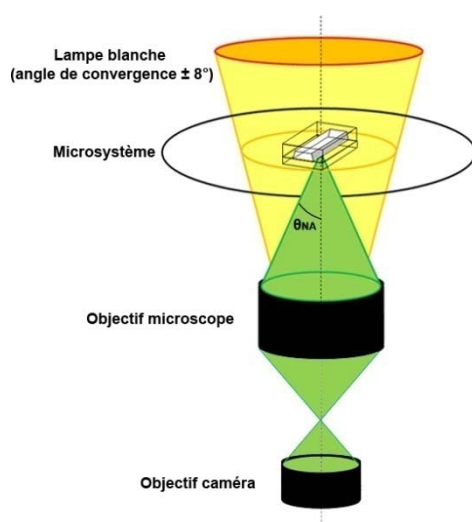
3.12 – Schéma simplifié d’un microsystème sous une loupe binoculaire avec mise en évidence des paramètres importants pour la modélisation.

⁵ Données fournies par Leica Microsystems

Notons que dans cette approche nous avons cherché à compenser l'angle formé par l'axe de la caméra et l'axe optique. La première méthode est de pencher le microsysteme. La seconde méthode est d'incliner le faisceau lumineux. Nous avons choisi de ne pas présenter ces résultats dans ce travail de thèse car ces expériences, peu contrôlées, sortent de l'utilisation classique d'une loupe binoculaire.

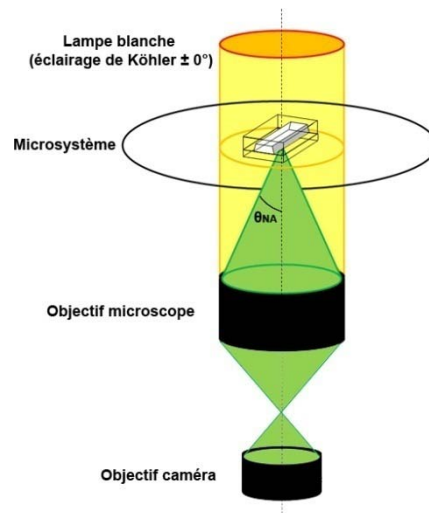
3.5.2. Le microscope

Le microscope que nous avons utilisé est un microscope inversé Leica DMIRB avec un objectif 10x ($NA=0.250$). Les deux oculaires permettent de visualiser la même image en étant parfaitement alignés avec l'axe optique. Nous avons effectué deux réglages de l'illumination du microsysteme. Dans un premier temps, un éclairage avec une lumière convergente possédant le même angle que la loupe binoculaire soit $\pm 8^\circ$ (FIG 3.13). Le microsysteme étant placé au centre du faisceau lumineux dans les deux cas, les effets de bords n'entrent pas en compte et les deux éclairages (binoculaire, éclairage divergent et microscope, éclairage convergent) peuvent être considérés équivalents.



3.13 – Schéma simplifié d'un microsysteme sous microscope : lumière convergente de $\pm 8^\circ$.

Dans un deuxième temps, nous avons réglé le microscope pour illuminer le microsysteme avec un éclairage de Köhler. Il s'agit d'une méthode d'éclairage à double diaphragme qui permet de rendre la lumière collimatée (FIG 3.14).

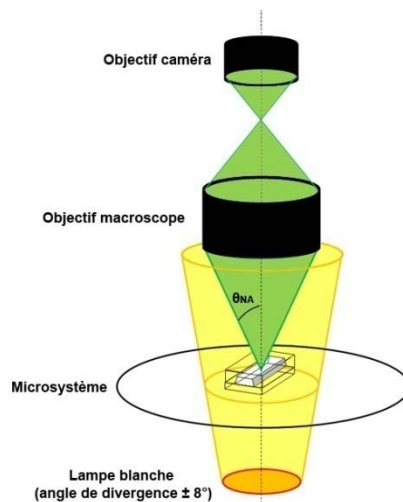


3.14 – Schéma simplifié d'un microscopie sous microscope et éclairage de Köhler.

Ces deux méthodes d'éclairage vont nous permettre de comparer le microscope avec la loupe binoculaire pour leur utilisation en réfractométrie.

3.5.3. Le macroscopie

Comme on peut le voir sur la figure 3.15, le macroscopie est un outil qui permet de visualiser un objet en étant aligné sur l'axe optique comme un microscope mais dont la gamme d'agrandissement est celle de la loupe binoculaire (10 à 100x). Le macroscopie que nous avons utilisé est un Leica Z16APO muni d'un objectif PANAPLO 1x. Comme pour la loupe binoculaire, l'ouverture numérique change avec l'agrandissement. Les données fournies par le fabricant sont disponibles à l'annexe II. Pour nos expériences, nous avons travaillé avec un zoom 5x et donc un angle d'ouverture numérique limite de 5.1°. Nous avons éclairé notre échantillon avec la même lampe que celle utilisée pour les expériences avec une loupe binoculaire (divergence de $\pm 8^\circ$)



3.15 – Schéma simplifié d'un microscopie sous macroscopie.

3.5.4. Résumé des caractéristiques des appareils

Afin de comparer ces trois appareils, nous avons résumé à la figure 3.16 les caractéristiques importantes pour la modélisation des ces outils dans leur conditions d'utilisation pour ce travail. Ce tableau servira de référence pour la suite de cette étude.

Outil optique		Angle de divergence de la lampe	Position zoom et NA	Agrandissement
Loupe binoculaire		$\pm 8^\circ$	5x : 0.101 (5.8°)	5x
			1.25x : 0.036 (2.1°)	1.25x
Microscope	- réglage Köhler	0° (collimaté)	Objectif 10x : 0.250 (14.3°)	10x
	- réglage convergent	$\pm 8^\circ$		
Macroscopie		$\pm 8^\circ$	5x : 0.089 (5.1°)	6.25x

FIG 3.16 – Tableau présentant les paramètres importants des différents outils optiques utilisés au cours de cette thèse.

Maintenant que nous savons comment fonctionnent ces appareils optiques, nous allons pouvoir présenter un modèle théorique basé sur leurs caractéristiques. Afin d'appuyer notre travail pratique, nous avons aussi effectué une modélisation numérique de notre outil de mesure par réflectométrie.

3.6. Modélisation numérique du réflectomètre intégré

3.6.1. Description du programme de modélisation numérique

Il nous a paru nécessaire de réaliser une modélisation numérique afin de comprendre l'influence du caractère désaxé de la loupe binoculaire par rapport au macroscopie et au microscope. Nous avons voulu aussi étudier le rapport entre l'ouverture numérique et l'angle de divergence de la lampe. La figure 3.17 présente un schéma du programme de modélisation numérique. Chaque étape est détaillée dans la suite du texte et le code source MATLAB est disponible dans son intégralité et commenté à l'annexe III.

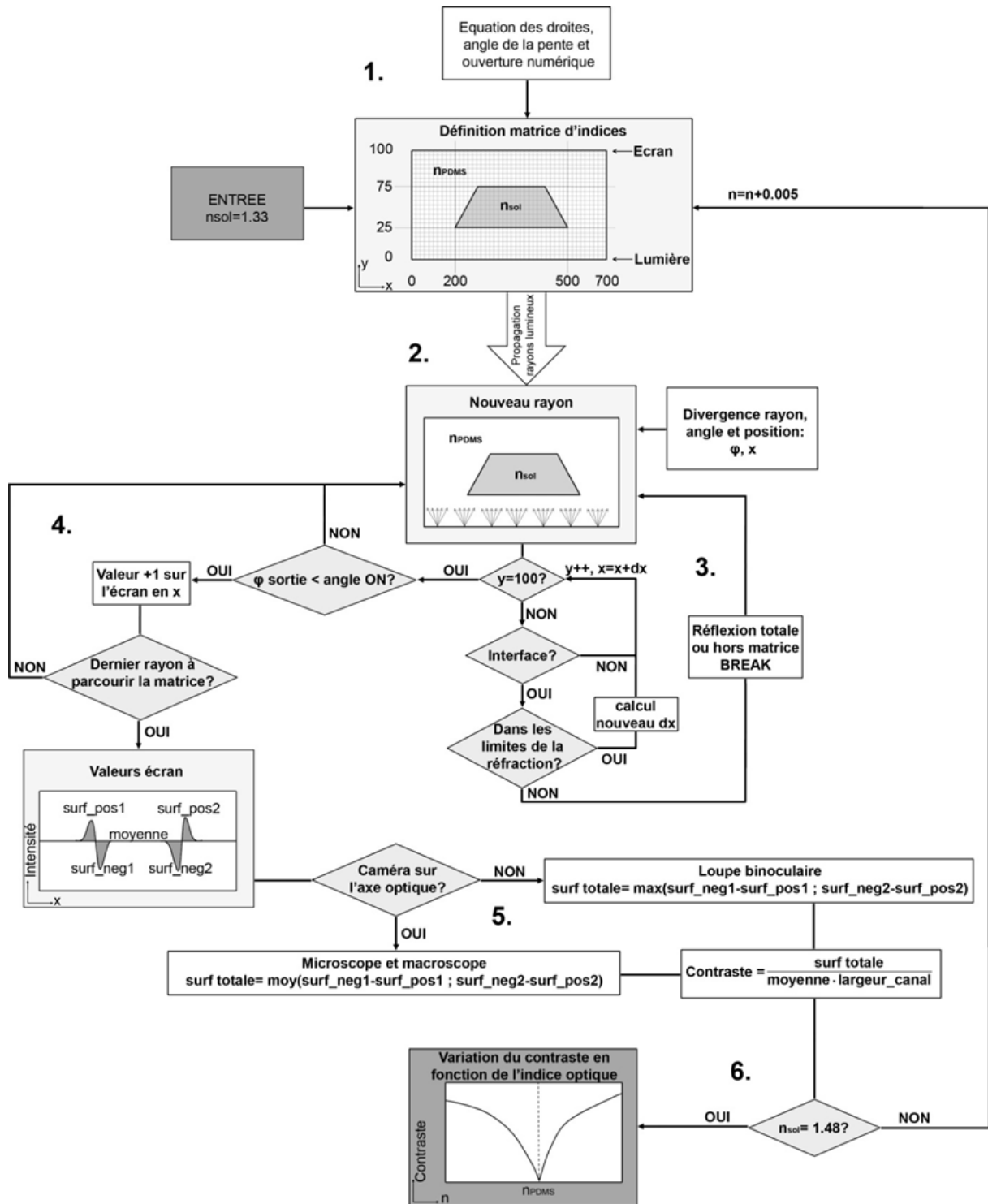


FIG 3.17 – Schéma du programme de simulation simplifié du contraste en fonction de l'indice optique.

- Définitions des paramètres géométriques :** on commence par définir la pente θ_p de la paroi (57.4°), l'angle d'ouverture numérique du système optique θ_{NA} , la position du canal et ses deux interfaces par une matrice d'indice de 700×100 . L'intérieur du canal a une valeur d'indice qui varie de 1.33 à 1.48 par pas de 0.05 (comme pour une solution qui change de

concentration), l'extérieur correspond à la valeur de l'indice de réfraction du PDMS ($n_{PDMS}=1.41$). On tient compte uniquement des interfaces PDMS-solution et solution-PDMS. La lumière est simulée par le plan $y=0$, très proche du canal. En effet, comme nous avons déjà supposé que les effets de bords étaient négligés, la source est vue comme une source ponctuelle étendue et sa distance importe peu pour notre simulation.

A l'opposé, nous avons créé un écran en $y=100$ dont le rôle est de collecter les rayons lumineux réfractés avant qu'ils ne se recombinent dans l'instrument optique de visualisation. Simuler l'éloignement réel de l'objectif de l'appareil optique n'est pas nécessaire car le profil de réfraction sur l'écran sera juste plus étalé (la déviation selon x des rayons réfractés est linéaire avec la distance).

2. **Définition des rayons lumineux :** un rayon lumineux qui va être réfracté par le canal est défini par sa position en x et sa direction de propagation. On définit un angle de divergence maximum autour duquel les rayons vont osciller par pas de 0.1° pour chaque position x . 0° correspond à un rayon vertical, -8° à un rayon se dirigeant de la droite vers la gauche et 8° un rayon allant de la gauche vers la droite.
3. **Propagation des rayons lumineux :** la boucle de tests simule la propagation d'un rayon à chaque pas ($y+1$) et détecte s'il y a une interface (variation de la matrice d'indices), calcule la nouvelle position x et la nouvelle direction de propagation. Si le rayon sort de la matrice 700×100 , son intensité est perdue. Lorsque $y=100$, le rayon atteint l'écran et son intensité peut être récupérée.
4. **Récupération de l'intensité d'un rayon qui atteint l'écran :** lorsqu'un rayon atteint l'écran, son intensité lumineuse (+1 sur l'écran à la position x du rayon) est considérée uniquement si son angle de propagation est inférieur à l'angle d'ouverture numérique défini pour l'appareil. Dans le cas d'une loupe binoculaire, nous avons simulé le décalage de la caméra par rapport à l'axe optique comme une asymétrie de l'ouverture numérique comme on peut le voir à la figure 3.18. Nous avons posé $\alpha=\theta_{NA}$ (à gauche l'angle d'ouverture numérique limite les rayons captés) et $\beta=\pi/2$ (pas de limite à droite). Quand il s'agit d'un appareil optique où la caméra est alignée avec l'axe optique (macroscope et microscope), l'angle d'ouverture numérique limite de manière symétrique les rayons lumineux ($\alpha=\beta=\theta_{NA}$).

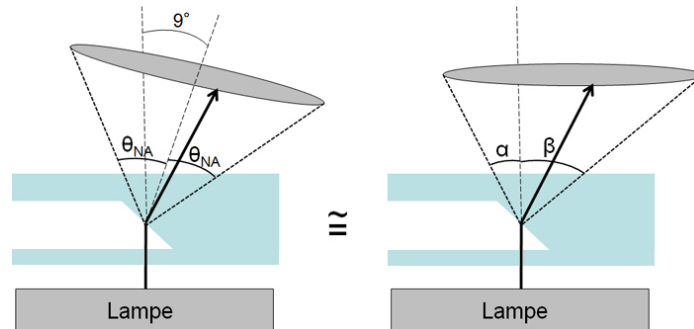


FIG 3.18 – Simulation de l'ouverture numérique pour une loupe binoculaire dont l'écran est penché avec un angle de 9° par rapport à l'axe optique.

Lorsque tous les rayons lumineux ont parcouru la matrice, on récupère les valeurs de l'écran et on constate généralement 4 zones autour d'une valeur moyenne I_m (les rayons n'ont presque pas été réfractés car les interfaces rencontrées étaient horizontales) : une zone d'intensité inférieure à la moyenne pour chaque interface car les rayons réfractés par les parois n'ont pas atteint cette zone (*surf_neg1* et *surf_neg2*) ; une zone d'intensité supérieure à la moyenne pour chaque interface car les rayons réfractés sont venus s'ajouter à la valeur moyenne (*surf_pos1*

et *surf_pos2*). La surface de ces zones varie en fonction de l'ouverture numérique de l'appareil optique modélisé.

5. **Calcul du contraste de l'interface :** en fonction de la symétrie de l'ouverture numérique, on considère soit la surface totale maximale entre les deux interfaces (loupe binoculaire), soit la surface totale moyenne entre les deux interfaces (macroscope et microscope). On rapporte cette mesure d'aire à une valeur de contraste selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Aire}}{I_{\text{moy}} \cdot L} = \frac{\int Idl}{I_{\text{moy}} \cdot L} = \frac{\Delta I \cdot l}{I_{\text{moy}} \cdot L} = C_w \cdot \frac{l}{L} \quad (3.12)$$

Avec C_w le contraste de l'interface et l/L le rapport de la largeur de la surface considérée et celle entre les deux interfaces simulées.

6. **Simulation numérique du contraste en fonction de l'indice de la solution :** tant que l'indice de la solution n'est pas égal à 1.48, on relance une nouvelle analyse. Lorsque toutes les valeurs de contraste sont calculées pour chaque indice défini, ces valeurs sont récupérées et présentées sous forme de graphique.

3.6.2. Variation de contraste simulé pour une loupe binoculaire

Nous constatons, tout d'abord, que les graphiques obtenus par modélisation numérique ont le même profil que ceux obtenus précédemment par calcul. Sur le graphique 3.19a, lorsque la divergence de la lampe est du même ordre de grandeur que l'angle d'ouverture numérique, l'intervalle Δn (défini dans la théorie autour de la valeur d'indice du matériau) tend vers zéro comme prévu. Lorsqu'on augmente ou diminue la divergence de la lampe, on retrouve cet intervalle. Quand la lampe est convergente ($\varphi=0$), tous les rayons sont collectés par l'appareil optique et le contraste tend vers zéro (pas d'interface observable). Sur le graphique 3.19b, lorsqu'on fait varier uniquement l'ouverture numérique, le contraste est d'autant plus fort que l'ouverture numérique est petite.

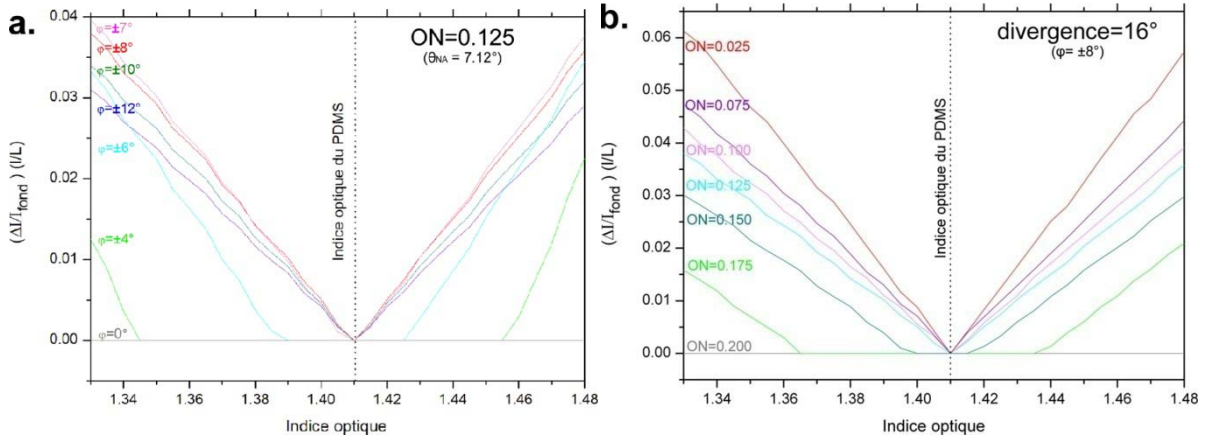


FIG 3.19 – Contraste rectifié en fonction de l'indice optique de la solution pour une loupe binoculaire. (a) variation de la divergence de la lampe. (b) variation de l'ouverture numérique (asymétrique).

3.6.3. Variation de contraste simulé pour un microscope ou un microscope

Nous remarquons, comme précédemment, que les graphiques obtenus par modélisation numérique ont le même profil que ceux obtenus précédemment par calcul. Sur le graphique 3.20a, il

existe un angle de divergence de la lampe qui permet d'obtenir un contraste maximum ($\varphi = \theta_{NA}$). Lorsque l'on fait varier l'ouverture numérique pour une valeur fixée de divergence (FIG 3.20b), la réponse en contraste est moins bonne que pour une loupe binoculaire (1/3 en moins que pour FIG 3.19b). Nous constatons aussi que lorsque l'ouverture numérique est trop grande ou trop petite par rapport à la divergence de la lampe, nous obtenons un grand intervalle Δn qui ne nous permet pas de mesurer un contraste. De plus. Dans certains cas, il n'y a même aucun signal de contraste ($ON=0.025$ et $ON=0.200$).

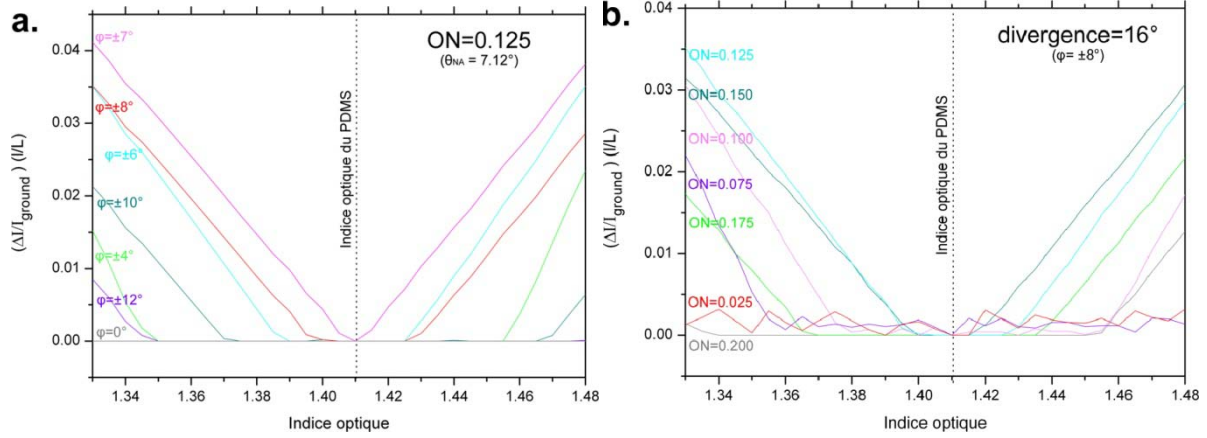


FIG 3.20 – Contraste rectifié en fonction de l'indice optique de la solution pour un microscope ou un macroscope. (a) variation de la divergence de la lampe. (b) variation de l'ouverture numérique (symétrique).

La modélisation numérique permet de confirmer, pour des mesures par réfractométrie, la nécessité d'une divergence de l'éclairage du même ordre de grandeur que l'ouverture numérique. De plus, le caractère stéréoscopique d'une loupe binoculaire semble amplifier le phénomène puisqu'on obtient un meilleur signal de contraste avec un microscope ou un macroscope à paramètres équivalents.

3.7. Mesure pratique du contraste des images observées

Afin de quantifier les variations locales de l'intensité des pixels de la caméra, nous trouvons dans la littérature plusieurs méthodes de mesure du contraste [84]. Le contraste d'une image mesure la variation relative de luminance et est donc une grandeur sans unité. La luminance peut être définie comme la "brillance" d'une surface réfléchissante éclairée telle qu'elle est vue par l'œil ou l'objectif d'une caméra⁶. Nous avons choisi de nous référer à la définition du contraste local C proposée par Weber [85]:

$$C = \frac{\Delta L}{L} = \left(\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\min}} \right), \text{ C varie entre -1 et } +\infty \quad (3.13)$$

En pratique, on évalue la valeur de l'intensité des pixels de l'interface par rapport à une valeur d'intensité de fond de l'image. Cette normalisation permet de s'affranchir des petites variations de l'intensité lumineuse de la lampe d'une image à l'autre. Nous avons deux méthodes pour mesurer le contraste en fonction de l'appareil optique utilisé.

⁶ Son unité légale est le candela par mètre carré (cd/m^2)

Dans le cas d'une loupe binoculaire où la caméra est décalée de 9° par rapport à l'axe optique, les deux interfaces ne vont pas être observées avec le même contraste. Cet état de fait est particulièrement visible dans le cas d'un canal trapézoïdal comme on peut le voir à la figure 3.21b. Le canal est rempli d'eau et on constate que l'interface 2 est plus sombre que l'interface 1 (un phénomène que l'on peut expliquer par l'asymétrie de la loupe binoculaire). Lorsque les parois sont presque verticales, comme c'est le cas pour une chambre réalisée avec un masque en chrome (FIG 3.21a), la différence d'intensité entre les deux interfaces est peu perceptible.

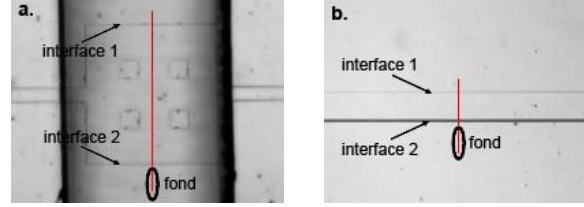


FIG 3.21 – Images prises sous une loupe binoculaire de deux microsystèmes remplis d'eau. La droite rouge indique les zones de mesure du contraste aux parois. **(a)** Chambre réalisée avec un masque en chrome (parois presque verticales) : les deux interfaces semblent avoir la même intensité. **(b)** Canal trapézoïdal : l'interface du bas est plus sombre que celle du haut.

Dans le cas d'une image réalisée sous une loupe binoculaire, nous avons choisi de considérer uniquement l'interface la plus sombre. Le contraste est défini comme suit :

$$C_{bino} = \left(\frac{I_{fond} - I_{\min(interface1,2)}}{I_{fond}} \right), C_{bino} \text{ varie entre 0 et +1} \quad (3.14)$$

Les valeurs d'intensité des pixels sont mesurées selon les droites en rouge de la figure 3.20. $I_{\min}$ est la valeur d'intensité minimale entre les deux interfaces et I_{fond} la moyenne locale⁷ de l'intensité des pixels du fond de l'image.

Une caractéristique importante de la loupe binoculaire est que l'on observe aussi des contrastes négatifs. En pratique, on observe souvent des lignes blanches (contraste négatif) associées aux lignes sombres (contraste positif). Le phénomène était très clair numériquement et s'explique bien en prenant en compte le caractère stéréoscopique de la loupe binoculaire

Pour le cas d'un macroscopie ou d'un microscope, comme la caméra est alignée sur l'axe optique, les deux interfaces observées ont la même intensité de pixels (voir FIG 3.22). Nous définissons le contraste en utilisant cette fois la valeur moyenne I_{moy} des deux interfaces :

$$I_{moy} = \left(\frac{I_{\min(interface1)} + I_{\min(interface2)}}{2} \right) \quad (3.15)$$

$$C_{micro,macro} = \left(\frac{I_{fond} - I_{moy}}{I_{fond}} \right), C_{micro,macro} \text{ varie entre 0 et +1} \quad (3.16)$$

⁷ La moyenne locale est définie par l'intensité d'une vingtaine de pixels.

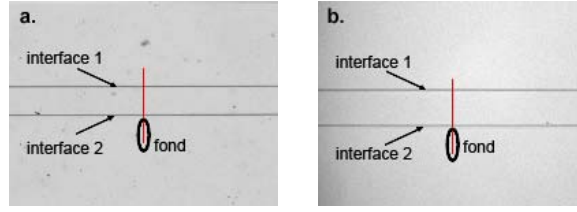


FIG 3.22 – Images d’un canal trapézoïdal rempli d’eau réalisées sous macroscopie (a) et microscope (b). Les deux interfaces ont la même intensité.

Dans la suite de cette thèse et en fonction des appareils optiques employés, nous allons utiliser l’une ou l’autre des définitions du contraste détaillées ici. Lorsque l’expérience sera réalisée avec une loupe binoculaire, la mesure du contraste tiendra compte uniquement de l’interface la plus sombre (équation 3.14). Quand nous effectuerons des expériences à l’aide d’un macroscopie ou d’un microscope, nous prendrons toujours en compte l’intensité moyenne des deux interfaces (équation 3.16).

3.8. Evaluation de la concentration d’une solution à partir d’une mesure de contraste

Nous allons expliquer ici comment convertir une mesure de contraste en une mesure de concentration. Il nous faut tout d’abord convertir notre contraste en valeur d’indice optique de la solution. Pour ce faire, nous avons réalisé sur chacun des appareils (et en fonction des agrandissements utilisés) une calibration avec des solutions d’indices connus variant de 1.33 à 1.48. Ces indices sont mesurables par des méthodes indépendantes ou existent dans des tables. Une fois l’indice connu, il est possible de remonter à la concentration *in situ* de la solution. A nouveau, il est possible de se référer aux tables ou de la calculer en fonction des masses volumiques [86].

$$C_w(t) \rightarrow n_s(t) \rightarrow \Phi_s(t) \quad (3.17)$$

Nous avons effectué un certain nombre de mesures à l’aide d’un réfractomètre portable sur des solutions et nous avons reporté ces points de mesures dans le graphique 3.23. Nous avons aussi cherché ces valeurs dans des tables et calculé la variation d’indice en fonction des fractions volumiques φ des solutions à l’aide de la formule suivante (pour deux solutés en solution aqueuse) :

$$n_s = n_{H_2O} \varphi_{H_2O} + n_x \varphi_x + n_y \varphi_y \quad (3.18)$$

$$\text{avec } \varphi_{H_2O} + \varphi_x + \varphi_y = 1 \quad \text{et} \quad \varphi_x = \beta \varphi_y$$

Lorsqu’il n’y a qu’un seul soluté dans une solution aqueuse, les formules sont aisément simplifiées sans qu’il soit nécessaire de le détailler ici.

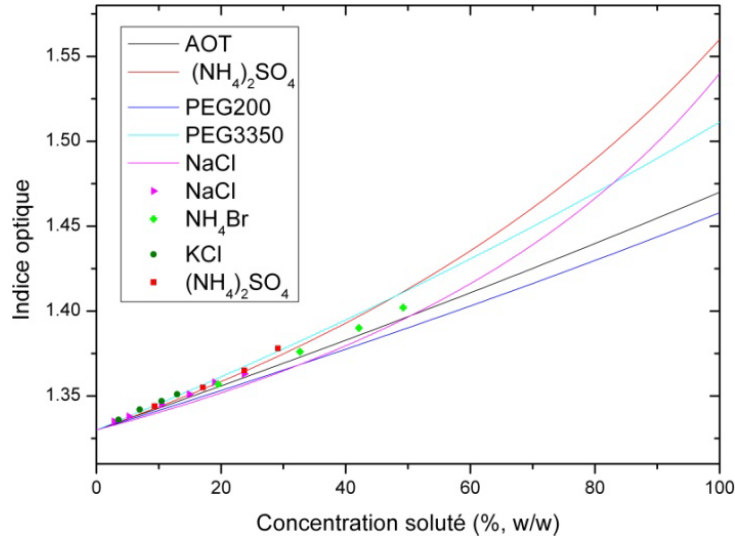


FIG 3.23 – Variation de l'indice optique d'une solution en fonction de sa concentration : valeurs expérimentales (■) et valeurs calculées (courbes) selon la formule des fractions volumiques selon [86].

En connaissant l'indice de réfraction pour chaque composé indépendant et avec leur densité, il est possible de convertir les fractions volumiques en fractions massiques pour les comparer les données expérimentales (FIG 3.23). Nous constatons un bon accord entre les valeurs mesurées et calculées.

3.9. Comparaison entre la théorie, la modélisation numérique et l'expérience

3.9.1. Expériences effectuées sur un canal à parois obliques avec différents instruments optiques

Afin de pouvoir comparer les différents instruments optiques à notre disposition, nous avons effectué la même expérience de réfractométrie sur chaque appareil. Nous avons utilisé le même microcanal trapézoïdal (possédant des parois obliques) et les mêmes solutions d'indices connus (solutions aqueuses avec NaCl, NH_4Br ou glycérol en quantités variables pour une variation d'indice optique de 1.33 à 1.47). Pour cette série d'expériences, nous sommes restés dans la même gamme d'agrandissement pour chaque appareil : soit 5x pour la loupe binoculaire, 6.25x pour le microscope et un objectif 10x pour le microscope. Les résultats de contrastes C_w sont les points reportés sur le graphique 3.24. Ils ont été multipliés par le rapport des largeurs moyennes de l'interface ($l_{\text{interface}}=12\mu\text{m}$) et du canal ($l_{\text{canal}}=172\mu\text{m}$) afin d'être comparés à la simulation numérique⁸, en traits pleins sur le graphique.

$$C_w \cdot \frac{l_{\text{interface}}}{l_{\text{canal}}} \quad (3.19)$$

⁸ Selon la formule 3.12

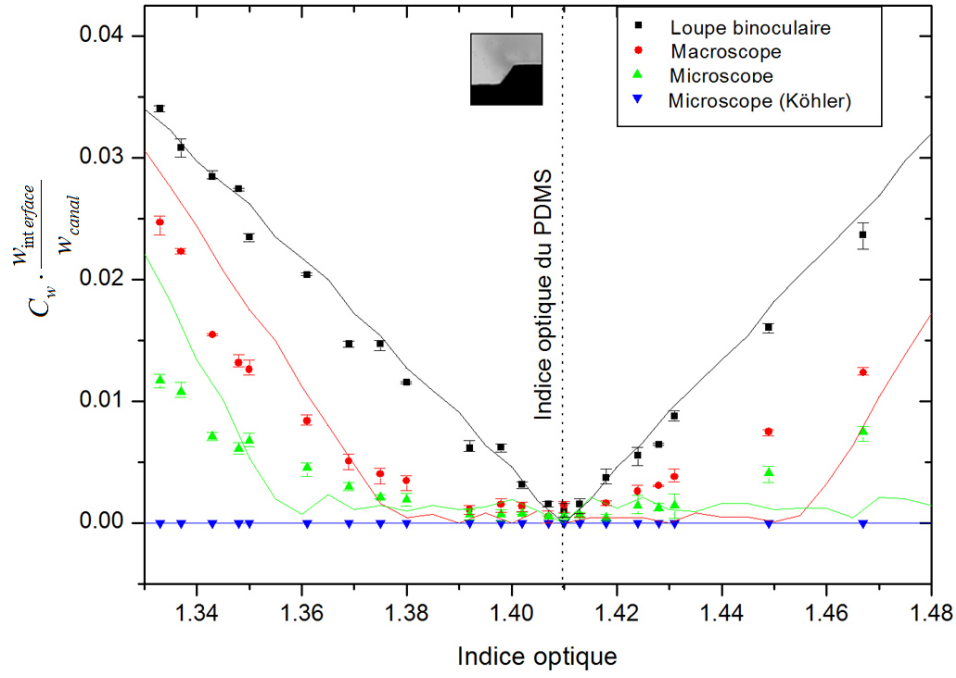


FIG 3.24 – Variation de contraste en fonction de l'indice optique, comparaison entre différents outils de visualisation (■ données obtenues lors des expériences ; — modélisation numérique sans facteur d'ajustement).

On constate une bonne adéquation avec la modélisation numérique et le modèle théorique. Comme prévu, on obtient le meilleur contraste avec la loupe binoculaire de par son caractère stéréoscopique. En plus, l'angle d'ouverture numérique étant très proche de l'angle de divergence de la lampe ($\theta_{NA}=\varphi$), l'intervalle Δn défini précédemment est très petit. Avec un macroscopie ou un microscope, la lampe incohérente permet d'obtenir un résultat plus difficilement exploitable de par la faible variation de contraste autour de l'indice optique du matériau. Avec un réglage de la lampe par la méthode de Köhler, nous n'obtenons aucun contraste et quelle que soit la solution de calibration choisie. Cette expérience met en avant la nécessité d'utiliser le bon appareil optique pour des mesures de réfractométrie. Nous allons donc effectuer toutes les expériences présentées dans la suite de ce travail sur une loupe binoculaire.

3.9.2. Etude de la forme des parois d'un canal sur le signal de réfractométrie

Maintenant que nous avons choisi l'appareil optique, nous nous sommes intéressés au contraste obtenu selon la forme de la paroi du microsystème. En effet, comme expliqué au chapitre 2, nous avons plusieurs méthodes de microfabrication qui vont influencer le profil des parois d'un canal. Le graphique 3.25 présente ces résultats de contraste C_w en fonction de l'indice optique obtenu sur une loupe binoculaire d'agrandissement 1.25x. Comme on peut s'y attendre, la meilleure variation de contraste est obtenue pour un canal trapézoïdal. Mais, avec une microfabrication classique, rapide et bon marché (par l'utilisation d'un masque sur transparent ; ■ sur le graphique), on obtient un signal de réfractométrie exploitable et reproductible, malgré le mauvais état de surface de ces microsystèmes. Lorsque les parois sont plus nettes grâce à l'utilisation d'un masque en chrome, le contraste observé est moins intéressant pour nos expériences. Investir du temps et de l'argent pour ce type de masque n'est donc pas opportun pour des mesures de concentrations *in situ* selon notre méthode.

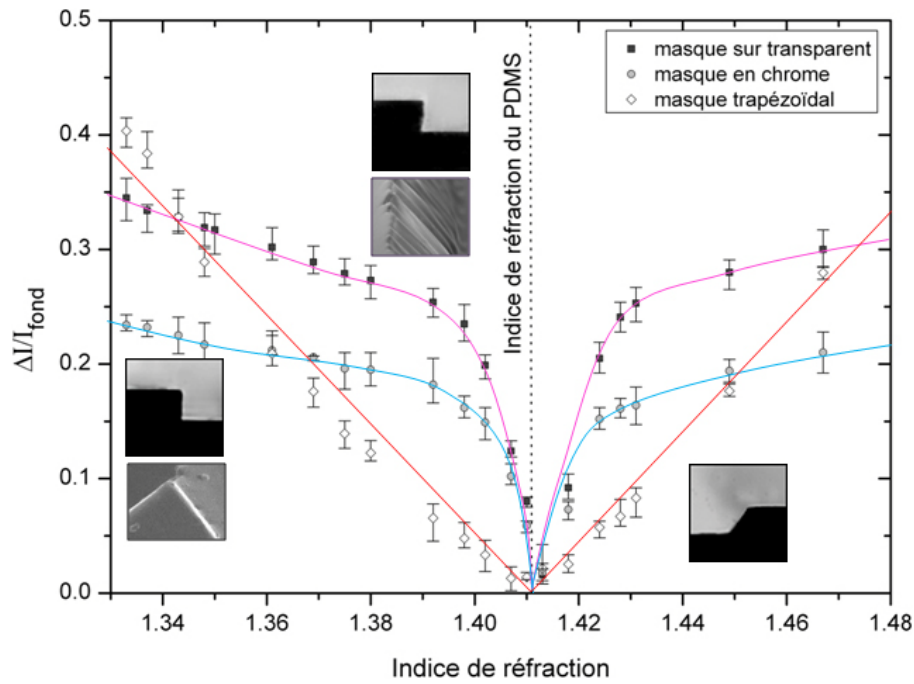


FIG 3.25 – Variation de contraste en fonction de l'indice optique, comparaison entre différents profils de parois.

Il est possible de mesurer, avec un canal trapézoïdal, un indice optique d'une précision de $5 \cdot 10^{-3}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que les systèmes de mesure de la concentration trouvés dans la littérature. Pour la suite de nos expériences, nous allons nous référer à ces courbes de calibration pour transformer des mesures de contraste en variation d'indice optique de la solution considérée. Elles se paramètrent facilement par des fonctions polynomiales.

3.10. Une application du réfractomètre : mesure du mélange et de la diffusion dans un canal trapézoïdal

3.10.1. Mélange de glycérol avec de l'eau

Pour cette expérience, nous avons utilisé un canal trapézoïdal en injectant, dans une jonction en T, une solution aqueuse de glycerol (47%w/w) d'un coté et de l'eau de l'autre (FIG 3.26). Le débit d'injection constant est de $0.04 \mu L/min$ pour chaque entrée. Comme dans la publication [87], on définit ensuite y , la largeur du canal ($y=0$ est le centre) et x , la longueur ($x=0$ est la jonction des deux fluides). On peut observer, le long du canal, la variation de contraste. Notons, ici, que l'interface du haut présente un contraste négatif. Comme expliqué dans le paragraphe 3.7 pour des mesures effectuées à l'aide d'une loupe binoculaire, nous mesurons le contraste (et donc la concentration le long de la paroi) uniquement pour l'interface du bas. Pour effectuer une mesure similaire sur la seconde interface, il faut inverser les deux entrées.

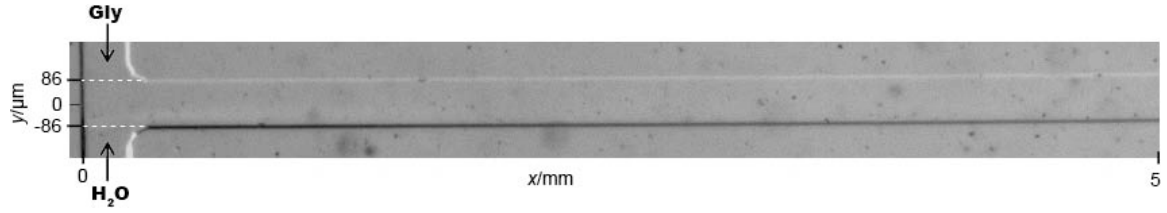


FIG 3.26 – Vue de dessus du canal trapézoïdal. Les deux solutions sont injectées (à gauche : haut et bas) chacune avec un débit constant de $0.04\mu\text{L}/\text{min}$. On peut mesurer la variation d'intensité sur la paroi inférieure où le contraste est négatif. Pour réaliser la mesure de l'autre interface, il faut inverser les deux fluides à l'entrée et refaire les mesures.

Le long du canal, il est possible de connaître le profil de concentration en sel de la solution selon x en résolvant de manière numérique l'équation de la diffusion :

$$\frac{\partial^2 \Phi(y)}{\partial y^2} = \frac{1}{D} \frac{\partial \Phi}{\partial t} \quad (3.20)$$

La résolution numérique consiste à découper l'objet en un nombre de tranches d'épaisseur h (parallèles au front de diffusion), à leur attribuer des concentrations correspondantes aux concentration initiales et à simuler la diffusion en remplaçant les dérivées par des différences finies. Le pas spatial selon x est obtenu en posant :

$$x = U \cdot t \quad (3.21)$$

Avec la vitesse dans le canal $U = Q_{inj}/(h \cdot w)$ ($Q_{inj} = 4\mu\text{L}/\text{min}$, $h = 17\mu\text{m}$ et $w = 172\mu\text{m}$ (w la largeur moyenne du canal) et le coefficient de diffusion du glycérol dans de l'eau à 25°C $D = 1.06 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ (selon les tables). En pratique, nous avons mesuré le contraste sur les deux parois du canal pour différentes valeurs de x et confronté ces mesures à un programme MATLAB qui résout l'équation 3.20 en retournant les valeurs de contraste aux parois. Les résultats sont présentés dans le graphique 3.27 et les courbes correspondent au calcul numérique.

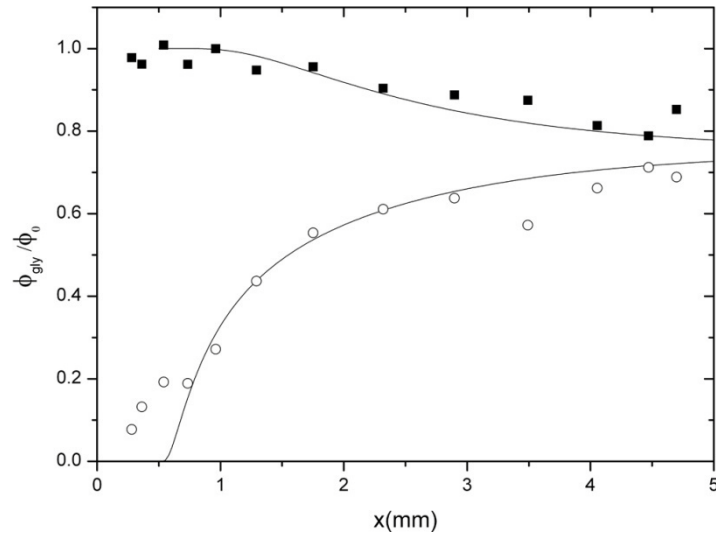


FIG 3.27 – Concentration en glycérol aux deux parois du canal et calcul numérique (lignes continues) avec le coefficient de diffusion à $D = 1.06 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$. La solution la plus concentrée en glycérol se dilue (■) et l'eau se concentre en glycérol le long du canal (○). La taille des points représente l'erreur de mesure.

On constate un très bon accord entre le calcul et l'expérience. Le mélange final est proche de 80% de glycérol. Cette mesure dépend du rapport des viscosités des deux solutions. Selon les tables, une solution de glycérol à 47%w/w est 4.9 fois plus visqueuse que l'eau à 25°C. Cette valeur correspond à nos mesures. Connaissant par réfractométrie le contraste, il est donc possible de calculer le coefficient de diffusion d'un mélange ainsi que le rapport de viscosité.

Nous avons ainsi la possibilité de réaliser un instrument mesurant la viscosité et le coefficient de diffusion sans ajout de traceurs ni utilisation de la fluorescence, deux conditions très importantes pour les applications chimiques.

3.11.Conclusion

L'outil que nous proposons est un refractomètre non intrusif, sans marquage des solutions à analyser, simple à fabriquer puisque ne nécessitant aucune étape supplémentaire de microfabrication. Il permet une mesure en temps réel de la concentration d'une solution dans la gamme de sensibilité des méthodes microfluidiques déjà exposées, soit $5 \cdot 10^{-3}$. De plus, nous avons pu utiliser cette méthode pour mesurer un coefficient de diffusion dans un microcanal.

Afin d'améliorer ces mesures de contraste, nous pourrions envisager des améliorations autant au niveau de la méthode qu'au niveau du matériel utilisé. Concernant la méthode, multiplier les données expérimentales permettrait de diminuer l'erreur moyenne. Concrètement, il s'agirait de considérer toute la longueur de l'interface, et non pas simplement une coupe à travers le canal ou la chambre à chaque image pour une expérience de pervaporation. Lorsqu'il s'agit de mesures de diffusion, il faudrait avoir à disposition plus d'images de la même expérience. Du point de vue du matériel, nous pourrions envisager une caméra 16 bit ainsi qu'un contrôle de l'homogénéité de la lampe. Nous pourrions aussi utiliser les piliers des chambres comme des sondes pour vérifier l'homogénéité de la chambre à tout instant.

Quoi qu'il en soit, notre méthode permet déjà de réaliser des mesures intéressantes. Les expériences de pervaporation effectuées à l'aide de cet outil sont présentées dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Applications au criblage de différents systèmes

4.1. Etudes de sursaturation de solutions ioniques

4.1.1. Expériences avec une solution binaire : NaCl et H₂O

La première expérience que nous avons menée est l'observation d'une solution aqueuse de sel (NaCl) dont les propriétés sont déjà connues et répertoriées dans les tables. La solubilité du NaCl dans de l'eau est de $6.1M$ ($0.26w/w$) à $25^{\circ}C$. Nous avons rempli nos six chambres avec un gradient linéaire entre une solution aqueuse de NaCl ($3M$) et de l'eau DI comme on peut le voir à la figure 4.1. Nous avons reporté la concentration au début de l'expérience en mole et en fraction massique pour chacune des chambres et exposé une photo des cristaux après concentration par pervaporation des chambres.

Chambres	Concentrations initiales
1	NaCl 3M (0.15w/w)
2	NaCl 2.4M (0.12 w/w)
3	NaCl 1.8M (0.10w/w)
4	NaCl 1.2M (0.07w/w)
5	NaCl 0.6M (0.03w/w)
6	H ₂ O

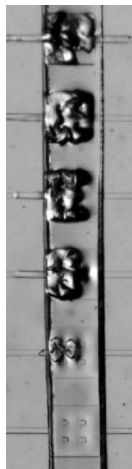


FIG 4.1 – Concentrations en NaCl de chaque chambre au début de l'expérience. A droite, photo des six chambres sous lumière blanche après 300min sous pervaporation.

Nous avons utilisé le même protocole que pour l'expérience avec la fluorescéine (§2.5.2 : air sec 2mbar dans le canal de pervaporation, $v_e=24\text{nm/s}$). Tout d'abord, nous avons relevé chaque événement de nucléation. Sachant qu'il faut 14min pour doubler la concentration d'une chambre comme il a été précédemment mesuré, il est donc possible de calculer la concentration de la solution au moment de la nucléation. Ces données, présentées dans le tableau 4.2, vont ensuite être comparées aux mesures de concentration par réfractométrie. On peut déjà remarquer que ces valeurs dépassent de beaucoup la limite de solubilité.

Chambres	Temps de nucléation (min)	Concentration calculée (M)
1	48	13.28
2	63	13.2
3	89	13.24
4	117	11.22
5	251	10.75
6	-	-

FIG 4.2 – Concentrations en NaCl pour chaque chambre lors d'un événement de nucléation calculé à l'aide des données de l'expérience sur la fluorescéine présentée au paragraphe 2.5.2.

En photographiant l'expérience toutes les minutes, nous avons aussi pu suivre l'évolution du contraste des parois au cours du temps. Après transformation des mesures de contraste en mesures de concentrations par les courbes de calibrations, nous présentons les résultats obtenus pour les six chambres dans le graphique 4.3.

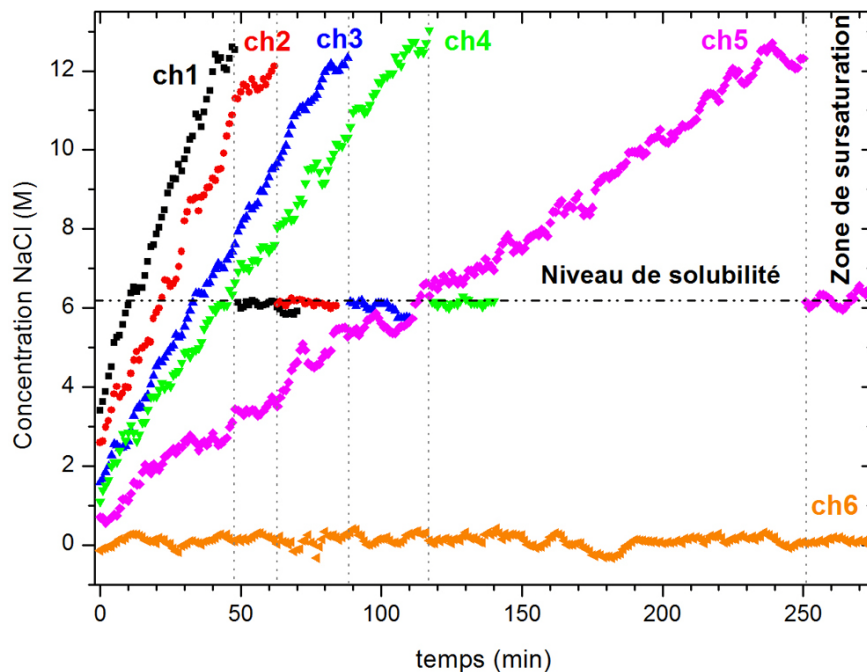


FIG 4.3 – Evolution de la concentration dans chaque chambre au cours du temps mesurée par réfractométrie. Les chambre concentrent linéairement jusqu'à dépasser le niveau de solubilité. Lorsqu'un événement de nucléation se produit, la concentration de la solution autour du cristal chute brusquement au niveau de la solubilité (6.1M).

Nous observons, comme attendu, que la concentration en sel évolue de manière linéaire au cours du temps avec des pentes dépendant de la concentration initiale de chaque chambre et de la vitesse de pervaporation (ch1 : $p=0.2$, ch2 : $p=0.14$, ch3 : $p=0.1$, ch4 : $p=0.09$, ch5 : $p=0.04$, ch6 :

$p=0$). Nous remarquons des fluctuations dépendant de la variation de la lampe. Les solutions dans les chambres vont cristalliser à des concentrations de l'ordre de deux fois la valeur de solubilité. L'analyse par réfractométrie permet de lire la valeur de supersaturation directement sur le graphique. Lorsqu'il y a un événement de nucléation, la concentration de la solution autour du cristal chute brutalement à la valeur de solubilité et reste constante le temps que le cristal croît et occupe les parois de la chambre. Nous n'avons pas reporté les mesures correspondantes sur la figure 4.3. La concentration de nucléation et la sursaturation mesurées pour chaque chambre sont reportées à la figure 4.4.

Chambres	Temps de nucléation (min)	Concentration mesurée (M)	Sursaturation (nb. de fois la solubilité)
1	48	12.60	2.07
2	63	12.11	1.99
3	89	12.32	2.02
4	117	13.02	2.13
5	251	12.69	2.08
6	-	-	-

FIG 4.4 – Concentrations en NaCl pour chaque chambre lors d'un événement de nucléation et calcul de la sursaturation par la technique de réfractométrie à la paroi.

Nous constatons qu'entre les concentrations calculées à l'aide de la vitesse de pervaporation mesurée sur l'expérience en fluorescence (tableau 4.2) et celle mesurées par réfractométrie lors de l'expérience avec le sel diffèrent parfois d'au maximum $1.8M$. Ces variations sont certainement dues aux conditions de l'expérience qui peuvent légèrement différer (épaisseur de la membrane d'un système à l'autre $e=21\pm0.5\mu m$, température de la pièce à $T=25\pm2^\circ C$, humidité relative de la pièce $HR=32\pm10\%$), sachant que l'indice de réfraction du NaCl varie peu avec la température [88]. Il faut aussi souligner que la nucléation est un événement aléatoire [89]. Une mesure par réfractométrie de la vitesse de pervaporation lors de chaque expérience apporte donc une précision nécessaire à l'analyse de l'expérience. Par la méthode de réfractométrie, nous évaluons la vitesse de pervaporation pour cette expérience à $23\pm2nm/s$.

Il est important de souligner aussi les valeurs de sursaturation observées. Selon la publication [89], le taux de nucléation d'une solution J (nombre de nucléis produit par unité de temps et de volume) se calcule comme suit :

$$J(S) = AS \exp\left(\frac{-B}{\ln^2 S}\right) \quad (4.1)$$

Avec S la sursaturation de la solution (rapport entre l'activité de la solution sursaturée et de son activité à l'équilibre), A un facteur cinétique et B un paramètre thermodynamique. L'aptitude d'une solution à rester sursaturée (ou dans un état métastable) dépend de ce taux de nucléation et du volume de la solution V . Ce temps t_i est donné par l'équation suivante :

$$t_i = \frac{1}{JV} \quad (4.2)$$

En microfluidique, nous travaillons avec des petits volumes ($V_{chambre}=5nL$). Il n'est donc pas surprenant que nous arrivions à maintenir des solutions dans un état métastable plus longtemps que

lors d'une expérience en éprouvette. A notre connaissance, c'est la première fois que la sursaturation d'une solution à pu être quantifiée expérimentalement pour un processus isotherme [90, 91].

4.1.2. Sursaturation et vitesse de pervaporation

Nous avons choisi de reproduire l'expérience de pervaporation de solution ionique présentée au paragraphe 4.1.1 en diminuant la vitesse de pervaporation (NaCl 3M, même solution). Nous avons soufflé de l'air humide dans le canal de pervaporation. Le taux d'humidité de 50% est contrôlé par un générateur d'humidité relative (de 10 à 90% à $\pm 1.5\%$ près, Calibrage). Nous avons comparé la vitesse de pervaporation et la solubilité dans une chambre où la concentration initiale de la solution aqueuse est de $\Phi_0 = 3M$ (la solubilité étant à 6.1M). Les résultats mesurés sont présentés dans le tableau 4.5. Nous pouvons souligner que les conditions d'expériences sont très proches (à l'exception d'une variation de 1°C pour la température de la pièce).

	Pervaporation : air sec	Pervaporation : air humide 50%
Concentration Φ_0	NaCl 3M (0.15w/w)	
Epaisseur membrane	21 $\pm$ 0.5 μ m	
Température de la pièce	25.6°C	26.7°C
Humidité relative de la pièce	30%	
Temps de nucléation	48min	66min
Concentration à la nucléation	12.6M	9.3M
Sursaturation (nb. de fois la solubilité)	2.07x	1.52x
Vitesse de pervaporation	23nm/s	10.6nm/s

FIG 4.5 – Comparaison des mesures réalisées sur deux microsystèmes lorsque le taux d'humidité de l'air varie dans le canal de pervaporation.

Les concentrations mesurées par réfractométrie au cours de l'expérience sont présentées à la figure 4.6. Nous avons reporté les données de la première chambre de l'expérience présentée au paragraphe 4.1.1 afin de les comparer. On observe, à nouveau, une croissance linéaire de la concentration et des petites variations dues à la lampe. Lorsqu'un événement de nucléation est détecté, la concentration chute au niveau de la solubilité le temps que le cristal croît et touche les parois. Au delà, les données ne sont pas reportées sur le graphique.

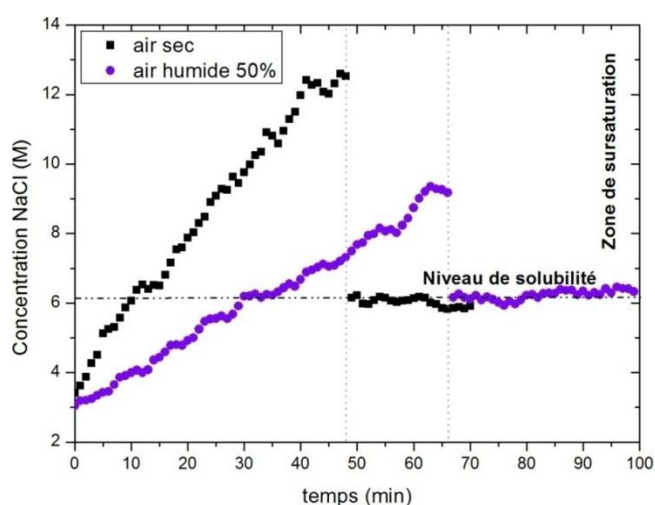


FIG 4.6 – Comparaison des mesures réalisées sur deux microsystèmes lorsque le taux d'humidité de l'air varie dans le canal de pervaporation.

On remarque une variation de la pente de croissance de la concentration qui dépend de la vitesse de pervaporation (la concentration initiale dans chaque chambre étant équivalente). On mesure $p_{air\ sec}=0.2$, $p_{50\%}=0.1$, $v_{e(air\ sec)}=23nm/s$ et $v_{e(50\%)}=10.6nm/s$ soit un facteur 2.2 entre les vitesses de pervaporation de ces deux expériences.

De plus, la concentration de nucléation est à $12.6M$ pour la première expérience et de $9.3M$ pour la seconde soit une variation de 26% de la sursaturation. Bien que le processus de nucléation peut intervenir de manière aléatoire, nous avons observé dans nos expériences précédentes que la sursaturation variait peu d'une chambre à l'autre ($2\pm0.15x$ selon FIG 4.4). Nous pouvons donc conclure que la sursaturation dépend de la vitesse de pervaporation. Ralentir le procédé de pervaporation permet de diminuer la sursaturation.

4.1.3. Diagramme de phase d'une solution ternaire : NaCl, NH₄Br et H₂O

Pour cette expérience, nous avons utilisé le même protocole que l'expérience précédente (air sec $2mbar$ dans le canal de pervaporation). Nous avons choisi de travailler avec deux sels modèles car les expériences de solubilité sont très faciles à reproduire en éprouvette et leurs propriétés sont répertoriées dans les tables. Nous avons réalisé un gradient de concentration linéaire entre deux solutions aqueuses. La première contenait du NaCl ($3M$) et la seconde du bromure d'ammonium (NH₄Br, $4M$). Les valeurs de solubilité de ces deux sels dans de l'eau DI à $25^{\circ}C$ sont respectivement de $6.1M$ ($0.26w/w$) pour le NaCl et de $8M$ ($0.43w/w$) pour le NH₄Br.

Dans le tableau 4.7, nous avons reporté la concentration au début de l'expérience en mole et en fraction massique pour chacune des chambres et exposé une photo des cristaux après concentration par pervaporation des chambres.

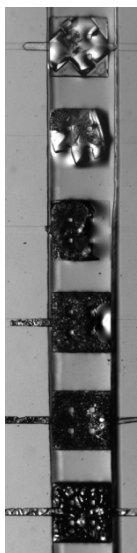
Chambres	Concentrations initiales	
1	NaCl $3M$ ($0.15w/w$)	
2	NaCl $2.4M$ ($0.12 w/w$) NH ₄ Br $0.8M$ ($0.06w/w$)	
3	NaCl $1.8M$ ($0.08w/w$) NH ₄ Br $1.6M$ ($0.12w/w$)	
4	NaCl $1.2M$ ($0.05w/w$) NH ₄ Br $2.4M$ ($0.18w/w$)	
5	NaCl $0.6M$ ($0.03w/w$) NH ₄ Br $3.2M$ ($0.23w/w$)	
6	NH ₄ Br $4M$ ($0.28w/w$)	

FIG 4.7 – Concentrations en NaCl et NH₄Br de chaque chambre au début de l'expérience. A droite, photo des six chambres sous lumière blanche après $60min$ sous pervaporation.

Nous avons observé dans chaque chambre un événement de nucléation et mesuré l'indice de réfraction de la solution. En connaissant la concentration à l'origine des deux sels dans chaque chambre et en utilisant la méthode des fractions massiques présentée au paragraphe 3.8, nous avons pu mesurer la concentration de chaque composé. Ces valeurs sont reportées à la figure 4.8.

Chambres	Temps de nucléation (min)	Concentration NaCl (w/w)	Concentration NH ₄ Br (w/w)
1	38.5	0.41	0
2	47	0.32	0.18
3	57.5	0.23	0.34
4	42	0.13	0.43
5	31	0.05	0.47
6	22	0	0.51

FIG 4.8 – Temps de nucléation et concentrations en NaCl et NH₄Br pour chaque chambre lors d'un événement de nucléation mesurés par réfractométrie.

La vitesse de pervaporation mesurée pour cette expérience est de : $24 \pm 1 \text{ nm/s}$. Afin de mettre à nouveau en évidence la sursaturation de la solution, nous avons choisi de représenter ces mesures dans un schéma ternaire triangulaire (FIG 4.9). Les explications pour la lecture d'un tel diagramme sont disponibles à l'annexe VI.

La courbe bleue présente les valeurs de solubilité selon les tables et trois expériences réalisées en éprouvettes. Pour les deux points rouges, nous avons constaté l'apparition de cristaux au fond de l'éprouvette et déduit que nous avons dépassé la courbe de solubilité. Le point bleu clair représente une expérience en éprouvette avec une solution non saturée (et donc en dessous de la courbe de solubilité). Nous estimons la variation due aux erreurs de pesées à $\pm 1\%$. Cette variation est représentée par la taille des points sur le graphique.

Les points en vert sur le graphique correspondent aux concentrations des solutions mesurées par réfractométrie lorsqu'un événement de nucléation est détecté dans une chambre sous pervaporation. La ligne continue verte est un simple guide pour les yeux du lecteur. Les conditions de cristallisation sont différentes et on observe, comme pour l'expérience précédente, une zone métastable de l'ordre de 1.2 à 1.8x la solubilité.

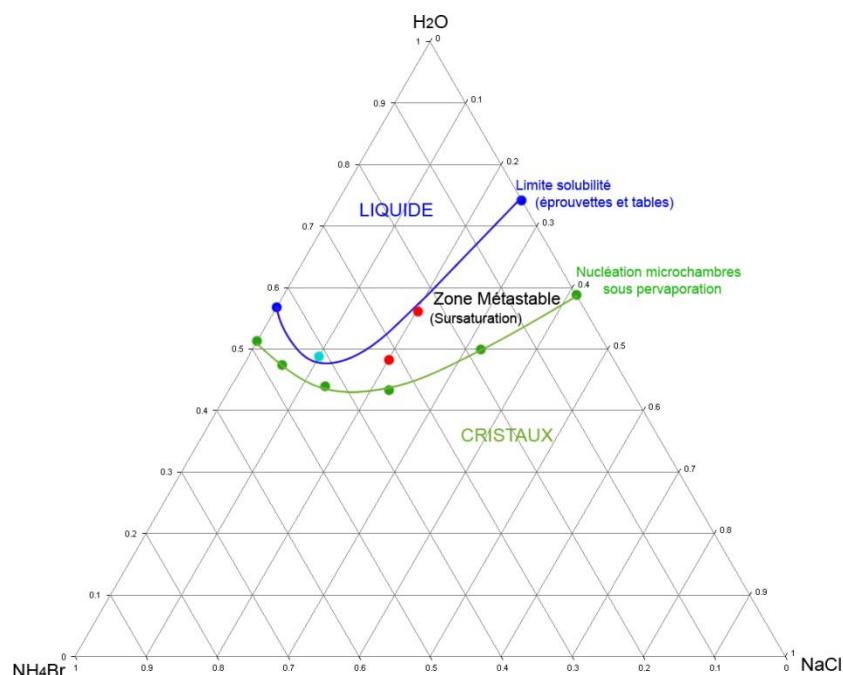


FIG 4.9 – Diagramme de phase ternaire : NaCl, NH₄Br et H₂O. Les points de mesure de la concentration de nucléation sous pervaporation sont représentés en vert (la ligne verte continue est là uniquement pour guider le lecteur. Les points bleus correspondent aux valeurs de solubilité des tables. Les points rouges sont les expériences en éprouvette au-delà de la courbe de solubilité. Finalement, le point bleu clair représente une expérience en éprouvette sous la limite de solubilité (courbe bleue).

La sursaturation semble être une particularité des solutions sous pervaporation en milieu confiné. Elle n'est pas négligeable puisqu'elle peut valoir jusqu'à deux fois (dans les deux cas présenté ici) la valeur de la solubilité donnée par les tables ou des expériences en éprouvettes. Pour étudier des systèmes de transitions plus complexes, il faudra tenir compte que l'on observe les phases "hors équilibre" et que la même expérience réalisée avec d'autres conditions de transformation (volume de la solution, vitesse de concentration) ne montrera pas le même résultat aux mêmes concentrations. Néanmoins, il est intéressant de noter que ce diagramme de phase s'obtient en une heure et en une seule expérience de criblage alors qu'il aurait fallu au moins cinquante expériences individuelles pour parcourir les concentrations explorées par la méthode de pervaporation.

4.2. Etudes de fluides complexes

4.2.1. Solution ternaire composée d'un polymère et un sel : PEG₂₀₀, PEG₃₃₅₀, (NH₄)₂SO₄ et H₂O

Les solutions aqueuses de polyéthylène glycol (PEG) ont fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Mélangées avec un sel organique (sulfate d'ammonium, (NH₄)₂SO₄), ces solutions sont très utilisées dans les biotechnologies pour les procédés d'extraction (séparation et purification) [92, 93]. Pour des concentrations en soluté en dessous de la valeur de démixtion, le fluide est homogène. Lorsque l'on concentre la solution par pervaporation, on observe une transition de liquide à liquide-liquide avec des gouttes riches en (NH₄)₂SO₄ et une phase externe enrichie en PEG (FIG 4.10A). Si on continue à pervaporer, les deux phases vont finir par se figer comme on peut commencer à le voir sur la figure 4.10B où le sel est déjà cristallisé.

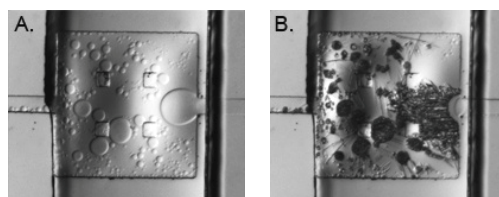


FIG 4.10 – Démixtion du PEG₂₀₀ (A, 30min) et cristallisation de la phase interne composée principalement de sulfate d’ammonium (B, 35min) dans la chambre 1.

Pour cette expérience, nous allons relever les concentrations au moment de la démixtion de la solution pour les deux longueurs de chaînes de PEG considéré (200 et 3350) et comparer nos résultats aux valeurs expérimentales trouvées dans la littérature [53, 94]. Après démixtion, la phase observée dévient inhomogène. Nous n’avons pas étudié en détail les transitions apparues après démixtion. Elles ne seront donc pas reportées dans l’analyse de l’expérience.

Nous avons utilisé le même protocole que l’expérience précédente (air sec 2mbar dans le canal de pervaporation). Le tableau 4.11 présente la concentration des chambres au début de l’expérience. La valeur en sel est constante mais les quantités en PEG (200 ou 3350) forment un gradient linéaire entre les six chambres. La sixième chambre ne possède que du sel. La valeur de solubilité du (NH₄)₂SO₄ dans de l’eau à 25°C est, selon les tables, de 3.12M (soit 29%w/w). La photo de droite montre les chambres à la fin de l’expérience.

Chambres	Concentrations initiales	
1	PEG 0.20w/w (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	
2	PEG 0.16w/w (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	
3	PEG 0.12w/w (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	
4	PEG 0.08w/w (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	
5	PEG 0.04w/w (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	
6	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 w/w	

FIG 4.11 – Concentrations en PEG et en sulfate d’ammonium de chaque chambre au début de l’expérience. A droite, photo des six chambres sous lumière blanche après 250min sous pervaporation (PEG₃₃₅₀).

Les deux tableaux suivants (4.12 et 4.13) présentent les résultats des deux expériences. Nous avons relevé le temps de démixtion pour les cinq premières chambres et les concentrations en PEG (200 et 3350) et en sel au moment de la séparation liquide-liquide. La vitesse de pervaporation est similaire pour chacune de ces deux expériences et est mesurée à 24 ±2nm/s.

Chambres	Temps de démixtion (min)	Concentration PEG ₂₀₀ (w/w)	Concentration (NH ₄) ₂ SO ₄ (w/w)
1	16	0.47	0.12
2	19	0.44	0.14
3	24	0.40	0.17
4	33.5	0.34	0.21
5	45	0.24	0.30
6	83.5 (cristallisation)	0	0.58 (cristallisation)

FIG 4.12 – Temps de démixtion et concentrations en PEG₂₀₀ et NH₄Br pour chaque chambre mesurés par réfractométrie. La dernière chambre cristallise car elle ne contient que du sel.

Chambres	Temps de démixtion (min)	Concentration PEG ₃₃₅₀ (w/w)	Concentration (NH ₄) ₂ SO ₄ (w/w)
1	12	0.38	0.09
2	15	0.36	0.11
3	17.5	0.32	0.13
4	25	0.30	0.18
5	34.5	0.21	0.27
6	83 (cristallisation)	0	0.56 (cristallisation)

FIG 4.13 – Temps de démixtion et concentrations en PEG₃₃₅₀ et NH₄Br pour chaque chambre mesurées par réfractométrie. La dernière chambre cristallise puisqu'elle ne contient que du sel.

Nous avons reporté nos mesures dans un diagramme de phase où les concentrations des deux solutés constituent les axes d'ordonnée et d'abscisse (FIG 4.14). Il n'est pas étonnant que la concentration en PEG pour des chaînes courtes (PEG₂₀₀) soit plus grande que pour des chaînes plus longues (PEG₃₃₅₀). Cette observation avait déjà été réalisée précédemment dans la publication de Yun-Long Gao en 1991 [94]. L'allure générale de ce diagramme est cohérente avec la littérature. Néanmoins, nous avons constaté que les valeurs de démixtion que nous avons trouvées pour des microchambres sous pervaporation sont au-delà des expériences faites en éprouvette dans cette même publication. Cela indique la présence de sursaturations en bonne cohérence avec les solutions ioniques présentées dans le paragraphe précédent.

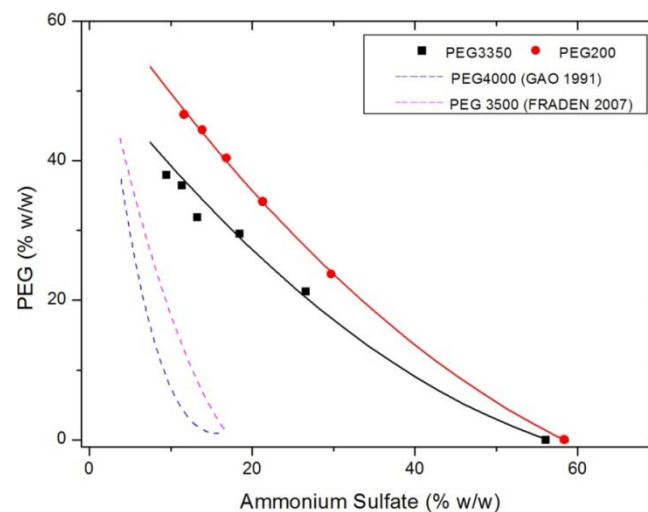


FIG 4.14 – Transition liquide-liquide entre du (NH₄)₂SO₄ et du PEG₂₀₀/PEG₃₃₅₀ observée dans des microchambres sous pervaporation ($v_e=24\text{nm/s}$). Comparaison avec les données de deux publications symbolisées par les deux lignes continues à gauche du graphique [53, 94].

Les expériences réalisées par le groupe de Seth Fraden en 2007 [53] sont aussi des expériences de pervaporation et on constate que les concentrations de démixtion sont aussi au-delà de la courbe binodale mesurée par Yun-Long Gao (FIG 4.14). Même si le mécanisme de concentration de la solution est le même que pour nos expériences, il existe plusieurs différences significatives entre nos deux protocoles qui peuvent expliquer une telle variation des mesures. Contrairement à nos expériences, il leur a été nécessaire d'ajouter un colorant alimentaire (5%w/v) pour suivre la concentration en sel de la solution. Ce dernier peut avoir une influence sur la concentration de démixtion. De plus, leur vitesse de pervaporation est au moins 5 fois plus faible⁹ que celle utilisée pour nos expériences, ce qui réduit fortement la sursaturation comme nous l'avons montré lors d'expériences précédentes.

En conclusion, nous avons criblé des solutions complexes en réalisant la mesure de la courbe de démixtion pour ces deux systèmes ternaires (PEG₂₀₀ et PEG₃₃₅₀). L'expérience a duré 1h20min par solution. Pour reproduire les concentrations explorées par pervaporation, il faudrait réaliser quelques dizaines d'expériences individuelles en éprouvettes.

4.2.2. Etudes d'une solution binaire avec un surfactant : AOT et H₂O

Nous avons choisi, pour plusieurs raisons, de travailler pour cette étude avec l'AOT. Tout d'abord, c'est un surfactant modèle qui a déjà été longuement étudié. Il est utilisé pour les études d'encapsulation par micelles inverses dans les microémulsion (encapsulation de drogues, synthèse de nanoparticules, ...) [95, 96] et possède un diagramme de phase très intéressant¹⁰. De plus, en ce concentrant, la solution finit par ne plus s'écouler aux environs de 75-80% d'AOT. Cela va nous permettre de tester le procédé avec des conditions de forte viscosité.

Comme nous avons déjà parlé de l'AOT dans le chapitre 1 en présentant une expérience de pervaporation réalisée dans des doigts [55], nous allons simplement rappeler ici les paramètres importants pour notre expérience. Lorsqu'on concentre une solution aqueuse d'AOT à température ambiante, nous pouvons observer successivement trois phases : une structure lamellaire (15 à 75%w/w d'AOT), cubique (autour de 80%w/w) et hexagonale (85 à 100%w/w). Il est souvent délicat de savoir quelle phase est observée sans utiliser des rayons X. Néanmoins, la vitesse de pervaporation et l'observation des phases sous de la lumière polarisée (les phases lamellaire et hexagonale étant biréfringentes) donnent des indications non négligeables.

L'AOT que nous utilisons pour nos expériences provient de chez Sigma Aldrich et est pur à 99%. C'est un solide à l'aspect cireux. Selon [97], à 75%w/w d'AOT, la solution devient très visqueuse et ressemble visuellement à du cristal. Juste avant d'atteindre cette concentration, l'échantillon se comporte déjà comme un gel (ne s'écoule pas). Pour tenter d'observer au mieux ces transitions de phases, nous avons réalisé une solution aqueuse contenant 1%w/w d'AOT et choisi de travailler à vitesse de pervaporation réduite par rapport aux expériences précédentes pour limiter la sursaturation. Nous avons observé l'expérience sous lumière blanche et sous polariseurs croisés pour observer la biréfringence des phases. En parallèle, nous avons mesuré cette vitesse par réfractométrie en début d'expérience à $v_e = 1.5 \pm 0.2 \text{ nm/s}$.

⁹ En faisant circuler de l'eau salée (NaCl 6M) dans le circuit de pervaporation au lieu d'air sec.

¹⁰ Diagramme de phase présenté à la figure 1.24.

Le graphique 4.15 montre l'évolution de la concentration de la solution mesurée par réfractométrie. La courbe rouge indique la concentration calculée avec la vitesse de pervaporation estimée précédemment. On constate un excellent accord aux temps courts. Ensuite, la courbe de concentration obtenue par réfractométrie (en noir sur le graphique) commence à diverger fortement aux environs de 1500min, 60% w/w d'AOT. Si l'on observe la chambre sous lumière blanche (photos au dessus du graphique), cet événement correspond à l'apparition d'une inhomogénéité dans la chambre (favorisée par une forte augmentation de la viscosité). Les photos prises sous polariseurs croisés ont révélé deux phases bien distinctes que l'on a pu attribuer respectivement à la phase lamellaire (à gauche dans le graphique) et à la phase hexagonale (à droite dans le même graphique). Lorsque la chambre n'est plus homogène, le signal de réfractométrie devient difficilement interprétable (points en gris sur la figure 4.15).

Il faut ainsi pour la réfractométrie, viser des conditions homogènes dans les chambres. L'apparition de phases très visqueuses interdit, pour l'AOT, une homogénéisation, ce qui limite la portée de la technique. Le criblage reste possible et on peut dire que de cette expérience, les deux phases (lamellaire et hexagonale) ont été mises en évidence en 2 jours.

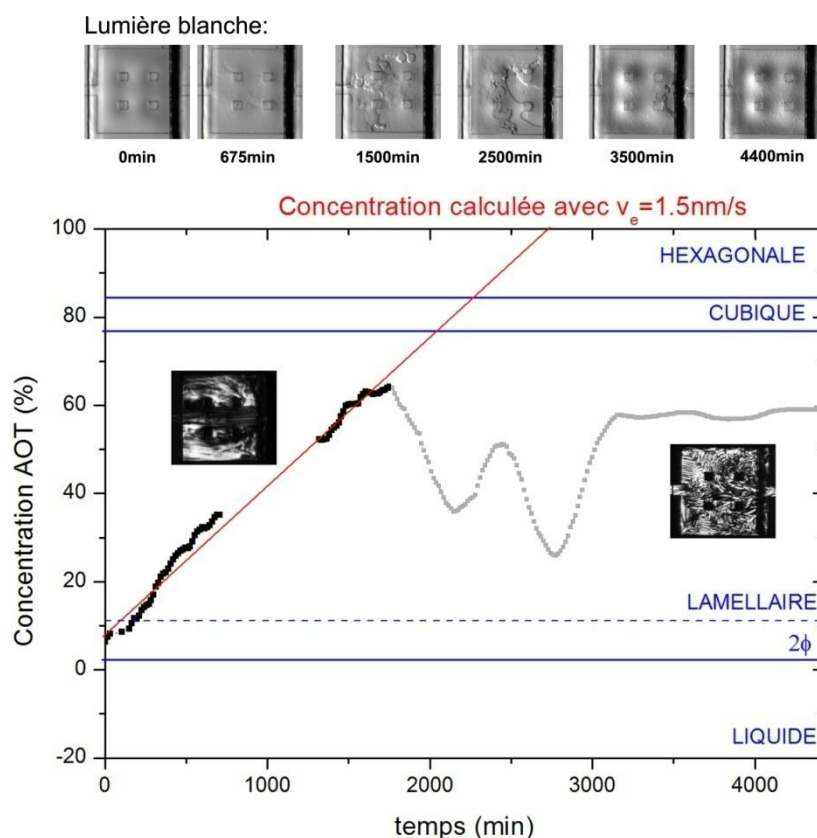


FIG 4.15 – Concentration en AOT mesurée par réfractométrie en fonction du temps. La courbe rouge montre l'évolution de la concentration pour $v_e = 1.5 \text{ nm/s}$. La photo de gauche montre la phase lamellaire sous polariseurs croisés, celle de gauche la phase hexagonale. Les photos sous lumière blanche sont présentées au dessus du graphique. On observe une inhomogénéité de la concentration dans la chambre entre 1500 et 3000min. Cela correspond à des variations au niveau du contraste à la paroi et induit des erreurs de mesures de concentrations par réfractométrie.

L'expérience décrite maintenant illustre l'importance de la cinétique. Nous avons repris notre protocole précédent et accéléré le processus pour établir des vitesses de pervaporation 15 fois supérieures (de l'ordre de $24 \pm 1 \text{ nm/s}$).

Les mesures de concentrations par réfractométrie sont présentées à la figure 4.16. Elles sont difficilement interprétables en terme de concentrations moyennes à cause des inhomogénéités présentes dans la chambre qui induit de fortes variations de contraste à la paroi. Cette inhomogénéité est très bien illustrée par l'image finale sous polariseurs croisés (juste au dessus du graphique à droite) où l'on retrouve plusieurs phases cohabitant dans la chambre. Certaines zones sont biréfringentes et d'autres ne le sont pas.

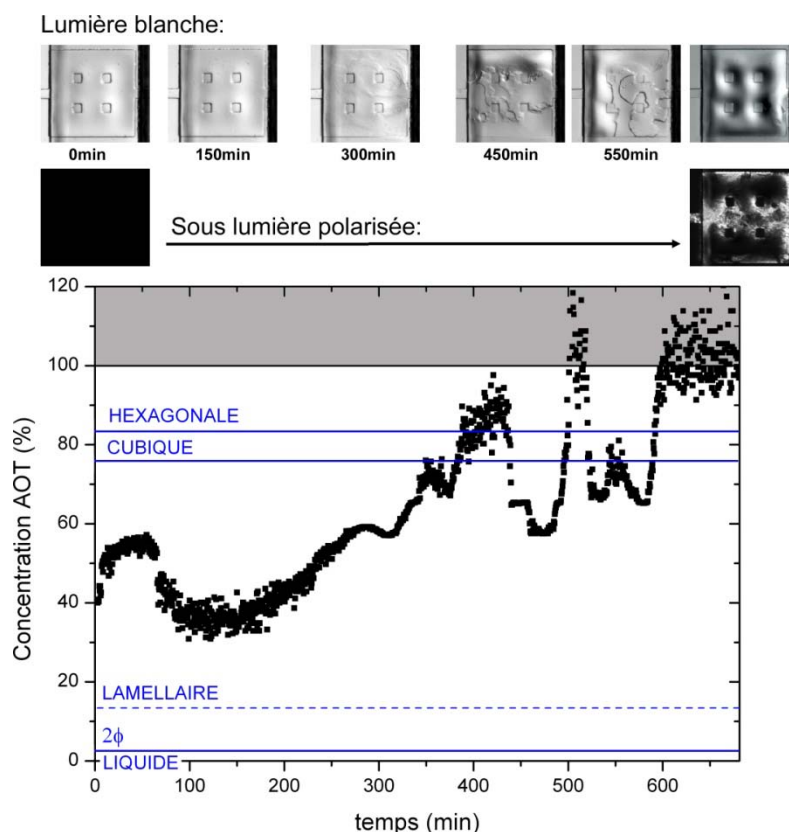


FIG 4.16 – Concentration en AOT mesurée par réfractométrie en fonction du temps. La vitesse de pervaporation est de l'ordre de $v_e=24\pm 1\text{nm/s}$. Les photos sous lumière blanche et sous polariseurs croisés sont présentées au dessus du graphique. La phase finale observée sous polariseurs croisés (en haut à droite) est inhomogène.

Ces deux expériences soulignent l'importance du rôle de la vitesse de pervaporation. Lorsqu'elle est trop rapide, elle peut induire des inhomogénéités dans la chambre. Cette situation est liée au fait que le nombre de Péclet dans la chambre est grand. La concentration de la solution peut alors difficilement être interprétée par la méthode de réfractométrie à la paroi. Cependant, en réduisant la vitesse de pervaporation, on arrive à cribler ce type de solutions.

4.3. Le criblage de protéines

Suite aux expériences réalisées avec des solutions ioniques, des surfactants ou des polymères, nous avons voulu confronter notre système avec la cristallisation de protéines. Pour cristalliser une protéine, comme nous l'avons expliqué au chapitre 1, il est nécessaire d'avoir le bon agent cristallisant et le bon pH. Ensuite, il faut concentrer la solution au-delà de la solubilité jusque dans la zone labile où la nucléation est favorisée. Finalement, lorsqu'on veut favoriser la croissance cristalline, il est

parfois nécessaire de diluer la solution pour qu'elle se trouve dans les concentrations de la région métastable¹¹ [1].

La protéine modèle que nous avons choisie de cristalliser est le lysozyme. C'est une protéine globulaire soluble dans l'eau, formée de 129 acides aminés qu'on trouve dans le blanc d'œuf. Sa structure tridimensionnelle est connue depuis 1965 et sert souvent de modèle lors des études préliminaires [98]. Si la température, la sursaturation et le pH influencent la cristallisation, le pH est le paramètre qui a le plus d'effet sur le nombre et la taille des cristaux et doit être compris entre pH 4.2 et 5.5 [99].

Le diagramme de phase du lysozyme est présenté à la figure 4.17 selon [100]. Les concentrations de la protéine et de son agent cristallisant (NaCl) sont reportées en abscisse et en ordonnée. La courbe en trait plein correspond à la solubilité et les points aux données expérimentales (les traits discontinus étant simplement des guides pour le lecteur). On distingue bien trois régions, une zone où la solution est sous-saturée et donc soluble, un état métastable favorable à la croissance cristalline et une région plutôt favorable à la nucléation (état labile). La solution aqueuse que nous avons réalisée pour notre expérience est indiquée par le point noir (nous en détaillerons la composition plus loin) et la flèche indique la variation de concentration induite par la pervaporation.

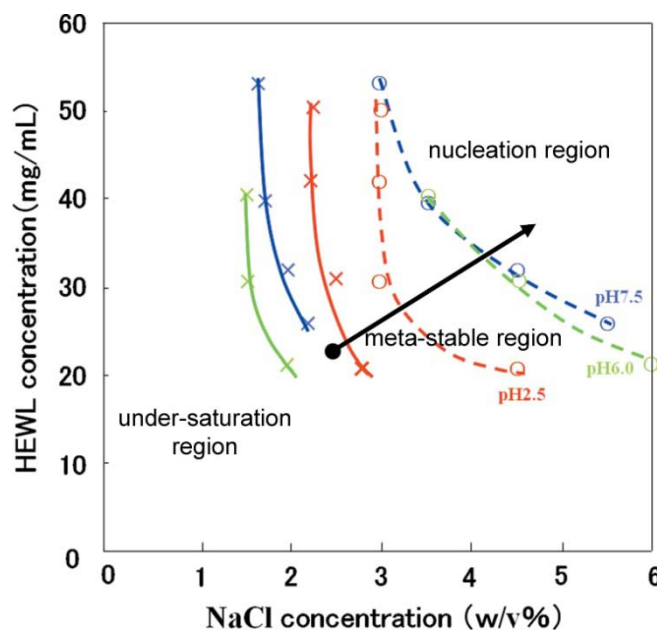


FIG 4.17 – Diagramme de phase du lysozyme (Hen Egg White Lysozyme) en fonction de la concentration en sel et du pH selon [100]. Les traits pleins correspondent à la courbe de solubilité et les points aux données expérimentales (○). Les courbes en pointillés ne sont que des guides pour le lecteur.

La solution aqueuse que nous avons réalisée est tamponnée à pH5 (Na-acétate 1M) et contient 22.5mg/mL de lysozyme et 0.45M de NaCl. Nous avons réalisé deux expériences avec des vitesses de pervaporation différentes : de l'ordre de $v_e=23\text{nm/s}$ pour la première et environ $v_e=1\text{nm/s}$ pour la seconde expérience. La température est à chaque fois maintenue à 20°C à l'aide d'une platine à effet pelletier (Linkam).

¹¹ Voir §1.3.3.

Après 24 heures et en fonction de la vitesse de pervaporation de l'expérience, les résultats obtenus sont très différents. Avec une vitesse de pervaporation de l'ordre de $v_e=23\text{nm/s}$, nous obtenons une structure amorphe. La concentration de la solution s'est faite trop rapidement et la protéine a précipité avant de cristalliser (FIG 4.18A). Lorsqu'on diminue fortement la vitesse de pervaporation (aux environs de $v_e=1\text{nm/s}$), nous obtenons des cristaux de protéines (FIG 4.18B).

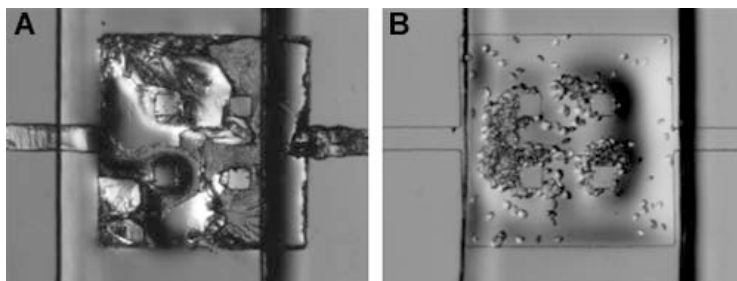


FIG 4.18 – Solution aqueuse de lysozyme (22.5mg/mL), NaCl (0.45M) tamponnée à $\text{pH}5$ après 24h sous pervaporation. (A) $v_e=23\text{nm/s}$ et (B) $v_e=1\text{nm/s}$.

On reconnaît les cristaux de lysozyme car ils sont biréfringents (contrairement aux cristaux de NaCl) et sont de forme tétragonale comme on peut le voir sur la figure 4.19 lors d'une expérience préliminaire réalisée dans un puits [101].

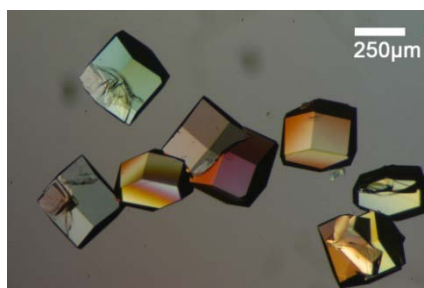


FIG 4.19 – Cristaux de lysozyme lors d'une expérience de cristallisation dans un puits sous polariseurs croisés (lysozyme : 25mg/mL , NaCl : 0.5M , $\text{pH} 5$, $t=24\text{h}$).

Les systèmes microfluidique de criblage de protéines existant sont déjà très avancés par rapport à l'expérience que nous avons menée sur notre propre microsystème mais cette expérience démontre les possibilités du criblage en chambre par pervaporation. [9, 18, 52]. Il faudrait étudier la possibilité de diluer le contenu d'une chambre après pervaporation pour passer de la zone labile du diagramme de phase d'une protéine à la zone métastable plus favorable à la croissance. Pour cela, nous pourrions utiliser des solutions salines dans le canal de pervaporation au lieu d'air comme cela a déjà été démontré pour un système de pervaporation en gouttes [53]. Notre microsystème aurait alors un atout supplémentaire : la possibilité de diffuser dans le canal d'alimentation. Diluer une solution à travers une membrane est un procédé très lent (une dizaine d'heures au moins suivant la concentration désirée). Avec notre microsystème, nous pourrions envisager de réduire rapidement la concentration dans la chambre ou de la maintenir constante en équilibrant le flux de diffusion dans le canal d'alimentation et la pervaporation.

4.4. Conclusion

Nous voudrions résumer les points essentiels de ce chapitre. Le réfractomètre a permis de mesurer directement la sursaturation des solutions et de localiser des transitions de phases de manière élégante. Ces deux aspects sont très utiles pour le criblage. Les expériences réalisées sur des solutions ioniques ont permis de mettre en évidence les sursaturations présentes dans les microchambres. Cette zone métastable dépend de la vitesse de pervaporation. Nous avons montré qu'en ralentissant le procédé, nous pouvions la diminuer. Nous avons ensuite étudié deux types de fluides complexe. L'étude de la démixtion d'une solution composée d'un polymère et d'un sel a permis de montrer la validité de notre procédé. Le criblage d'un surfactant a illustré les possibilités de cribler des solutions très visqueuses. Enfin, les expériences préliminaires réalisées sur une protéine ont ouvert les possibilités de cristalliser des particules très délicates.

Conclusion

Dans ce travail de thèse, nous avons présenté un système microfluidique destiné au criblage. Nous avons utilisé la pervaporation pour explorer les diagrammes de phases de solutions modèles et travaillé dans des chambres de $5nL$. La fabrication du microsystème est basée sur les technologies de fabrication par lithographie molle. Les membranes en PDMS ne sont perméables qu'à l'eau dans le cadre des expériences réalisées lors de ce travail. Cela nous permet de concentrer une solution aqueuse en soluté jusqu'à observer des phénomènes de transitions de phase (cristallisation, démixtion, nucléation, changement de structure, ...). Nous avons dû développer un protocole particulier pour réaliser des canaux de $1mm$ de haut qui minimisent la pression exercée sur la membrane. Les microsystèmes sont robustes et résistent à des pressions de l'ordre de $4bar$ dans les canaux. L'épaisseur de la membrane constante et reproductible ($e=21\pm0.5\mu m$) permet de garantir un processus de pervaporation homogène et contrôlé.

La concentration étant un paramètre essentiel du criblage, nous avons été amenés, dans un premier temps, à développer un outil de mesure *in situ* en temps réel. Cette méthode a pour avantage d'être non intrusive et sans modification particulière du microsystème. Elle consiste à utiliser les parois du microsystème comme élément optique. Elle nécessite une source lumineuse non collimatée comme l'ont montré la modélisation numérique et les expériences que nous avons réalisées. Le principe est le suivant : il existe en général un saut d'indice à la paroi. Les rayons lumineux qui traversent l'interface paroi-chambre dévient par réfraction. Cela se traduit au niveau du plan image par une zone sombre qui en retour donne une information sur la concentration. Cette méthode permet de mesurer la concentration avec une précision de $5\cdot 10^{-3}M$ qui est comparable systèmes déjà existants. Nous avons montré que, par cette méthode, nous pouvons estimer un coefficient de diffusion (glycérol dans de l'eau) et un rapport de viscosité dans une T-jonction sans ajouter de traceurs ni utiliser la fluorescence, conditions importantes pour les applications chimiques.

Dans un second temps, nous avons réalisé une série d'expériences de criblage sur des systèmes modèles (solutions ioniques, surfactants, polymères, protéines, ...) avec notre microsystème fluidique. Chaque expérience a été analysée par la méthode réfractométrique. Nous avons observé de manière globale que concentrer des petits volumes permettaient de maintenir la solution dans un état métastable (sursaturé) plus longtemps que pour des expériences classiques en éprouvettes (solutions ioniques, PEG). Cette sursaturation est quantifiable (de l'ordre de 2 fois la concentration de solubilité,

pour nos expériences) et est d'autant plus importante que la vitesse de pervaporation est grande. En parallèle, nous avons remarqué des inhomogénéités dans les chambres, lorsque la solution devient trop visqueuse (AOT) et un résultat amorphe dans le cas de la cristallisation de protéine (lysozyme). Ces observations nous ont amenés à réduire la vitesse de pervaporation (de 25nm/s à 1.5nm/s). En la diminuant, nous avons obtenu des résultats intéressants comme une diminution significative de la sursaturation pour une solution ionique (NaCl), une meilleure homogénéisation de la chambre pour l'AOT et l'observation des phases attendues (lamellaire, hexagonale) sous lumière polarisée, ainsi que des cristaux de lysozyme.

Finalement, il apparaît que la pervaporation était une piste intéressante pour étudier des diagrammes de phase. Des améliorations du microsystème sont envisageables suivant les solutions que l'on désire étudier. Les expériences de criblage restent néanmoins des problématiques complexes et par conséquent, les microsystèmes le sont aussi. Une bonne connaissance des technologies de microfabrication (principalement par lithographie molle) est indispensable ainsi que des notions de physico-chimie. L'analyse de la concentration par réfractométrie est particulièrement adaptée pour ce type d'expériences puisque les matériaux utilisés sont optiquement transparents et les parois rarement droites dans les procédés de microfabrication classique.

Annexes

AI. Données numériques pour la loupe binoculaire¹²

Living up to Life



Optical Data

Instrument **Leica MZ10F Stereomicroscope**

a) Visual Data

iris Diaphragm -
Objective Planapo 1.0x (10447151) Working Distance 55 mm
Eyepiece 10x/21 B (10447160)
Tube Factor -

Zoom Position	Total Magnification	Object Field mm	numerical Aperture	Diameter Exit Pupil mm	Resolution lp/mm	Resolution μ m	Depth of Field* mm
0.8	8. x	26.3	0.025	1.56	75	13.3	2.14
1.0	10. x	21.	0.031	1.55	93	10.8	1.38
1.25	12.5 x	16.8	0.036	1.44	108	9.26	0.968
1.6	16. x	13.1	0.045	1.41	135	7.41	0.608
2.0	20. x	10.5	0.054	1.35	162	6.17	0.409
2.5	25. x	8.4	0.064	1.28	192	5.21	0.28
3.2	32. x	6.56	0.078	1.22	234	4.27	0.181
4.0	40. x	5.25	0.093	1.16	279	3.58	0.123
5.0	50. x	4.2	0.101	1.01	303	3.3	0.094
6.3	63. x	3.33	0.124	0.98	372	2.69	0.061
8.0	80. x	2.63	0.125	0.78	375	2.67	0.052

* after Berek

¹² La MZ 10F a des caractéristiques équivalentes à la MZ FLIII (selon Leica Microsystems).

AII. Données numériques pour le macroscopie

Optical Data



Instrument **Macroscopie Leica Z16APO**

Visual Data

Objective Planapo 1.0x (10447176) Working Distance 97 mm
 Eyepiece 10x/21B (10445111)
 Tube Factor 1.25 (Y-Tube)

Zoom Position	Total Magnification	Field of View mm	numerical Aperture	Diameter Exit Pupil mm	Resolution lp/mm	Resolution μ m	Depth of Field* mm
0.57	7.13	29.5	0.017	1.19	51.	19.6	3.76
0.8	10.	21.	0.023	1.15	69.	14.5	2.
1.0	12.5	16.8	0.027	1.08	81.	12.3	1.38
1.6	20.	10.5	0.041	1.03	123.	8.13	0.578
2.0	25.	8.4	0.049	0.98	147.	6.8	0.392
2.5	31.3	6.72	0.058	0.93	174.	5.75	0.269
3.2	40.	5.25	0.069	0.86	207.	4.83	0.181
4.0	50.	4.2	0.079	0.79	237.	4.22	0.13
5.0	62.5	3.36	0.089	0.71	267.	3.75	0.096
6.3	78.8	2.67	0.099	0.63	297.	3.37	0.072
8.0	100.	2.1	0.107	0.54	321.	3.12	0.056
9.2	115.	1.83	0.112	0.49	336.	2.98	0.048

* after Berek

Leica Microsystems (Switzerland) Ltd
 Business Unit SM
 CH - 9435 Heerbrugg

Telephone +41 71 726 3333
 Fax +41 71 726 3366
www.stereozoom.com

Stereozoom Data.xls
 26.08.2003

AIII. Modélisation numérique : code source MATLAB

```
%-----  
function Res=f_exp_2interfaces_surface()  
  
%clear graphiques  
close all  
clear all  
%-----  
%MATRICE D'INDICES  
%-----  
  
%Initialisation de la matrice d'indice  
INDICE=ones(100,700);  
v_PENTE1=zeros(50,1);  
v_PENTE2=zeros(50,1);  
  
%définition indices  
npdms=1.41;  
nsol=1.33; %H2O, initialisation valeur indice  
%boucle variation d'indice de 1.33 à 1.48  
for m=1:31  
    FINAL(m,1)=nsol;  
% Remplissage de la matrice d'indice (1.41 pdms, et isol pour la solution)  
%//A MODIFIER LORSQUE L'ON CHANGE DE PROFIL\<\  
    INDICE(:, :)=npdms;  
%définition des points départ: ax,ay, arrivée by et de la pente  
    ax1=200;  
    ax2=500;  
    ay=25;  
    by=75;  
    angle=54.7; %angle en degrés (défini par la gravure)  
    pente=-tan(pi*angle/180); %angle de la droite  
    alpha1=ay+pente*ax1;  
    alpha2=ay-pente*ax2; %equation de la droite: x=pente*y+alpha  
    bx1=(by-alpha1)/(-pente);  
    bx2=(by-alpha2)/pente;  
    teta2=0;  
    ON=0.101; %OUVERTURE NUMERIQUE APPAREIL  
    angleON=(asin(ON)*180/pi); %/1.41 pour tenir compte de la réfraction  
    pdms-air en sortie!!!  
%remplissage de l'interface (entre by et ay)  
    for i=ay:by  
        for j=1:700  
            if j<=(i-alpha2)/pente %j < ou = a la valeur de la droite  
limite  
                INDICE(i,j)=nsol;  
            end  
            if j<=(i-alpha1)/(-pente)  
                INDICE(i,j)=npdms;  
            end  
        end  
    end  
end  
%-----  
%VECTEUR PENTE REMPLISSAGE  
%-----  
%//A MODIFIER LORSQUE L'ON CHANGE DE PROFIL\<\  
%pente a zero sauf sur l'interface diagonale ou pente=défini ligne 29  
for i=1:51
```

```

        v_PENTE1(i,1)=-pente;
        v_PENTE2(i,1)=pente;
    end
%-----
%PROPAGATION RAYONS LUMINEUX
%-----
%vecteur X et Y sont les coordonnées du rayon lumineux sur la matrice
d'indices
    ECRAN=zeros(706,2);
    for a=1:706 %remplissage coordonnées x écran (y =intensité qui frappe a
ce point)
        ECRAN(a,1)=a;
    end
    %position initiale du rayon (valeur réelle)
    for i=1:1:700
        for angler=-8:0.1:8 %divergence des rayons et pas pour la variation
d'angle
            X=zeros(99,1);
            Y=zeros(99,1);
            X(1)=i;
            Y(1)=1;
            penter=tan(pi*angler/180); %pente du rayon (variation de 17°)
            dx=penter; %calcul coordonnées dx déplacement latéral pour y+1
en vertical au départ du rayon
            x_coord=i;
            for k=1:99
                x_coord=x_coord+dx;
                X(k+1)=round(x_coord);%round pour s'inscrire dans la
matrice d'indice
                Y(k+1)=Y(k)+1; %point virtuel pour le calcul de l'indice
                if X(k+1)<1 | (X(k+1))>700 % si les rayon sont perdu
latéralement
                    break %le reste du vecteur X,Y est a zero et
l'intensité transmise aussi
                %-----
                %REFRACTION
                %-----
                elseif INDICE(Y(k),X(k))~=INDICE(Y(k+1),X(k+1))%
récupération des valeur de l'indice
                    if ay<Y(k) & Y(k)<by & i>350 %si on est dans la zone
ou se trouve la pente2
                        pente_interface=v_PENTE2(Y(k)-23,1);
                        teta1=angle-angler; %en degrés

                        teta2=asin(sin(pi*teta1/180)*INDICE(Y(k),X(k))/INDICE(Y(k+1),X(k+1)))*180/p
i; %en degrés

                        angler=angle-teta2; %en degrés
                        dx=tan(pi*angler/180);
                    else
                        teta1=angler; %en degrés

                        teta2=asin(sin(pi*teta1/180)*INDICE(Y(k),X(k))/INDICE(Y(k+1),X(k+1)))*180/p
i; %en degrés

                        angler=teta2;
                        dx=tan(pi*angler/180);
                    end
                    if ay<Y(k) & Y(k)<by & i<350 %si on est dans la zone
ou se trouve la pente1
                        pente_interface=v_PENTE1(Y(k)-23,1);
                        teta1=-angle-angler; %en degrés

```

```

teta2=asin(sin(pi*teta1/180)*INDICE(Y(k),X(k))/INDICE(Y(k+1),X(k+1)))*180/p
i; %en degrés
        angler=-angle-teta2; %en degrés
        dx=tan(pi*angler/180);
    else
        teta1=angler; %en degrés

teta2=asin(sin(pi*teta1/180)*INDICE(Y(k),X(k))/INDICE(Y(k+1),X(k+1)))*180/p
i; %en degrés
        angler=teta2;
        dx=tan(pi*angler/180);
    end
    if imag(teta2)~=0 % réflexion totale
        break %le reste du vecteur X Y est a zéro et
l'intensité transmise aussi
    end
end
end
%        figure(1) %plot écran
%        plot(X,Y);
%        hold on
%        if angler<angleON %on coupe le rayon du coté positif, cas
asymétrique : loupe binoculaire
%        if -angleON<angler & angler<angleON %on coupe à l'ON
symétriquement des 2 côtés : cas microscope et macroscopie
            ECRAN((X(99)+1),2)=ECRAN((X(99)+1),2)+1;
            ECRAN(1,2)=0;
            ECRAN(701,2)=0;
            ECRAN(702,2)=0;
            ECRAN(703,2)=0;
            ECRAN(704,2)=0;
            ECRAN(705,2)=0;
            ECRAN(706,2)=0;
        end
    end
end
%
%
% surf(INDICE); %graphique 3D de la matrice d'indice
figure(m)
plot(ECRAN(:,1),ECRAN(:,2));
moyenne=0; %moyenne en dessous de laquelle la surface est comptée
surface_neg1=0; %surface1 de la zone "sombre"
surface_pos1=0; %surface1 de la zone "claire"
surface_neg2=0; %surface2 de la zone "sombre"
surface_pos2=0; %surface2 de la zone "claire"

for i=300:400 %valeur moyenne (loin des interfaces, =I (théorie))
    x=ECRAN(i,2);
    moyenne=moyenne+ECRAN(i,2);
end
moyenne=moyenne/101; %moyenne signal écran

%INTERFACE 1
for i=50:300 % à vérifier au cas par cas pour les bornes
    if ECRAN(i,2)<moyenne %pour casser la partie qui perd en intensité
        surface_neg1=surface_neg1+(moyenne-ECRAN(i,2));
    elseif ECRAN(i,2)>moyenne
        surface_pos1=surface_pos1+(ECRAN(i,2)-moyenne);
    elseif nsol==1.41

```

```

        surface=0;
    end
end

%INTERFACE 2
for i=400:650 % à vérifier au cas par cas pour les bornes
    if ECRAN(i,2)<moyenne %pour casser la partie qui perd en intensité
        surface_neg2=surface_neg2+(moyenne-ECRAN(i,2));
    elseif ECRAN(i,2)>moyenne
        surface_pos2=surface_pos2+(ECRAN(i,2)-moyenne);
    elseif nsol==1.41
        surface=0;
    end
end

surface1=surface_neg1-surface_pos1; %surface1 observée par la camera
surface2=surface_neg2-surface_pos2; %surface2 observée par la camera
if surface1<0
    surface1=0;
end
if surface2<0
    surface2=0;
end

% CAS SYMETRIQUE-----
% surface_totale=(surface1+surface2)/2 % =Icoll (théorie)
% CAS ASYMETRIQUE-----
if surface2<surface1
    surface_totale=surface1; % =Icoll (théorie)
elseif surface1<surface2
    surface_totale=surface2; % =Icoll (théorie)
else
    surface_totale=0; % =Icoll (théorie)
end

%-----
FINAL(m,2)=surface_totale/(moyenne*264.598)    %(largeur  moyenne  en
pixels du canal simulé, comparaison expériences)
nsol= nsol+0.005;
end
figure(32)
plot(FINAL(:,1),FINAL(:,2));
end
%
```

AIV. Lecture d'un diagramme de phase ternaire

Bien que la lecture d'un diagramme de phase ternaire soit triviale pour un chimiste, elle l'est moins pour un physicien. C'est pour cette raison que nous nous sommes permis de détailler rapidement sa lecture dans cette annexe.

La présence de trois constituants dans un mélange permet une représentation triangulaire. La figure AVI.1 présente les règles de lecture du diagramme. Chaque sommet correspond à un constituant pur A, B ou C. Sur chaque coté du triangle, on peut indiquer la composition des mélanges binaires (entre 0 et 100%) A-B, A-C et B-C. Chaque point à l'intérieur du triangle représente un mélange ternaire A-B-C sachant que $\%A + \%B + \%C = 100\%$. L'unité utilisée pour indiquer la proportion des différents constituants peut être un pourcentage molaire, massique ou volumique et est à préciser pour chaque diagramme.

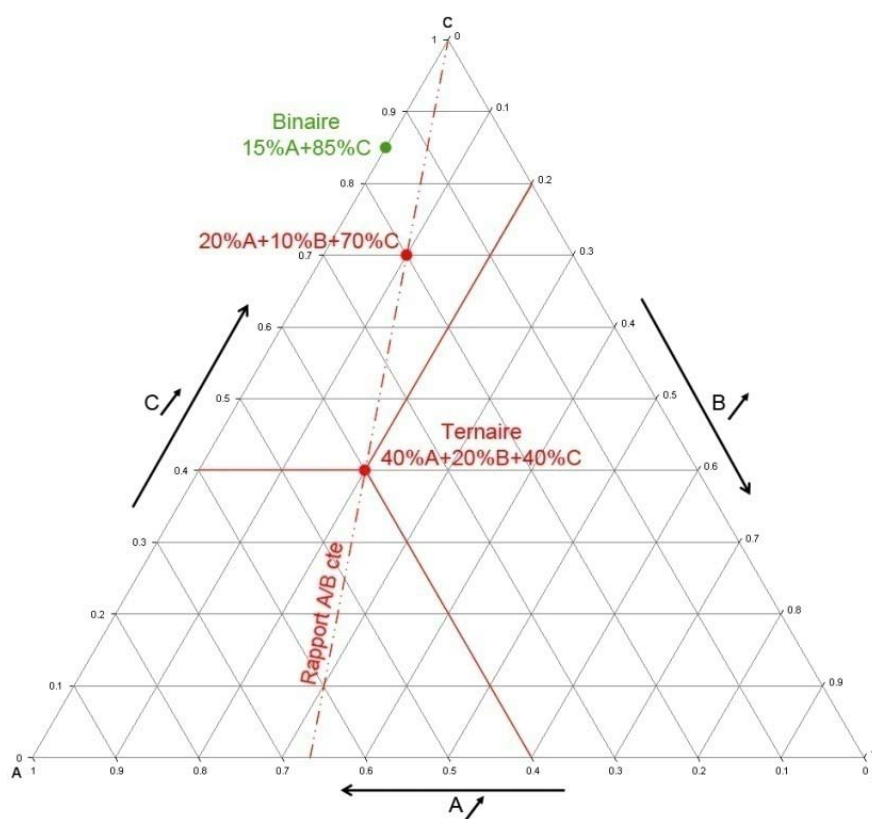


FIG AVI.1 – Règle de lecture d'un diagramme de phase ternaire triangulaire.

Bibliographie

1. Asherie, N., *Protein crystallization and phase diagrams*. Methods, 2004. **34**(3): p. 266-272.
2. Kirby, B.J., et al., *Microfluidic routing of aqueous and organic flows at high pressures: fabrication and characterization of integrated polymer microvalve elements*. Lab Chip, 2005. **5**(2): p. 184-90.
3. Nisisako, T., S. Okushima, and T. Torii, *Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system*. Soft Matter, 2005. **1**: p. 23-27.
4. D'Arcy, A., A. MacSweeney, and A. Haber, *Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization*. Methods, 2004. **34**(3): p. 323-328.
5. Bunick, C., A.C.T. North, and G. Stubbs, *Evaporative microdialysis: an effective improvement in an established method of protein crystallization*. Acta Crystallographica Section D, 2001. **56**(11).
6. Doublé, S., *Macromolecular Crystallography Protocols: Preparation and Crystallization of Macromolecules*. Humana Press, 2007.
7. Chirgadze, D., *Protein Crystallisation in Action* [Ressource électronique]. Université de Cambridge, 3 juillet 2001.
Diponible sur : <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~dima/whitepapers/xtal-in-action/xtal-in-action-html.html>.
8. Hansen, C. and S.R. Quake, *Microfluidics in structural biology: smaller, faster... better*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 538-44.
9. Gerds, C.J., et al., *Time-controlled microfluidic seeding in nL-volume droplets to separate nucleation and growth stages of protein crystallization*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(48): p. 8156-60.
10. Tabeling, P., *Introduction à la microfluidique*. Editions Belin, 2003.
11. Bruus, H., *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press US, 2007.

12. Kamholz, A.E., et al., *Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: The T-sensor*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(23): p. 5340-5347.
13. Anderson, M.J., C.L. Hansen, and S.R. Quake, *Phase knowledge enables rational screens for protein crystallization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16746-51.
14. Unger, M.A., et al., *Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*. Science, 2000. **288**(5463): p. 113-116.
15. Goulpeau, J., et al., *Experimental study and modeling of polydimethylsiloxane peristaltic micropumps*. Journal of Applied Physics, 2005. **98**(4).
16. Thorsen, T., S.J. Maerkl, and S.R. Quake, *Microfluidic large-scale integration*. Science, 2002. **298**(5593): p. 580-584.
17. Hansen, C.L., et al., *Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic flormulator*. PNAS, 2007. **101**(40): p. 14431-14436.
18. Hansen, C.L., et al., *A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16531-6.
19. Hansen, C.L., et al., *A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(10): p. 3142-3.
20. Chou, H.P., C. Hansen, and S.R. Quake, *A Microfabricated Rotary Pump*. Biomedical Microdevices, 2001. **3**(4): p. 323-330.
21. Salemme, F.R., *Free Interface Diffusion Technique for Crystallization of Proteins for X-Ray Crystallography*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1972. **151**(2): p. 533-&.
22. Anna, S.L., N. Bontoux, and H.A. Stone, *Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels*. Applied Physics Letters, 2003. **82**(3): p. 364-366.
23. Thorsen, T., et al., *Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device*. Physical Review Letters, 2001. **86**(18): p. 4163-4166.
24. Garstecki, P., et al., *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up (vol 6, pg 437, 2006)*. Lab on a Chip, 2006. **6**(5): p. 693-693.
25. Li, L., et al., *Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(51): p. 19243-8.
26. Gerdts, C.J., et al., *The plug-based nanovolume Microcapillary Protein Crystallization System (MPCS)*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2008. **64**(Pt 11): p. 1116-22.
27. Laval, P., et al., *A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams*. Lab Chip, 2007. **7**(7): p. 829-834.
28. Kahlenberg, L., *On the nature of the process of osmosis and osmotic pressure with observations concerning dialysis*. Journal of Physical Chemistry, 1906. **10**(3): p. 141-209.
29. Kober, P.A., *Pervaporation, perstillation and percrystallization*. Journal of the American Chemical Society, 1917. **39**: p. 944-948.

30. Loeb, S. and S. Sourirajan, *Sea water demineralization by means of an osmotic membrane*. Adv. Chem. Ser., 1962. **38**: p. 117-132.
31. Fries, R. and J. Neel, *Transfert Selectif a Travers Des Membranes Actives*. Journal De Chimie Physique, 1965. **62**(5): p. 494-&.
32. Aptel, P., et al., *Application of Pervaporation Process to Separate Azeotropic Mixtures*. Journal of Membrane Science, 1976. **1**(3): p. 271-287.
33. Li, G., et al., *Time-dependence of pervaporation performance for the separation of ethanol/water mixtures through poly(vinyl alcohol) membrane*. J Colloid Interface Sci, 2007. **306**(2): p. 337-44.
34. Alaa Fahmy, M.E., *Membrane Processes for the Dehydration of Organic Compounds*. 101p. Thèse de doctorat, Universität Hannover, 2002.
35. Brüscke, H., *Multilayered membrane and its use in separating liquid mixtures by the pervaporation method*. German Pat. DE 3,220,570, 1983.
36. Kim, J.H., K.H. Lee, and S.Y. Kim, *Pervaporation separation of water from ethanol through polyimide composite membranes*. Journal of Membrane Science, 2000. **169**(1): p. 81-93.
37. Lipski, C. and P. Cote, *The Use of Pervaporation for the Removal of Organic Contaminants from Water*. Environmental Progress, 1990. **9**(4): p. 254-261.
38. Sampranpiboon, P., et al., *Separation of aroma compounds from aqueous solutions by pervaporation using polyoctylmethyl siloxane (POMS) and polydimethyl siloxane (PDMS) membranes*. Journal of Membrane Science, 2000. **174**(1): p. 55-65.
39. Wynn, N., *Pervaporation comes of age*. Chemical Engineering Progress, 2001. **97**(10): p. 66-72.
40. Sommer, S., et al., *Performance efficiency of tubular inorganic membrane modules for pervaporation*. Aiche Journal, 2005. **51**(1): p. 162-177.
41. Amrani, M., *Approche thermodynamique appliquée au choix de membranes pervaporatives*. Revista Ingeniería e Investigación, 2006. **26**: p. 42-49.
42. Clément, R., A. Jonquière, and P. Lochon, *Etat de l'art sur la pervaporation et la perméation en phase vapeur*. Groupe Ensic, Nancy, Rapport pour ADEME, 2001.
43. Wijmans, J.G. and R.W. Baker, *The Solution-Diffusion Model - a Review*. Journal of Membrane Science, 1995. **107**(1-2): p. 1-21.
44. de Jong, J., R.G. Lammertink, and M. Wessling, *Membranes and microfluidics: a review*. Lab Chip, 2006. **6**(9): p. 1125-39.
45. Merkel, T.C., et al., *Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane)*. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2000. **38**(3): p. 415-434.
46. Blume, I., et al., *Vapour sorption and permeation properties of poly(dimethylsiloxane) films*. Journal of Membrane Science, 1991. **61**: p. 85-97.
47. Timmer, B.H., et al., *Micro-evaporation electrolyte concentrator*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2003. **91**(1-3): p. 342-346.

48. Verneuil, E., A. Buguin, and P. Silberzan, *Permeation-induced flows: Consequences for silicone-based microfluidics*. Europhysics Letters, 2004. **68**(3): p. 412-418.
49. Walker, G.M. and D.J. Beebe, *An evaporation-based microfluidic sample concentration method*. Lab on a Chip, 2002. **2**(2): p. 57-61.
50. Goedecke, N., J. Eijkel, and A. Manz, *Evaporation driven pumping for chromatography application*. Lab on a Chip, 2002. **2**(4): p. 219-223.
51. Leng, J., et al., *Microevaporators for kinetic exploration of phase diagrams*. Phys Rev Lett, 2006. **96**(8): p. 084503.
52. Shim, J., et al., *Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein Crystals*. Crystal Growth & Design, 2007. **7**(11): p. 2192-2194.
53. Shim, J.U., et al., *Control and measurement of the phase behavior of aqueous solutions using microfluidics*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(28): p. 8825-35.
54. Petrov, P.G., S.V. Ahir, and E.M. Terentjev, *Rheology at the phase transition boundary: 1. Lamellar L-alpha phase of AOT surfactant solution*. Langmuir, 2002. **18**(24): p. 9133-9139.
55. Leng, J., M. Joanicot, and A. Ajdari, *Microfluidic exploration of the phase diagram of a surfactant/water binary system*. Langmuir, 2007. **23**(5): p. 2315-7.
56. Bartolo, D., et al., *Microfluidic stickers*. Lab Chip, 2008. **8**: p. 274-279.
57. Studer, V., et al., *Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve*. Journal of Applied Physics, 2004. **95**(1): p. 393-398.
58. Li, C.W., R. Chen, and M. Yang, *Generation of linear and non-linear concentration gradients along microfluidic channel by microtunnel controlled stepwise addition of sample solution*. Lab Chip, 2007. **7**(10): p. 1371-3.
59. Jeon, N.L., et al., *Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems*. Langmuir, 2000. **16**: p. 8311-8316.
60. Goulpeau, J., et al., *Building up longitudinal concentration gradients in shallow microchannels*. Lab Chip, 2007. **7**(9): p. 1154-61.
61. Yamada, M., et al., *A microfluidic flow distributor generating stepwise concentrations for high-throughput biochemical processing*. Lab Chip, 2006. **6**(2): p. 179-84.
62. Siyan, W., et al., *Application of microfluidic gradient chip in the analysis of lung cancer chemotherapy resistance*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(3): p. 806-810.
63. Campbell, K. and A. Groisman, *Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps*. Lab Chip, 2007. **7**(2): p. 264-72.
64. Dertinger, S.K., et al., *Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks*. Anal Chem, 2001. **73**: p. 1240-1246.
65. Jiang, X., et al., *A general method for patterning gradients of biomolecules on surfaces using microfluidic networks*. Anal Chem, 2005. **77**(8): p. 2338-47.

66. Schindler, M. and A. Ajdari, *Modeling phase behavior for quantifying micro-pervaporation experiments*. 2008.
67. Laval, P., J.B. Salmon, and M. Joanicot, *A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics*. Journal of Crystal Growth, 2007. **303**(2): p. 622-628.
68. Cadman, A.D., R. Fleming, and R.H. Guy, *Diffusion of lysozyme chloride in water and aqueous potassium chloride solutions*. Biophysical Journal, 1982. **37**(3): p. 569-574.
69. Duffy, D.C., et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
70. Deng, T., et al., *Prototyping of masks, masters, and stamps/molds for soft lithography using an office printer and photographic reduction*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(14): p. 3176-3180.
71. Xia, Y.N. and G.M. Whitesides, *Soft lithography*. Annual Review of Materials Science, 1998. **28**: p. 153-184.
72. Bender, M., et al., *High resolution lithography with PDMS molds*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2004. **22**(6): p. 3229-3232.
73. Courjon, D. and C. Bainier, *Le champ proche optique: theorie et applications*. Publié par Springer, 2001.
74. Eddings, M.A., M.A. Johnson, and B.K. Gale, *Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2008. **18**(6).
75. Goulpeau, J., *Intégration de puce à ADN dans un microsystème fluide*. 203p. Thèse de Doctorat: Physique: Université Paris 6, 2006.
76. Liu, R.H., et al., *Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2000. **9**(2): p. 190-197.
77. Stroock, A.D., et al., *Chaotic mixer for microchannels*. Science, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
78. Matsumoto, R., H.F. Zadeh, and P. Ehrhard, *Quantitative measurement of depth-averaged concentration fields in microchannels by means of a fluorescence intensity method*. Experiments in Fluids, 2005. **39**(4): p. 722-729.
79. Sparks, D., et al., *A microfluidic system for the measurement of chemical concentration and density*. Boston Transducers'03: Digest of Technical Papers, Vols 1 and 2, 2003: p. 300-303.
80. Domachuk, P., et al., *Compact resonant integrated microfluidic refractometer*. Applied Physics Letters, 2006. **88**(9).
81. Calixto, S., et al., *Capillary refractometer integrated in a microfluidic configuration*. Applied Optics, 2008. **47**(6): p. 843-848.
82. Schueller, O.J.A., et al., *Reconfigurable diffraction gratings based on elastomeric microfluidic devices*. Sensors and Actuators a-Physical, 1999. **78**(2-3): p. 149-159.
83. Nothnagle, P.E., W. Chambers, and M.W. Davidson, *Introduction to Stereomicroscopy*. [en ligne]. Nikon, MicroscopyU. Melville, New York.

- Diponible sur : <http://www.microscopyu.com/print/articles/stereomicroscopy/stereointro-print.html>.
84. Hautière, N., D. Aubert, and M. Jourlin, *Application à la mesure de distance de visibilité par caméra embarquée*. Traitement du Signal, 2006. **23**(2): p. 145-158.
 85. Peli, E., *Contrast in complex images*. J Opt Soc Am A, 1990. **7**(10): p. 2032-40.
 86. Rogers, J. and P.A. Winsor, *Change in Optic Sign of Lamellar Phase (G) in Aerosol Ot/Water System with Composition or Temperature*. Journal of Colloid and Interface Science, 1969. **30**(2): p. 247-&.
 87. Salmon, J.B., et al., *In situ Raman imaging of interdiffusion in a microchannel*. Applied Physics Letters, 2005. **86**(9).
 88. Haslego, C., *Crystallization*. [Ressource électronique]. The Chemical Engineers' Resource Page, Midlothian, VA-USA.
Diponible sur : <http://www.cheresources.com/cryst.shtml>.
 89. Kashchiev, D. and G.M. van Rosmalen, *Review: Nucleation in solutions revisited*. Crystal Research and Technology, 2003. **38**(7-8): p. 555-574.
 90. Löffelmann, M. and A. Mersmann, *How to measure supersaturation?* Chemical Engineering Science, 2002. **57**(2002): p. 4301-4310.
 91. Kim, B.C., Y.H. Kim, and K. Fukui, *Crystallization monitoring in supersaturated solution with a quartz crystal sensor* Analytica Chimica Acta, 2003. **491**(2003): p. 71-80.
 92. Zafarani-Moattar, M.T. and R. Sadeghi, *Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate: Experiment and correlation*. Fluid Phase Equilibria, 2001. **181**(1-2): p. 95-112
 93. Bridges, N.J., K.E. Gutowski, and R.D. Rogers, *Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS)*. Green Chem, 2007. **9**: p. 177-183.
 94. Gao, Y.-L., et al., *Thermodynamics of ammonium sulfate—polyethylene glycol aqueous two-phase systems. Part1. Experiment and correlation using extended uniquac equation*. Fluid Phase Equilibria, 1991. **63**(1-2): p. 157-171.
 95. Pan, X. and S.R. Bhatia, *Effect of counterion substitution on the viscosity anomaly in AOT microemulsions*. J Colloid Interface Sci, 2008. **327**(1): p. 152-6.
 96. Onori, G. and A. Santucci, *Viscosity Studies of Water-Containing Reversed AOT Micelles*. J Colloid Interface Sci, 1992. **150**(1): p. 195-199.
 97. Franses, E.I. and T.J. Hart, *Phase behavior and molecular motion of aerosol OT in liquid-crystalline phases with water*. J Colloid Interface Sci, 1983. **94**: p. 1-13.
 98. Phillips, D.C., *The three-dimensional structure of an enzyme molecule*. Sci Am, 1966. **215**(5): p. 78-90.
 99. Judge, R.A., et al., *The effect of temperature and solution pH on the nucleation of tetragonal lysozyme crystals*. Biophysical Journal, 1999. **77**(3): p. 1585-1593.

100. Iwai, W., et al., *Crystallization and evaluation of hen egg-white lysozyme crystals for protein pH titration in the crystalline state*. Journal of Synchrotron Radiation, 2008. **15**: p. 312-315.
101. Hodgson, C.J., S.N. Maduck, and D.S. Rahman, *A Study in Hen Egg White Lysozyme Crystal Growth*. DUJS, 1999. **1**(1): p. 30-34.

Pervaporation microfluidique pour le criblage et mesures de concentration *in situ*

Ce travail de thèse présente la conception et la réalisation d'un dispositif microfluidique en PDMS (Polydiméthylsiloxane) pour exploration des diagrammes de phase. Le microsystème est basé sur le principe de pervaporation (évaporation à travers une membrane) et comporte des microchambres indépendantes de 5nL de solution dont on fait varier la concentration au court du temps. Il est possible de concentrer jusqu'à l'observation de transitions de phases (démixtion, nucléation, cristallisation, ...). Nous avons montré que la pervaporation est une piste intéressante pour l'exploration de diagrammes de phases. En parallèle, nous avons développé un outil original de mesure *in situ* en temps réel de la concentration, paramètre essentiel du criblage. Cet outil, basé sur le principe de réfractométrie, a pour avantage d'être non intrusif et ne requiert aucune modification particulière du microsystème. La méthode consiste à utiliser les parois des microcanaux comme éléments optiques. Nous montrons que cette méthode permet de mesurer un coefficient de diffusion et un rapport de viscosité dans une jonction en T sans ajout de traceurs ni utilisation de la fluorescence. Nous avons utilisé cette méthode de mesure de la concentration lors d'expériences sur des systèmes modèles (solutions ioniques, surfactants, polymères, protéines, ...).

Mots clés :

pervaporation, microfluidique, PDMS, réfractométrie intégrée, diagramme de phase, sursaturation

Microfluidics pervaporation for screening and *in situ* concentration measurement

This thesis presents the design and implementation of a microfluidic device in PDMS (Polydimethylsiloxane) for the exploration of phase diagrams. The microsystem uses pervaporation (evaporation through a membrane). It includes independent microchambres 5nL solution which concentration changes over time. It is possible to concentrate up to the observation of phase transitions (demixing, nucleation, crystallization, ...). We have shown that pervaporation is an interesting method for phase diagram explorations. In parallel, we developed an original tool for *in situ* and in real time concentration measurements, which is the fundamental screening parameter. This tool, based on the principle of refractometry, has the advantage of being non-intrusive and requires no special modification of the microsystem. The method uses the microchannel walls as optical elements. We show that this method allows to measure diffusion coefficients and viscosities in T-junctions without adding tracers nor use fluorescence. We used this method for measuring *in situ* concentration in screening experiments using model fluid systems (ionic solutions, surfactants, polymers, proteins, ...).

Key words :

pervaporation, microfluidics, PDMS, integrated refractometry, phase diagram, supersaturation