



HAL
open science

Développement d'un dispositif microfluidique permettant l'étude de la viscosité de solutions de protéines concentrées, sur une large gamme de concentration

Paul Cochard-Marchewka

► **To cite this version:**

Paul Cochard-Marchewka. Développement d'un dispositif microfluidique permettant l'étude de la viscosité de solutions de protéines concentrées, sur une large gamme de concentration. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSLS007 . tel-03959893

HAL Id: tel-03959893

<https://pastel.hal.science/tel-03959893>

Submitted on 27 Jan 2023

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 PSL

Préparée à l'École Supérieure de Physique
et de Chimie Industrielles de la ville de Paris

**Développement d'un dispositif microfluidique
permettant l'étude de la viscosité de solutions de
protéines concentrées, sur une large gamme de
concentration**

Soutenue par

Paul

COCHARD-MARCHEWKA

Le 14 mars 2022

Ecole doctorale n° 388

**Chimie Physique et Chimie
Analytique de Paris Centre**

Spécialité

Physico-Chimie

Composition du jury :

Anke LINDNER
Professeure,
Laboratoire Physique et Mécanique
des Milieux Hétérogènes, Paris *Présidente*

Cécile COTTIN-BIZONNE
Directrice de recherche,
Institut Lumière Matière, Villeurbanne *Rapporteuse*

Jean-Baptiste SALMON
Directeur de recherche,
Laboratoire du Futur, Pessac *Rapporteur*

Jean BAUDRY
Directeur de recherche,
Laboratoire Colloïdes
et Matériaux Divisés, Paris *Directeur de thèse*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury. Merci à Cécile Cottin-Bizonne et Jean-Baptiste Salmon d'avoir accepté de rapporter ce travail. Merci également pour la qualité des échanges que nous avons eu lors de la soutenance, et pour la pertinence des corrections proposées. Merci à Anke Lindner d'avoir accepté la présidence de ce jury, et pour les discussions que nous avons eu au cours de ma dernière année.

Ensuite je souhaite remercier les membres du laboratoire LCMD. Travailler avec vous a été un réel plaisir et a permis d'adoucir un contexte peu propice aux interactions sociales.

Merci à Jérôme Bibette, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli.

Merci à Florence pour ton accompagnement et ta patience malgré mon manque d'organisation et ma connaissance lacunaire du règlement du labo.

Merci à Isa pour ton assistance constante et pour tes conseils de lecture.

Merci à Hélène pour ton aide et ton écoute.

Merci à Nicolas pour nos discussions toujours intéressantes sur la mécanique des fluides, ainsi que pour l'année que nous avons passé dans le même bureau.

Merci à Jessica d'avoir été là du premier au dernier jour et pour l'attention que tu portes à tous les membres du labo, qui a permis de dénouer un nombre incalculables de difficultés scientifiques ou psychologiques.

Merci à Claire pour ton soutien toujours plein d'humour, j'espère que tu m'inviteras à ta soutenance.

Merci à Alexandre pour ton accompagnement, pour nos discussions embrumées à 7h30 pendant le deuxième confinement et pour ton humour cinglant.

Merci à Martin pour ta gentillesse et ta prévenance au bureau et en dehors, notamment pendant la phase de rédaction.

Merci à Antu et Nathan d'avoir animé le bureau E.106.

Merci à Elliot pour cet été 2020 et pour la suite.

Merci à Guilhem, qui m'a accompagné depuis la 1A. Des TPs de chimie organique à nos cafés devant le chantier, nos discussions ont toujours été précieuses.

Enfin merci à Jean, pour m'avoir convaincu de faire une thèse et pour m'avoir accompagné tout au long de celle-ci. Ce projet n'a pas été facile, mais ta pédagogie et ta disponibilité n'ont jamais fait défaut.

Je tiens également à remercier celles et ceux qui m'ont accompagné à Paris, Lyon ou Calais. Vous êtes trop nombreux-ses pour être cité-e-s ici, mais votre présence a été précieuse tout au long de cette thèse. Merci tout particulièrement à Auriane pour le soutien que tu m'as apporté durant cette thèse. Tes DJ sets ont accompagné la plupart de mes soirées en salle blanche, et t'avoir dans ma vie a embelli toutes les autres.

Enfin et surtout merci à mes deux frères, Raphaël et Élie, ainsi qu'à mes deux parents, Carole et Pierre, pour tout ce que vous m'avez apporté et pour l'exemple que vous représentez pour moi.

Table des matières

I	Introduction	9
1	Introduction générale	10
2	Protéines	12
2.1	Structure protéique et fonction biologique	12
2.1.1	Structure spatiale des protéines	12
2.1.2	Paradigme structure-fonction	13
2.2	Protéines en solution	14
3	Protéines thérapeutiques	16
3.1	Biopharmaceutiques	16
3.1.1	L'ADN recombinant	16
3.1.2	Petites et grandes molécules	16
3.2	Anticorps	17
3.2.1	Rôle dans le système immunitaire	17
3.2.2	Anticorps thérapeutiques	18
3.2.3	Thérapies sériques et anticorps polyclonaux	18
3.2.4	Anticorps monoclonaux	18
3.2.5	Applications thérapeutiques	19
3.3	Formulation, production et administration	21
3.3.1	Voies d'administration	21
3.3.2	Viscosité	22
3.3.3	Stabilité	22
3.3.4	Caractérisation expérimentale	23
4	Étude de solutions concentrées de protéines	24
4.1	Problématiques générales	24
4.1.1	Production des solutions de protéines	24
4.1.2	Concentration des solutions de protéines	24
4.2	Rhéologie de solutions de protéines concentrées	25
4.3	Microrhéologie	26
5	Microrhéologie en gouttes microfluidiques	27
5.1	Microfluidique	27
5.1.1	Laminarité	27
5.1.2	Phénomènes de transport	27
5.2	Applications	27
5.2.1	Puces microfluidiques	28
5.3	Microfluidique en gouttes	29
5.3.1	Génération d'émulsion microfluidiques	29
5.3.2	Micro-réacteurs biologiques	29
5.3.3	Concentration de solutés	30
5.4	Microrhéologie en gouttes microfluidiques	30

II	La puce	32
1	Architecture de la puce	33
1.1	L'intérêt d'une plateforme intégrée	33
1.2	Cahier des charges	33
1.3	Description générale	34
2	Production et manipulation de micro-gouttes	36
2.1	Émulsification	36
2.1.1	Émulsification par flux	36
2.1.2	Émulsification par gradient de confinement	37
2.1.3	Dimensionnement	38
2.2	Sélection & stabilisation des gouttes	40
2.2.1	Pièges à gouttes	40
2.2.2	Contrôle des écoulements	41
2.2.3	Équilibre des flux résiduels	44
3	Concentration des solutés par rétrécissement des gouttes	46
3.1	Pervaporation de l'eau	47
3.2	Modélisation unidimensionnelle	48
3.3	Homogénéité dans la goutte	49
4	Micro-fabrication	53
4.1	Le choix du PDMS	53
4.2	Moules en SU-8 multi-couches	53
4.2.1	Épaisseurs relatives des couches	54
4.2.2	Limites de l'enduction centrifuge	55
III	Suivi de la concentration	57
1	Suivi du volume des gouttes	59
1.1	Sphéricité des gouttes	59
1.1.1	Déformation des gouttes : longueur capillaire	59
1.1.2	Influence du surfactant	60
1.1.3	Modélisation du profil des gouttes	60
1.2	Mesure du rayon de la goutte	63
1.2.1	Détection du bord de la goutte	64
1.2.2	Précision de la mesure	65
1.2.3	Erreur sur le volume	66
1.3	Mise au point sur l'équateur de la goutte	67
1.3.1	Autofocus logiciel	67
1.3.2	Évaluation de la performance de mise au point	68
1.3.3	Tolérance de la mise au point	69
1.3.4	Répétabilité et erreur sur le volume	71
1.4	Erreur sur la concentration	72
2	Système optique	73
2.1	Montage expérimental	73
2.2	Automatisation	73
3	Concentration et fraction massiques	76
3.1	Conservation de la masse de soluté	76
3.2	Volume des mélanges	77
3.2.1	Définitions	77
3.2.2	Volume partiel spécifique	77
3.2.3	Tabulation du volume partiel spécifique apparent	79
3.3	Fraction massique dans la goutte	80
3.3.1	Calcul de la fraction massique	80
3.3.2	Impact de la prise en compte du volume spécifique	81

3.4	Conclusion	83
IV	Microrhéologie	84
1	Suivi de particules browniennes	85
1.1	Diffusion brownienne	85
1.2	Microrhéologie passive	89
1.2.1	Diffusion dynamique de la lumière	89
1.2.2	Suivi de particules	90
1.3	Statistique de la microrhéologie: définitions	91
2	Localisation des particules	94
2.1	Localisation d'une particule fixe	94
2.1.1	Fonction d'étalement du point	94
2.1.2	Pixellisation	96
2.1.3	Statistique d'émission photonique	96
2.1.4	Bruit de fond	98
2.1.5	Localisation du centre de la PSF	98
2.2	Erreur de localisation pour une particule diffusante	99
2.2.1	Flou de mouvement	99
2.2.2	Obturateur déroulant	100
2.2.3	Influence de la viscosité	100
2.3	Estimation expérimentale de l'erreur de localisation pour une particule fixe	101
3	Estimation du coefficient de diffusion	104
3.1	Définition du problème	104
3.1.1	Données expérimentales	104
3.1.2	Distribution des déplacements	104
3.2	Estimateurs de D	105
3.2.1	Estimateur MSD	106
3.2.2	Estimateur CVE	108
3.3	Erreur sur D	110
3.4	Pondération des trajectoires	111
V	Résultats et discussion	112
1	Introduction	113
2	Microrhéologie	114
2.1	Rhéologie de l'eau	114
2.2	Estimateur CVE	115
2.3	Diffusion des particules	116
2.3.1	Confinement et effets de bord	116
2.3.2	Rayon hydrodynamique des traceurs	119
2.3.3	Précision et répétabilité des mesures	120
2.3.4	Influence du rétrécissement des gouttes	120
3	Concentration dans la puce	123
3.1	Rhéologie du sucre	123
3.2	Validation de l'approche expérimentale sur la gamme 1-150 mPa.s	123
3.3	Extension de la gamme accessible	124
3.3.1	Mouvement des gouttes	125
3.3.2	Microrhéologie à deux points	127
3.3.3	Phase continue Fomblin Y06/6	128
3.4	Rétrécissement des gouttes	129

4	Viscosité de solutions de protéines	131
4.1	Étude de solutions de protéines concentrées	131
4.1.1	Stabilisation stérique des traceurs	131
4.1.2	Réduction du volume consommé	131
4.2	Albumine	131
4.3	Lysozyme	133
VI	Conclusion	137
VII	Annexe	141
1	Traceurs	142
1.1	Taille des traceurs	142
1.1.1	Diffusivité	142
1.1.2	Signal lumineux : estimation du nombre de photons détectés	143
1.1.3	Sédimentation	144
1.2	Stabilité	146
1.2.1	Double couche électrique	146
1.2.2	Ions et protéines	146
1.2.3	Stabilisation stérique des traceurs	147
2	Protocoles Expérimentaux	149
3	Algorithme de Crocker-Grier	162
4	Influence de la taille des gouttes	164
4.1	Effets de bord	164
5	Viscosités tabulées	168
5.1	Viscosité de l'eau	168
5.2	Viscosité du sucre	168

Table des figures

1	Structure tridimensionnelle d'une immunoglobuline humaine	12
2	Interactions faibles et repliement des protéines	13
3	Interactions faibles et fonction protéique	14
4	Représentation du potentiel électrostatique d'un anticorps	15
5	Viscosité d'anticorps quasi-identiques	22
6	Agrégation d'un anticorps monoclonal	23
7	Production d'une émulsion microfluidique	29
8	Processus Celligo, HiFiBio Therapeutics	30
9	Représentation en perspective de la puce	35
10	Principales géométries microfluidiques pour l'émulsification par flux	37
11	Émulsificateur à gradient de confinement (step-dropmaker)	38
12	Production de gouttes par gradient de confinement	39
13	Dimensions de l'émulsificateur à gradient de confinement	39
14	Puits cylindriques permettant le piégeage des gouttes	40
15	Ascension d'une goutte dans un puits	41
16	Schéma du dispositif d'ajustement gravitationnel du débit.	43
17	Dispositif expérimental microfluidique	45
18	Rétrécissement d'une goutte, images au microscope	46
19	Perméation de l'eau au sein de la puce	47
20	Pervaporation unidimensionnelle à travers une membrane de PDMS	48
21	Modélisation unidimensionnelle du rétrécissement de la goutte	50
22	Dessin des couches de fabrication de la puce	54
23	Masque d'exposition	56
24	Image multicanale d'une micro-goutte	59
25	Schéma de la courbure d'une goutte	61
26	Profils de déformations simulés numériquement	62
27	Erreur relative sur le volume liée à la non-sphéricité des gouttes	63
28	Influence du seuil de binarisation sur le rayon apparent en fluorescence	65
29	Seuil de binarisation adaptatif et rayon apparent en fluorescence	66
30	Interface de la goutte en lumière blanche	67
31	Interface de la goutte en lumière blanche, simulation numérique	68
32	Différentes positions de mise au point en lumière blanche	69
33	Différentes positions de mise au point en fluorescence	70
34	Scores de mise au point selon différentes méthodes analytiques	70
35	Rayon apparent de la goutte pour différentes position de mise au point	71
36	Photographie du montage expérimental	74
37	Processus automatisé d'acquisition des images	75
38	Erreur liée à la non prise en compte du volume spécifique	82

39	Diffusion brownienne - Jean Perrin	86
40	Trajectoires expérimentales de particules browniennes	88
41	PSF simulée	95
42	PSF simulée avec pixellisation	96
43	PSF simulée avec pixellisation et bruit de Poisson	97
44	Erreur de localisation pour une particule diffusante	101
45	Trajectoires de deux particules fixes	102
46	Rapport signal sur bruit pour une particule diffusante	106
47	Évolution du MSD	108
48	Erreur relative de l'estimateur CVE	109
49	Erreur relative sur D	111
50	Influence de la longueur des trajectoires sur la viscosité mesurée	116
51	Répartition des viscosités mesurées dans le plan équatorial	117
52	Relation entre la viscosité mesurée et la position des particules dans la goutte	118
53	Rétrécissement d'une goutte d'eau pure	121
54	Viscosité de l'eau pure, avec rétrécissement des gouttes	122
55	Viscosité relative de solutions de sucres - 1-200 mPa.s - Novec 7500	124
56	Biais relatif sur la mesure de la viscosité de solutions de sucrose	125
57	Viscosité relative de solutions de sucrose - Novec 7500 - 1-1500 mPa.s	126
58	Courbe de viscosité du sucrose - plateau de viscosité - Novec 7500	128
59	Viscosité relative de solutions de sucrose - Fomblin Y06/6 - 1-10000 mPa.s	130
60	viscosité relative de solutions de BSA - modèle de Krieger-Dougherty	132
61	viscosité relative de solutions de lysozyme - modèle de Krieger-Dougherty	134
62	Cristallisation du lysozyme	135
63	Rendement quantique de la caméra ORCA-Flash 4.0 LT	143
64	Sédimentation de particules de taille variable en fonction de la fraction volumique en protéine	145
65	Hauteur caractéristique de la distribution particulaire	146
66	Directions de diffusion pour une particule au voisinage de l'interface	165
67	Coefficient de traînée pour une particule diffusant au voisinage de l'interface	166

Liste des tableaux

1	Valeurs numériques retenues pour la modélisation des écoulements dans la puce	44
2	Valeurs numériques retenues pour la perméation de l'eau à travers le PDMS	49
3	Tableau récapitulatif des dimensions relatives des couches	55
4	Erreur sur le volume liée à la détection du bord de la goutte	67
5	Distribution des positions de mise au point z	71
6	Volume spécifique du sucrose à différentes fractions massiques ^{1,2}	80
7	Mesures du rayon hydrodynamique par DLS	119
8	Viscosité dans des gouttes d'eau pure, sans rétrécissement	120
9	Viscosité maximale mesurable - Novec 7500	127
10	Viscosité maximale mesurable - Fomblin Y06/6	129
11	Grandeurs tabulées pour la BSA	132
12	Grandeurs tabulées pour le lysozyme	133
13	Viscosité de l'eau: valeurs tabulées	168
14	Viscosité du sucrose: valeurs tabulées	169

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Introduction générale

Les protéines sont des macromolécules de tailles et de structures variées, assurant des fonctions biologiques tout aussi variées.

Le rôle clé des protéines dans certains processus biologiques, notamment au sein du système immunitaire, a été identifié à la fin du XIX^e siècle, et exploité à des fins thérapeutiques. Le traitement du diabète par l'insuline extraite du pancréas de boeuf ou la transfusion de sérum antibactérien ont longtemps été des exemples de thérapies prometteuses mais limitées par les difficultés d'approvisionnement et le cas échéant par l'immunogénicité des transfusions inter-espèces ou inter-individus.

En permettant l'introduction de séquences étrangères dans le génome d'organismes vivants, le génie génétique a ouvert la voie à la production industrielle de lignées de protéines identiques, à l'immunogénicité fortement diminuée grâce aux techniques d'ingénierie protéique et donc utilisables comme traitements de longue durée.

En éliminant le recours à l'extraction animale, la synthèse recombinante a rendu les insulinothérapies accessibles en plus grand nombre. En utilisant la sélectivité d'anticorps de synthèse pour cibler des pathogènes ou moduler des processus biologiques spécifiques, les biopharmaceutiques ont ouvert des perspectives thérapeutiques inédites, notamment dans la lutte contre le cancer ou le traitement des maladies auto-immunes, pathologies souvent incurables touchant chacune 10% de la population mondiale.

La production, la formulation et l'administration de biopharmaceutiques amène des défis nouveaux, directement liés à la complexité des structures des protéines et à la diversité de leurs comportements en solution.

Parce qu'elle dépend d'interactions spécifiques se développant avec l'extérieur, la fonction des protéines est intimement liée à leur structure tridimensionnelle, qui elle-même résulte de l'équilibre complexe d'interactions faibles. La composition du milieu environnant les protéines, notamment la concentration de macromolécules s'y trouvant, peut influencer sur leur structure et leur stabilité.

La rhéologie des solutions de protéines concentrées est une approche importante, permettant notamment le contrôle de la viscosité de solutions concentrées de biopharmaceutiques en vue de leur injection sous-cutanée, et plus généralement la compréhension des interactions interprotéiques non-spécifiques à travers leurs conséquences macroscopiques.

La rareté et la difficulté de préparation des solutions de protéines concentrées limite fortement les expériences de caractérisation accessibles. Ce doctorat s'inscrit dans un effort de recherche global visant à développer des techniques de caractérisation permettant l'étude de solutions de protéines fortement concentrées en minimisant la quantité d'échantillon nécessaire.

Nous avons développé une puce microfluidique permettant de réaliser plusieurs caractérisations complètes à partir d'un échantillon commercial dilué de protéines, sans avoir recours à des étapes de concentration préalables comme l'ultracentrifugation par exemple. La production et la manipulation de micro-gouttes permet de réduire la consommation d'échantillon et de concentrer le soluté au sein de la puce en exploitant la pervaporation de l'eau vers un canal latéral, séparé du canal principal par une paroi de PDMS d'épaisseur optimisée. Pendant le rétrécissement des gouttes, la microrhéologie par suivi de particules multiples permet une mesure régulière de la viscosité.

La conception innovante de notre puce nous a permis de réaliser des expériences avec des volumes d'échantillons de 1 μL , correspondant à 1 μg de protéines.

Dans la suite de cette introduction, nous présenterons brièvement les concepts clés de la structure et de la fonction biologique des protéines ; leur utilisation thérapeutique croissante au sein de la classe des

biopharmaceutiques et les défis posées par leur structure complexe en termes de formulation, de production et d'administration. Nous aborderons ensuite la nécessité et les spécificités de l'étude des solutions concentrées de protéines ainsi que l'intérêt de la rhéologie comme observation macroscopique des interactions interprotéiques, avant de conclure cette introduction par une présentation de l'outil microfluidique, et plus précisément de l'intérêt des gouttes microfluidiques pour la recherche en biologie.

Dans la partie II, nous décrirons notre puce microfluidique et son fonctionnement. Après une présentation de son architecture, nous présenterons la technologie de l'émulsification par gradient de confinement, qui permet de réduire la consommation d'échantillon, ainsi que les dispositifs de piégeage des gouttes et de contrôle des écoulements permettant une manipulation sélective des gouttes et leur stabilisation tout au long de l'expérience. Nous discuterons ensuite du phénomène de pervaporation de l'eau, de son utilisation pour la concentration du soluté, et des questions que le rétrécissement des gouttes pose en terme d'homogénéité des solutions.

Nous évoquerons enfin les défis qu'a présenté la micro-fabrication de la puce, en particulier l'obtention de moules en résine multi-couches, avant de présenter le système et le processus d'acquisition optiques permettant le suivi de la concentration et la mesure de la viscosité.

La partie III sera consacrée au suivi de la concentration dans la puce. Nous montrerons pourquoi la concentration du soluté dans les gouttes permet d'étudier des solutions sursaturées sans complexité ajoutée, en partant de solutions diluées. Nous montrerons également qu'en contrepartie, le suivi de la concentration dans la puce nécessite une mesure précise du volume des gouttes, dont nous détaillerons le principe, ainsi que la prise en compte du volume partiel spécifique des solutés, concept que nous introduirons.

En partie IV nous présenterons le principe de la microrhéologie par suivi de particules multiples. Après une présentation de la diffusion brownienne et une définitions des concepts statistiques employés, nous présenterons en détail les différentes sources d'erreur pouvant affecter la localisation des particules et la précision de l'estimateur statistique retenu pour le calcul du coefficient de diffusion.

Les résultats des expériences de validation démontrant la viabilité et la précision de notre approche seront détaillés en partie V, accompagnés d'une discussion sur les performances et les limitations de notre dispositif. Nous montrerons notamment que l'architecture de notre puce ainsi que la précision du suivi des particules permettent d'étendre la gamme de viscosité accessible jusqu'à 1 Pa.s et au-delà.

Après une conclusion (partie VI) rassemblant l'ensemble des enseignements de ce doctorat et présentant les perspectives ouvertes par notre approche, un ensemble de calculs, de protocoles expérimentaux et de données techniques seront rassemblées en annexe (partie VII).

Chapitre 2

Protéines

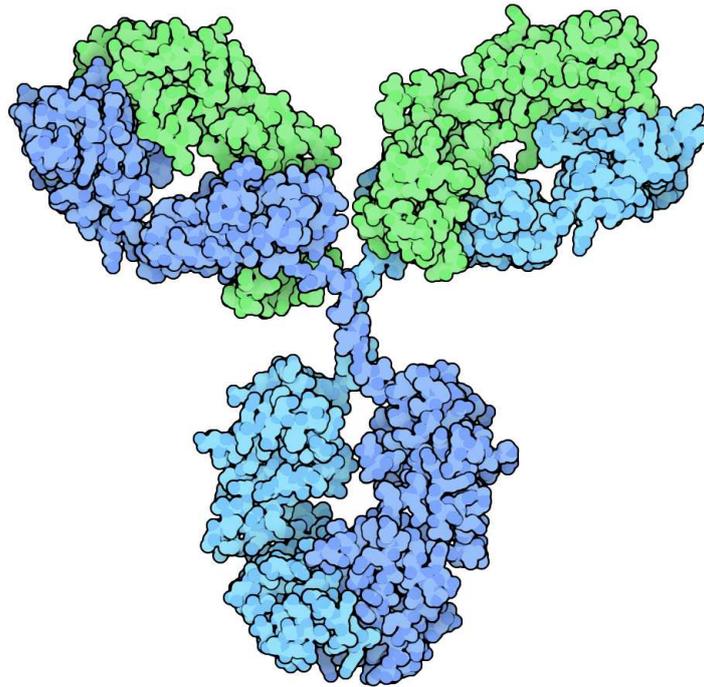


FIG. 1 – *Illustration de la structure tridimensionnelle d'une immunoglobuline humaine. Plus communément appelées anticorps, les immunoglobulines sont des protéines de taille moyenne, avec un poids moléculaires de 150 kDa et une longueur entre 10 et 15 nanomètres.*

Leur structure caractéristique en Y est constituée de quatre chaînes polypeptidiques, reliées par des ponts disulfures : deux chaînes lourdes, en bleu sur l'illustration, et deux chaînes légères, représentées en vert.

Illustration par David S. Goodsell³, extraite de la banque de données sur les protéines RCSB

2.1 Structure protéique et fonction biologique

2.1.1 Structure spatiale des protéines

Les protéines sont des molécules de tailles et de structures variées. Avec un poids moléculaire moyen autour de 30 kDa, la plupart des protéines sont des macromolécules.

Les protéines sont formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, polymère formé à partir d'une combinaison des 22 acides aminés protéinogènes⁴.

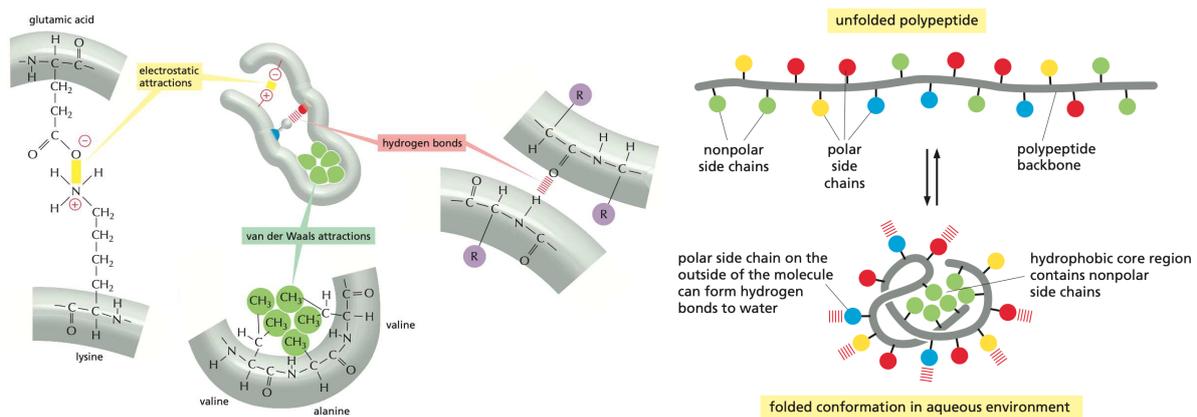
La séquence peptidique est la structure primaire de la protéine. Elle découle de la traduction de brins d'ARN messenger par les ribosomes, et reflète directement l'information génétique.

Les acides aminés constitutifs de la protéine ont des propriétés chimiques différentes, et développent donc des affinités différentes l'un par rapport à l'autre. La formation de liaisons hydrogènes entre les groupements -amide et -carbonyle du squelette peptidique entraînent l'apparition de structures tridimensionnelles locales, qui constituent la structure secondaire de la protéine.

Des interactions intraprotéiques telles que des forces de Van der Waals, des liaisons ioniques ou des interactions hydrophobes, entraînent un repliement global de la protéine, qui adopte alors sa structure tridimensionnelle finale, la structure tertiaire.

Les 22 acides aminés protéinogènes ont des propriétés chimiques différentes (polarité, acido-basicité, etc). Les interactions qu'ils développent entre eux sont en général modulées par le solvant environnant, par exemple son pH. La majorité des protéines sont des ampholytes, et possèdent plusieurs sites acido-basiques de pKa variable. La distribution de charges d'une protéine, et donc l'équilibre des interactions électrostatiques qui en découle dépendent du pH.

Un autre exemple est celui des interactions hydrophobes : la plupart des protéines aura tendance à se replier de sorte qu'un coeur hydrophobe concentre les acides aminés non polaires au coeur de la structure tridimensionnelle, minimisant ainsi les interactions défavorables avec l'eau.



(a) Interactions faibles entre acides aminés, à l'origine du repliement protéique (b) L'équilibre des interactions aboutit à la structure tridimensionnelle de la protéine

FIG. 2 – La structure tridimensionnelle d'une protéine est un minimum local d'énergie conformationnelle, résultat d'interactions complexes entre les acides aminés composant sa structure primaire, la chaîne polypeptidique. La stabilité de la structure est également liée aux interactions développées entre les acides aminés situés à l'extérieur de la structure et l'environnement. Figures extraites du livre *Molecular Biology of the Cell*, par Bruce Alberts et al⁴

Dans le cas de protéines multimériques, constituées de plusieurs sous-unités, on parle de structure quaternaire pour décrire l'agencement des différentes sous-unités.

Chacune de ces étapes représente une complexité supplémentaire aboutissant à la structure finale de la protéine. Hormis quelques exceptions, on peut également les classer par intensité d'interactions : la structure primaire est soutenue par des liaisons peptidiques covalentes, la structure secondaire par des liaisons hydrogènes et la structure tertiaire par des interactions à plus longue portée, qualifiées de liaisons secondaires.

La structure native d'une protéine représente un minimum d'énergie conformationnelle.

2.1.2 Paradigme structure-fonction

Les interactions intra-protéiques entre acides aminés aboutissent à la conformation spatiale de la protéine. De manière similaire, les interactions entre la protéine et son environnement dépendent de la nature et de l'agencement des acides aminés présents à l'extérieur de sa structure.

Dans la quasi-totalité des cas, la fonction d'une protéine dépend des interactions entre la protéine et son environnement, et donc de la structure de la protéine.

Parmi la multitude de protéines exploitant les interactions spécifiques pour remplir des fonctions biologiques complexes, trois exemples permettent d'illustrer le rôle de ces interactions.

L'actine G est une protéine globulaire, capable de s'organiser sous la forme de filaments (on parle alors d'actine F) composé d'une multitude de protéines d'actine reliées entre elles par des interactions spécifiques. Ces filaments structurels jouent un rôle important dans l'architecture et la mobilité cellulaire.

Les enzymes sont des protéines catalytiques, permettant d'abaisser l'énergie d'activation de réactions chimiques spécifiques. Elles se lient préférentiellement à un ou plusieurs substrats au niveau de sites de liaison présents sur sa structure tridimensionnelle, à proximité desquels un site actif permet la catalyse de la réaction.

Enfin, les immunoglobulines (ou anticorps) sont des protéines du système immunitaire. Aux deux extrémités supérieures de leur structure caractéristique⁵ en Y (visible en figure 1), les sites de reconnaissance, ou paratopes, interagissent de façon spécifique avec un site précis, épitope, d'un antigène. La liaison de l'anticorps à l'antigène forme un complexe immun, favorisant l'élimination de l'antigène par le système immunitaire⁶.

Les anticorps partagent une structure et une séquence polypeptidique largement identique, composant l'ossature de la protéine.

L'essentiel de la diversité séquentielle des anticorps réside dans les zones hypervariables, faisant partie du paratope⁴.

Ainsi, des modifications séquentielles localisées et limitées permettent aux anticorps d'interagir spécifiquement avec des épitopes de taille et de nature variables.

Ces trois cas illustrent le rôle clé que jouent les interactions inter-protéines dans la fonction biologique. La sélectivité des interactions significatives entre une protéine et sa cible est permise par la structure locale de domaines spécifiques (figure 3a).

Dans la quasi totalité des cas, ces phénomènes d'association sont réversibles (figure 3b). Ainsi, l'activité d'une protéine est caractérisée par son affinité avec sa cible.

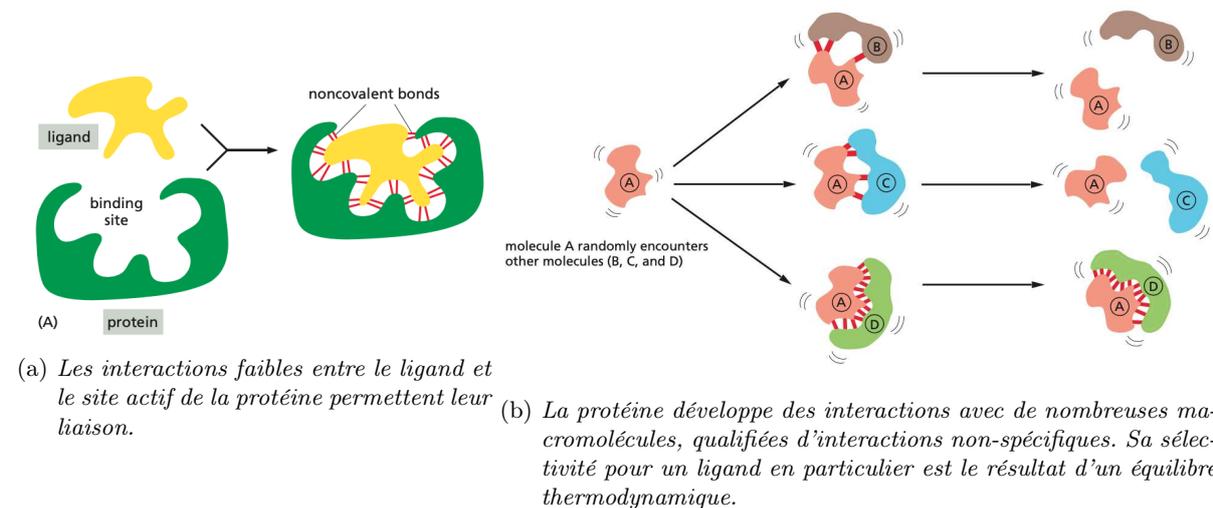


FIG. 3 – Les interactions faibles entre acides aminés sont également à l'origine de la sélectivité de certaines protéines. Modulée par des changements de structure localisés sur un ou plusieurs sites actifs, l'affinité d'une protéine pour sa cible est le résultat d'un équilibre thermodynamique. Figures extraites du livre *Molecular Biology of the Cell*, par Bruce Alberts et al⁴

2.2 Protéines en solution

De même que leur structure tridimensionnelle, la fonction des protéines est donc le résultat d'un équilibre complexe d'interactions développées par les acides aminés qui les constituent.

Cet équilibre est modulé par les propriétés du solvant, comme nous l'avons vu, mais également par la composition macromoléculaire de l'environnement.

Rappelons ce qui est illustré en figure 3b : la spécificité d'une protéine résulte d'un maximum d'affinité

pour sa cible, mais n'exclut pas le développement d'interactions avec d'autres macromolécules. Ainsi, une protéine en solution va développer des interactions avec les autres protéines du milieu, on parle d'interactions non-spécifiques.

Nous avons également vu que ces interactions dépendent de l'environnement : des facteurs tels que le pH (figure 4) ou la concentration en sel peuvent moduler la nature et la portée des interactions non-spécifiques, et ainsi le comportement des protéines en solution.

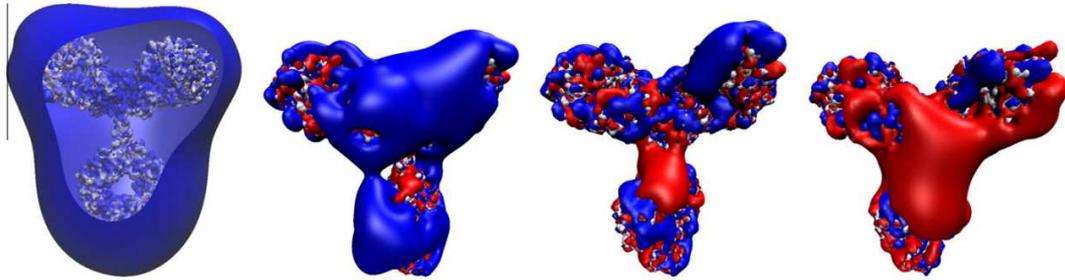


FIG. 4 – Représentation du potentiel électrostatique d'un anticorps à différents pH. Les zones bleues correspondent à un potentiel électrostatique de $+\frac{k_B T}{e}$, et les zones rouges à un potentiel de $-\frac{k_B T}{e}$. De gauche à droite : à pH 3, les sites acido-basiques de l'anticorps sont intégralement protonés, le potentiel est uniformément positif (bleu) ; l'augmentation progressive du pH (5, 8 puis 10) fait apparaître une répartition locale évolutive de charges positives et négatives. La charge globale de l'anticorps ainsi que sa distribution locale de charges ont une influence sur les interactions qu'il développe avec son environnement. Figure par Dejan Arzenšek et al⁷.

Restons sur l'exemple des interactions électrostatiques : les protéines possèdent une charge globale non nulle, mais avec une distribution locale de charges non uniforme. Entre deux protéines, les interactions électrostatiques pourront donc être tour à tour attractives ou répulsives selon la distance.

Prenons l'exemple des solutions d'anticorps.

Ces protéines présentent une charge globale négative, et développent des interactions électrostatiques répulsives à longue portée. A plus courte portée cependant, la non-uniformité des charges et le moment dipolaire qui en résulte entraîne le développement d'interactions électrostatiques attractives, auxquelles s'ajoutent une attraction plus locale encore liées aux interactions hydrophobes ou de Van der Waals⁸.

Les milieux biologiques contiennent le plus souvent un grand nombre de protéines différentes, et sont le plus souvent très concentrés. Le sang contient entre 60 et 80 mg.mL⁻¹ de protéines, majoritairement des albumines et des globulines. Les protéines représentent en général entre 20 et 30% du volume totale d'une cellule, avec des concentrations cytoplasmiques atteignant les 350 mg.mL⁻¹ pour les érythrocytes.

La vie d'une protéine a donc lieu dans un milieu fortement encombré. Son repliement, ses interactions avec son environnement et donc son rôle biologique sont affectés par les interactions non-spécifiques. La prise en compte de l'encombrement macromoléculaire dans les expériences *in vitro*, et l'étude de son impact sur l'activité protéines sont des sujets de recherche actuels⁹⁻¹⁴.

Si l'étude des solutions de protéines concentrées est donc une étape indispensable à une meilleure compréhension du vivant, ces considérations s'étendent désormais à un autre domaine, celui de la production et de l'utilisation de protéines de synthèse, utilisées comme médicament.

Chapitre 3

Protéines thérapeutiques

Les protéines sont devenues un instrument thérapeutique à part entière, un nouveau type de médicament amenant avec lui de nouvelles perspectives de soin et de nouveaux défis de formulation.

3.1 Biopharmaceutiques

Le terme biopharmaceutiques s'est construit par opposition aux médicaments dits traditionnels, issus de la synthèse chimique.

Depuis le XIX^e siècle, la synthèse chimique totale permet de produire des composés en grande quantité et à coût maîtrisé, permettant l'usage à grande échelle de principes actifs naturels comme l'aspirine, ou de composés entièrement nouveaux issus du criblage pharmaceutique.

Le terme biopharmaceutique désigne par opposition les médicaments d'origine biologique, produits par des organismes vivants. Au sens large, il regroupe par exemple les transfusions sanguines ou les greffes d'organes. Depuis les années 1980, il désigne principalement les molécules issues des techniques de recombinaison génétique.

3.1.1 L'ADN recombinant

En 1972 l'équipe de Paul Berg est la première à réaliser l'insertion d'information génétique au sein d'un brin d'ADN¹⁵. Depuis, l'ADN recombinant regroupe toutes les techniques de clonage, découpage, jonction, ou plus récemment de synthèse enzymatique de séquences d'ADN¹⁶. L'inclusion de séquences étrangères dans le génome d'organismes vivants, le plus souvent des cultures de bactéries ou des lignées immortelles de cellules de mammifères, permet l'expression de polypeptides d'intérêt.

Cette découverte a entraîné un regain d'intérêt de la part de l'industrie pharmaceutique¹⁷, attirée par la perspective de produire à grande échelle des médicaments commercialisables. Par extension, on appelle protéines recombinantes les protéines obtenues par la technologie de l'ADN recombinant.

Le premier polypeptide recombinant à être commercialisé est l'insuline, au début des années 1980¹⁸, mettant fin aux perspectives de pénuries qui agitaient les États-Unis depuis le début des années 1970.

En tirant parti des ribosomes bactériens, l'ADN recombinant permet en effet la synthèse de molécules hors de portée de la synthèse chimique. Une fois créé en laboratoire, le gène codant l'insuline humaine peut être reproduit à l'infini et produit à grande échelle par des colonies bactériennes, complétant ainsi l'extraction d'insuline porcine ou bovine à partir de sous-produits de l'industrie animale.

La synthèse de l'insuline recombinante est l'équivalent de la synthèse d'aspirine chimique : une nouvelle technologie permet la production à plus grande échelle d'un principe actif connu.

Comme la synthèse chimique avant lui, l'ADN recombinant a ouvert la voie vers un nouveau champ de recherche pharmaceutique : la production de protéines entièrement nouvelles, conçues sur mesure pour atteindre des cibles thérapeutiques de manière beaucoup plus spécifique que les médicaments traditionnels.

3.1.2 Petites et grandes molécules

La distinction entre biopharmaceutiques et médicaments traditionnels s'exprime souvent par leur taille, on qualifie de grandes molécules les médicaments polypeptidiques et de petites molécules les médicaments traditionnels.

Cette distinction fait d'une part référence aux voies de synthèses employées : comme on l'a vu précédemment, il est impossible d'obtenir des macromolécules polypeptidiques par voie chimique.

D'autre part, cette distinction révèle des différences en terme de mode d'action.

C'est en effet la taille et la complexité structurelle des biopharmaceutiques qui leur permet d'interagir de manière spécifique avec leur cible. Les petites molécules ont l'inconvénient d'interagir avec un grand nombre de protéines autres que leur cible, entraînant des effets secondaires qui limitent les doses administrables et ainsi l'efficacité du traitement.

Fixée à un poids moléculaire de 900 daltons, la limite entre grandes et petites molécules correspond également à la tolérance maximum des membranes biologiques : les biopharmaceutiques ne passent ni au travers de la paroi intestinale ; ni au travers des membranes cellulaires ; ni au travers de la barrière hémato-encéphalique, ce qui limite leur mode d'action et d'administration comme nous en discuterons par la suite.

Les biopharmaceutiques ne représentent pas qu'une classe de médicaments rendue nouvellement accessible grâce aux progrès des techniques de production. En permettant la synthèse de polypeptides de taille et de complexité arbitraires, la synthèse recombinante apporte de nouvelles manières d'envisager la thérapie.

Les biopharmaceutiques permettent des approches de soin entièrement nouvelles, leur spécificité accrue permettant le développement d'une thérapie sur-mesure, adaptée à chaque patient.e.

En contrepartie, les biopharmaceutiques nécessitent de nouvelles techniques de production, avec leur lot de défis, notamment en termes de formulation.

Nous le verrons, la stabilité et la viabilité des protéines thérapeutiques passe par une caractérisation de leurs propriétés physiques en solution concentrée.

3.2 Anticorps

Nous avons jusqu'à présent parlé des biopharmaceutiques sous l'appellation générale de polypeptides recombinants. A quelques exceptions près, la plupart des biopharmaceutiques sont des protéines recombinantes. Et plus précisément, l'immense majorité des protéines recombinantes sont des anticorps monoclonaux.

3.2.1 Rôle dans le système immunitaire

Sécrétées par les lymphocytes B, les immunoglobulines appartiennent au système immunitaire adaptatif. Leur principale caractéristique est leur capacité à se lier sélectivement à un épitope donné, ciblant ainsi un antigène.

Dans certains cas, la fixation d'un anticorps sur sa cible constitue une action thérapeutique en soi : en se liant à un épitope donné, l'anticorps peut en neutraliser la fonction biologique.

C'est par exemple le cas des immunoglobulines anti-toxines, qui jouent un rôle important dans la lutte contre les infections bactériennes. En se fixant aux toxines bactériennes, ils les empêchent de pénétrer dans les cellules.

Les anticorps peuvent également jouer le rôle d'activateur de la réponse immunitaire : en se fixant en grand nombre à la surface d'un pathogène, on parle alors d'opsonisation, les anticorps favorisent l'action du système immunitaire, à travers le recrutement de macrophages, de lymphocytes NK ou encore par activation de la cascade du complément⁶.

A la suite d'une primo-infection par un pathogène donné, le système immunitaire est capable, via des mécanismes de recombinaisons et de mutations localisées de l'ADN, de produire une très grande diversité de lymphocytes B produisant des anticorps différents, puis de sélectionner les lignées présentant la meilleure affinité pour le pathogène. L'information structurelle des antigènes est ensuite conservée via la production de lymphocytes B mémoire, permettant une réponse immunitaire plus forte et plus spécifique lors des infections ultérieures.

Ce mécanisme peut être exploité à des fins thérapeutiques : l'injection d'un pathogène inactivé ou de protéines spécifiques permet une réponse immunitaire contrôlée et la mise en mémoire de l'antigène par le corps. C'est le principe de la vaccination, on parle alors d'immunisation active.

3.2.2 Anticorps thérapeutiques

Si ils remplissent des fonctions similaires à leurs équivalents naturels, les anticorps thérapeutiques ne font pas partie du système immunitaire adaptatif.

L'administration d'anticorps thérapeutiques permet d'influer sur des processus biologiques en ciblant des macromolécules impliquées. Leur action est limitée dans le temps, avec une demi-vie dans la circulation sanguine de 20 jours, et n'a pas pour conséquence la mise en mémoire d'une quelconque information par le système immunitaire.

En ciblant les pathogènes qui en sont à l'origine, l'injection d'anticorps renforce la réponse immunitaire. On parle alors d'immunisation passive.

En ciblant des macromolécules solubles impliquées dans la communication intercellulaire, les anticorps thérapeutiques permettent de moduler des processus biologiques majeurs, notamment la réponse immunitaire et les processus d'inflammation.

Les techniques actuelles permettent la modification structurelle des anticorps, amenant ainsi des modes d'actions nouveaux. Il est par exemple possible de créer des anticorps bi-¹⁹ voire tri-spécifiques²⁰, possédant deux paratopes distincts, capables de favoriser la rencontre entre plusieurs antigènes en se liant à l'un et l'autre. Il est également possible de lier un anticorps à une molécule thérapeutique. Grâce à la spécificité des anticorps, ces conjugués permettent l'administration de chimiothérapies puissantes²¹.

3.2.3 Thérapies sériques et anticorps polyclonaux

L'utilisation des anticorps comme médicament est bien antérieure à la production de protéines recombinantes.

L'immunisation passive est d'ailleurs un phénomène naturel : le transfert d'immunoglobulines au fœtus via le cordon ombilical puis le lait maternel renforce les défenses immunitaires de l'enfant, là encore avec un effet limité dans le temps.

Pour les anticorps thérapeutiques à proprement parler, les premières mentions remontent à la fin du XIX^e siècle²².

On peut citer l'exemple des sérums anti-venins : en concentrant le sérum d'un animal précédemment immunisé par inoculation de venin, on récupère un cocktail d'anticorps (anticorps polyclonaux) dont une partie est dirigés contre les toxines du venin. Injecté à un humain, ce sérum permet de neutraliser le venin.

Bien qu'efficace, cette opération ne peut qu'être ponctuelle : les anticorps animaux, ainsi que le reste des protéines du sérum, représentent en eux-mêmes des cibles pour le système immunitaire. L'injection d'une grande variété d'anticorps étrangers entraînera le développement d'une réponse dirigée contre eux, et la neutralisation à terme des injections successives.

Dans la première moitié du XX^e siècle, les thérapies sériques étaient une méthode répandue de lutte contre les infections bactériennes. Ici encore, il s'agit d'un transfert d'immunité passive : en injectant le sérum d'une personne guérie à une personne malade, on transfère des anticorps dirigés contre le pathogène en cause.

Là aussi, l'injection de grandes quantités d'anticorps polyclonaux étrangers présente un grand risque de réactions immunogènes regroupées sous le nom général de maladie sérique, et dont les complications peuvent aller jusqu'à la mort. La découverte et le développement de molécules antibiotiques²³ à partir des années 1940 a considérablement réduit l'utilisation des thérapies sériques. Depuis les années 2000, on constate cependant un regain d'intérêt pour cette approche thérapeutique, pour le traitement de souches multirésistantes²⁴ ou en l'absence de traitement disponible pour des infections virales, comme le virus Ebola²⁵ ou le SARS-Cov-2²⁶ plus récemment.

3.2.4 Anticorps monoclonaux

La production d'anticorps de synthèse par la technologie de l'ADN recombinant a permis deux avancées majeures aidant à maximiser l'efficacité et à minimiser l'immunogénicité des traitements, permettant ainsi leur emploi sur une longue durée, pour une action ciblée et de grande efficacité.

La synthèse recombinante et l'hybridation avec des cellules immortelles permet la production de lignées d'anticorps identiques, les anticorps monoclonaux²⁷. Il devient alors possible d'injecter uniquement l'anticorps d'intérêt au lieu d'anticorps polyclonaux d'efficacité variée et d'immunogénicité supérieure.

Il est également possible d'humaniser les anticorps d'origine animale²⁸, voire même de produire des anticorps entièrement humains issus de l'immunisation d'animaux génétiquement modifiés²⁹.

Pour un anticorps donné, ces techniques permettent donc le clonage massif d'anticorps humanisés à l'immunogénicité réduite³⁰.

Mais encore faut-il découvrir et isoler l'anticorps d'intérêt. La première étape, c'est donc la détermination de la cible thérapeutique.

Une fois la cible identifiée, l'antigène correspondant est isolé et inoculé à un animal, le plus souvent la souris³¹.

Une fois l'animal immunisé, un grand nombre de ses lymphocytes B, cellules productrices d'anticorps, est prélevé. Chacune de ces cellules produit en continu des copies d'un anticorps monoclonal. Parmi les millions d'anticorps monoclonaux produits par les différentes cellules prélevées, il s'agit donc de trouver celui ou ceux présentant la meilleure affinité pour l'antigène ciblé.

Cette méthode de sélection peut être remplacée ou complétée par le développement et l'exposition de bibliothèques de phages^{32,33}.

Le criblage est une étape d'une grande complexité³⁴. L'étude en parallèle d'une si grande diversité de cellules nécessite des ressources matérielles conséquentes, et a longtemps représenté un réel frein au développement des anticorps thérapeutiques. Nous évoquerons dans la suite de cette introduction le processus Celligo, développé par l'entreprise HiFiBio Therapeutics, et appliquant la microfluidique en gouttes au criblage de lymphocytes B.

3.2.5 Applications thérapeutiques

Avec une approche thérapeutique nouvelle, les anticorps sont des traitements prometteurs pour certaines pathologies. Dirigés contre un antigène précis, ils permettent une grande spécificité d'action. On retrouve dans les domaines d'applications les deux grands mécanismes d'actions précédemment évoqués : moduler l'action du système immunitaire, ou cibler des pathogènes qui lui échappent.

Afin d'illustrer cette dualité, revenons à un exemple très actuel : en ciblant la protéine spike du SARS-Cov-2, le sotrolimab empêche le virus de pénétrer dans les cellules et pourrait aider au traitement de formes graves de la maladie³⁵.

Dans certains cas, la réponse immunitaire au virus dégénère et entraîne une réaction inflammatoire aiguë et potentiellement mortelle, l'orage cytokinique. En ciblant directement des composants du système immunitaire, l'emploi d'anticorps permet de réguler l'inflammation. C'est le cas par exemple du tocilizumab³⁶ dirigé contre la cytokine inflammatoire interleukine 6 (IL-6), ou de l'itolizumab³⁷, qui cible les récepteurs CD6 situés à la surface des lymphocytes T, limitant ainsi leur prolifération et la stimulation de l'hyperinflammation.

Si les traitements anti-Covid à base d'anticorps thérapeutiques permettent d'illustrer les différents rôles que peuvent jouer ces biopharmaceutiques, leur valeur ajoutée reste discutable, et ils ne représentent pas un domaine d'application majeur.

Traitement des maladies auto-immunes

Historiquement, les maladies auto-immunes ont été le premier champ d'application des anticorps thérapeutiques. Consécutives à des dysfonctionnements du système immunitaire, notamment la reconnaissance du soi⁶, les maladies auto-immunes touchent 8% de la population des pays industrialisés, avec une forte prévalence chez les femmes³⁸ (78%). Parmi les plus connues, on peut citer le diabète de type 1, la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la sclérose en plaques : des pathologies dégénératives lourdes, dont les symptômes sont handicapants et dans certains cas mortels.

Pour certaines de ces maladies, les traitements par anticorps monoclonaux représentent une opportunité thérapeutique inédite, permettant à des patiente·e-s de vivre une vie la plus normale possible.

Dans ces cas là, il ne s'agit pas d'éliminer un agent pathogène, mais de réguler l'activité de protéines cibles pour corriger les dysfonctionnement du système immunitaire des patient·e-s.

Un grand nombre de maladie autoimmunes sont le résultat d'hyperinflammation. On retrouve donc dans cette catégorie une majorité d'anticorps anti-cytokines. Le tocilizumab anti-IL-6 précédemment cité est d'ailleurs initialement indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Le traitement de cette maladie chronique dégénérative est probablement l'application la plus célèbre des anticorps thérapeutiques.

Touchant 0.4-0.5% de la population³⁹, la polyarthrite rhumatoïde était précédemment incurable. Les symptômes de cette maladie peuvent être considérablement allégés dans la majorité des cas grâce à des anticorps ciblant des cytokines inflammatoires. L'interleukine 6 précédemment mentionnée donc, mais surtout le facteur de nécrose tumorale $TNF-\alpha$. Ce vecteur d'inflammation est ciblé par un grand nombre d'anticorps commercialisés, dont le premier et le plus connu d'entre eux : l'adalimumab. Commercialisé en 2002 sous le nom d'Humira³³, cet anticorps est depuis plusieurs années le médicament le plus vendu au monde en terme de chiffre d'affaires⁴⁰.

En ciblant des cytokines ou des protéines membranaires de lymphocytes par exemple, ces anticorps agissent sur l'ensemble du système immunitaire, ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient. Un avantage car la neutralisation d'une cible unique permet parfois le traitement de plusieurs pathologies : en plus de la polyarthrite rhumatoïde, l'adalimumab est indiqué pour le traitement d'autres types d'arthrite, mais également de la maladie de Crohn, du psoriasis, et de la maladie hémolytique du nouveau-né par exemple.

Une inconvénient dans certains cas, car l'action de ces anticorps peut être immunosuppressante, compromettant leur utilisation notamment pour des traitements à vie. On peut citer l'exemple du natalizumab, anticorps prometteur pour le traitement de la sclérose en plaques chez les patient·e·s jeunes, mais avec un fort risque de complications liées à son effet immunosuppresseur.

Traitement du cancer

Le traitement de certains cancers est l'autre domaine d'application thérapeutique majeur des anticorps monoclonaux.

Les cellules cancéreuses sont à l'origine des cellules du soi, dont la dégénération et la prolifération incontrôlées deviennent pathologiques, mais dont la proximité structurelle avec les cellules normales limite l'efficacité des traitements. Les chimiothérapies sont des traitements agressifs, reposant sur l'utilisation de molécules à large spectre, s'attaquant aussi bien aux cellules cancéreuses qu'au reste du corps. Les traitements physiques, la chirurgie ou la radiothérapie, ne proposent qu'un ciblage anatomique du traitement, et ne permettent que le traitement de cancers localisés.

Les anticorps thérapeutiques permettent à la fois un traitement ciblé du cancer grâce à leur grande spécificité, et une action globale grâce à leur diffusion dans tout le corps via la circulation sanguine.

Parmi les anticorps anticancéreux, on retrouve les deux approches distinctes évoquées précédemment : certains anticorps neutralisent l'action des cellules tumorales en se liant sélectivement à des protéines membranaires, d'autres participent à l'élimination des tumeurs en modulant l'action du système immunitaire.

Pour le premier mode d'action, on peut citer l'exemple du trastuzumab, un anticorps monoclonal ciblant les protéines HER2 surexprimées à la surface des cellules tumorales dans certains cas de cancers du sein⁴¹. La neutralisation des récepteurs HER2 permet de limiter la croissance tumorale en empêchant l'angiogénèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins alimentant la tumeur en oxygène et en nutriments.

Le trastuzumab est également disponible sous la forme d'un conjugué anticorps-médicament. Associé à la mertansine, un agent cytotoxique puissant, le trastuzumab emtansine permet la lyse ciblée des cellules cancéreuses exprimant le récepteur HER2²¹.

La croissance des tumeurs cancéreuses résulte d'un équilibre entre la réponse immunitaire et les mécanismes d'immunosuppression qu'elle développe, que l'on qualifie d'échappement tumoral⁴².

Certains anticorps thérapeutiques visent donc à contourner l'échappement tumoral via une modulation du système immunitaire, permettant ainsi la destruction de la tumeur. L'un des plus employés est le pembrolizumab⁴³. En ciblant les récepteurs PD-1 à la surface des lymphocytes T, cet anticorps désactive une des barrières immunitaires empêchant les cellules T de s'attaquer aux cellules du soi. A l'inverse des immunoglobulines anti-cytokines précédemment évoquées, la modulation consiste ici à désinhiber le système immunitaire.

Ces quelques exemples n'ont pas de visée exhaustive, mais reflètent une réalité : les anticorps thérapeutiques ne sont plus des traitements expérimentaux. Utilisés couramment dans le traitement de certains cancers, ils permettent de multiplier les chances de survie et de rémission.

Contre les maladies auto-immunes, ils représentent une opportunité thérapeutique inédite, permettant à

des patient·e·s d'éviter les symptômes handicapants de pathologies dégénératives lourdes. Sur les vingt médicaments les plus vendus en 2020, huit sont des anticorps monoclonaux⁴⁰, et un neuvième est une protéine de fusion construite à partir d'un fragment d'anticorps. Cette statistique, exprimée en terme de chiffre d'affaires, reflète une double réalité : elle démontre l'ancrage durable des anticorps monoclonaux dans l'offre thérapeutique, mais souligne également le coût élevée de ces thérapies, en partie corrélé à la complexité des processus de découverte, formulation et production de ces médicaments.

3.3 Formulation, production et administration

Les biopharmaceutiques ne sont pas des médicaments comme les autres. Les méthodes de production et d'administration de ces traitements sont spécifiques, de même que les contraintes physiques propres aux solutions de protéines concentrées.

L'immunothérapie nécessite l'administration de doses importantes d'anticorps⁴⁴, de l'ordre de 1-10 mg.kg⁻¹, concentrées dans un volume parfois réduit comme nous le verrons.

Diverses étapes du processus de fabrication des anticorps monoclonaux nécessitent la manipulation de solutions concentrées⁴⁵.

Nous verrons que l'administration, mais aussi la production et le stockage des biopharmaceutiques nécessitent la manipulation de solutions de protéines concentrées, dont certaines propriétés représentent des difficultés majeures : la viscosité élevée et la formation d'agrégats.

3.3.1 Voies d'administration

L'injection est la seule voie d'administration possible pour les anticorps thérapeutiques. Leur taille (150kDa en moyenne) rend impossible leur assimilation via la membrane intestinale, et donc leur administration par voie orale.

Il existe plusieurs types d'injection, chacun présentant des avantages et des inconvénients propres. Nous discuterons ici des deux méthodes représentant la quasi-totalité des méthodes d'administration des biopharmaceutiques : la perfusion intraveineuse et l'injection sous-cutanée.

Perfusion intraveineuse

La perfusion intraveineuse permet d'injecter de grands volumes de liquides (jusqu'à 200 mL) à faible débit. En contrepartie, elle nécessite la pose d'un cathéter veineux par un personnel qualifié, et une surveillance médicale pendant la durée d'injection qui peut être de plusieurs heures.

Cette méthode reste la voie d'administration de référence pour les thérapies lourdes, notamment pour les traitement anticancers. Les patient·e·s hospitalisé·e·s recevant déjà des traitements par voie intraveineuse, il est possible d'administrer des anticorps monoclonaux par un simple changement de poche de perfusion sans contrainte ou coût additionnels.

La question du mode d'injection se pose dans le cas des traitements chroniques, notamment contre les maladies auto-immunes.

Prenons l'exemple des inhibiteurs de TNF- α mentionnés précédemment. Ils permettent de réduire les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, améliorant considérablement la vie des patient·e·s, mais nécessitent pour cela des injections hebdomadaires.

Dans ce cadre, une perfusion intraveineuse représente pour les patient·e·s un déplacement à l'hôpital ou dans une structure médicale et une immobilisation pendant plusieurs heures, pour un traitement à vie. Du côté de la collectivité, cette intervention représente un coût régulier, à multiplier par le nombre important de personnes concernées par le traitement⁴⁶.

Injection sous-cutanée

L'injection sous-cutanée présente le double avantage de ne nécessiter ni matériel spécialisé ni supervision médicale, l'injection pouvant être réalisée à domicile par les patient·e·s, au moyen d'auto-injecteurs⁴⁷. En contrepartie, le volume d'injection maximum est fortement réduit (2 mL), ainsi que le diamètre de l'aiguille.

L'administration des immunothérapies en injection sous-cutanée entraîne un gain important en termes de confort, de suivi de traitement^{48,49} et de coût sociétal, mais représente un défi physico-chimique pour

la formulation des anticorps monoclonaux.

La réduction du volume entraîne des concentrations en anticorps allant jusqu'à $100\text{-}200\text{ g.L}^{-1}$. À de telles concentrations, la viscosité de la solution peut être suffisamment importante pour empêcher l'injection via une aiguille de faible diamètre⁵⁰, d'autant que la force nécessaire au passage de l'aiguille varie comme η/d^4 .

À de telles concentrations, l'agrégation des anticorps peut aller jusqu'à obstruer partiellement ou totalement l'aiguille, augmentant encore la contrainte nécessaire⁵¹.

À travers la problématique de l'injection, nous avons évoqué deux facteurs de complexité majeurs propres aux biopharmaceutiques : la viscosité des solutions, et leur stabilité.

3.3.2 Viscosité

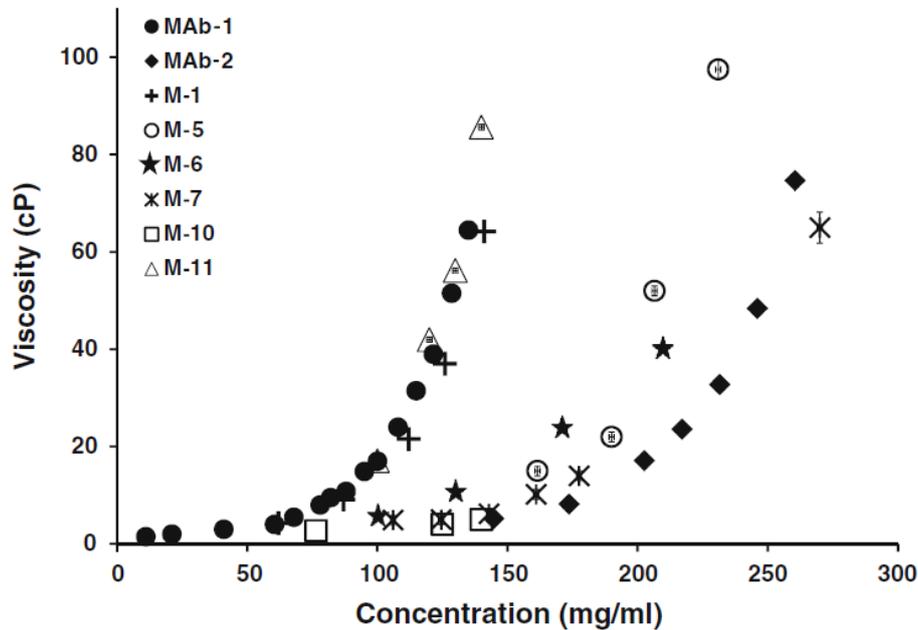


FIG. 5 – Viscosité dynamique en fonction de la concentration pour deux anticorps monoclonaux quasi-similaires (*mAb-1* et *mAb-2*) et une série d'anticorps obtenus par mutation des deux premiers (*M-1,5,6,7,10,11*). Malgré des séquences polypeptidiques quasi-identiques, ces anticorps ont des comportements visqueux très différents. Figure par Sandeep Yadav et al⁵²

Nous avons déjà évoqué la complexité du comportement visqueux des solutions de protéines concentrées, liée aux interactions non-spécifiques s'y développant.

Les immunoglobulines sont des protéines multi-domaines dont la structure est relativement flexible.

On parle d'auto-association pour qualifier les interactions se développant entre plusieurs anticorps identiques. À haute concentration, l'auto-association est la contribution principale à la viscosité des solutions d'anticorps⁵²⁻⁵⁴.

L'auto-association dépend fortement de la structure des domaines variables des anticorps, ceux développant le plus d'interactions. Ainsi, deux anticorps de séquence très similaire peuvent montrer des comportements visqueux très différents⁵⁵⁻⁵⁷ (figure 5).

3.3.3 Stabilité

Du fait de leur structure flexible, les anticorps se déforment à haute concentration, sous l'effet de ces interactions.

Les changements de conformation ainsi induits posent un problème majeur aux solutions concentrées de biopharmaceutiques : en exposant des zones hydrophobes, la dénaturation des anticorps favorise la formation d'agrégats (figure 6).

La formation d'agrégats est difficilement évitable lors des phases de production, de stockage ou de manipulation des anticorps^{59,60}. De même que la dénaturation qui en est à l'origine, l'agrégation est po-

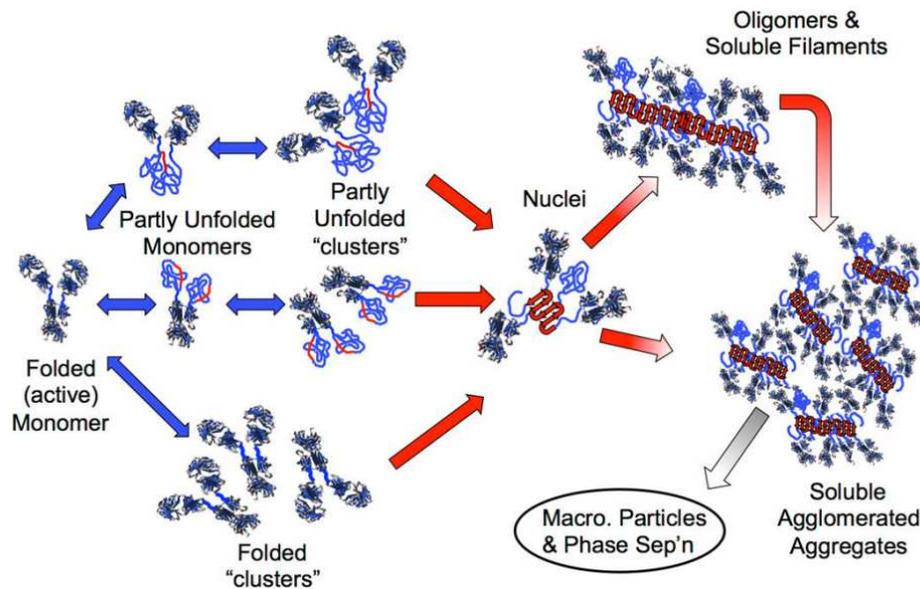


FIG. 6 – Différentes voies d'agrégation pour un anticorps monoclonal à haute concentration. La déformation des anticorps peut exposer des zones hydrophobes conduisant à l'agrégation, avec ou sans formation de clusters dynamiques au préalable. Les agrégats sont de taille variable, potentiellement irréversibles et peuvent aboutir à une séparation de phase et à la précipitation des anticorps. Figure par Christopher J. Roberts⁵⁸

tentiellement irréversible⁶¹. Selon la taille et le nombre des agrégats, ce phénomène peut empêcher la formulation d'un anticorps monoclonal à des fins thérapeutiques : premièrement, l'agrégation diminue la biodisponibilité du traitement.

Également, elle augmente fortement son immunogénicité^{62–64}, avec des effets indésirables allant jusqu'à la mort⁶⁵. Rappelons en effet que l'accumulation d'un grand nombre d'anticorps à un même endroit est l'un des facteurs déclencheurs de la cascade du complément et de la réponse immunitaire. Ainsi, la présence d'agrégats dans les solutions d'anticorps est réglementée⁶⁶.

3.3.4 Caractérisation expérimentale

La complexité de la formulation des immunothérapies est amplifiée par le fait que les interactions d'auto-association et la stabilité des anticorps dépendent de leur structure et de nombreux paramètres extérieurs tels que le pH ou la présence d'excipients^{67–72}.

Malgré de nombreux efforts de recherche en cours, il est aujourd'hui impossible de prédire la viscosité ou la stabilité d'un anticorps à partir de sa séquence ou de sa structure. Les modélisations numériques^{73–75} sont encore insuffisantes, et la pertinence des modèles colloïdaux est sujette à débat^{76,77}.

La viscosité et la stabilité des anticorps sont des paramètres importants, nécessitant une formulation adaptée⁷⁸ et une vigilance accrue à chaque étape de la production⁷⁹ ou de l'administration des traitements⁸⁰. Nous avons évoqué la problématique de l'injection de formulations concentrées d'anticorps car elle est l'illustration la plus marquante de l'influence de la viscosité et de la stabilité. Il arrive que l'un ou l'autre de ces facteurs empêchent le développement de formulations sous-cutanées d'un anticorps donné^{81,82}. Cependant, la viscosité et la stabilité des protéines posent également des défis lors de la production et du stockage des biopharmaceutiques^{68,83–87}.

On comprend ainsi que le développement d'un biopharmaceutique ne peut pas se limiter à la recherche du candidat présentant la meilleure action thérapeutique *in vitro*. La caractérisation expérimentale des biopharmaceutiques reste une étape indispensable, préalable à leur production et distribution commerciale. L'optimisation de la formulation nécessite l'exploration croisée de nombreux paramètres, démultipliant ainsi le nombre d'expériences nécessaires.

Ces expériences de caractérisation impliquent la manipulation et l'étude de solutions de protéines concentrées, un domaine présentant des contraintes spécifiques.

Chapitre 4

Étude de solutions concentrées de protéines

4.1 Problématiques générales

Guidé en partie par le développement des biopharmaceutiques et des contraintes de formulation qui leur sont associées, un effort de recherche grandissant s'intéresse à l'étude expérimentale de solutions de protéines concentrées.

Pour ces expériences, les solutions de protéines présentent des contraintes supplémentaires.

4.1.1 Production des solutions de protéines

Premièrement, les protéines peuvent coûter cher, voire n'être tout simplement pas accessibles. Rappelons-le, les biopharmaceutiques sont produits par des cultures de bactéries ou des cellules de mammifères génétiquement modifiées. Une méthode de production onéreuse, nécessitant un savoir-faire et des infrastructures de pointe, et ne permettant donc pas une montée rapide en volume de production.

Si le criblage de candidats a longtemps été l'étape limitante du développement des biopharmaceutiques, c'est aujourd'hui leur production qui peine à suivre le rythme^{60,88-90}.

Le prix au gramme des anticorps monoclonaux va de 400€ pour un anticorps monoclonal murin de contrôle à +100k€ pour les anticorps thérapeutiques les plus onéreux. A cette gamme de prix, le coût des expériences devient vite prohibitif.

L'étude des solutions concentrées de protéines s'accompagne donc d'un besoin pressant de caractérisation de faibles volumes d'échantillons concentrés.

Un exemple intéressant est celui de la détection d'agrégats sub-micrométriques, invisibles au microscope. La démonstration de l'immunogénicité de ces petits agrégats^{91,92} amené les agences sanitaires à réglementer⁶⁶ la concentration d'agrégats sub-micrométriques tolérée dans les formulations commerciales, alors que les techniques de caractérisation nécessaires à leur détection n'ont pas encore atteint le stade industriel.

Le développement récent de nombreux dispositifs de mesures poursuivant cet objectif⁹³⁻⁹⁶ témoigne du dynamisme de ce domaine de recherche.

4.1.2 Concentration des solutions de protéines

Si les échantillons de protéines sont rares, les échantillons de protéines concentrées le sont encore plus. Les protéines sont des solutés de grande taille, relativement instables. La préparation des échantillons est donc plus technique que dans d'autres domaines. La concentration de solutions de protéines nécessite l'utilisation de techniques de pointe telles que l'ultracentrifugation. Coûteuses en matériel et en temps, et nécessitant un personnel qualifié, ces étapes de préparation ajoutent à la complexité de la préparation des échantillons, et limite l'intégration des techniques de caractérisation à des flux de production continus.

La rareté et la difficulté de préparation des échantillons limitent fortement le nombre d'expériences accessibles pour l'étude des solutions de protéines concentrées.

4.2 Rhéologie de solutions de protéines concentrées

Dans ces travaux, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à la viscosité des solutions concentrées de protéines.

Pour les protéines thérapeutiques, la viscosité des solutions représente un problème physique concret : la viscosité des solutions d'anticorps peut empêcher leur administration. La viscosité est donc une mesure de contrôle ou servant au criblage des conditions de formulation optimales.

De manière plus générale, la rhéologie des solutions de protéines offre un accès indirect aux interactions microscopiques qui les caractérisent. Le suivi de la viscosité permet d'accéder à l'organisation microscopique des protéines en solution⁹⁷⁻¹⁰⁰, et donc une meilleure compréhension des phénomènes d'organisation collective, notamment l'auto-association.

S'il n'est pas encore parfaitement établi, le lien entre la viscosité et l'auto-association et/ou l'agrégation des anticorps est quant à lui en cours d'étude¹⁰¹⁻¹⁰³.

Pour les raisons précédemment évoquées, la rhéologie des protéines est particulièrement complexe. Les expériences standard de rhéologie se font au moyen de rhéomètres, nécessitant des volumes d'échantillons de l'ordre de 1-10 mL.

Les rhéomètres les plus avancés mesurent la force de réaction exercée par le fluide en réponse à une contrainte de cisaillement. C'est le cas des rhéomètres rotatifs pour lesquels la contrainte est programmable, ce qui permet d'explorer une gamme de viscosité plus importante et l'étude de fluides non-newtoniens, dont la viscosité dépend de la contrainte.

La précision et la versatilité des rhéomètres rotatifs en ont fait le standard pour les mesures de viscosité en laboratoire. Cependant, ils présentent des limitations sérieuses pour la rhéologie de solutions de protéines.

Pour les rhéomètres rotatifs, le volume minimal d'échantillon nécessaire est de 100 μL ¹⁰¹ (pour une géométrie cône-plaque), dans la pratique cette valeur oscille plutôt autour de 1-5 mL. Un tel volume de solution représente une grande quantité de protéines, surtout lors de l'étude de solutions concentrées (jusqu'à 300-500 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Le fait qu'un grand nombre de mesures soit nécessaire démultiplie ce coût : la mesure doit-être réalisée à plusieurs concentrations pour établir la courbe de viscosité, et le cas échéant de nombreux paramètres doivent-être évalués pour optimiser une formulation.

Les interactions entre protéines précédemment évoquées, notamment liées à leur distribution de charges⁵⁶, entraîne une déviation marquée de la viscosité des solutions de protéines concentrées par rapport à des modèles purement hydrodynamiques comme celui des sphères dures par exemple.

À haute concentration, les transitions de phase entraînent des inhomogénéités au sein des échantillons, perturbant leur étude rhéologique.

Parallèlement au développement des biopharmaceutiques, de nombreux travaux ont cherché à optimiser la rhéologie de solutions de protéines, en diminuant le volume d'échantillon nécessaire et en augmentant les capacités de parallélisation.

Certaines de ces techniques reprennent l'approche des rhéomètres classiques, et visent à mesurer la réponse d'un fluide à une déformation donnée. On peut notamment citer l'utilisation de micro-balances à quartz¹⁰⁴ et les micro-rhéomètres capillaires^{101,105}.

Ces techniques permettent de réduire le volume d'échantillon consommé, mais semblent bloquer sur la limite de 100 μL .

Pour mesurer la viscosité d'échantillons allant jusqu'à 1 μL , d'autres techniques exploitent le lien entre viscosité et diffusion des particules (cf partie IV, 1.1). Les principales sont la diffusion dynamique de la lumière¹⁰⁶, l'analyse de la dispersion de Taylor¹⁰³, la diffusion de neutrons aux petits angles¹⁰⁷ ou le suivi de particules browniennes¹⁰⁸.

C'est cette dernière technique que nous avons exploré plus en détail au cours de ces travaux.

4.3 Microrhéologie

La microrhéologie consiste à mesurer les propriétés rhéologiques d'un milieu en observant le mouvement de particules calibrées, que l'on qualifera de traceurs dans la suite de ce manuscrit.

On distingue deux types de microrhéologie.

Tout d'abord la microrhéologie active, où l'on mesure la résistance du fluide à un mouvement des traceurs imposé par un champ extérieur (champ magnétique par exemple).

Les premiers exemples remontent aux années 1920, avec l'étude du déplacement de particules magnétiques¹⁰⁹.

La microrhéologie passive étudie le mouvement propre des traceurs, résultat de la diffusion brownienne (cf partie IV, 1.1). Dans ce domaine, ce sont les travaux de Thomas G. Mason et David A. Weitz dans les années 1990^{110,111} qui sont fondateurs. Cette technique, que nous avons retenu pour approche expérimentale, sera décrite en partie IV

Cette technique permet de mesurer la viscosité de volumes inférieurs à 1 μL . Elle a aussi l'avantage de pouvoir fonctionner avec un suivi vidéo des particules sur un microscope optique, sans application de contrainte ou de champ extérieur. Cette simplicité permet son intégration à des dispositifs conçus pour minimiser les volumes consommés et offrant des possibilités de parallélisation inégalées : les puces microfluidiques.

Chapitre 5

Microrhéologie en gouttes microfluidiques

5.1 Microfluidique

La microfluidique décrit l'étude et la manipulation des fluides à l'échelle microscopique. Le comportement des écoulements dans des canaux micrométriques diffère grandement de celui des écoulements macroscopiques.

5.1.1 Laminarité

À de si petites échelles, les écoulements sont le plus souvent laminaires : le fluide s'écoule dans un mouvement d'ensemble, sans turbulence.

De manière très simplifiée, on peut distinguer deux catégories de forces influant l'écoulement d'un fluide donné. Les forces inertielles sont générées par l'écoulement lui-même, et dépendent donc de sa vitesse. Les forces de frottement dépendent quant à elles de la viscosité du fluide et de la géométrie de l'écoulement. Le nombre de Reynolds Re est un nombre adimensionné quantifiant le rapport entre forces d'inertie et forces visqueuses au sein d'un écoulement. Il est défini selon :

$$Re \equiv \frac{\rho V_c L_c}{\eta} \quad (\text{I.1})$$

V_c et L_c représentent respectivement la vitesse et la longueur caractéristiques de l'écoulement. ρ est la masse volumique du fluide, et η sa viscosité dynamique.

Ce nombre permet d'évaluer, en ordre de grandeur, l'influence relative des forces inertielles et des forces de frottement, et ainsi d'évaluer le caractère laminaire ou turbulent de l'écoulement. Pour $Re \gg 1$ l'écoulement est turbulent, et il est laminaire pour $Re \ll 1$.

Avec des longueurs caractéristiques de l'ordre de la centaine de micromètres et des vitesses faibles, les écoulements microfluidiques sont quasi-systématiquement laminaires, et ce quelque soit la viscosité du fluide.

5.1.2 Phénomènes de transport

La laminarité des écoulements simplifie la manipulation des fluides, et permet un contrôle précis des phénomènes de transport : en l'absence de turbulence, le transport de matière par convection est inexistant. Ce sont donc les phénomènes d'advection et de diffusion, plus facilement modélisables, qui dominent.

La microfluidique permet donc un contrôle précis des transports de masse^{112,113}. De plus, l'importance des surfaces d'échange par rapport aux volumes de fluides étudiés permet le plus souvent des transferts thermiques rapides, assurant ainsi l'équilibre des températures.

5.2 Applications

Les possibilités offertes par la manipulation de fluides à une si petite échelle ont été exploitées dans de nombreux domaines. On peut citer l'apparition au début des années 1950 des premiers systèmes

d'impression à jet d'encre¹¹⁴, ou les premiers cytomètres à flux apparus à la même période et permettant le comptage de cellules circulant dans des capillaires en verre.

La faible dimension caractéristique des écoulements permet surtout d'envisager l'intégration de circuits microfluidiques sur une petite surface, à la manière des circuits imprimés en électronique. On parle alors de puce microfluidiques.

5.2.1 Puces microfluidiques

Gravure sur Silicium

Les années 1950 coïncident également avec l'apparition des techniques de photolithographie permettant la microgravure de transistors sur des substrats semi-conducteurs.

L'essor de la microélectronique s'accompagne d'un perfectionnement et d'une démocratisation de ces techniques, permettant la fabrication à grande échelles de systèmes plus complexes.

En remplaçant les transistors par des canaux microfluidiques, l'utilisation de ces techniques de gravure permet d'envisager la production de circuits microfluidiques intégrés. En 1979, le premier chromatographe miniature est gravé sur un substrat de Silicium par Terry et al¹¹⁵.

Lithographie douce

L'essor de la microfluidique coïncide avec le développement par Georges Whitesides et al¹¹⁶ des techniques de lithographie douce (soft lithography).

La puce n'est plus obtenue directement par photogravure sur un substrat rigide, mais répliqué par moulage d'un élastomère sur une matrice rigide.

Le poly(diméthylsiloxane) (abrégé en PDMS) est le plus répandu de ces élastomères.

Le PDMS est transparent, ce qui permet l'observation des puces au microscope¹¹⁷. Sa déformabilité rend possible l'intégration de valves¹¹⁸ permettant la commande de circuits microfluidiques complexes.

Le PDMS est également bio-compatible et perméable aux gaz, ce qui permet la culture cellulaire ou bactérienne au sein des puces microfluidiques.

Enfin, la soft lithography permet de produire à faible coût un grand nombre de puces à usage unique, à partir d'une seule matrice. L'étape de moulage de l'élastomère peut se faire hors d'une salle blanche, ce qui contribue à réduire les coûts.

L'accessibilité et la versatilité des puces obtenues par soft lithography ont contribué à la diversification des applications de la microfluidique.

Microfluidique et hydrodynamique

La précision inégalée dans la manipulation des fluides et les capacités de prototypage de la lithographie douce font de la microfluidique un outil idéal pour les études hydrodynamiques.

La prédictabilité des écoulements permet la conception de géométries dédiées à l'observation de phénomènes hydrodynamiques précis, géométries pouvant être prototypées puis optimisées rapidement et à moindre coût par lithographie douce.

Il est ainsi possible d'isoler et d'observer des phénomènes hydrodynamiques complexes, notamment les instabilités d'écoulement¹¹⁹ ou encore les effets de bords¹²⁰.

La maîtrise des écoulements permet également la synthèse de colloïdes monodisperses^{121,122}.

Microfluidique et biologie

Depuis les premiers cytomètres à flux permettant le comptage de cellules, les avancées de la microfluidique et la miniaturisation des systèmes de détection ont permis la naissance d'un domaine à part entière de la biologie : la manipulation et l'observation de cellules uniques.

Le développement de la technique FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) en 1972 démultiplie les capacités de tri cellulaire. Cette technique de cytométrie en flux consiste à caractériser le signal de fluorescence de cellules passant sous un faisceau laser, puis à trier les cellules en au moins deux populations distinctes au moyens d'impulsions piézoélectriques.

En permettant la manipulation de brins d'ADN individuels, la microfluidique a révolutionné le séquençage génétique, abaissant le coût de séquençage d'un génome de 1 millions à 4000 dollars¹²³.

Le développement du PDMS, matériau biocompatible permettant la culture cellulaire, permet la transposition de processus expérimentaux biologique en microfluidique.

Au-delà de la manipulation de fluides à l'échelle micrométrique, la génération et la manipulation de micro-gouttes ont démultiplié les capacités de parallélisation de la microfluidique ainsi que ses applications dans le domaine de la biologie.

5.3 Microfluidique en gouttes

5.3.1 Génération d'émulsion microfluidiques

Deux substances non miscibles vont spontanément former un mélange diphasique, comme lorsque l'on verse délicatement de l'huile sur de l'eau.

L'application de forces de cisaillement permet de disperser les phases. On observe alors la dispersion d'une phase dans l'autre : des gouttelettes de phase dispersée se forment dans la phase continue. C'est ce qui se produit lorsque qu'on mélange avec plus de vigueur de l'huile et de l'eau.

La configuration la plus stable restant celle qui minimise la surface de contact entre les deux phases, les gouttes vont avoir tendance à coalescer. L'emploi d'un surfactant, molécule tensioactive se plaçant à l'interface entre les deux phases, permet de d'empêcher la coalescence, et ainsi de stabiliser l'émulsion.

Dans la transformation d'un mélange eau-huile en mayonnaise ou en vinaigrette, c'est la phosphatidylcholine qui va jouer le rôle de surfactant. Plus connu sous le nom de lécithine, ce lipide est présent dans le jaune d'oeuf ou dans le soja par exemple.

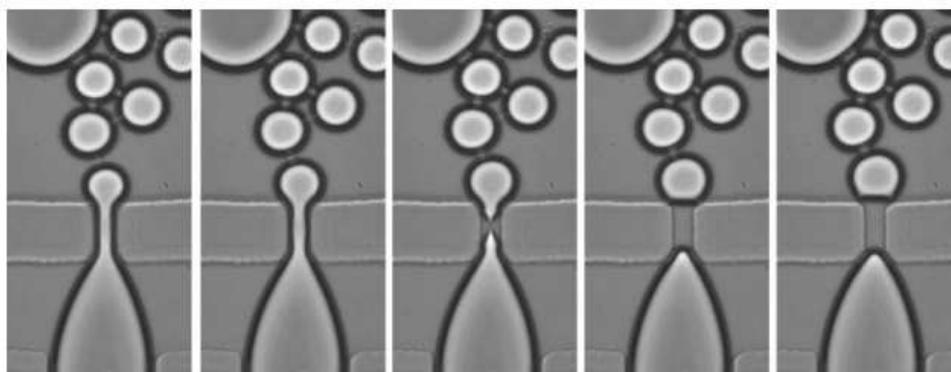


FIG. 7 – Production de micro-gouttes au sein d'une puce microfluidique. Ici, l'émulsion est obtenue par *flow-focusing* (cf partie II, 2.1). L'orifice rectangulaire à l'origine de la production des gouttes mesure $40\ \mu\text{m}$. Figure par Howard A. Stone et al¹²⁴

Les phénomènes d'émulsification sont contrôlables au sein des puces microfluidiques, différentes techniques permettant d'imposer les forces de cisaillement nécessaires à la dispersion d'une phase dans une autre. On obtient alors une série de gouttes microfluidiques dispersée dans une phase continue.

Les techniques d'émulsification microfluidique permettent la production à haut débit (jusqu'à 1 kHz) d'émulsions monodisperses de grande stabilité (exemple en figure 7).

Chaque goutte de cette émulsion représente alors un micro-réacteur indépendant de taille calibrée, offrant des possibilités de parallélisation inégalées.

D'autres techniques, comme celles que nous avons retenu (cf partie II, 2.1), permettent la génération d'un nombre minimal de gouttes calibrées, minimisant ainsi la consommation d'échantillon.

5.3.2 Micro-réacteurs biologiques

En permettant la génération et l'étude simultanée de milliers de conditions expérimentales différentes, la microfluidique en gouttes est particulièrement adaptée aux expériences de biologie. Plus intéressant encore, la petite taille des gouttes microfluidiques permet d'y encapsuler et d'y étudier une cellule unique. Diverses techniques permettent la manipulation individuelle et donc le tri de gouttes.

Ainsi, la microfluidique permet l'étude parallèle de milliers de cellules individuelles¹²⁵, l'isolation de cellules d'intérêt et l'établissement du lien phénotype-génotype grâce au séquençage de cellules uniques^{126,127}.

Le processus Celligo, détaillé en figure 8, représente l'un des aboutissements du développement de la microfluidique en goutte.

La production et la manipulation à haut débit de gouttes microfluidiques contenant des cellules uniques permet le tri de lymphocytes B, et ainsi le criblage d'anticorps thérapeutiques avec des performances inégalées.

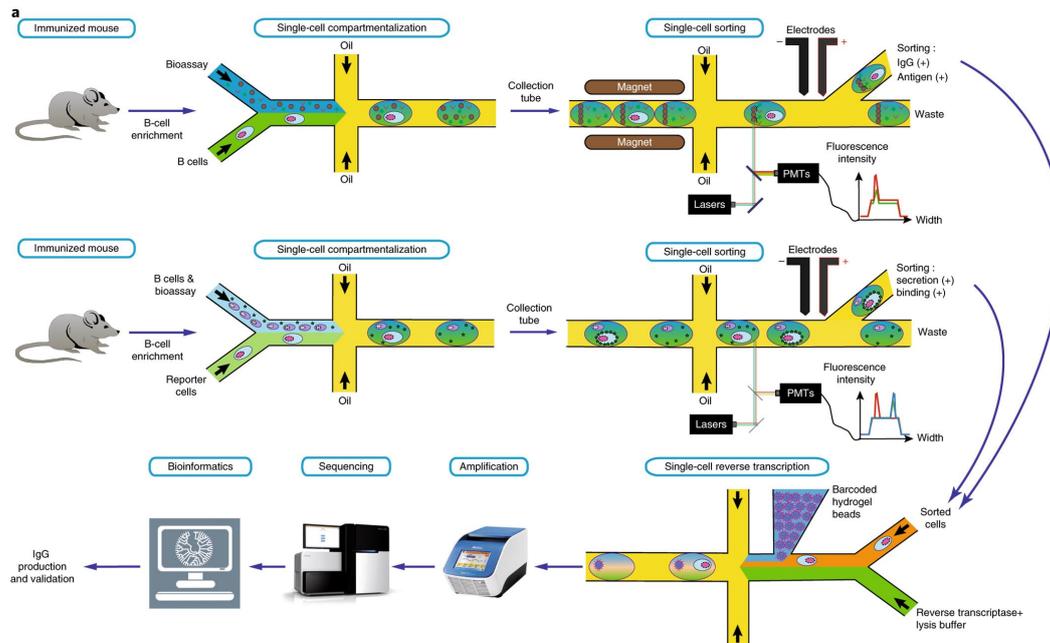


FIG. 8 – Le processus Celligo est une des applications les plus abouties de la microfluidique en goutte. L'encapsulation de lymphocytes B uniques; la production, la manipulation et le tri de gouttes à haut débit; le développement de bioessais en goutte; le séquençage du génome des cellules d'intérêt; et enfin l'analyse bioinformatique permettent la sélection automatisée à haut débit de candidats anticorps thérapeutiques. Figure extraite de Gerard et al 2020, *HiFiBio Therapeutics*¹²⁸

5.3.3 Concentration de solutés

Grâce au contrôle précis des phénomènes de transport dont nous avons précédemment discuté, la microfluidique permet également la modification des conditions expérimentales dans les gouttes.

Il est notamment possible de concentrer les solutés qui y sont encapsulés.

La perméation de l'eau hors des gouttes entraîne une réduction de leur volume, et par conséquent une augmentation de la concentration en soluté dans les gouttes.

Cette perméation peut être induite par des phénomènes d'osmose au sein d'une émulsion^{129,130}, ou encore par diffusion de l'eau à travers un matériau semi-perméable.

Cette seconde possibilité est offerte par le PDMS, polymère semi-perméable à l'eau¹³¹, rendant ainsi possible la perméation de l'eau à travers les puces microfluidiques, via des processus que nous étudierons plus en détail (partie II, 3.1).

La perméation permet la génération de flux au sein des puces, exploités notamment par des dispositifs de pompage passifs^{113,132,133}. Dans le cas d'une émulsion microfluidique aqueuse, la diffusion sélective de l'eau permet la concentration du soluté à des niveaux inégaux : la faible taille des gouttes favorise l'homogénéité des échantillons¹³⁴, et l'absence d'interface liquide-gaz ou liquide-solide limite les phénomènes de nucléation, permettant ainsi l'étude de solutions sursaturées, comme nous aurons l'occasion d'en discuter par la suite.

Cette technique a été principalement employée pour l'étude de la cristallisation de protéines¹³⁵⁻¹³⁷, ou pour la concentration de soluté à des fins analytiques¹³⁸.

5.4 Microrhéologie en gouttes microfluidiques

Nous avons vu que la structure des protéines et leur comportement sont fonctions de leur environnement, notamment de la concentration en macromolécules du milieu, l'encombrement moléculaire.

L'étude des protéines en milieux concentrés est indispensable à la compréhension de leur rôle biologique, de leur implication dans certaines pathologies ou encore de leur action thérapeutique par exemple.

Dans cette optique, la mesure de la viscosité est un indicateur intéressant, permettant un accès indirect aux propriétés microscopiques des solutions de protéines. Dans le cadre des protéines thérapeutiques, la rhéologie est une fin en soi, car les processus de production et d'administration imposent des limites physiques à la viscosité des solutions.

Du fait de la rareté et du prix élevé de certaines solutions de protéines, notamment les protéines thérapeutiques, la multiplication des conditions expérimentales à évaluer représente un coût et une complexité de préparation des échantillons non négligeables pour les méthodes de caractérisation traditionnelles.

Depuis le début des années 2000, de nombreux efforts de recherche visent à réduire la quantité d'échantillon nécessaire pour la rhéologie de solutions de protéines concentrées, notamment en exploitant les possibilités de parallélisation et de miniaturisation offertes par la microfluidique.

Ces travaux de doctorat s'inscrivent dans cet effort de recherche. Au cours de cette thèse, nous avons développé une plateforme microfluidique intégrée permettant le suivi microrhéologique de la viscosité de solutions aqueuses tout en utilisant la perméation de l'eau pour augmenter continuellement la concentration, permettant ainsi une caractérisation rhéologique en une seule expérience. La combinaison entre microrhéologie en gouttes et concentration d'émulsions microfluidiques était a priori inédite au début de cette thèse. Nous avons récemment appris qu'une étude similaire a été menée indépendamment par le groupe de recherche de Lynn Walker¹³⁹, confirmant ainsi l'intérêt pour de telles approches.

Dans la partie II, nous verrons en quoi l'architecture de notre puce permet de limiter grandement la consommation d'échantillon, jusqu'à 1-5 μL correspondant à 10 μg de protéines, grâce à une géométrie d'émulsification précédemment développée permettant de produire des gouttes monodisperses en faible quantité. Nous verrons également, au moyen de raisonnements et modélisations issus de la littérature, que la pervaporation de l'eau à travers le PDMS nous permet de concentrer continuellement les solutés dans les gouttes, et ce jusqu'à un facteur 400, tout en conservant l'immobilité et l'homogénéité des gouttes.

Dans la partie III, nous présenterons la méthode permettant un suivi de la concentration dans la goutte, ainsi qu'une étude systématique des différentes sources d'erreurs expérimentales et de leur impact sur la précision de la mesure. Nous verrons que la concentration des solutés dans la puce apporte des avantages importants, mais nécessite la prise en compte de corrections liées au volume partiel spécifique des solutés, notion que nous détaillerons.

Dans la partie IV, nous présenterons la technique de microrhéologie par suivi vidéo de particules multiples. Pour chacun des paramètres expérimentaux et des méthodes analytiques retenues, nous étayerons notre choix par une estimation systématique de la précision, à l'aide de calculs issus de la littérature. Nous verrons que le recours à un estimateur statistique basé sur la covariance des déplacements permet d'augmenter la précision du suivi des particules.

La partie V sera consacré à l'exposé des différents résultats obtenu au moyen de notre puce, ainsi que d'une discussion sur les avantages et les limites de notre approche expérimentale, avant d'envisager de futures perspectives en partie VI.

Deuxième partie

La puce

Chapitre 1

Architecture de la puce

1.1 L'intérêt d'une plateforme intégrée

Au-delà de la simple miniaturisation, un des intérêts majeurs de la microfluidique est de concevoir des dispositifs expérimentaux complets, regroupant tout un protocole expérimental sur une même puce. Depuis le début du XXI^e siècle, le concept de laboratoire sur puce est l'un des piliers du développement de la microfluidique.

En permettant l'intégration de valves¹⁴⁰ et la production de circuits complexes à faible coût, la technique de soft lithography¹¹⁶ a ouvert la voie à un nouveau champs de recherche, la microfluidique booléenne, ou microfluidique digitale.

Le concept est le suivant : les valves permettent la construction de portes logiques microfluidiques. En assemblant un grand nombre de ces portes on peut réaliser des circuits de complexité théoriquement arbitraire, permettant des analyses automatisées^{141,142}.

Ce que promettait la microfluidique, c'était de pouvoir assembler des circuits fluidiques comme on assemble des composants électroniques sur un circuit intégré.

Malheureusement, les résistances hydrodynamiques ne s'associent pas aussi simplement que les résistances électriques, et les gradients de pression / débits hydrodynamiques ne se convertissent pas aussi facilement que des tensions / intensités électriques.

Impossible donc de créer une puce microfluidique avec la même facilité qu'un circuit imprimé électronique.

Même si les espoirs initiaux ont dû être revus à la baisse, la microfluidique offre une flexibilité sans pareille pour concevoir des plateformes intégrées, minimisant le matériel et le nombre d'étapes nécessaires. Réaliser l'intégralité d'une expérience au sein d'une même puce permet de limiter les volumes morts (les volumes de fluide consommés pour remplir le dispositif expérimental), limitant ainsi grandement le volume d'échantillon nécessaire.

1.2 Cahier des charges

Avant de présenter plus en détail la puce et ses caractéristiques, il convient de définir sa fonction et les ambitions de notre système expérimental. Cette puce s'inscrit dans un effort de recherche visant à réduire la complexité et les coûts de la rhéologie de solutions de protéines.

C'est donc l'objectif premier de la puce : réaliser des mesures de viscosité précises sur des volumes de protéines concentrées aussi réduits possible. Pour l'étude de solution de protéines, une gamme de viscosité mesurable 1-150 mPa.s permet la caractérisation complète du comportement visqueux¹⁴³.

Le second objectif de la puce est de pouvoir concentrer les solutés en son sein. L'avantage est multiple : il permet de couvrir une grande gamme de concentration en une seule expérience, poursuivant ainsi la consommation d'échantillon, mais également d'atteindre des concentrations très élevées en partant d'échantillons dilués, facilitant grandement leur manipulation.

Nous nous fixons comme objectif de pouvoir réaliser la caractérisation visqueuse complète d'un anticorps monoclonal à partir d'une échantillon commercial standard, sans avoir besoin de concentrer la solution au préalable. La concentration maximale des formulations sous-cutanées d'anticorps monoclonaux étant de 150 mg.mL⁻¹, une concentration de 200 mg.mL⁻¹ est un bon objectif.

Les échantillons dilués d'anticorps monoclonaux sont typiquement formulés sous forme de tubes de 100 μL contenant 100 μg de protéines, soit une concentration de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Comme évoqué en introduction, la microfluidique en gouttes permet de générer un grand nombre de compartiments de faible volume, représentant autant de réacteurs indépendants.

L'utilisation de gouttes est également un atout majeur pour la concentration du soluté dans la puce¹³⁷. L'absence d'interface liquide-gaz ou liquide-solide limite la nucléation, et la taille des gouttes, plus précisément leur ratio surface / volume, est un atout majeur pour l'homogénéité du soluté au sein de la goutte, comme nous le verrons en 3.3.

L'utilisation de gouttes est également un avantage pour l'étude des biopharmaceutiques, dont l'adsorption aux interfaces pourrait être une source d'inhomogénéité, ou encore un déclencheur d'agrégation⁷⁹.

Une fois le choix de la microfluidique en goutte arrêté, l'objectif de réduction du volume consommé passe par la capacité à produire les gouttes à la demande, comme nous le verrons en 2.1.

La mesure de viscosité par microrhéologie nécessite que les gouttes soient immobiles dans la puce : les mouvements de translation ou de rotation perturberaient le suivi des traceurs (cf IV). Ainsi, les gouttes doivent être isolées et protégées des éventuels écoulements dans la puce.

Afin d'améliorer les performances et l'ergonomie de notre puce, nous avons enfin souhaité pouvoir sélectionner individuellement des gouttes microfluidiques d'intérêt en vue de leur observation, et ceci pour une raison bien précise : malgré la grande stabilité des traceurs utilisés pour la microrhéologie, il arrive que des agrégats de 2-3 particules soient encapsulés dans une goutte. La présence d'un seul agrégat dans une goutte peut suffire à fausser la mesure de la viscosité de 10-20%. Ces événements rares ne posent pas de problème lors de l'étude de gouttes de grande taille contenant un grand nombre de particules¹⁴⁴, mais dans notre cas nous souhaitons minimiser le nombre de traceurs dans la goutte, tout en limitant au maximum la production de gouttes. La capacité à manipuler les gouttes avec suffisamment de précision pour choisir d'en observer une plutôt qu'une autre a donc été un des objectifs de la conception de notre puce.

Notre système expérimental doit donc permettre la génération et la manipulation de micro-gouttes contenant des solutions aqueuses de protéines. Dans un second temps, les gouttes doivent être rétrécies par un facteur 50-100 au moins, tout en étant suffisamment stabilisées pour permettre la mesure de viscosité par microrhéologie.

Chaque choix de conception tient compte des limitations imposées par les techniques de fabrication des puces microfluidiques. Dans la mesure du possible, nous avons cherché à limiter la technicité de fabrication de la puce, mais nous verrons que certaines de ses caractéristiques imposent une structure tridimensionnelle relativement complexe.

Enfin, pour favoriser son utilisation éventuelle par le plus grand nombre, nous avons essayé de réduire au maximum les équipements et le savoir-faire nécessaires à son utilisation.

1.3 Description générale

(Un schéma légendé de la puce est visible en figure 9)

Le canal principal, situé au centre de la puce, possède deux entrées et une sortie.

Le premier élément de ce canal est un émulsificateur (dropmaker), dont le fonctionnement est décrit plus loin.

L'entrée la plus en amont (à gauche sur la figure 9) est destinée à la phase continue, la seconde à la phase dispersée.

En aval du dropmaker, une première chambre permet le stockage temporaire des gouttes en vue de leur manipulation.

Cette chambre débouche sur le canal à proprement parler. La longueur du canal est de 8000 μm , sa largeur est de 400 μm et sa hauteur varie entre 200 et 300 μm selon les versions de la puce.

En ajustant précisément le débit, les gouttes d'intérêt peuvent être piégées dans les puits cylindriques situés au-dessus du canal d'observation. Ces puits, au nombre de sept, ont un diamètre de 300 μm et une profondeur équivalente.

En aval du canal, une seconde chambre d'observation facilite l'ajustement du débit et la manipulation des gouttes.

Le second élément de la puce est un canal latéral de 500 μm de largeur et de 500-600 μm de hauteur, destiné au passage de l'air. Ce canal entoure quasiment toute le canal principal avec un resserrement au

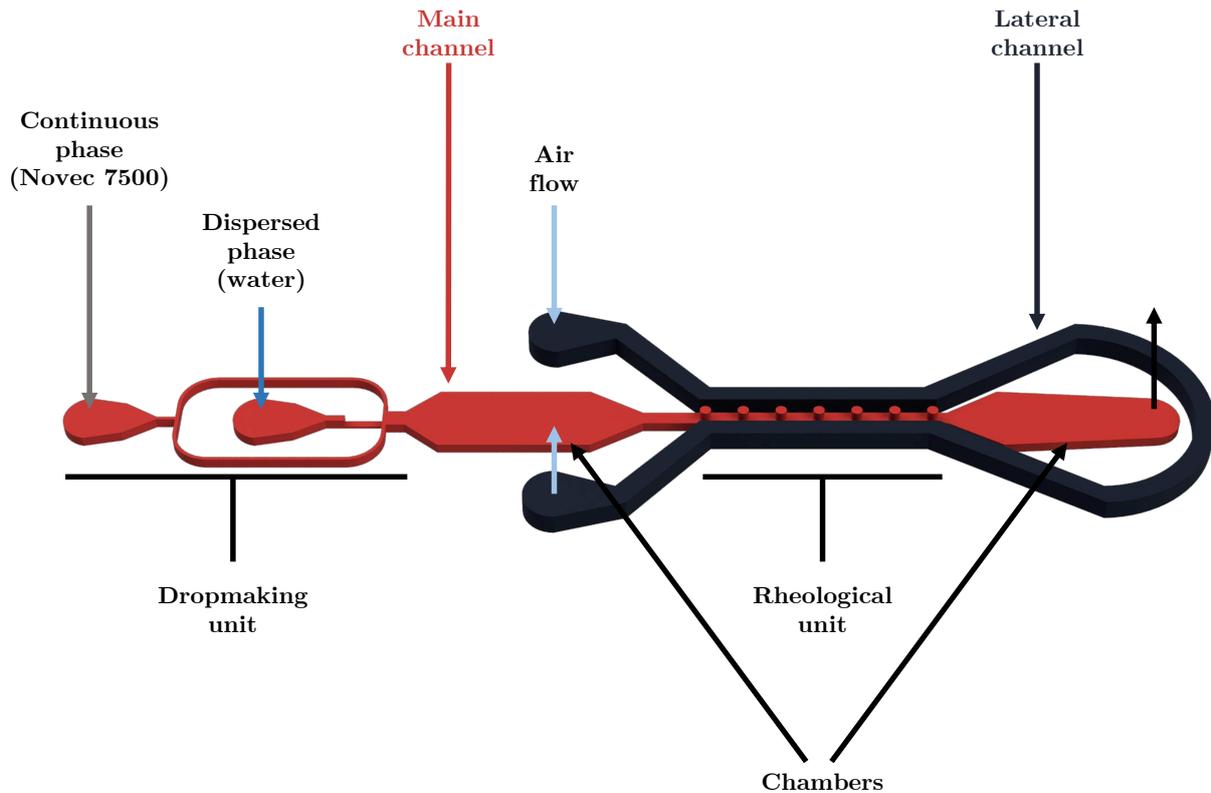


FIG. 9 – Représentation en perspective de la puce. La section la plus en amont de la puce (à gauche) est un émulsificateur, avec une entrée de phase continue (huile fluorée) et une entrée de phase dispersée (solution aqueuse). Des puits cylindriques situés au-dessus du canal central permettent le piégeage et l'observation des gouttes. En amont et en aval du canal central, deux chambres de stockage facilitent la manipulation des gouttes. L'épaisseur réduite entre le canal latéral et le canal central au niveau des puits permet à l'eau de pénétrer à travers le PDMS, entraînant le rétrécissement des gouttes.
Barre d'échelle : 5000 μm

niveau du canal d'observation, duquel il est séparé par une distance de 200 μm de part-et-d'autre. Cette faible épaisseur de PDMS agit comme une membrane semi-perméable permettant la pervaporation de l'eau.

Décrire la puce d'amont en aval revient à décrire la chronologie d'une expérience : l'échantillon est encapsulé dans des gouttes, lesquelles sont triées dans la première chambre. Les gouttes d'intérêt sont chargées dans les puits, permettant ainsi la mesure de la viscosité pendant que le passage de l'air dans le canal latéral entraîne un rétrécissement des gouttes par pervaporation.

Au cours de ce chapitre, nous présenterons les phénomènes physiques à l'oeuvre dans chacune de ces étapes, et l'adéquation de l'architecture et du dimensionnement de la puce à nos objectifs expérimentaux.

Chapitre 2

Production et manipulation de micro-gouttes

2.1 Émulsification

Le premier élément de notre puce microfluidique est un dropmaker intégré (cf figure 11). Produire les émulsions microfluidiques *in-situ* ajoute à la complexité de la puce et de sa micro-fabrication (cf chapitre 4), mais offre des avantages en terme de réduction du volume d'échantillon nécessaire et de précision de la mesure (cf 1.1).

La production de micro-gouttes nécessite une déformation suffisante de la phase dispersée pour permettre son émulsification.

L'émulsification résulte d'une compétition entre plusieurs forces hydrodynamiques¹⁴⁵ :

- la déformation de l'interface entre les deux phases causée par les contraintes locales de cisaillement
- la pression capillaire, qui cherche à minimiser la surface de l'interface, et donc s'oppose aux effets précédents
- d'éventuels effets inertiels liés à l'écoulement

Différents designs de puces microfluidiques permettent une émulsification passive, uniquement causée par les flux de différentes phases au sein de la puce.

2.1.1 Émulsification par flux

La grande majorité des dropmakers utilisent l'émulsification par flux, (flow-emulsification). Les deux phases non-miscibles se rencontrent, et la déformation de l'écoulement de phase dispersée induite par l'écoulement de la phase continue aboutit à la formation de gouttes. C'est la géométrie de la puce ainsi que les caractéristiques des écoulements (flux, densité, viscosité, etc) qui définissent la fréquence de formation et la taille des gouttes. Trois géométries, illustrées en figure 10, composent la grande majorité des flow-emulsificators utilisés¹⁴⁶ :

- co-flow : les deux phases sont injectées via des microcanaux co-axiaux. Selon le ratio de leur débits respectifs, le jet de phase continu peut être suffisamment déstabilisé pour aboutir à la formation d'un train de gouttes. Cette géométrie est plébiscitée pour les dropmakers en capillaires de verre, mais est beaucoup plus difficile à obtenir pour des puces en PDMS.
- cross-flow : les deux écoulements se rencontrent non plus de manière coaxiale, mais avec un angle (le plus souvent de 90°).
- flow-focusing : l'écoulement de phase continue vient pincer l'écoulement de phase dispersée.

Ces géométries sont éprouvées, elle ont l'avantage d'être relativement simples à fabriquer et à utiliser : les puces de flow-focusing en PDMS sont parmi les plus répandues, et dans le cas d'une géométrie co-flow deux capillaires en verre et deux pousses-seringues permettent d'obtenir un dropmaker fonctionnel. Certaines puces fonctionnent même par imposition du débit de sortie, ce qui permet de remplacer les pousses-seringues par une micro-pipette¹⁴⁷.

Ces dropmakers fonctionnent avec des écoulements continus : les gouttes sont produites à des fréquences allant jusqu'à 1 kHz. Comme évoqué précédemment, les caractéristiques de l'émulsion dépendent certes de la géométrie et des dimensions de la puce ainsi que de la viscosité des fluides, mais également des

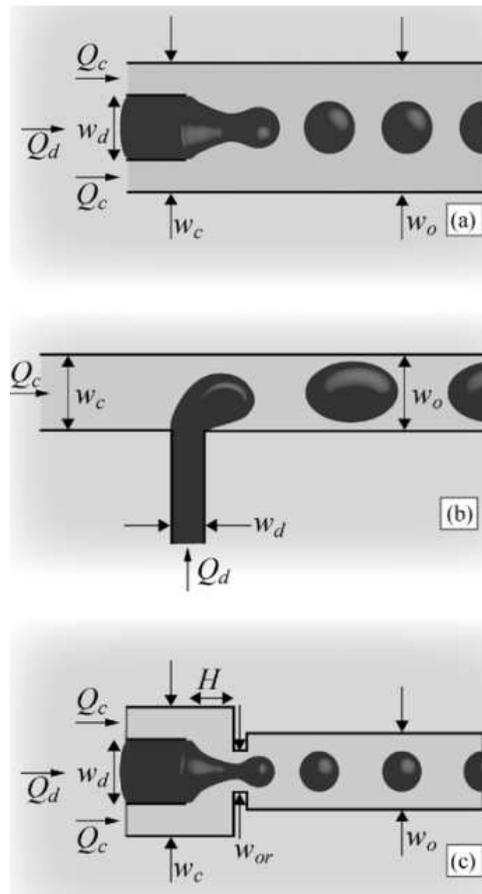


FIG. 10 – Principales géométries microfluidiques pour l'émulsification par flux.

(a) Co-flow (b) Cross-flow (c) Flow-focusing

La phase dispersée est représentée en gris sombre, et la phase continue en gris clair.

Figure par G. F. Christopher et S. L. Anna¹⁴⁶

débits des phases dispersées et continues.

Lors du processus d'émulsification, on observe des phases transitoires, liées à l'inertie du circuit microfluidiques et des composants d'alimentation (pousse-seringue ou contrôleur de pression), durant lesquelles les flux ne sont pas constants.

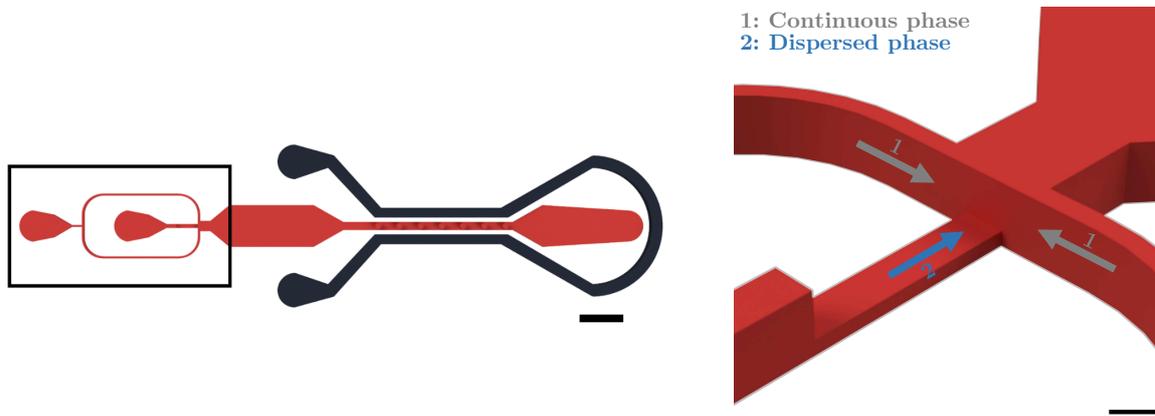
Il faut donc attendre d'atteindre un régime d'équilibre pour deux débits, celui de la phase continue et celui de la phase dispersée, pour que l'émulsion obtenue soit conforme aux attentes expérimentales.

Expérimentalement, l'émulsification par flux est plus indiquée pour la production de gouttes en continu¹⁴⁶, mais beaucoup moins pour la génération ponctuelle d'un nombre réduit de gouttes monodisperses..

2.1.2 Émulsification par gradient de confinement

La technique d'émulsification par gradient de confinement (step-emulsification) utilise des géométries de confinement variable pour produire des gouttes. La dispersion de l'émulsion n'est plus causée par l'écoulement de la phase continue, mais par un gradient de pression capillaire lié à la courbure de l'interface phase dispersée-phase continue¹⁴⁸. Il a été montré expérimentalement qu'en dessous d'un débit limite d'écoulement de phase dispersée, la taille des gouttes produites ne dépend que de la géométrie des micro-canaux^{149,150}. On produit donc des émulsions monodisperses indépendamment des débits imposés. Cette caractéristique, ainsi que la géométrie des émulsificateurs, est principalement exploitée pour permettre la production de volumes importants de gouttes monodisperses, via la parallélisation des dropmakers¹⁵¹.

Dans notre cas, on cherche à limiter au maximum la consommation de phase dispersée, et donc le nombre de gouttes produites.



(a) Vue de dessus de la puce. La section correspondant à l'émulsificateur est encadrée en noir. Barre d'échelle : 2000 μm
 (b) Vue en perspective latérale de l'émulsificateur. Barre d'échelle : 400 μm

FIG. 11 – La première section de la puce est un émulsificateur permettant de produire des micro-gouttes. L'écoulement de phase dispersée (2) traverse une section de hauteur réduite avant de déboucher sur une chambre remplie de phase continue. Le gradient de confinement aboutit à la formation de gouttes. L'écoulement de phase continue (1) permet de séparer les gouttes.

Pour ce faire, la phase continue et la phase dispersée sont injectées à très faible débit ($10 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ et $5 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivement). En coupant les flux dès l'apparition des premières goutte, il est possible d'obtenir une salve d'une dizaine de gouttes monodisperses (cf figure 12).

Nous mettons ainsi à profit les caractéristiques de l'émulsification par gradient de confinement : Ce n'est pas l'écoulement de phase continue qui impose les contraintes à l'origine de la formation des gouttes, mais le gradient de confinement.

Ainsi, contrairement à l'émulsification par flux, la taille des gouttes ne dépend pas du débit de phase continue. Il n'est donc pas nécessaire d'atteindre un régime d'équilibre entre les deux phases pour obtenir des gouttes monodisperses.

L'écoulement de phase continue ne sert qu'à séparer les gouttes après leur formation, facilitant ainsi leur manipulation ultérieure.

Le régime d'écoulement de phase dispersée se situe en-dessous du débit limite évoqué précédemment. Ainsi, la salve de gouttes obtenues est monodisperse, et leur taille ne dépend que des dimensions du dropmaker, comme nous le verrons dans la section suivante.

Cette faible production de gouttes permet de réduire grandement le volume d'échantillon nécessaire à la réalisation d'une expérience.

Selon le système d'injection utilisé, ce volume est de 1-10 μL .

2.1.3 Dimensionnement

Le canal d'entrée de la phase dispersée est un canal rectangulaire de dimensions $h \times w$. Pour notre design, la largeur du canal est fixée à $w = 200 \mu\text{m}$, et sa hauteur varie en fonction de l'épaisseur des couches de SU-8 (cf 4.2).

Sur une longueur $L = 1000 \mu\text{m}$ précédant la jonction avec les canaux d'entrée de la phase continue, la hauteur du canal phase dispersée est réduite, avec une hauteur $h_s = h/4$. En sortie, à la jonction avec les canaux phase continue, le canal retrouve sa hauteur initiale h et s'élargit, avec une largeur de $500 \mu\text{m}$. Ces dimensions sont reportées en figure 13.

Cette portion de longueur L à hauteur réduite constitue le step de notre step-dropmaker. C'est à sa sortie que, en changeant le confinement imposé à la phase dispersée, on va disperser la phase aqueuse et former des gouttes.

Des expérimentations et modélisations précédemment réalisées permettent d'estimer le diamètre d des

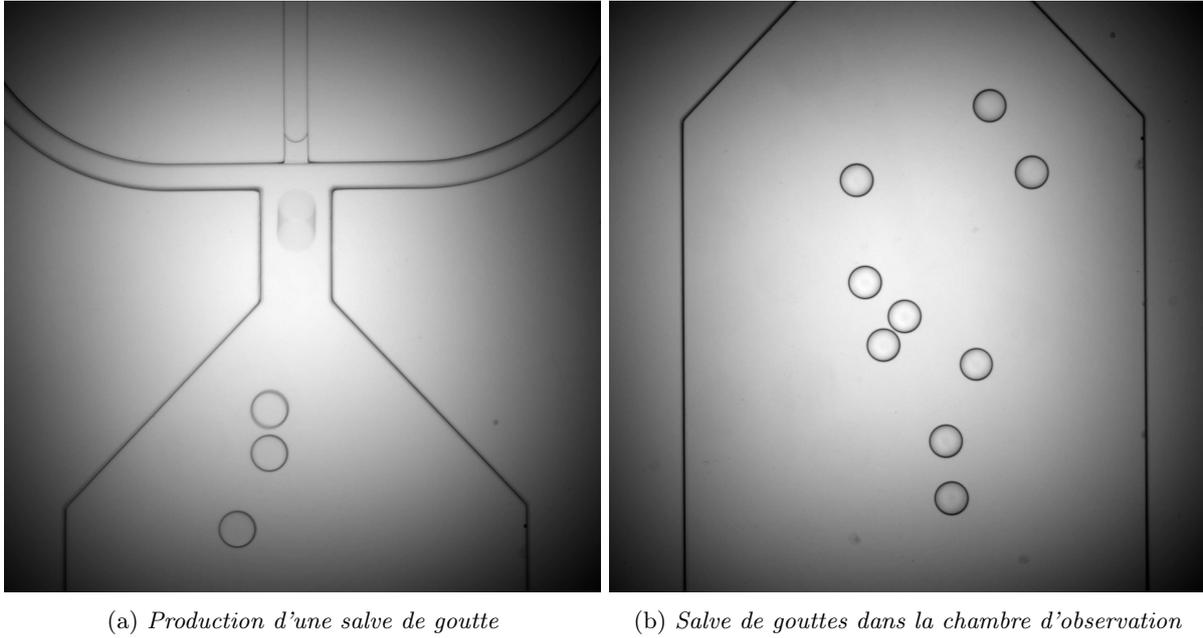


FIG. 12 – L'utilisation d'un step-dropmaker permet de limiter la consommation d'échantillon. Les gouttes imagées font $\approx 150 \mu\text{m}$ de diamètre. Ces images ont été réalisées avec une ancienne version de la puce, la largeur w du gradient de confinement est ici de $100 \mu\text{m}$.

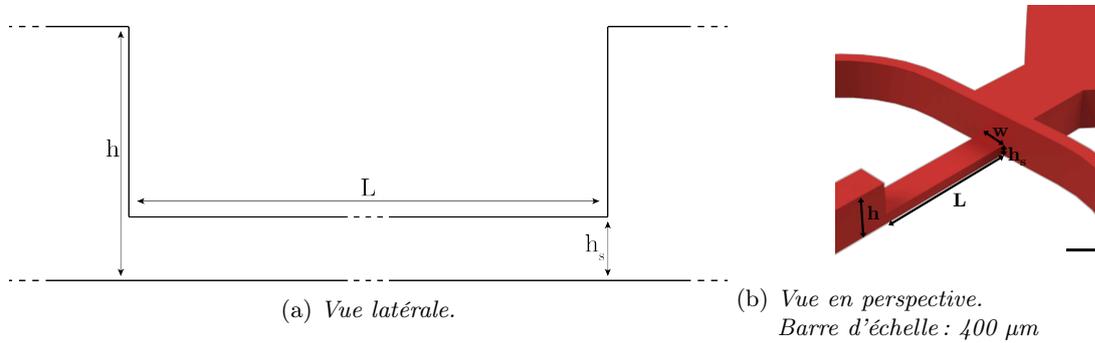


FIG. 13 – Dimensions de l'émulsificateur à gradient de confinement. Le diamètre des gouttes dépend principalement de la hauteur h_s du canal de confinement, et marginalement de sa largeur w .

gouttes ainsi formées au moyen de formules semi-empiriques.

A faible débit, le diamètre des gouttes est défini par¹²² :

$$d \approx h_s \left(3.9 + 0.05 \frac{w}{h_s} \right) \quad (\text{II.1})$$

Hormis une influence relativement faible de la largeur w , le diamètre des gouttes produites ne dépend donc que de la hauteur du step h_s .

Nous avons fait le choix de placer le gradient de confinement selon l'axe \vec{z} (cf figures 11b et 13b). Ainsi, la hauteur h_s est imposée par l'épaisseur des couches de résine, et non par les dimensions du masque d'exposition de la puce (cf 4). En fonction des besoins, il nous est donc possible d'ajuster la hauteur du step pour produire des gouttes de diamètre varié.

Nous avons expérimenté des hauteurs h_s entre 30 et $60 \mu\text{m}$, ce qui équivaut à des gouttes entre 120 et $240 \mu\text{m}$ de diamètre environ.

2.2 Sélection & stabilisation des gouttes

2.2.1 Pièges à gouttes

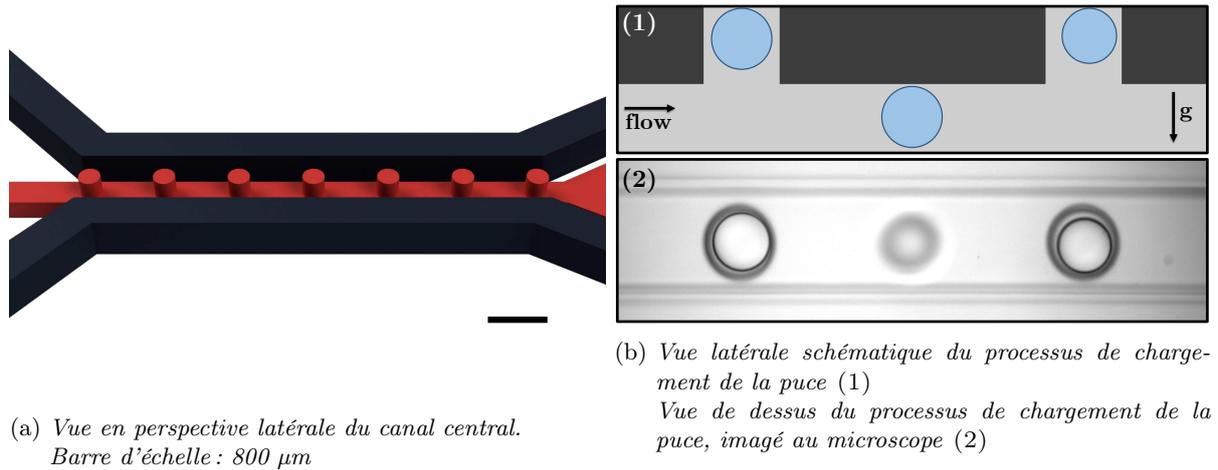


FIG. 14 – Les puits cylindriques situés au-dessus du canal central permettent le piégeage des gouttes. Les gouttes d'eau étant moins denses que la phase continue ($\Delta\rho = 614 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$), une goutte située en dessous d'un puits va avoir tendance à y entrer. Les puits sont séparés d'une distance importante (1000 μm) pour permettre une sélection précise des gouttes.

Pour pouvoir être observées dans les meilleures conditions, les gouttes d'intérêt sont piégées dans des puits cylindriques situés au-dessus du canal principal (cf figure 14a).

La phase continue (huile fluorée) a une densité supérieure à celle de l'eau ($d=1.614$ pour le Novec 7500). Par conséquent, les gouttes d'eau flottent donc en permanence vers le haut, et sont en temps normal tangentielles à la paroi supérieure de la puce.

Lorsqu'une goutte se retrouve immédiatement en dessous d'un puits de stockage, elle va avoir tendance à flotter vers le fond du puits, et ainsi se retrouver piégée (cf figure 14b).

Le piégeage de la goutte de la goutte n'est pas immédiat : lors de son ascension, la goutte en mouvement subit une force de traînée causée par l'écoulement de phase continue autour d'elle.

Expérimentalement, on constate l'existence d'une vitesse limite d'écoulement au-delà de laquelle le piégeage des gouttes n'est pas possible.

Rappelons que l'objectif est de piéger sélectivement des gouttes d'intérêt. L'idée est donc de manipuler les gouttes avec précision, afin que les gouttes d'intérêt soient amenées sous les puits avec une vitesse suffisamment faible pour être piégées et que les autres gouttes traversent le canal suffisamment rapidement pour ne pas être piégées.

Le déplacement des gouttes est causé par l'écoulement de phase continue dans la puce. La précision de leur manipulation dépend donc de la précision avec laquelle on peut contrôler cet écoulement.

Nous avons constaté que la précision des dispositifs habituels (contrôleur de pression microfluidique ou pousse-seringue) n'était pas suffisante pour réaliser ce piégeage sélectif de manière satisfaisante, nous amenant à développer un autre dispositif de contrôle du débit.

Dans la suite de ce chapitre, nous réaliserons une estimation en ordre de grandeur de la vitesse limite de piégeage v_{lim} , Dans un second temps, nous comparerons les vitesses minimales d'écoulement atteignables par les systèmes de contrôle à notre disposition.

Modélisation du piégeage des gouttes

Considérons une goutte de rayon R quelconque située dans le canal principal de largeur w et de hauteur $h < w$. La goutte se situe immédiatement en dessous d'un puits cylindrique de profondeur h_p et de diamètre d_p (cf figure 15).

Entraînée par l'écoulement de phase continue, la goutte est animée d'une vitesse horizontale \vec{v}_x . Lorsque la goutte est sous le puits, il s'y ajoute une composante verticale \vec{v}_z correspondant à son ascension.

On modélise simplement le processus de piégeage en considérant que la goutte reste bloquée dans le puits si elle a le temps d'y entrer à moitié pendant qu'elle se trouve intégralement en dessous.

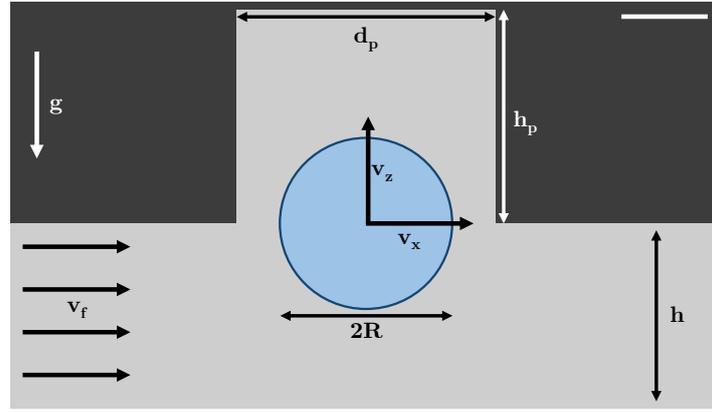


FIG. 15 – Ascension d’une goutte dans un puits.

La composante verticale de la vitesse de la goutte (\vec{v}_z) est assimilée à sa vitesse de sédimentation. La composante horizontale (\vec{v}_x) est assimilée à la vitesse de l’écoulement dans le canal principal (\vec{v}_f). En considérant la goutte doit monter au moins à moitié dans le puits (distance $\Delta z = R$) pour être piégée, et ce pendant le temps où elle se situe intégralement sous le puits, on peut aboutir à une estimation de la vitesse limite de piégeage.

Barre d’échelle : 100 μm .

Cette condition s’exprime selon :

$$\frac{R}{v_z} \leq \frac{d_p - 2R}{v_x} \quad (\text{II.2})$$

Toujours dans un raisonnement en ordre de grandeur, on néglige l’influence des parois de la puce. On considère que la vitesse de la goutte est égale à celle de la phase continue, et que cette dernière est uniforme en tout point de l’écoulement. On assimile la vitesse ascensionnelle de la goutte à sa vitesse de Stokes, soit sa vitesse de sédimentation à l’équilibre dans un fluide infini. Ainsi :

$$v_x = v_f \quad (\text{II.3})$$

$$v_z = \frac{2R^2 \Delta \rho g}{9\eta} \quad (\text{II.4})$$

Avec $\Delta \rho$ la différence de masse volumique entre les phases continues et dispersées, η la viscosité de la phase continue et g l’intensité de la pesanteur.

En considérant les valeurs numériques rappelées au tableau 1, la relation (II.2) nous permet alors d’estimer une vitesse d’écoulement limite au-dessus de laquelle le piégeage n’est pas possible :

$$v_f^{lim} = \frac{2R^3 \Delta \rho g}{9(d_p - 2R)\eta} \quad (\text{II.5})$$

$$v_f^{lim} \approx 10 \text{ mm.s}^{-1} \quad (\text{II.6})$$

2.2.2 Contrôle des écoulements

Comme vu précédemment (cf partie 2.2.1), le piégeage des gouttes n’est efficace et sélectif que si l’on est capable de faire varier précisément la vitesse d’écoulement dans le canal principal en-dessous et au dessus de la valeur limite v_f^{lim} .

L’écoulement dans la puce, quantifié par le débit volumique Q , est causée par la différence de pression ΔP entre l’entrée du circuit fluide et sa sortie.

On peut faire l’analogie entre notre circuit fluide et un circuit électrique. Dans ce cas, ΔP peut être comparé à la tension électrique et Q à l’intensité du courant.

Similairement à la loi d’Ohm, on appelle résistance hydrodynamique le coefficient de proportionnalité entre ces deux valeurs à l’équilibre, selon :

$$Q = \frac{\Delta P}{R_h} \quad (\text{II.7})$$

La résistance hydrodynamique dépend de la géométrie de l’écoulement et de la viscosité du fluide.

Le débit dans la puce est généralement imposé par des dispositifs de contrôle extérieurs (pousse-seringue ou contrôleur de pression).

Expérimentalement, nous avons observé que la précision de ces dispositifs n'est pas suffisante pour piéger les gouttes de manière efficace, nous amenant à développer un nouveau dispositif de contrôle du débit basé sur l'équilibre gravitationnel.

Dans la suite de cette partie, nous estimerons le débit minimum imposable par chacun de ces dispositifs, et nous détaillerons les caractéristiques les rendant indiqués ou non pour la manipulation et le piégeage de micro-gouttes.

Contrôle du débit

L'utilisation d'un pousse-seringue revient à imposer un débit volumique d'entrée Q^{min} . Dans notre cas, le débit minimum imposable est $Q_{ps}^{min} \approx 20 \text{ nL.s}^{-1}$.

A l'équilibre, le débit dans le canal central de la puce est égal à Q^{min} . En supposant la vitesse de l'écoulement, constante sur toute la section du canal, on peut alors estimer la vitesse minimale imposable par notre pousse-seringue :

$$v^{min} = \frac{Q^{min}}{hw} \quad (\text{II.8})$$

$$v_{ps}^{min} \approx 250 \mu\text{m.s}^{-1} \quad (\text{II.9})$$

Le pousse-seringue offre théoriquement une précision largement suffisante pour réaliser le piégeage des gouttes.

Cependant, nous avons constaté expérimentalement que l'inertie d'un tel système entraîne un latence trop importante entre la commande et l'établissement de l'écoulement.

Contrôle de la différence de pression

Le contrôle de la différence de pression ΔP permet de limiter le temps de réponse du circuit, permettant un contrôle plus précis des écoulements et donc des gouttes.

Nous disposons d'un contrôleur de pression microfluidique. Muni d'un compresseur, il possède une précision théorique de 1 mbar.

Nous avons également mis en oeuvre un système de contrôle gravitationnel du flux dans la puce, permettant d'imposer une différence de pression liée à la différence de hauteur entre deux niveaux de phase continue.

Durant la phase de production de gouttes, la phase continue est injectée dans la puce au moyen d'un pousse-seringue. Une fois les micro-gouttes obtenues, une valve permet de connecter l'entrée de la puce à un réservoir de phase continue similaire au réservoir de sortie de la puce (cf figure 16).

Selon le principe des vases communicants, un flux va se former entre les deux réservoirs ainsi connectés, tendant à équilibrer la pression hydrostatique de chaque côté.

Le réservoir d'entrée est monté sur un bras articulé, permettant un réglage instantané de sa hauteur et donc un contrôle précis du flux.

Pour estimer le débit minimum imposable par chacun de ces dispositifs, il nous faut calculer la valeur de R_h définie en (II.7).

Pour ce faire, on réduit la puce à son seul canal central, donc les dimensions sont rappelées dans le tableau 1. Cette approximation revient à négliger les résistances hydrodynamiques des autres éléments de la puce et du circuit, ce qui revient in fine à surestimer le débit dans la puce. Ce qui nous intéresse, c'est certes la comparaison de l'estimation du débit avec v_f^{lim} (déjà le résultat d'une estimation en ordre de grandeur), mais surtout la comparaison entre la précision d'un contrôleur de pression et celle du dispositif d'équilibre gravitationnel. Pour cette comparaison, l'approximation du circuit au canal central de la puce n'a aucune influence.

Dans le cas d'une conduite cylindrique, la loi de Poiseuille fournit une expression analytique du débit volumique en fonction de la différence de pression. Pour une conduite rectangulaire, le débit s'exprime

par une décomposition en série de Fourier¹⁵² :

$$Q = \frac{h^3 w \Delta P}{12 \eta L} \left[1 - \frac{192 h}{\pi^5 w} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \right] \quad (\text{II.10})$$

Notre contrôleur de pression a une précision théorique de 1 mbar, soit 100 Pa. Pour cette différence de pression, les relations (II.10) et (II.8) nous donnent :

$$Q_{cp}^{min} \approx 1840 \text{ nL.s}^{-1} \quad (\text{II.11})$$

$$v_{cp}^{min} \approx 23 \text{ mm.s}^{-1} \quad (\text{II.12})$$

Cette valeur est supérieure à l'estimation de v_{lim} proposée en (II.6). Si notre raisonnement tend certainement à surestimer le débit réel, soulignons également que la précision du contrôleur de pression ne correspond pas à la valeur minimale imposable. Cette dernière n'est pas rendue publique par le constructeur, mais on l'estime vers 5-10 mbar. Quoi qu'il en soit, le contrôleur de pression ne permet pas une manipulation suffisamment précise des gouttes.

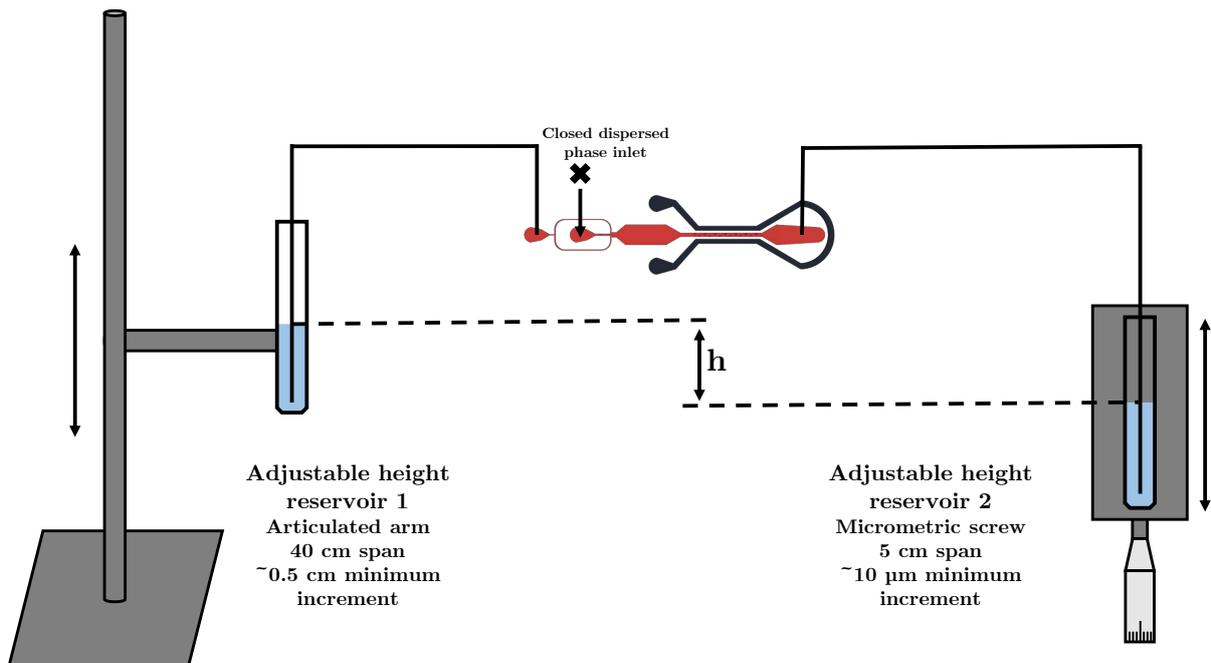


FIG. 16 – Schéma du dispositif d'ajustement gravitationnel du débit. Une fois l'entrée de phase dispersée fermée, l'ajustement de la différence de hauteur h entre les réservoirs d'entrée et de sortie permet de contrôler l'écoulement dans la puce. Schéma sans échelle.

Considérons à présent le cas d'un contrôle gravitationnel du débit. La différence de pression entre l'entrée et la sortie de la puce est alors définie par l'équation fondamentale de l'hydrostatique :

$$\Delta P = \rho g h \quad (\text{II.13})$$

Avec ρ la masse volumique de la phase continue, g l'intensité de la pesanteur et h la différence d'altitude entre les niveaux de phase continue dans chacun des réservoirs.

Le réservoir de sortie est monté sur une vis micrométrique, permettant de régler cette différence de hauteur avec une précision de $h^{min} = 10 \mu\text{m}$. En utilisant les relations (II.13), (II.10) et (II.8), on peut calculer la vitesse d'écoulement minimale imposable par ce dispositif :

$$\Delta P_{cg}^{min} \approx 160 \text{ mPa} \quad (\text{II.14})$$

$$Q_{cg}^{min} \approx 3 \text{ nL.s}^{-1} \quad (\text{II.15})$$

$$v_{cg}^{min} \approx 40 \mu\text{m.s}^{-1} \quad (\text{II.16})$$

Le réservoir d'entrée est monté sur un bras articulé permettant de régler rapidement la différence de hauteur avec une amplitude de 40 cm, soit $h \in [-20\text{cm}, 20\text{cm}]$.

$$\Delta P_{cg}^{max} \approx \pm 3 \text{ kPa} \quad (\text{II.17})$$

$$Q_{cg}^{max} \approx \pm 58 \mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{II.18})$$

$$v_{cg}^{max} \approx \pm 0.72 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{II.19})$$

Au moyen d'une modélisation simple, on a vérifié que le dispositif de contrôle gravitationnel permet d'imposer une différence de pression avec une précision bien plus importante qu'un contrôleur de pression, correspondant à un débit a priori suffisamment faible pour permettre le piégeage des gouttes.

Variable	Symbole	Valeur retenue
Rayon de la goutte	R	100 μm
Diamètre du puits	d_p	300 μm
Largeur du canal	w_c	400 μm
Hauteur du canal	h_c	200 μm
Longueur du canal	L	8 mm
Viscosité Novec 7500	η	1.2 mPa.s
Masse volumique Novec 7500	ρ_1	1614 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Masse volumique de l'eau	ρ_2	1000 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Différence de masse volumique	$\Delta\rho$	614 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Intensité de la pesanteur	g	9.81 $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

TAB. 1 – Valeurs numériques retenues pour la modélisation des écoulements dans la puce et du piégeage des gouttes.

2.2.3 Équilibre des flux résiduels

Outre la sélection et le stockage des gouttes, les puits cylindriques permettent d'isoler la goutte de l'écoulement dans le canal principal.

L'objectif de notre puce est la caractérisation visqueuse des gouttes, réalisée par suivi vidéo de traceurs (cf partie IV). Pour ce faire, il est indispensable que la goutte soit immobile, non seulement par translation mais également par rotation. Les premières tentatives, consistant à immobiliser les gouttes par confinement latéral, ont été mises en échec par la rotation de la goutte induite par les flux résiduels présents dans la puce.

Pour notre problème, un défi supplémentaire est posé par le rétrécissement des gouttes. Il impose que la capacité d'immobilisation des gouttes soit indépendante de leur taille, limitant l'efficacité des systèmes de stockage bi-dimensionnel de gouttes¹⁵³.

Malgré la protection offerte par les puits cylindriques, au-delà d'un certain débit l'écoulement dans le canal principal entraîne la rotation des gouttes sur elles-mêmes.

Une fois les puits chargés, il faut donc limiter au maximum les flux résiduels au sein de la goutte pour maximiser la précision de la mesure de la viscosité.

Le dispositif de contrôle gravitationnel permet également de limiter au maximum ces flux, en ajustant la différence de hauteur entre les deux réservoirs à l'aide de la vis micrométrique.

Le montage expérimental final (visible en figure 17) combine l'utilisation de pousses-seringues et du dispositif de contrôle gravitationnel du débit précédemment cité.

L'utilisation des pousses seringues est pour nous une solution de confort : ils permettent d'imposer des débits suffisamment faible permettant l'émulsification des gouttes tout en limitant au maximum la consommation d'échantillon.

Cependant, il est tout à fait envisageable de se passer de pousses-seringues et de n'utiliser que le contrôle gravitationnel. On pourrait imaginer prélever un faible volume d'échantillon, l'injecter dans la puce et produire les micro-gouttes en ne jouant que sur la différence de hauteurs entre divers réservoirs.

Il est donc possible d'utiliser notre puce microfluidique sans équipement autres qu'un microscope.

Avec une telle précision et relative simplicité d'utilisation, pourquoi le contrôle gravitationnel des équipements n'est pas une technique standard en microfluidique ? Reprenons la relation (II.13) : à l'origine

de la différence de pression imposant l'écoulement, il y a la différence de hauteur entre les niveaux des deux réservoirs. A mesure de l'écoulement, le réservoir d'entrée va se vider, celui de sortie va se remplir, et leurs niveaux vont avoir tendance à s'équilibrer. La différence de pression, et donc l'écoulement, n'est donc pas stable dans le temps.

Dans notre cas, la quantité minimale de volume passant d'un réservoir à l'autre lors de la production des gouttes permet de négliger cette variation. Dans la suite de l'expérience, l'équilibre gravitationnel est utilisé pour annuler le débit. Le volume transitant par la puce est donc quasi-nul.

Le contrôle gravitationnel de l'écoulement ne permet donc pas de travailler avec des débits importants, mais est particulièrement adapté à notre application, où les volumes transitant par la puce sont infimes.

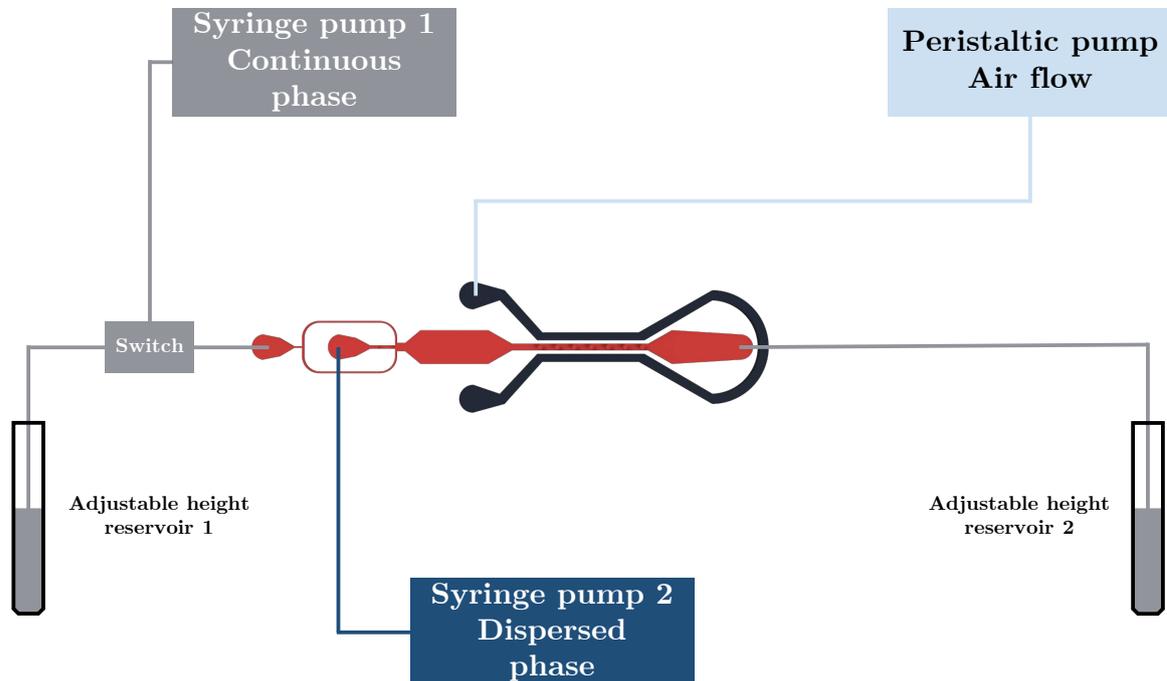


FIG. 17 – Dispositif expérimental microfluidique. Un pousse-seringue à deux canaux (Nemesys Dossiermodul 14:1, Cetoni GmbH) permet l'injection de la phase continue et de la phase dispersée. L'action d'une valve 3-voies (Stopcock 3-way, Masterflex) permet de relier la première entrée de la puce à un réservoir de phase continue (15 mL conical centrifuge tube, Falcon™), placé sur un bras articulé. La sortie de la puce est connectée à un réservoir similaire, monté sur une vis micrométrique (BM11.25, Newport). Une pompe péristaltique (Sci-Q 323, Watson Marlow) permet de générer un flux d'air dans le canal latéral de la puce. L'intégralité des connexions entre les différents éléments du montage est réalisée avec des tubes en PTFE souples de diamètre interne 1.06 mm et de diamètre externe 1.68 mm (TX/Fluor, Adtech Polymer Engineering Ltd). Schéma sans échelle.

Chapitre 3

Concentration des solutés par rétrécissement des gouttes

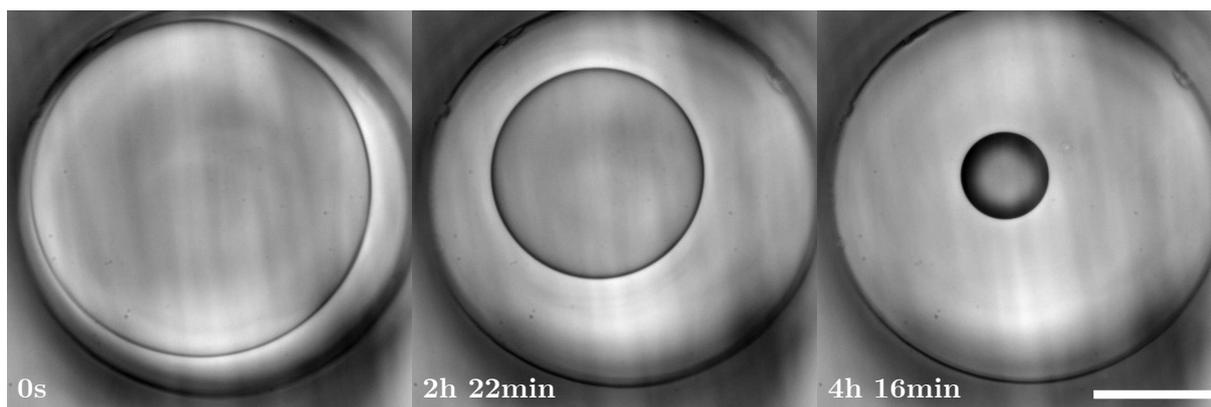


FIG. 18 – Images au microscope $\times 40$ du rétrécissement d'une goutte microfluidique au sein d'un puits cylindrique, à différents stades. Le rétrécissement de la goutte entraîne une concentration du soluté en son sein.
Barre d'échelle : $100\ \mu\text{m}$

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons le phénomène de pervaporation, permettant la perméation de l'eau à travers la membrane de PDMS séparant les deux canaux de la puce. Cette perméation entraîne une diminution de la quantité d'eau présente dans les gouttes, et donc une diminution de leur volume entraînant une concentration du soluté.

La capacité de modifier la concentration du soluté au sein de la puce présente un double avantage. Le premier, c'est une réduction considérable de la quantité de soluté nécessaire à la réalisation de l'expérience.

Dans notre cas, le rayon initial maximal pour les gouttes est de $150\ \mu\text{m}$. Le rayon final ne dépend que du soluté : une goutte d'eau pure peut disparaître complètement, pour une goutte d'eau salée on obtiendra un cristal de sel, etc. Cependant, nous avons constaté expérimentalement (cf partie V) qu'en dessous de $20\ \mu\text{m}$ la mesure de la viscosité est compromise. De $150\ \mu\text{m}$ à $20\ \mu\text{m}$, on peut concentrer le soluté par un facteur 420 environ.

En ordre de grandeur, ce sont donc quasiment trois décades de concentration qui sont explorables en une seule expérience. Ainsi, on réduit de plusieurs dizaines le nombre d'expérience nécessaire.

Ce facteur pourrait encore être augmenté avec un redimensionnement de la puce : dans les conditions expérimentales actuelles, notre technique de mesure du volume impose un rayon maximum de $290\ \mu\text{m}$ pour les gouttes (cf III.1.3), qui produirait un facteur de concentration supérieur à 3000. Cependant, la densité de particules présente dans la goutte limite la plage de volumes explorable avec une bonne mesure de la viscosité (cf IV.3 et VII.3).

Plus intéressant encore, la concentration du soluté dans la puce permet de travailler avec des solutions

initialement diluées, ce qui limite encore la quantité consommée et permet surtout d'éliminer les étapes d'ultracentrifugation nécessaires à l'obtention de solutions concentrées de biopharmaceutiques.

Le flux de perméation de l'eau, et donc la vitesse de rétrécissement des gouttes, a une double influence sur la précision de la mesure de viscosité. La mesure de la viscosité n'est pas instantanée : chaque mesure se fait à partir d'un timelapse de 100 secondes. Cette durée doit être négligeable devant la durée de rétrécissement, pour éviter de trop grandes variations de la viscosité pendant la mesure. De manière générale, une plus grande durée de rétrécissement permet de réaliser un plus grand nombre de mesures et d'avoir plus de données.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous verrons qu'un autre phénomène limite la vitesse de rétrécissement. En effet, la perméation de l'eau hors des gouttes peut induire des inhomogénéités dans la goutte, perturbant la mesure de la viscosité.

3.1 Pervaporation de l'eau

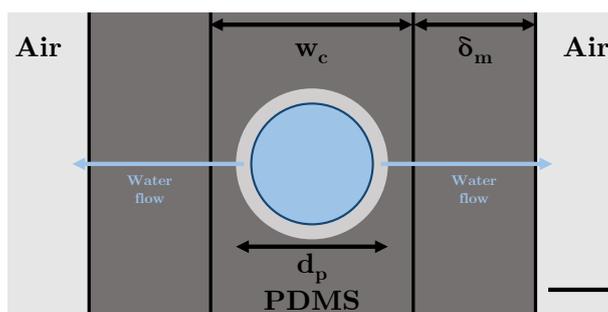


FIG. 19 – Représentation schématique de la perméation de l'eau au sein de la puce, vue de dessus. La goutte est piégée dans un puits cylindrique rempli de phase continue. L'eau s'évapore à travers la membrane de PDMS jusqu'au canal latéral rempli d'air. Barre d'échelle : 100 μm

Pour caractériser le phénomène de transfert de l'eau hors des gouttes et vers le canal latéral nous avons employé le terme générique de perméation, qui désigne le transfert de masse à travers un solide, pouvant être causé par divers phénomènes¹¹³.

Plus précisément, il s'agit ici de pervaporation : l'eau se solubilise dans le PDMS, avant de diffuser à travers et de s'évaporer dans le canal latéral. Le moteur de la perméation est ici le gradient de concentration de l'eau.

La membrane séparant les deux canaux, comme le reste de la puce, est composée de PDMS réticulé. Il s'agit donc d'un réseau tridimensionnel de chaînes polymères, dont les propriétés dépendent des composants utilisés et de leurs proportions.

Le PDMS est donc un composé partiellement perméable, certains composés pouvant diffuser à travers le réseau¹⁵⁴.

Pour chacun des composés utilisés lors de nos expériences (sucrose, protéines, sels, tampons organiques), la perméation du soluté à travers le PDMS est négligeable devant celle de l'eau¹³¹.

Nous avons constaté expérimentalement que la vitesse moyenne de rétrécissement des gouttes était proportionnelle à l'épaisseur de PDMS séparant le bord du puits de la goutte.

Compte-tenu de la géométrie de notre puce, il n'existe pas de solution analytique simple au problème de la diffusion de l'eau. Nous présentons ci-dessus une modélisation unidimensionnelle¹¹³ de la pervaporation de l'eau, en considérant une membrane de PDMS séparant l'eau pure de l'air ambiant. Cette modélisation est particulièrement adaptée dans le cas de gouttes confinées^{108,113,139}.

Rappelons dans notre puce la goutte n'est en contact avec le PDMS qu'au sommet du puits, éventuellement sur un de ses côtés également. Cela amène deux complications : la solubilisation et la diffusion de l'eau dans la phase continue est donc un préalable non-négligeable à sa pervaporation à travers le PDMS (cf figure 19). Également, la surface d'échange entre l'eau et le PDMS est moins aisée à définir.

Nous verrons cependant que la modélisation unidimensionnelle de la pervaporation de l'eau permet une bonne estimation de la vitesse de rétrécissement observée expérimentalement.

Un raisonnement en ordre de grandeur nous est amplement suffisant : si l'estimation de la vitesse de rétrécissement nous est nécessaire pour dimensionner la puce a priori, la connaissance précise de la dynamique de rétrécissement ne nous est en revanche pas indispensable, car le suivi de la concentration dans la goutte est rendu possible par la mesure de son volume (cf partie III).

3.2 Modélisation unidimensionnelle

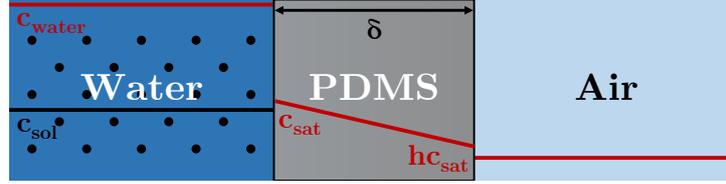


FIG. 20 – Pervaporation unidimensionnelle à travers une membrane de PDMS d'épaisseur δ . L'évolution de la concentration en eau est représentée (sans échelle) par une ligne rouge. Le soluté, représenté par des points noirs, n'est pas soluble dans le PDMS. Sa concentration (représentée par une ligne noire) est donc nulle en dehors de la phase aqueuse. Figure adaptée de Bacchin et al¹¹³)

Pour obtenir une estimation des flux de perméation de l'eau, nous considérons un modèle simplifié unidimensionnel : une phase liquide est séparée d'une phase gazeuse par une membrane d'épaisseur δ (cf figure 20).

Dans le cas du PDMS, la sélectivité du transport est principalement liée à l'affinité du polymère pour les perméants^{155,156}. On parle alors de membrane dense, et la perméation y est décrite par un modèle de dissolution-diffusion^{157,158}.

La pervaporation se fait donc en trois étapes : le perméant (ici l'eau) se dissout dans la membrane (ici le PDMS), puis diffuse à travers la membrane pour enfin s'évaporer dans la phase gazeuse (ici l'air ambiant contenu dans le canal latéral).

On considère que les phénomènes d'absorption et de désorption de part et d'autre de la membrane ne sont pas limitants^{113,157}, et on ne s'intéresse donc qu'à la diffusion à travers la membrane.

Cette diffusion se fait le long d'un gradient de concentration, causé par la différence de concentration d'un côté à l'autre de la membrane.

Modélisation du flux massique

Le flux massique d'eau à travers la membrane est donné par une loi de Fick, selon¹¹³ :

$$J = \frac{Dc_{sat}}{\delta}(1 - h) \quad (\text{II.20})$$

D est le coefficient de diffusion de l'eau dans la membrane, c_{sat} est la concentration saturante d'eau dans la membrane et h est l'humidité relative dans la phase gazeuse.

Du côté de la membrane en contact avec la phase liquide, la concentration en eau est de c_{sat} . De l'autre côté, en contact avec l'air extérieur, elle est de hc_{sat} . On retrouve bien le gradient de concentration intervenant dans la relation (II.20) : $\nabla c = c_{sat}(1 - h)/\delta$.

On estime alors le flux massique, en considérant les valeurs expérimentales regroupées dans le tableau 2 :

$$J \approx 1.2 \cdot 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{II.21})$$

Estimation de la durée de l'expérience

Considérons une goutte typique, de volume 5 nL (environ 106 μm de rayon). On considère le temps de rétrécissement complet comme le temps au bout duquel l'intégralité de la masse d'eau contenue dans la goutte a pervaporé, selon :

$$t_r = \frac{V\rho}{JS} \quad (\text{II.22})$$

$$t_r \approx 7300 \text{ s} \quad (\text{II.23})$$

Avec ρ la masse volumique de l'eau et S la surface d'échange, considérée ici comme la surface intérieure du puits.

Expérimentalement, on mesure un débit moyen de rétrécissement de $d_r^{exp} \approx 0.6 \text{ pL}^{-1}$, en accord avec le débit $d_r = 0.7 \text{ pL.s}^{-1}$ estimé à partir de (II.23).

Ce temps de rétrécissement est un bon compromis. Il permet de réduire au maximum la durée d'une expérience, tout en garantissant l'homogénéité dans la goutte, comme nous le verrons à la section suivante. Rappelons également que pour une épaisseur de membrane fixée, le temps de rétrécissement peut être ajusté en faisant varier h , le taux d'humidité de l'air. Si il peut être contraignant de générer de l'air sec sans matériel adapté, il est à l'inverse aisé d'augmenter le taux d'humidité dans le canal latéral : il est possible de réaliser l'expérience sans flux d'air, en laissant l'entrée du canal latéral déconnectée. Expérimentalement, nous avons constaté que cette configuration multipliait par 2-3 la durée de rétrécissement. De manière plus radicale, il est également possible de remplir les canaux d'eau. L'eau pervapore donc à travers l'épaisseur de PDMS au-dessus des canaux (environ 1 cm), et le rétrécissement prend plus de 24 heures.

Nous avons enfin vérifié expérimentalement qu'en présence de flux d'air la vitesse de rétrécissement des gouttes était bien proportionnelle à l'épaisseur de la membrane. Ainsi, le recours à la pervaporation vers un canal latéral pour le rétrécissement des puces permet d'optimiser la durée de l'expérience en fonction des objectifs.

Variable	Symbole	Valeur Retenue
Coefficient de diffusion de l'eau dans le PDMS	D	$8.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$
Concentration de saturation de l'eau dans le PDMS	c_{sat}	0.72 kg.m^{-3}
Humidité relative de l'air ambiant	h	0.5
Surface d'échange	S	0.57 mm^2
Épaisseur de la membrane de PDMS	δ_m	200 μm
Épaisseur totale de PDMS à considérer pour la diffusion	δ	250 μm

TAB. 2 – Valeurs numériques retenues pour la perméation de l'eau à travers le PDMS. L'épaisseur δ considérée pour la modélisation correspond dans notre cas à l'addition de l'épaisseur de PDMS séparant les deux canaux, δ_m , et de la distance entre le bord du puits et le bord du canal central, en moyenne 50 μm .

3.3 Homogénéité dans la goutte

Le rétrécissement d'une goutte par pervaporation entraîne une augmentation de la concentration du soluté qu'elle contient. Sur le bord externe de la goutte, à l'interface eau-phase continue, l'eau va diffuser vers l'extérieur, ce qui va entraîner une contraction de la goutte, et un recul de l'interface. Le soluté n'étant pas soluble dans la phase continue, le recul de l'interface va entraîner une augmentation de la concentration près de la surface externe de la goutte.

Les molécules de soluté vont ensuite diffuser le long du gradient de concentration, soit vers le centre de la goutte.

Exposé simplement, le problème est le suivant : si la vitesse caractéristique de recul de l'interface est petite devant la vitesse caractéristique d'homogénéisation des molécules de soluté par diffusion, on pourra considérer que la concentration dans la goutte est homogène car le gradient de concentration diminuera rapidement. Dans le cas inverse, il y aura accumulation du soluté à l'interface.

Quelles seraient les conséquences d'une inhomogénéité dans la goutte sur la précision de nos mesures ? La viscosité est mesurée via une technique de suivi vidéo de particules multiples (cf IV1.2.2). Plusieurs traceurs fluorescents sont imagés dans le plan équatorial de la goutte. Un coefficient de diffusion est mesuré pour chaque traceur, et c'est la moyenne de ces coefficients qui est utilisée pour calculer la viscosité. Si la concentration en soluté n'était pas homogène, la viscosité au sein de la goutte ne le serait pas non plus.

Plus problématique encore, des gradients de concentration dans la goutte créeraient des gradients de densité, qui pourraient induire des flux convectifs qui entraîneraient les traceurs avec eux. La mesure de viscosité par microrhéologie ne serait alors plus valable, car elle repose sur l'hypothèse d'un mouvement uniquement diffusif pour les traceurs.

Il nous faut donc nous assurer qu'il n'y a pas d'inhomogénéité au sein de la goutte.

Le comportement d'une suspension colloïdale dans une goutte en cours de rétrécissement a été étudié lors de précédents travaux¹³⁴, le raisonnement suivant s'en inspire.

Considérons une goutte de rayon R , contenant une solution aqueuse d'un soluté de rayon moléculaire r .

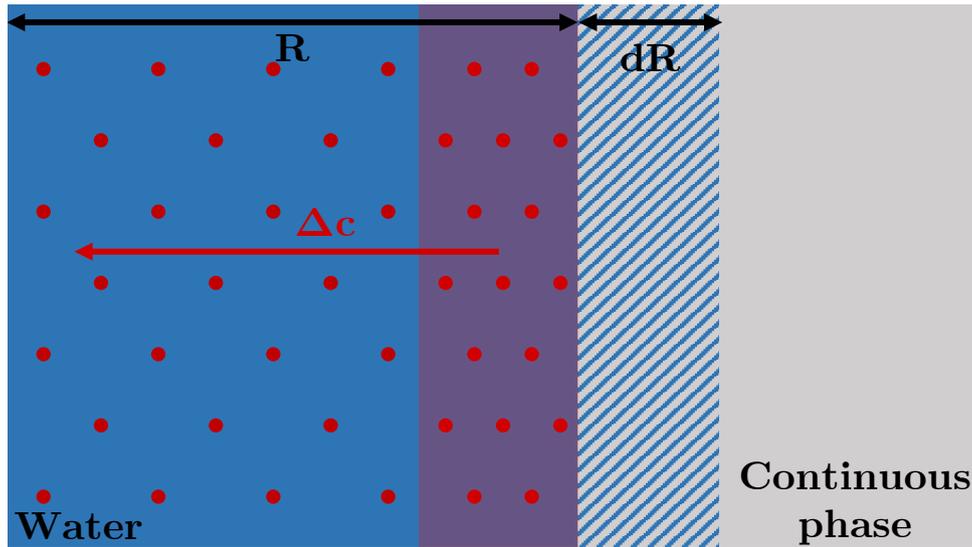


FIG. 21 – Modélisation unidimensionnelle du rétrécissement de la goutte. Le rétrécissement équivaut à un recul de l'interface sur une distance dR , représentée par une section hachurée. Ce recul induit une accumulation de soluté (représenté par les points rouges) au voisinage de l'interface, entraînant à son tour la diffusion de soluté le long du gradient de concentration, vers le centre de la goutte.

L'ensemble des valeurs évoquées ci-dessous sont valables à 25°C, soit $T = 298$ K.

La vitesse de rétrécissement de la goutte correspond à la vitesse à laquelle son interface se rapproche de son centre. Elle s'exprime selon :

$$v = \frac{dR}{dt} \quad (\text{II.24})$$

On suppose isotropes les phénomènes de diffusion et de rétrécissement, c'est à dire que chaque point de l'interface de la goutte se déplace vers le centre à la même vitesse.

Compte-tenu de notre géométrie, cela revient à faire l'hypothèse que la pervaporation de l'eau au niveau des points de contacts avec la paroi en PDMS n'est pas significativement plus favorable que la diffusion à travers la phase continue puis à travers le PDMS.

Bien que non démontrée analytiquement, cette hypothèse est vérifiée expérimentalement par l'absence de flux convectifs dans les gouttes aux viscosités les plus faibles.

La goutte étant de symétrie sphérique, on peut réduire le problème à une dimension sans perte de généralité.

Du fait de la sur-concentration à l'interface, les molécules de soluté diffusent le long du gradient de concentration, soit vers le centre de la goutte.

Le flux diffusif des molécules de soluté s'exprime selon une loi de Fick :

$$J_d = D \nabla c = D \frac{\Delta c}{R} \quad (\text{II.25})$$

L'accumulation de soluté à l'interface, lié au rétrécissement de la goutte, est modélisable par un phénomène d'advection.

Le flux d'advection s'exprime selon :

$$J_a = v \Delta c \quad (\text{II.26})$$

Le rapport de ces deux flux donne le nombre de Péclet :

$$Pe = \frac{Rv}{D} \quad (\text{II.27})$$

Pour pouvoir considérer qu'il n'y a pas d'accumulation à l'interface, et ainsi faire l'hypothèse d'une concentration uniforme dans la goutte, il faut nous placer aux petits nombres de Péclet, ce qui revient à respecter la condition suivante :

$$Pe \ll 1 \quad (\text{II.28})$$

Vitesse de rétrécissement

Pour ce calcul en ordre de grandeur, on considère que cette vitesse est constante. Expérimentalement, on mesure une valeur moyenne $v \approx 5 \text{ nm.s}^{-1}$.

Coefficient de diffusion

Le coefficient de diffusion des molécules de soluté dans la goutte s'exprime selon la loi de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{II.29})$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité dans la goutte.

Le coefficient de diffusion dépend donc de la taille du soluté et de la viscosité dans la goutte. Dans notre cas, la taille du soluté étudié va de 1 nm pour le sucrose à 10nm pour les anticorps thérapeutiques. On retient donc $r = 5 \text{ nm}$ pour la suite du raisonnement.

On considère que la viscosité au sein de la goutte varie entre celle de l'eau et 1000 mPa.s, ce qui correspond à une valeur maximale mesurable.

Rayon de la goutte

Le rayon des gouttes varie entre 150 μm et 0 μm . Dans la pratique, aucune mesure de viscosité n'est possible en dessous d'un rayon de 20 μm .

Estimation du nombre de Péclet

Dans le cas typique d'une goutte de rayon $R = 50 \mu\text{m}$ contenant une solution d'anticorps monoclonaux à une viscosité $\eta = 10 \text{ mPa.s}$ et rétrécissant à une vitesse $v = 5 \text{ nm.s}^{-1}$, l'équation (II.27) nous donne :

$$Pe \approx 0.06 \quad (\text{II.30})$$

On peut donc considérer que la concentration en soluté est uniforme dans la goutte.

Il est cependant possible de se placer dans une situation où la condition (II.28) n'est plus respectée : considérons par exemple une solution d'anticorps de viscosité $\eta = 200 \text{ mPa.s}$, contenue dans une goutte de rayon $R = 40 \mu\text{m}$. On aurait alors :

$$Pe \approx 0.9$$

Dans ces cas là, il est toujours possible de réduire la vitesse de rétrécissement des gouttes de manière à vérifier la condition (II.28). Cela peut se faire en ajustant la taille de la membrane séparant le canal central et le canal latéral, ou encore en variant l'humidité de l'air circulant dans ce dernier.

Pour une diminution plus drastique de la vitesse de rétrécissement, il est également envisageable de remplir le canal latéral d'eau et de laisser l'eau pervaloriser uniquement via l'épaisseur de PDMS sur le dessus de la puce. On atteint alors des durée de rétrécissement de 24-48h.

Cette modélisation nous permet donc d'estimer l'homogénéité dans la goutte. Pour une expérience donnée, la vitesse de rétrécissement peut donc être ajustée de manière à minimiser la durée de l'expérience tout en s'assurant de l'homogénéité dans la goutte.

L'architecture de notre puce microfluidique permet de remplir les objectifs de notre approche, énoncés au début de cette partie.

En utilisant un émulsificateur à gradient de confinement, notre approche permet la production à la demande de salves d'une dizaine de micro-gouttes, réduisant ainsi à 1 μL le volume d'échantillon nécessaire. Rappelons l'objectif que nous nous étions fixé : nous souhaitons pouvoir partir d'un échantillon de 100 μL d'anticorps concentrés à 1 mg.mL^{-1} et atteindre une concentration finale de 200 mg.mL^{-1} .

Avec un facteur de concentration de plus de 400, notre puce permet largement de remplir cet objectif : la concentration maximale accessible à partir d'un échantillon dilué est de 420 mg.mL^{-1} précisément.

Avec une consommation réduite à un 1 μL , notre approche permet dans l'idéal de réaliser 100 expériences avec un échantillon dilué. Même en prenant une large marge de sécurité, pouvoir réaliser une dizaine d'expérience de caractérisation à partir d'un échantillon dilué de 100 μL est une performance inégalée, à comparer aux quantités nécessitées par les expériences de rhéologie des anticorps, qui vont de la centaine de milligrammes à la dizaine de grammes^{54,56}.

La conception d'une puce aussi performante et d'utilisation relativement simple a posé un certains nombres de défis compte-tenu des limitations des techniques de micro-fabrication, comme nous le verrons au chapitre suivant. La puce a en effet une structure tridimensionnelle, et contient à la fois des structure de grande dimensions et des sections nécessitant une résolution de l'ordre du micromètre.

Chapitre 4

Micro-fabrication

4.1 Le choix du PDMS

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est le composant privilégié pour le prototypage de puces microfluidiques. Il est en effet très abordable comparé aux alternatives existantes, et demande un nombre réduit d'équipements et d'étapes de fabrication.

Les limitations du PDMS sont principalement sa faible résistance aux solvants organiques, sa perméabilité à l'eau, sa déformabilité et l'impossibilité de production à grande échelle.

Certains solvants, dont une partie est employée dans le champ de la biologie, attaquent le PDMS en le faisant gonfler voire en le dégradant, ce qui le rend incompatible avec certaines applications.

L'eau pervapore à travers le PDMS, ce qui pose notamment problème lors d'éventuelles étapes d'incubation en microfluidique en gouttes, les gouttes risquant de disparaître au bout de quelques heures.

Enfin, la déformabilité du PDMS peut poser problème aux hauts débits.

Dans ces cas de figures, des alternatives existent pour le prototypage de puces sans PDMS : on peut obtenir des puces rudimentaires en alignant des capillaires en verre, ou remplacer le PDMS par de la NOA (Norland Adhesive Optical), une colle UV. La gravure laser peut également être utilisée pour produire des puces intégralement en verre, mais leur coût est plus important (minimum 1000€ par puce).

Pour des puces produites à plus grande échelle, c'est le rendement des techniques de fabrication en PDMS qui pose problème. Les étapes de fabrication ne sont pas parallélisables, et nécessitent un personnel formé, capable de travailler en salle blanche. Pour produire des puces à plus grande échelle et moins cher, on préfère utiliser des polymères thermoplastiques, plus résistants et utilisables dans des processus industriels.

Dans notre cas, une des limitations du PDMS est au contraire un atout : la perméabilité du PDMS à l'eau nous permet d'utiliser certains parois de notre puce comme des membranes semi-perméables. Faire rétrécir les gouttes par pervaporation de l'eau serait impossible dans des puces en verre ou en polymère rigide, ou nécessiterait l'inclusion de membranes dédiées.

Le choix du PDMS implique également la fabrication d'une puce hétérogène : la structure des canaux étant obtenue par moulage, l'ajout d'une lame de verre est nécessaire pour sceller le circuit et ainsi former la puce.

La microfluidique en gouttes nécessite une absence quasi-totale de mouillage, pour la manipulation des gouttes mais surtout pour leur production. Dans notre cas, le verre (et dans une moindre mesure le PDMS brut) sont trop hydrophile pour permettre la production de gouttes. L'utilisation de puces PDMS-verre nécessite un traitement hydrophobe préalable à base de silane.

4.2 Moules en SU-8 multi-couches

La technique de photo-lithographie sur des wafers de silicium recouverts de SU-8 est la plus répandue pour la fabrication de matrices microfluidiques. Issue du domaine de la micro-électronique, elle offre une résolution inégalée.

Dans cette partie, nous discuterons des limites de cette technique dans notre cas d'application : la superposition de couches de SU-8 épaisses par enduction centrifuge (spin-coating). Pour de plus amples informations sur les étapes de fabrication d'un tel moule, le protocole expérimental détaillé est reproduit en annexe VII2.

4.2.1 Épaisseurs relatives des couches

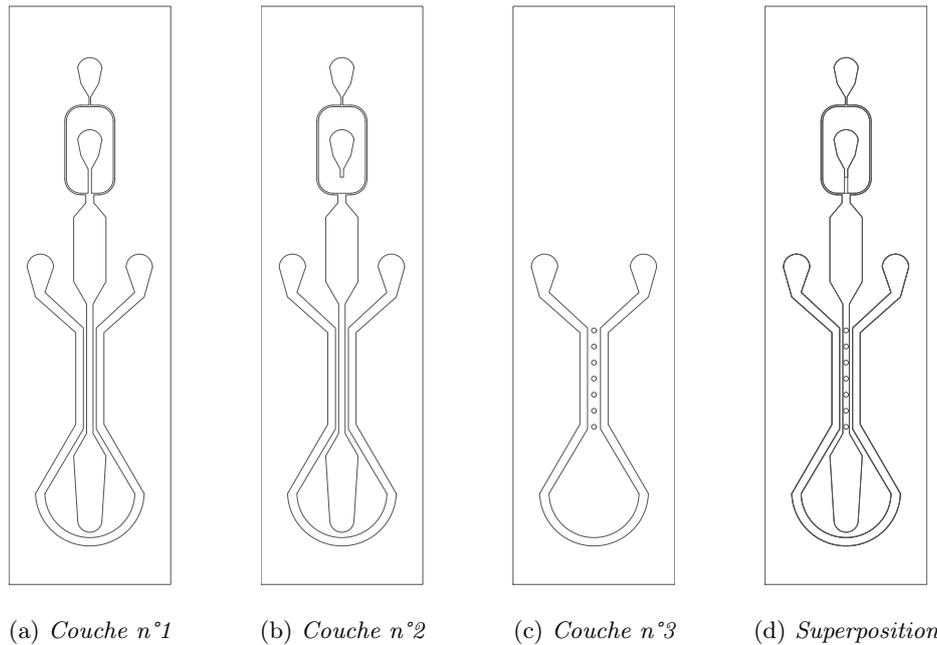


FIG. 22 – Dessins des couches de fabrication et de la puce complète. La première couche contient les motifs du canal central et du canal latéral. La deuxième est identique à la première, à l'exception du canal de l'émulsificateur. L'alignement des deux premières couches permet ainsi de créer la différence de hauteur à l'origine du gradient de confinement. Souvent appliquée en deux fois, la troisième couche est la plus épaisse, elle permet de placer les puits cylindriques au-dessus du canal central. Chaque couche contient le motif du canal latéral, afin que celui-ci fasse toute la hauteur de la puce pour maximiser la perméation de l'eau. La dimensions des motifs est environ 3.5×1 cm. Dessin réalisés sur le logiciel AutoCAD (Autodesk).

Notre puce a un design tridimensionnel, du fait des puits présents au dessus du canal principal et de l'inclusion d'un dropmaker à step. Chaque étage de la puce correspond à une couche de SU-8 distincte déposée sur le wafer en silicium, ce qui complexifie le processus de fabrication.

Chaque couche est exposée successivement. L'alignement des différents motifs doit être réalisé avec une grande précision.

La hauteur des couches de SU-8 est également limitée par le processus de spin-coating. Difficile d'obtenir des couches individuelles régulières de plus de $250 \mu\text{m}$ ¹⁵⁹.

Dans notre cas la seconde difficulté est la plus limitante. Supposons vouloir travailler avec des gouttes de rayon R .

L'épaisseur de chacune des couches doit alors remplir les conditions suivantes :

- l'épaisseur de la première couche est cruciale car c'est elle qui impose le diamètre des gouttes produites. Un step de hauteur h_1 produira des gouttes de diamètre $d \approx 4h_1$ (cf relation (II.1)).
- le second motif est quasi identique au premier, à l'exception du step. Par conséquent, la majeure partie de la puce (canal central et chambres de sélection en amont et en aval) aura une hauteur $h_p = h_1 + h_2$. On veut que les gouttes ne soient pas confinées, pour faciliter leur manipulation et la mesure de leur volume dans la puce, mais aussi pour garantir le bon fonctionnement du dropmaker. Le diamètre de la goutte doit donc être inférieur à la hauteur de la puce : $h_p \geq 2R$.
- La troisième couche ne concerne que les puits situés au dessus du canal principal (et le canal latéral mais ce dernier ne contient pas de gouttes). Expérimentalement, on montre qu'avoir un puits aussi profond que le diamètre des gouttes ne suffit pas à les protéger efficacement des flux résiduels dans la puce. Une marge de sécurité de $20\text{-}50 \mu\text{m}$ est nécessaire, soit : $h_3 \geq 2R + 20 - 50 \mu\text{m}$

Les conditions sur l'épaisseur des couches sont résumées dans le tableau 3.

Couche	1	2	3
Épaisseur	$R/2$	$\geq 3R/2$	$\geq 2R + 20 - 50 \mu\text{m}$

TAB. 3 – Tableau récapitulatif des dimensions relatives des couches

4.2.2 Limites de l'enduction centrifuge

Épaisseur maximale et irrégularités

L'épaisseur des couches de SU-8 qu'il est possible d'obtenir par spin-coating est limitée. Elle dépend principalement de deux facteurs : la viscosité de la résine SU-8 choisie, et la vitesse de rotation du spin-coater.

Augmenter la taille initiale des gouttes étudiées permet d'élargir la gamme de concentrations explorée. Dans cet effort, c'est la profondeur des puits qui est limitante. Rappelons la condition énoncée en 3 : la profondeur des puits doit au moins être égale au diamètre des gouttes, plus une marge de sécurité.

Expérimentalement, une couche de résine appliquée sur une couche de résine précédemment exposée produit une épaisseur plus faible que si elle avait été appliquée directement sur un wafer de silicium.

De plus, les couches préexistantes imposent une augmentation des temps de cuisson SB et PEB (cf VII2), déjà très longs pour une couche d'une telle épaisseur. Dans la pratique, pour que la troisième couche soit exposable le wafer doit rester au moins 2 heures sur une plaque à 95°C. Sur des temps aussi long, le moindre défaut d'horizontalité de la plaque chauffante se traduit par un glissement de la couche de résine non encore exposée, ce qui entraîne *in fine* une variabilité des profondeurs des puits sur le moule final.

Cette variabilité s'ajoute à celle engendrée par la faible vitesse de rotation du spin-coater¹⁵⁹.

L'utilisation de la résine SU-8 2150, une des plus visqueuses disponibles, avec un spin-coater réglé sur 1500 tours/minute permet d'atteindre des épaisseurs de 250 μm au maximum, avec une grande variabilité sur la puce.

Ces conditions limitent la taille maximale des gouttes utilisables, et entraînent une forte consommation de moules car seul un certain pourcentage de puces sont utilisables sur chaque wafer.

Moules à quatre couches

Pour avoir des puits plus profonds que 200-250 μm , la solution retenue est de décomposer la troisième couche en deux couches d'épaisseur égale, et exposées avec un motif identique. Cette technique permet d'atteindre des épaisseurs de 300-350 μm avec une variabilité bien moindre.

En contrepartie, l'alignement des deux dernières couches se fait dans des conditions loin d'être optimales, ce qui entraîne un léger décalage des puits. Ce décalage n'affecte cependant pas le piégeage des gouttes.

La nécessité de superposer des couches d'une part, et celle de travailler à de grandes épaisseurs d'autre part, poussent les techniques d'enduction centrifuge et d'alignement dans leurs retranchements, induisant une perte de précision et une dégradation de l'aspect des puces.

Cependant, l'utilisation de moules en SU-8 reste incontournable en termes de résolution et d'état de surface, comparée aux alternatives comme le micro-usinage de moule métallique ou l'impression 3D.

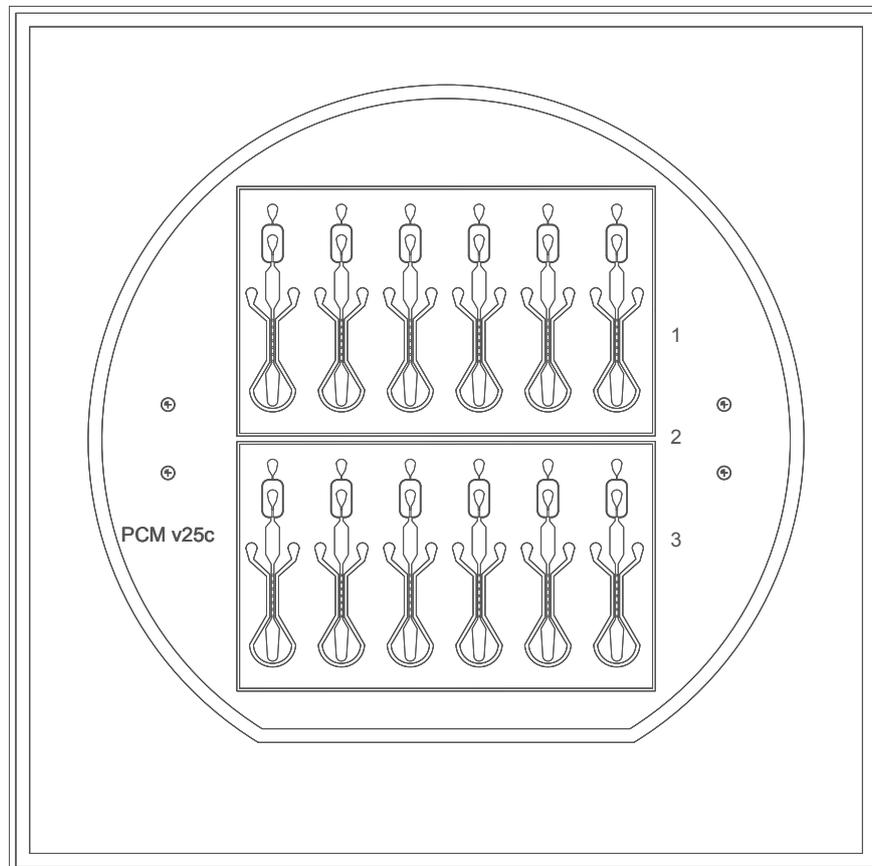


FIG. 23 – Dessin de masque d'exposition. Ce dessin montre la superposition des trois masques nécessaires à la fabrication d'un moule en SU-8. Situées de part et d'autre du motif, les mirettes de positionnement permettent d'aligner les couches. Les masques sont conçus pour exposer un wafer de Silicium de 10 cm de diamètre. Le bord extérieur du dessin est un carré de 13 cm de côté. Dessin réalisé sur le logiciel AutoCAD (Autodesk)

Troisième partie

Suivi de la concentration

Nous avons établi que l'utilisation de gouttes microfluidiques présente des avantages indéniables pour la rhéologie des solutions concentrées de protéines.

Un avantage majeur de notre système expérimental est sa capacité à concentrer le soluté au sein des gouttes : en une seule expérience et à partir d'une seule solution initiale, notre approche fournit autant de points de mesure que plusieurs dizaines de mesures de rhéologie classique, réduisant d'autant le volume consommé et le temps nécessaire à la préparation des échantillons.

Cet atout n'en serait pas un sans un suivi précis de la concentration au sein des gouttes : pour une expérience de rhéologie classique, un échantillon est préparé par concentration étudiée. Ainsi, leur concentration est connue avec certitude, en tenant compte toutefois de la précision des appareils de mesure.

Dans notre cas, un seul échantillon est préparé : la solution initiale diluée. Il nous faut donc pouvoir mesurer la concentration dans les gouttes tout au long de l'expérience, sans quoi la mesure de la viscosité perdrait toute valeur.

Nous avons développé une méthode de suivi automatisé de la concentration dans les gouttes, ne nécessitant aucune intervention de l'utilisateur-riche, et permettant une mesure de la concentration à moins de 5% d'erreur près. Dans cette partie du manuscrit, nous détaillerons son fonctionnement, ainsi que les différents calculs, simulations numériques et expériences démontrant sa viabilité et sa précision. Nous discuterons également des éventuelles limitations de notre dispositif résultant de cette approche.

S'il nous est impossible de mesurer directement la composition de la goutte au sein de la puce microfluidique, la microscopie nous donne en revanche accès au volume de la goutte. En mesurant le facteur de rétrécissement de la goutte, nous verrons qu'il est possible de calculer avec précision sa composition. Nous verrons cependant qu'un certain nombre d'hypothèses sous-tendent le passage de l'imagerie de la goutte au calcul de son volume, mais également le passage du volume de la goutte à la concentration de soluté en son sein.

Nous discuterons dans un premier temps du suivi du volume de la goutte, en étudiant l'influence de la forme des gouttes et des méthodes algorithmiques de détection.

Dans un second temps, nous discuterons de l'influence du volume partiel spécifique des solutés sur le volume de la goutte, et des éventuelles corrections nécessaires pour exprimer la concentration de soluté dans la goutte.

Chapitre 1

Suivi du volume des gouttes

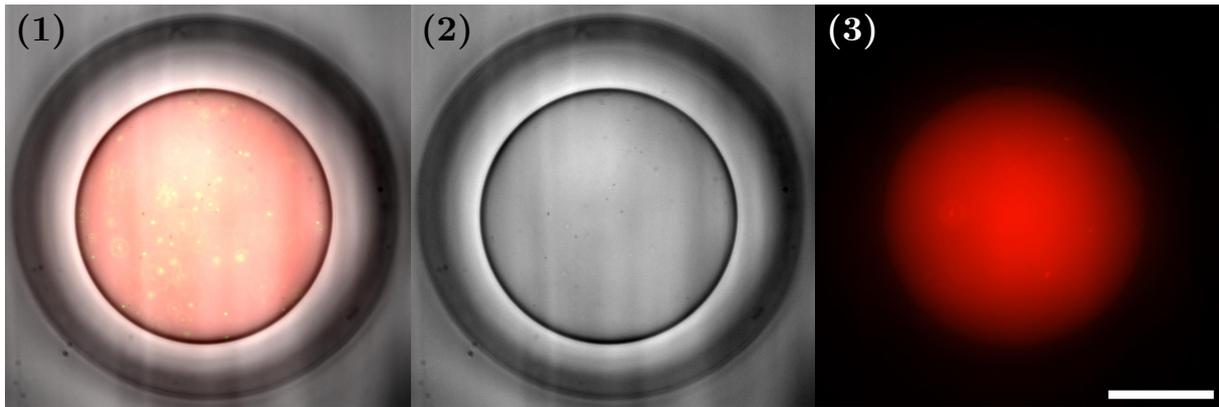


FIG. 24 – Image multicanale d’une micro-goutte chargée dans un puits. En plus de la lumière blanche, deux canaux de fluorescence sont imagés (détaillés en 2.2). La fluorescence FITC (fluorescence verte) permet d’imager les traceurs, et la fluorescence Alexa Fluor 568 (AF 568) permet d’imager la goutte teintée par un fluorophore.

- (1) Superposition des 3 canaux : lumière blanche, FITC, AF 568
- (2) Lumière blanche uniquement
- (3) Alexa Fluor 568 uniquement

1.1 Sphéricité des gouttes

La mesure de la concentration ne nous étant pas directement accessible, nous avons choisi de mesurer le volume des gouttes, puis d’en déduire la concentration de soluté s’y trouvant.

Cependant, la mesure du volume de la goutte ne nous est pas immédiatement accessible non plus : imagées au microscope, les gouttes apparaissent comme des disques, dont nous pouvons en revanche mesurer le rayon.

Dans cette section, nous montrons que les gouttes étudiées peuvent être assimilées à des sphères, et que leur volume peut être calculé selon :

$$V(t) = \frac{4}{3}\pi R^3(t) \quad (\text{III.1})$$

1.1.1 Déformation des gouttes : longueur capillaire

Au sein de notre puce microfluidique, les gouttes d’eau sont en suspension dans une phase continue (pour nous, de l’huile fluorée) dans laquelle elles ne sont pas solubles. La forme des gouttes n’est donc pas imposée par un éventuel confinement, mais résulte de la compétition entre deux phénomènes. L’eau n’étant pas soluble dans la phase continue, la minimisation de l’énergie interfaciale passe par une minimisation de l’interface. On définit la tension de surface γ , énergie par unité de surface qui quantifie la propension des fluides à minimiser leur surface de contact. Dans le cas d’une goutte, la surface minimale de contact

est une sphère parfaite.

L'autre phénomène est lié au champ gravitationnel. La différence de masse volumique entre les fluides génère une force tendant au contraire à aplatiser la goutte.

On introduit la longueur capillaire l_c , la taille caractéristique de la goutte lorsque les deux phénomènes précédemment cités sont énergétiquement équivalents.

On peut alors écrire :

$$1 = \frac{\gamma l_c^2}{\Delta \rho g l_c^4} \quad (\text{III.2})$$

On en déduit ainsi l'expression de la longueur capillaire :

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma}{\Delta \rho g}} \quad (\text{III.3})$$

$\Delta \rho = |\rho_1 - \rho_2|$ est la différence de masse volumique entre les deux fluides, et g correspond à l'accélération de la pesanteur.

On estime que la déformation liée au champ gravitationnel est négligeable pour $l \ll l_c$, soit $l < \frac{l_c}{10}$.

Il est donc important de vérifier cette hypothèse au sein de notre système, pour s'assurer que notre méthode de mesure du volume reste précise en toutes circonstances : si les gouttes ne peuvent plus être assimilées à des sphères, la relation (III.1) n'est plus valide.

Au sein de notre puce microfluidique, les gouttes d'eau sont en suspension dans du Novec 7500. La tension de surface entre cette huile fluorée et l'eau vaut $\gamma \approx 45 \text{ mN.m}^{-1}$, et la différence de masse volumique vaut $\delta \rho = 614 \text{ kg.m}^{-3}$, pour des fluides purs^{160,161}.

L'équation (III.3) nous donne alors $l_c \approx 2.7 \text{ mm}$.

1.1.2 Influence du surfactant

La présence de surfactant aux interfaces entraîne des variations importantes de la tension de surface. Lors de nos expériences, la concentration en surfactant dans la phase continue varie entre 0.05% et 0.2% en masse, selon la composition de la phase aqueuse. Une fois les gouttes positionnées dans les puits, la puce est éventuellement rincée avec de l'huile moins concentrée en surfactant (entre 0% et 0.02% en masse), pour éliminer notamment le risque de transfert micellaire¹⁶².

Il est difficile d'estimer la concentration en surfactant présente à l'interface entre la goutte et l'huile à un instant t , car nous n'avons pas d'information précise sur le comportement du surfactant RAN-008.

Nous avons par conséquent considéré le cas le plus extrême, avec une concentration en surfactant de 0.2%.

Pour une telle concentration en surfactant, la tension capillaire entre l'eau et l'huile est de $\gamma_{(0.2)} \approx 5 \text{ mN.m}^{-1}$, pour une longueur capillaire $l_{c(0.2)} \approx 90 \mu\text{m}$.

La condition $l \ll l_c$ n'est plus remplie, nos gouttes ayant un diamètre supérieur à $90 \mu\text{m}$.

1.1.3 Modélisation du profil des gouttes

La déformation des gouttes ne pouvant être négligée, il nous reste à modéliser le problème pour évaluer l'influence de cette déformation sur la mesure du volume.

Considérons une goutte d'eau de rayon r piégée dans un des puits cylindriques de notre puce. Elle est en suspension dans de l'huile fluorée, plus dense que l'eau ($\Delta \rho = 614 \text{ kg.m}^{-3}$). Par conséquent, la goutte est maintenue au contact du plafond du puits par la poussée d'Archimède. Ce plafond est supposé parfaitement horizontal dans notre modèle.

L'intérieur du puits est composé de PDMS soumis à un traitement de surface par silanisation, ce qui le rend très hydrophobe. On considère donc qu'il n'y a aucun mouillage.

Dans ces conditions, la forme de la goutte est une surface symétrique par rapport à un axe orienté selon \vec{z} et passant par le centre de la goutte. Cette surface est caractérisée par ses deux courbures principales, de rayon R_1 et R_2 , définis par l'équation de Gauss-Laplace :

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (\text{III.4})$$

ΔP est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte, exprimée selon¹⁶³ :

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{b} - \Delta \rho g z \quad (\text{III.5})$$

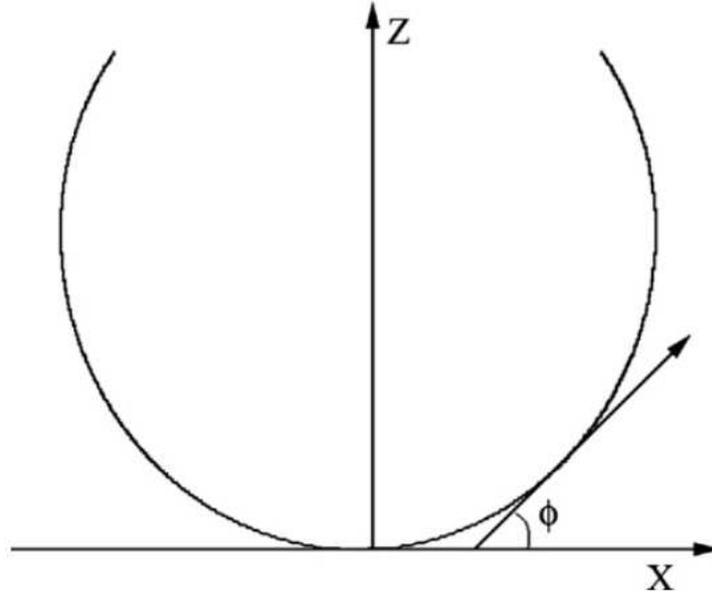


FIG. 25 – Schéma des notations utilisées pour la résolution de l'équation de Gauss-Laplace. Figure extraite de Zholob et al 2007¹⁶³

Avec b le rayon de courbure à l'apex de la goutte.

La résolution de l'équation de Gauss-Laplace nous permet donc d'accéder à la forme de la goutte. Les tensiomètres à goutte pendante suivent le raisonnement inverse : en produisant une goutte de volume connu et en détectant son profil, on déduit la tension de surface entre deux fluides.

On introduit s l'abscisse curviligne le long de la goutte ; $\phi(s)$ l'angle entre la tangente à un point de la goutte et l'axe horizontal ; x et y les coordonnées horizontales et verticales respectivement (cf figure 25). La courbure méridionale de la goutte peut être définie comme :

$$\frac{1}{R_1} = \frac{d\phi}{ds} \quad (\text{III.6})$$

La courbure azimutale est quant à elle définie par :

$$\frac{1}{R_2} = \frac{\sin \phi}{x} \quad (\text{III.7})$$

On peut donc réécrire l'équation (III.4) selon :

$$\gamma \left(\frac{d\phi}{ds} + \frac{\sin \phi}{x} \right) = \frac{2\gamma}{b} - \Delta\rho g \quad (\text{III.8})$$

En divisant les deux membres de l'équation (III.8) par γ/b , on obtient :

$$\frac{d\phi}{dS} = 2 - \beta Z - \frac{\sin \phi}{Z} \quad (\text{III.9})$$

avec

$$S = \frac{s}{b}, \quad X = \frac{x}{b}, \quad Z = \frac{z}{b} \quad (\text{III.10})$$

les valeurs adimensionnées de l'abscisse curviligne et des coordonnées horizontales et verticales, respectivement,
et

$$\beta = \frac{\Delta\rho g b^2}{\gamma} \quad (\text{III.11})$$

le nombre de Bond, qui caractérise la forme de la goutte.

Deux équations additionnelles décrivent la forme de la surface :

$$\frac{dX}{dS} = \cos \phi \quad (\text{III.12})$$

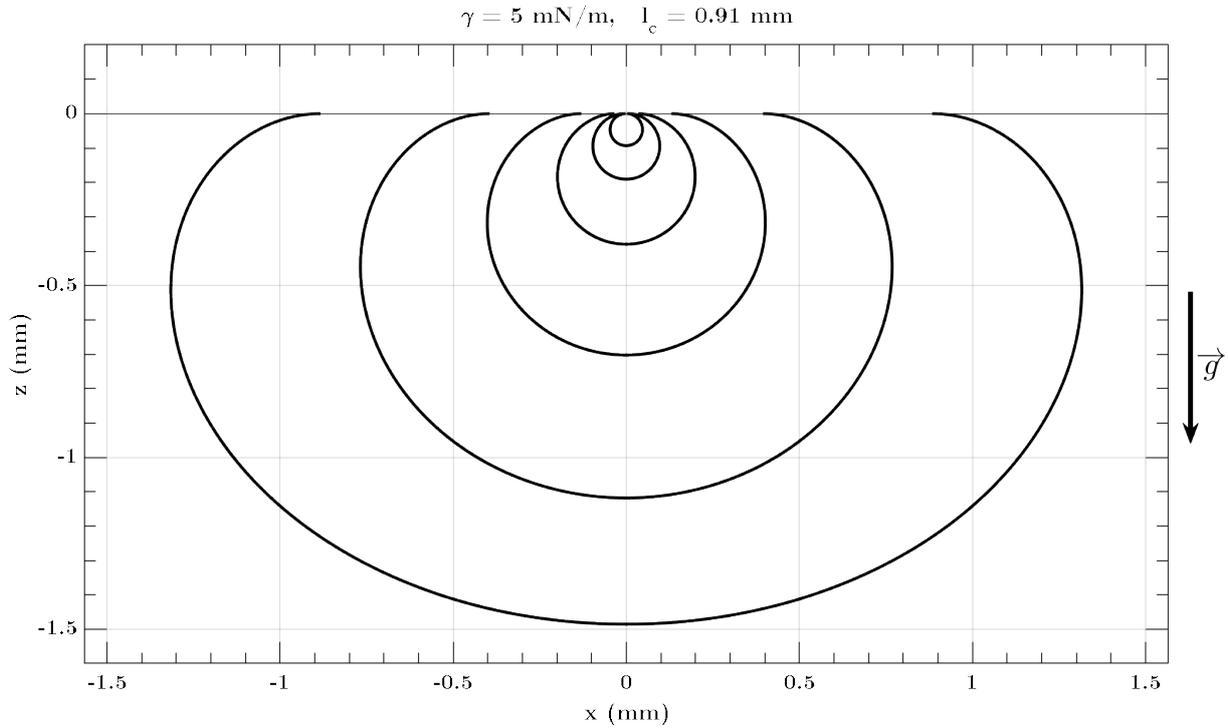


FIG. 26 – Profils de déformation simulés numériquement pour des gouttes de volumes variés en suspension dans une phase continue Novec 7500 contenant 0.2% en masse de surfactant RAN-008 (RAN Biotechnologies, Inc), pour une tension de surface $\gamma = 5 \text{ mN.m}^{-1}$ entre l'eau et la phase continue. Pour une meilleure illustration, les coordonnées indiquées sur cette figure correspondent au référentiel du puits cylindrique, et ne correspondent pas au système de coordonnées défini pour la résolution de l'équation (III.8) et présenté en figure 1.1.3

$$\frac{dZ}{dS} = \sin \phi \quad (\text{III.13})$$

Enfin, on a les conditions aux limites suivantes :

$$X(0) = 0; \quad Z(0) = 0; \quad \phi(0) = 0 \quad (\text{III.14})$$

Ces conditions aux limites ne permettent pas la résolution directe des équation (III.8), (III.12) et (III.13). En effet, du fait de la déformation de la goutte il existe une zone tangentielle entre la goutte et le sommet du puits, et ce même en l'absence de mouillage.

Il existe ainsi une valeur limite S_{lim} telle que :

$$X(S \in [0, S_{lim}]) = 0 \quad (\text{III.15})$$

Dans le cas idéal d'une goutte parfaitement sphérique, on a $S_{lim} = 0$.

Dans le cas inverse, S_{lim} étant inconnu a priori, la résolution de l'équation doit se faire en partant du bas de la goutte.

Les équations (III.12) et (III.13) permettent en effet de déterminer la courbure du profil de la goutte, mais sans connaître S_{lim} on obtiendrait une infinité de solutions.

Il faut donc résoudre l'équation en partant du bas de la goutte. Cette résolution ne produit qu'une seule solution vérifiant les conditions aux limites détaillées en (III.14).

Par symétrie de révolution, on en déduit enfin une modélisation de la forme de la goutte.

Pour une altitude z donnée, la coupe de la goutte est un disque de rayon $x(z)$, et donc de surface $a(z) = \pi x^2(z)$. On en déduit le volume de la goutte :

$$V = \pi \int_0^h x^2 dz \quad (\text{III.16})$$

Ensuite, rappelons que la goutte est imagée par le dessous, selon l'axe z dans notre système de coordonnées. La goutte apparaît comme un disque de rayon R_{app} . Ce rayon apparent correspond à la distance

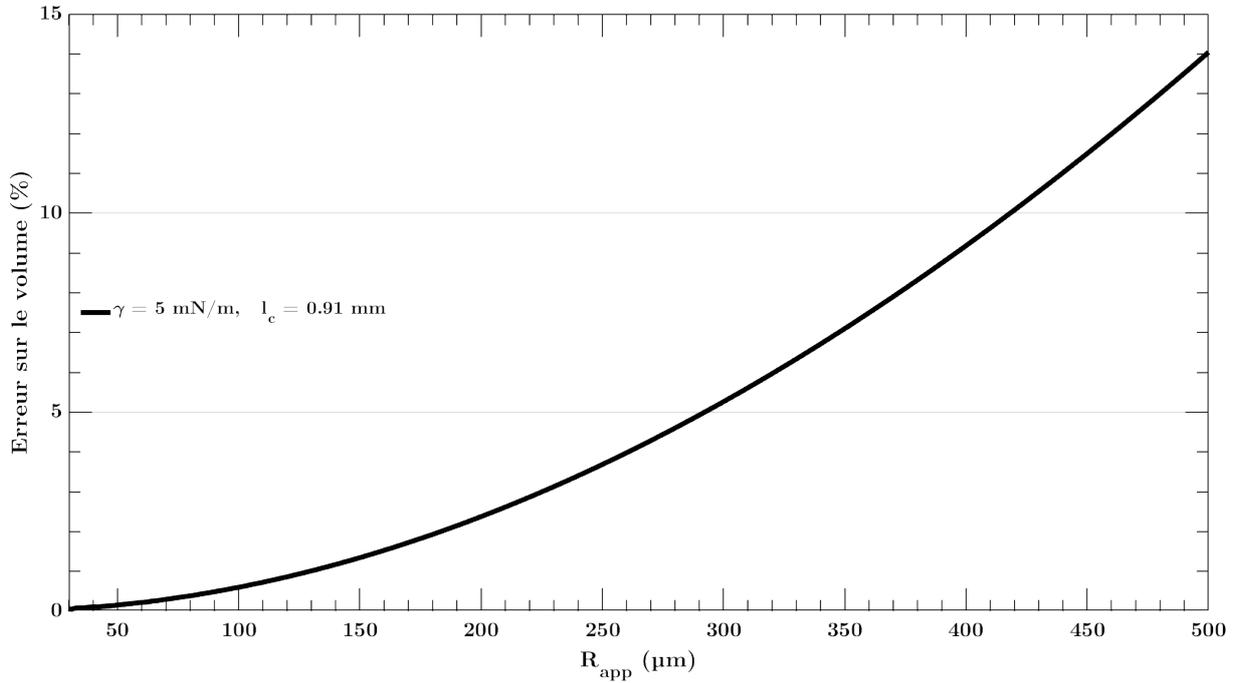


FIG. 27 – Erreur relative sur le volume liée à la non-sphéricité des gouttes, en fonction du rayon apparent, estimée par la relation (III.19). La ligne verticale correspond à $R = 150 \mu\text{m}$, rayon maximum étudié dans la version actuelle de notre puce. L'erreur est donc inférieure à 1.5% dans notre cas.

maximale entre le profil de la goutte et son axe central, soit :

$$R_{app} = x_{max} = \max(x(z)) \quad (\text{III.17})$$

Le volume apparent qui est mesuré par le système optique s'exprime selon :

$$V_{app} = \frac{4}{3}\pi x_{max}^3 \quad (\text{III.18})$$

Les équations (III.16) et (III.18) nous permettent enfin d'estimer numériquement l'erreur relative sur la mesure du volume :

$$\delta = \frac{|V_{app} - V|}{V} \quad (\text{III.19})$$

On vérifie que cette erreur a un impact limité pour des gouttes sub-millimétriques (cf figure 27). Dans notre cas, la goutte a un rayon maximal de $150 \mu\text{m}$, limité par le diamètre des puits cylindriques. Pour une goutte de cette taille, l'erreur sur le volume est inférieure à 1.5%.

Pour une tension de surface $\gamma = 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, on atteint une erreur de 5% sur le volume pour un rayon apparent $R_{app}^{5\%} \approx 290 \mu\text{m}$, ce qui permet d'envisager une augmentation de la taille initiale des gouttes pour couvrir une gamme de concentration plus étendue.

1.2 Mesure du rayon de la goutte

Nous avons établi que la mesure du rayon des gouttes permet d'en calculer le volume avec suffisamment de précision.

Intéressons-nous à présent à la mesure du rayon à proprement parler. Nous avons cherché à développer une mesure automatisée. Le problème peut donc se décomposer en deux étapes : dans un premier temps, quelle méthode retenir pour détecter la goutte ? Et dans un second temps, quelle précision peut-on attendre sur la mesure du rayon ?

1.2.1 Détection du bord de la goutte

Si la vision humaine est particulièrement performante pour identifier des formes, on ne peut pas en dire autant des ordinateurs.

Parmi les plusieurs approches envisageables, nous détaillerons ici deux stratégies distinctes, exploitant tour à tour l'imagerie en lumière blanche et la microscopie de fluorescence. Dans notre dispositif expérimental, les gouttes sont régulièrement imagées selon deux canaux distincts : une photographie en lumière blanche, et une en fluorescence permettant de n'observer que la goutte, préalablement teintée par un fluorophore (voir la figure 24 de ce chapitre, et la figure 37 du chapitre 2.2).

En lumière blanche : transformée de Hough

La détection des bords de la goutte revient à un problème de détection de cercles. Sur les images en lumière blanche, le bord de la goutte apparaît comme une bande sombre (visible en figure 30a).

La transformée de Hough est une technique de reconnaissance de formes utilisée en traitement d'images. Initialement développée pour détecter les trajectoires linéaires formées par des particules ionisante au sein de chambres à bulles¹⁶⁴, elle a été généralisée pour permettre la détection d'autres formes géométriques¹⁶⁵.

Cette méthode algorithmique nécessite une puissance de calcul non négligeable, surtout si la gamme de rayons explorée est étendue, ainsi qu'un réglage approprié de sa sensibilité, au vu de sa forte propension à détecter des artefacts.

Comparée à un simple seuillage, l'avantage majeur de la transformée de Hough est qu'elle intègre une information sur la forme recherchée. Elle est donc particulièrement puissante pour détecter les gouttes au milieu de formes parasites non circulaires.

Dans notre cas, la seule autre forme visible sur l'image est malheureusement un cercle, et correspond au sommet du puits. Le défi est donc double : il s'agit d'être suffisamment sensible pour détecter la goutte, tout en étant sûr de ne détecter qu'elle.

Une autre spécificité de notre approche complique encore l'application de la transformée de Hough : au cours d'une expériences type, le rayon de la goutte varie fortement. A l'image, la goutte passe d'un disque de 300 μm de diamètre quasiment confondu avec les parois du puits à un disque de 50 μm de diamètre au milieu du puits.

Dans ces conditions, nous n'avons pas réussi à concevoir un algorithme capable de détecter de manière fiable le bord des gouttes uniquement à partir des images en lumière blanche et dans un temps raisonnable.

En fluorescence : seuillage

Pour détecter le bord de la goutte, une autre stratégie consiste à teinter la phase dispersée avec un fluorophore. La goutte devient alors fluorescente, et en l'imageant sur un canal dédié on se situe dans le cas idéal d'une image sombre avec un disque de fluorescence, dont le rayon correspond à celui de la goutte.

La détection de la goutte en fluorescence se fait par seuillage : après binarisation de l'image avec un seuil t , on peut calculer le centroïde et le rayon équivalent de la région correspondant à la goutte. Le seuil t peut être fixé arbitrairement, ou calculé à partir de l'image par des méthodes analytiques, comme par exemple la méthode d'Otsu qui retient le seuil minimisant la variance intra-classe des pixels¹⁶⁶.

Sur une image de microscopie réelle, le bord du disque de fluorescence n'est pas parfaitement défini. De plus, la goutte étant sphérique, le disque de fluorescence n'est pas homogène : l'intensité sera maximale au centre du disque, là où la goutte est la plus épaisse, et plus faible sur les bords de la goutte, où elle tend à se confondre avec le bruit de fond.

On a alors un profil d'intensité continu. Par conséquent, le rayon apparent de la goutte va être fonction du seuil choisi pour la binarisation (cf figure 28).

Pour une image donnée, il est possible de définir un seuil t tel que le rayon apparent de la goutte en fluorescence soit égal au rayon mesuré en lumière blanche. Cependant, cette correspondance n'est valable que pour une taille de goutte donnée : plus une goutte est petite, moins le gradient de signal entre son centre et ses bords sera important. De plus, lors d'une expérience de rétrécissement, le fluorophore se retrouve concentré à mesure que la goutte rétrécit, nécessitant une évolution du seuil.

La figure 29 montre l'évolution du rayon apparent en fluorescence en fonction du seuil, pour une même goutte à deux stades de rétrécissement différents. On constate premièrement une grande variation du seuil de correspondance, qui rend impossible l'emploi d'un seuil de binarisation constant pour toute la

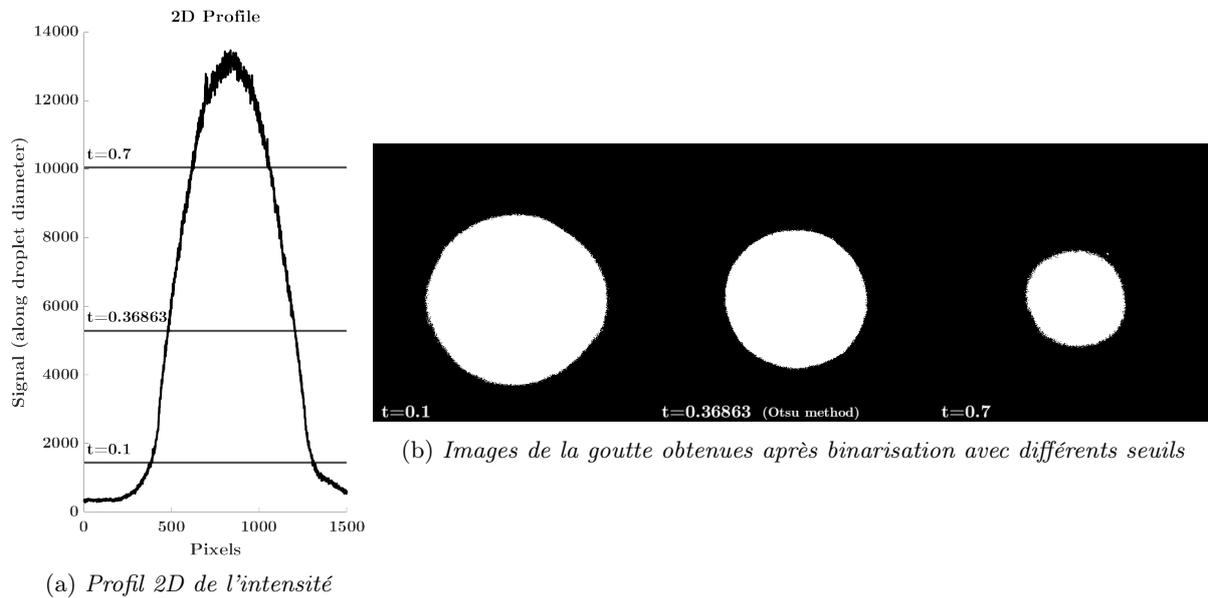


FIG. 28 – En fluorescence, le seuil de binarisation influe sur le rayon apparent de la goutte. Le profil du signal de fluorescence émis par la goutte est continu, avec un contraste beaucoup moins important qu'en lumière blanche. Par conséquent, il n'est pas aisé de définir précisément la position du bord de la goutte. A droite est représentée l'apparence de la goutte pour différents seuils de binarisation, matérialisés par des lignes horizontales sur l'histogramme du signal à gauche.

durée de l'expérience. De plus, les deux seuils de correspondance obtenus se situent de part et d'autre du seuil défini par la méthode d'Otsu. Une binarisation des images avec une méthode adaptative n'est donc pas non plus envisageable.

Approche hybride

Pour atteindre les objectifs de précision et d'automatisation que nous nous sommes fixés, la méthode retenue dans notre algorithme combine les deux techniques précédemment décrites.

Le seuillage de l'image du canal de fluorescence par la méthode d'Otsu permet une première approximation du rayon de la goutte, avec une puissance de calcul réduite.

Cette information permet de réduire la gamme de rayon explorée par la transformée de Hough, appliquée dans un second temps au canal en lumière blanche, diminuant grandement le temps de calcul nécessaire ainsi que le risque d'erreur.

Cet algorithme fonctionne de manière autonome et avec une grande fiabilité : il ne demande aucune intervention de l'utilisateur-riche et détecte le bord de la goutte dans plus de 99 % des cas.

1.2.2 Précision de la mesure

La transformée de Hough permet de détecter des cercles se détachant du fond de l'image. L'algorithme est conçu pour détecter la bordure extérieure des cercles.

En lumière blanche, l'interface de la goutte et la phase continue est matérialisée par une bande sombre (figure 30a). En partant du centre de la goutte, le voisinage de l'interface s'accompagne d'un assombrissement progressif, puis par une discontinuité marquée vers une zone de plus forte luminosité.

Ces évolutions sont encore mieux visibles sur le profil d'intensité lumineuse de la goutte, tracé selon son diamètre horizontal et visible en figure 30b.

La transformée de Hough détecte le bord de la goutte au niveau de la zone de plus fort contraste, correspondant à la discontinuité de l'intensité lumineuse sur le bord extérieur de la bande sombre, comme on peut le voir en figure 30b. C'est ce qui la rend plus précise que le seuillage en fluorescence.

Se pose cependant la question de la position réelle de l'interface de la goutte : correspond-elle à cette zone de plus fort contraste?

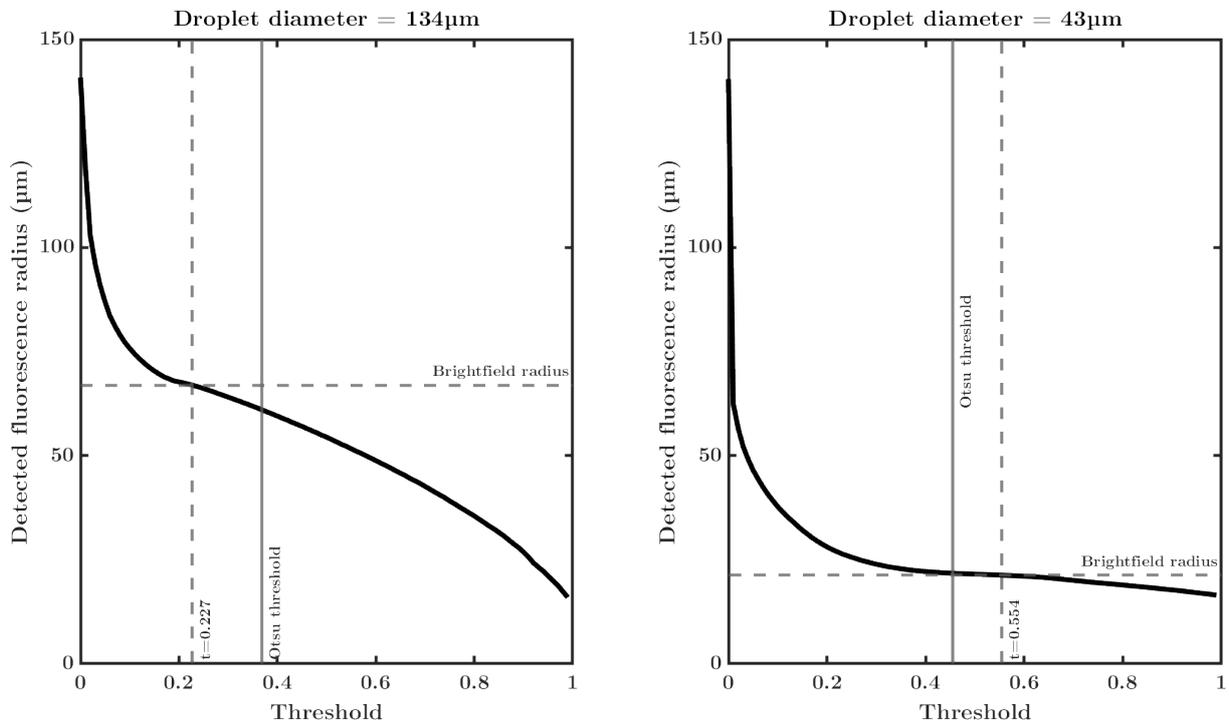


FIG. 29 – Rayon apparent en microscopie de fluorescence en fonction du seuil de binarisation pour deux diamètres différents. La concentration du fluorophore dans la goutte pendant son rétrécissement empêche la définition d'un seuil de binarisation t permettant une estimation correcte du rayon en fluorescence. Pour chaque diamètre, la ligne verticale en pointillés correspond au seuil t auquel le rayon apparent en fluorescence est identique au rayon mesuré en lumière blanche. La ligne verticale continue correspond au seuil adaptatif déterminé par la méthode d'Otsu¹⁶⁶. On constate que ce seuil se situe alternativement au-dessus ou en dessous du seuil de correspondance, montrant ainsi l'inadéquation des méthodes de binarisation adaptatives à notre approche expérimentale

Les variations d'intensité lumineuse au niveau de l'interface de la goutte sont le résultat des phénomènes de réflexion et de diffraction par le bord de la goutte.

Des travaux ont cherché à modéliser la diffraction de la lumière par des objets colloïdaux, puis la propagation du champ diffusé à travers le chemin optique d'un microscope¹⁶⁷. En s'appuyant sur leurs résultats, nous avons réalisé une modélisation numérique de l'image d'une goutte par un dispositif optique aux propriétés voisines du notre. Visible en figure 31, le résultat montre premièrement une bonne adéquation entre le profil simulé et le profil observé expérimentalement (figure 30b), et valide également la pertinence de la détection du rayon par la transformée de Hough.

La comparaison des résultats expérimentaux aux simulations numériques nous permet d'évaluer l'erreur commise sur le rayon de la goutte, qui est indépendante du rayon de la goutte, et de l'ordre de 500 nm. Il nous est difficile d'espérer faire mieux qu'une erreur de l'ordre de la longueur d'onde λ .

1.2.3 Erreur sur le volume

La précision de la mesure du rayon de la goutte est de l'ordre de la longueur d'onde λ .

Le volume de la goutte étant proportionnel à son rayon au cube, l'additivité des variances nous permet d'exprimer l'erreur relative sur le volume comme trois fois l'erreur relative sur le rayon. Cette dernière dépend du rayon de la goutte, en effet nous avons vu que l'erreur de localisation du bord de la goutte est indépendante de son rayon.

Les estimations de l'erreur maximale sur le volume de la goutte, visibles en 4, montrent un effet négligeable pour les gouttes de plus de 100 μm de rayon, mais atteignant 7.5% d'erreur pour les plus petites gouttes, de 20 μm de rayon.

Notre approche permet donc la détection fiable et automatisée du bord des gouttes, ainsi qu'une mesure précise de leur rayon.

Le rétrécissement des gouttes dans la puce présente cependant une autre difficulté : nous avons jusqu'à

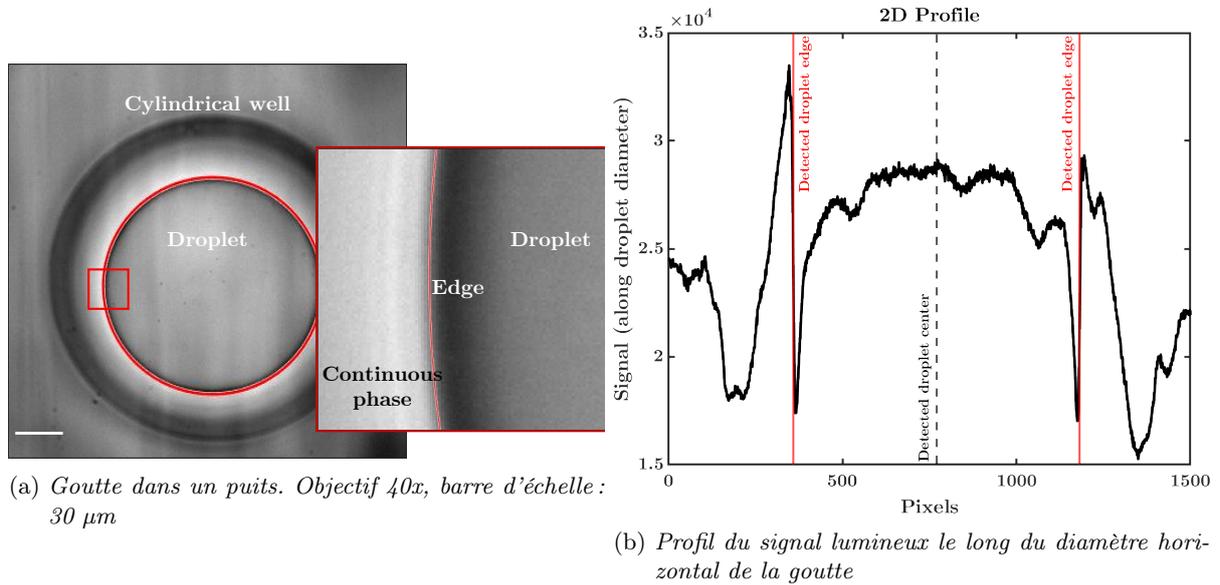


FIG. 30 – En lumière blanche, l'interface apparaît comme une bande sombre. La figure 30a montre une goutte chargée dans un puits, imagée par microscopie optique en lumière blanche. Le cercle rouge correspond à la localisation du bord de la goutte détectée par transformée de Hough. On vérifie sur l'insert et sur le profil du signal en 30b que le bord détecté se situe au point de contraste maximum entre la bande sombre et le fond plus lumineux.

Rayon de la goutte	150 μm	100 μm	50 μm	20 μm
Erreur relative sur le rayon	0.3%	0.5%	1%	2.5%
Erreur relative sur le volume	1%	1.5%	3%	7.5%

TAB. 4 – Erreur relative sur le rayon et sur le volume liée à la détection du bord de la goutte, pour des rayons entre 150 μm et 20 μm

présent considéré des images nettes, avec une mise au point sur l'équateur de la goutte.

La diminution du rayon des gouttes et éventuellement les mouvements de dérive du microscope (cf partie IV, 2.3) entraînent une variation de la position z_e de l'équateur de la goutte.

Pour maintenir la mise au point sur le bord de la goutte, il faut donc recourir à la mise au point automatique (autofocus).

Dans la suite de notre raisonnement, nous détaillerons les performances de l'autofocus logiciel associé à notre système expérimental, ainsi que son impact sur la précision de la mesure du volume.

1.3 Mise au point sur l'équateur de la goutte

Pour mesurer le rayon de la goutte avec le plus de précision possible, la mise au point est faite sur l'équateur de la goutte, qui apparaît alors comme un cercle contrasté. La mise au point est donc faite à $z_e = \frac{r}{2}$, avec z_e la position de l'équateur par rapport au sommet du puits, et r le rayon de la goutte. Lors du rétrécissement de la goutte son rayon diminue, et z_e varie donc également.

Le recours à l'autofocus représente un important gain de temps et de praticité, car il permet de lancer une expérience de plusieurs heures sans avoir à ajuster la mise au point du microscope. Encore faut-il que la mise au point automatique produise un résultat exact.

1.3.1 Autofocus logiciel

Le logiciel ZEN Blue, qui commande notre microscope dispose d'une fonction d'autofocus, qui permet de faire la mise au point sur le bord de la goutte.

Il s'agit bien d'un autofocus logiciel : avant l'acquisition, le microscope va prendre une série d'images à des positions z variées, dans notre cas avec un pas fixe de $\Delta z = 1 \mu\text{m}$.

Pour chaque image, un algorithme calcule un score de mise au point à partir du contraste détecté. La

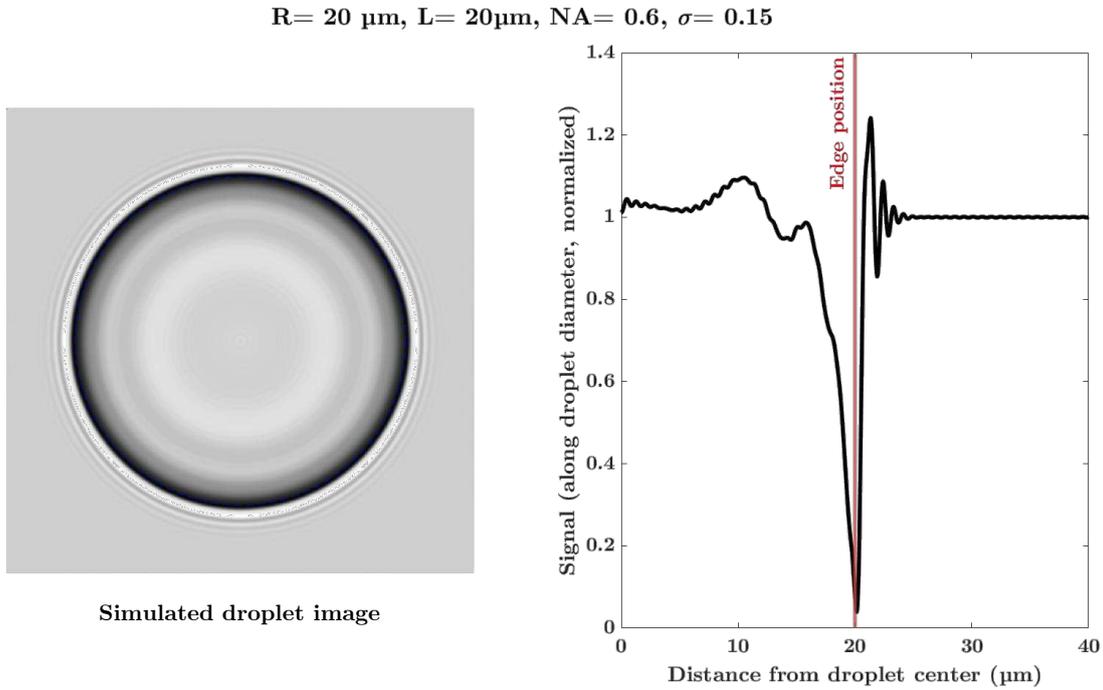


FIG. 31 – Image simulée d’une goutte, et profil du signal lumineux correspondant. Des méthodes numériques¹⁶⁷ permettent de modéliser la propagation à travers le chemin optique d’un microscope du champ diffusé par un objet colloïdal. Ici, l’image simulée correspond à celle d’une goutte de $20 \mu\text{m}$ de rayon observée par un objectif d’ouverture numérique 0.6. Le paramètre σ quantifie la cohérence de la lumière incidente, il a été optimisé pour refléter au mieux nos conditions expérimentales. Sur le profil d’intensité lumineuse, on constate que la zone de contraste maximum, détectée par la transformée de Hough, correspond à λ près à la position réelle du bord de la goutte, représentée par une ligne verticale rouge.

position de l’image avec le meilleur score est retenue pour la mise au point.

Différentes méthodes existent pour calculer ce score, chacune avec des résultats et une vitesse d’exécution variables^{168,169}. Le logiciel ZEN Blue n’étant pas open source, nous ne connaissons pas la ou les méthodes utilisées.

Le choix qui s’offre à nous est le même que pour la détection des bords de la goutte : est-il plus pertinent de faire la mise au point sur le canal de fluorescence ou en lumière blanche? Comme pour la transformée de Hough, en lumière blanche la tâche est rendue plus difficile par la présence du puits : il n’est pas rare que l’autofocus préfère mettre au point sur le cercle très net représenté par le haut du puits que sur le bord de la goutte. Pour éviter cela, il faut définir avec soin la gamme de positions en z accessibles par l’autofocus. Ce réglage doit s’effectuer à la dizaine de μm près, et risque d’être mis en défaut par d’éventuelles dérives de la puce pendant la durée de l’expérience, précédemment évoquées.

En fluorescence, la goutte est le seul objet lumineux dans le champ de vision du microscope. La mise au point ne risque donc pas d’être parasitée par la présence des bords du puits. Historiquement, les algorithmes de mise au point automatiques ont été développés pour l’imagerie en lumière blanche^{170,171}, qui offre un meilleur contraste.

1.3.2 Évaluation de la performance de mise au point

Une goutte a été chargée dans un puits, après que le canal latéral de la puce a été rempli d’eau pour limiter au maximum le rétrécissement.

Le diaphragme d’ouverture du microscope a été ouvert au maximum afin de réduire la profondeur de champ et exacerber ainsi le contraste de mise au point.

La mise au point sur l’équateur de la goutte a été réalisée manuellement puis automatiquement, chaque fois à 10 reprises. Cela nous a permis de définir une position moyenne de mise au point optimale pour chacune des méthodes.

La goutte a ensuite été imagée faisant varier la position z du microscope par incréments de $\Delta z = 5$

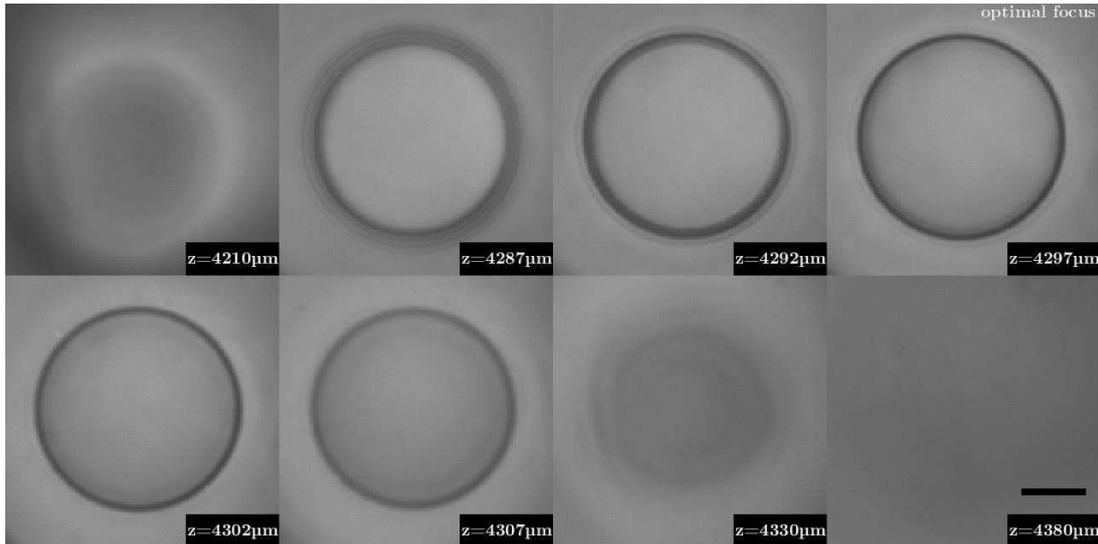


FIG. 32 – Images de la goutte à différentes positions de mise au point z , lumière blanche. La position de mise au point optimale, déterminée en lumière blanche, correspond à une position $z = 4297 \mu\text{m}$ et est représentée en haut à droite.

μm sur une amplitude de $200 \mu\text{m}$ correspondant à la profondeur du puits. Entre $4285 \mu\text{m}$ et $4315 \mu\text{m}$, l'incrément est réduit à $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ pour gagner en précision autour de la position $z = 4297 \mu\text{m}$. Cette position correspond à moins de $0.5 \mu\text{m}$ près aux positions optimales pour les mises au point manuelles et automatiques. Dans la suite de notre raisonnement et sur les différentes figures présentées, il y sera fait référence comme la position de mise au point optimale.

Une partie de ces images est reproduite en figure 32 pour l'imagerie de lumière blanche et en figure 33 pour l'imagerie de fluorescence. On observe déjà que le bord de la goutte est plus facilement distinguable en lumière blanche. Également, l'impact visuel des variations de la position z est plus important.

Pour chaque image de la série, un score de mise au point a ensuite été calculé selon différentes méthodes^{169,172}, pour le canal de lumière blanche et le canal de fluorescence.

Les résultats, visibles en figure 34, confirment la supériorité de la mise au point automatique en lumière blanche. Pour la majorité des méthodes analytiques, on observe un pic à la position de mise au point optimale. Il est important de noter que le second pic, observable à $z \approx 4260 \mu\text{m}$, n'est pas un artefact mais correspond au sommet du puits.

La figure 34b montre un décalage quasi systématique de la qualité de mise au point pour la lumière fluorescence, avec pour conséquence son absence de fiabilité pour la détection de l'équateur de la goutte.

1.3.3 Tolérance de la mise au point

Quelle est l'influence des erreurs de mise au point sur le calcul du rayon de la goutte? Pour chaque image de la série précédemment évoquée, nous avons calculé le rayon apparent de la goutte, en lumière blanche. Le bord de la goutte a été détecté par une transformée de Hough (cf 1.2.1). Les résultats sur toute l'amplitude de positions explorées, visibles en figure 35, montrent une variation quasi-négligeable pour les erreurs de mise au point de $\pm 5 \mu\text{m}$, avec une variation de rayon apparent inférieure à 0.4% , correspondant à une erreur relative sur le volume inférieure à 1.2% .

Cette expérience n'ayant été réalisée que sur une seule goutte, nous ne sommes pas en mesure de dire si l'erreur absolue liée à la mise au point dépend ou non du rayon de la goutte.

La goutte imagée lors de cette expérience étant de rayon plus faible ($R = 16 \mu\text{m}$) que la limite inférieure ($R = 20 \mu\text{m}$) définie pour notre dispositif, alors si l'erreur absolue ne dépend pas de la taille de la goutte l'erreur relative sur le volume ne pourra qu'être inférieure à 1.2% .

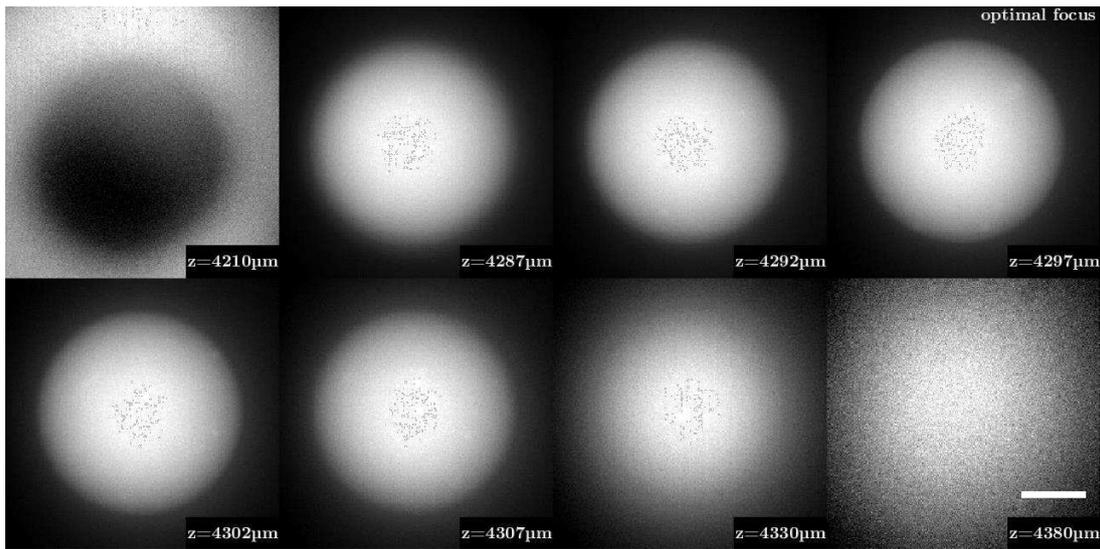


FIG. 33 – Images de la goutte à différentes positions de mise au point z , fluorescence. La position de mise au point optimale, déterminée manuellement en lumière blanche, correspond à une position $z = 4297 \mu\text{m}$ et est représentée en haut à droite.

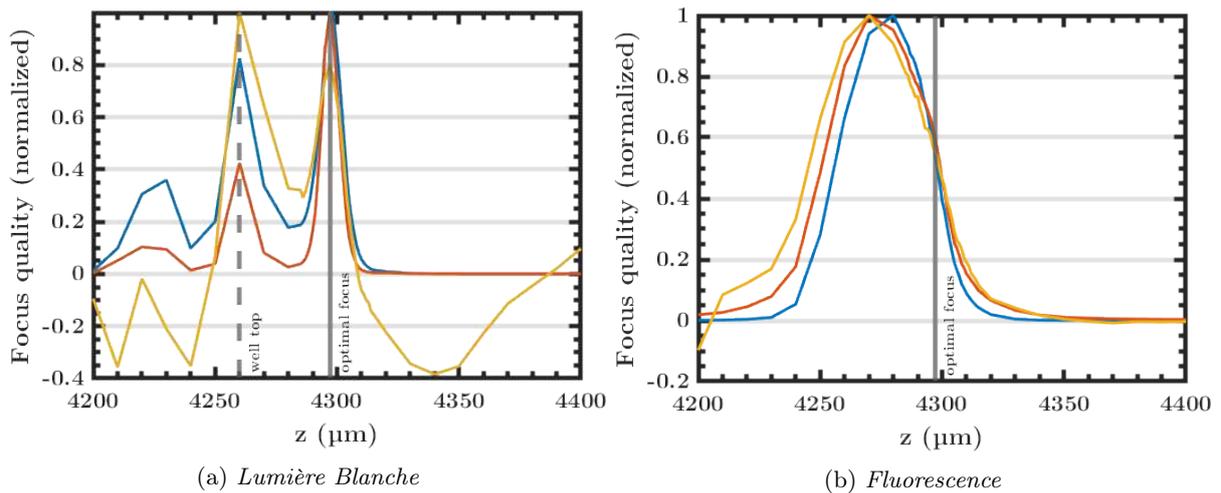


FIG. 34 – Scores de mise au point pour différentes méthodes analytiques. Les logiciels de mise au point automatique calculent un score de focus par image, et considèrent que la position de mise au point optimale correspond à l'image avec le score maximal. Plusieurs fonctions existent¹⁶⁹, nous avons représenté ici les plus pertinentes. en lumière blanche, on constate un pic marqué à la position z correspondant à la position de mise au point idéale déterminée manuellement, $z = 4297 \mu\text{m}$. Le second pic autour de $4260 \mu\text{m}$ correspond à la mise au point sur le bord supérieur du puits, et n'est donc pas un artefact logiciel. Sur les images de fluorescence, le score maximum est systématiquement attribué à plus de $20 \mu\text{m}$ de la position réelle. Courbes générées à l'aide du code de Saïd Pertuz¹⁷²

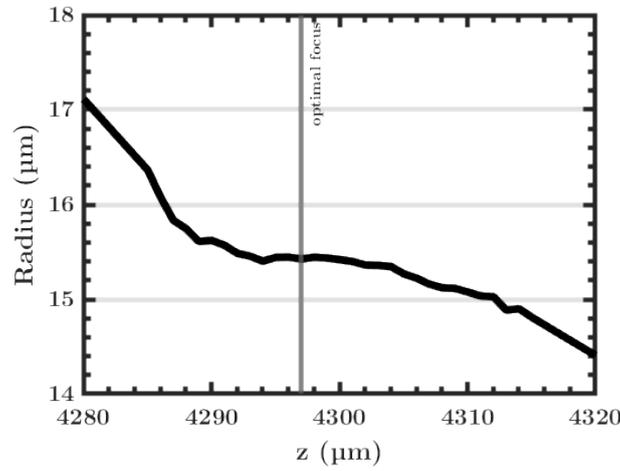


FIG. 35 – Rayon apparent de la goutte estimé par transformée de Hough pour différentes positions de mise au point, en lumière blanche. Au voisinage ($\pm 5 \mu\text{m}$) de la position optimale, l'erreur relative maximale commise sur le rayon de la goutte est de 0.4%, soit une erreur de 1.2% sur le volume.

1.3.4 Répétabilité et erreur sur le volume

Enfin, nous avons cherché à évaluer la répétabilité de la mise au point automatique. Pour ce faire, nous avons comparé 10 répétitions successives d'autofocus logiciel avec 10 répétitions de mise au point manuelle (cf tableau 5).

Les deux techniques donnent des valeurs moyennes voisines, mais la mise au point automatique est presque 15 fois plus précise.

Rappelons cependant que cette mesure a été réalisée en conditions réelles, avec une goutte chargée dans un puits. Même avec le canal latéral rempli d'eau, la goutte d'eau subit un rétrécissement lié à la per-vaporation de l'eau dans le PDMS et à la solubilité de l'eau dans la phase continue, ce qui entraîne un déplacement faible mais continu de l'équateur de la goutte.

Pour limiter l'influence de ce déplacement sur la pertinence de nos résultats, nous avons veillé à ce que l'intervalle temporel entre deux images soit le même en mise au point manuelle ou en mise au point automatique. Les expériences en mise au point automatique ayant été réalisées après celles en mise au point manuelle, le décalage de $0.7 \mu\text{m}$ entre les positions de mise au point moyennes va dans le sens d'un rétrécissement de la goutte. Cette hypothèse est confirmée par l'évolution de la valeur moyenne du rayon calculé de la goutte.

Malgré une plus grande précision en z , la mise au point automatique entraîne une variance légèrement plus importante pour le rayon de la goutte.

Les expériences que nous avons réalisées nous ont permis de vérifier la pertinence de la mise au point automatique pour notre expérience. L'autofocus fournit un gain de praticité et de précision, et la variance de la mise au point entraîne une erreur largement négligeable sur la mesure du volume.

Mise au point	n	$\langle z \rangle$ (μm)	$\sigma(z)$ (μm)	$\langle \hat{r} \rangle$ (μm)	$\sigma(\hat{r})$ (μm)	$\delta(\hat{V})$
Manuelle	10	4297.4	2.39	15.88	0.0857	1.6%
Automatique	10	4296.7	0.167	16.14	0.0541	1.0%

TAB. 5 – Distribution des positions de mise au point z selon la méthode retenue, et erreur relative commise sur la mesure du volume. La mise au point automatique est de loin la plus précise, avec un écart-type 20 fois plus faible pour la position de mise au point. La tolérance de la détection du rayon réduit l'écart pour l'erreur relative sur le volume mesuré. Les expériences de mise au point automatiques ayant été réalisées avant les expériences de mise au point manuelle, le léger décalage entre les positions $\langle z \rangle$ et les rayons mesurés $\langle \hat{r} \rangle$ pour les deux méthodes est probablement dû à un léger rétrécissement de la goutte

1.4 Erreur sur la concentration

Un des intérêts de notre système expérimental est la possibilité de tracer l'intégralité de la courbe de viscosité en partant d'une seule solution diluée. La contrepartie de cette simplicité c'est un ensemble de nouvelles sources d'erreurs potentielles et d'incertitude se propageant pendant la durée de l'expérience. La déformation des gouttes (1.1.3), la mesure du rayon de la goutte (1.2) et la mise au point automatique (1.3) produisent individuellement des erreurs insignifiantes sur le volume. A un instant donné, le volume de la goutte peut être mesuré avec une erreur relative δ telle que :

$$\delta_V = \delta_V^s + \delta_V^e + \delta_V^f \delta(V) \leq 5\% \quad (\text{III.20})$$

$$(\text{III.21})$$

Avec δ_s , δ_e , δ_f les erreurs relatives sur le volume causées par la non-sphéricité des gouttes, la détection du bord de la goutte et la mise au point respectivement.

L'erreur relative sur le volume est donc inférieure à 5% dans la quasi-totalité des cas (sauf pour les gouttes de rayon inférieur à 40 μm , pour lesquelles l'erreur liée à la détection du bord peut dépasser les 5%).

A un instant t , la concentration dans la goutte s'exprime selon :

$$c = \frac{m}{V} \quad (\text{III.22})$$

m est la masse de soluté présente dans la goutte. On a vu en partie 3.1 que cette masse était constante, mais sa valeur n'est pas connue. La seule grandeur à laquelle nous avons accès, c'est la concentration de la solution initiale injectée dans la puce, c_0 .

On exprime alors la concentration selon :

$$c = c_0 \frac{V_0}{V} \quad (\text{III.23})$$

V_0 et V sont mesurés de la même manière, et sont donc sujettes aux mêmes erreurs éventuelles. On néglige ici l'erreur relative sur la concentration initiale c_0 . La goutte étant imagée immédiatement après sa production, on fait l'hypothèse qu'elle ne subit aucun rétrécissement. La préparation de la solution initiale entraîne elle-même une incertitude additionnelle, mais cette dernière est indépendante de notre processus expérimental et n'est donc pas prise en considération. Nous verrons cependant à la fin de cette partie que la capacité de notre dispositif à concentrer le soluté dans la puce limite grandement l'incertitude sur la composition de la concentration initiale.

L'erreur relative sur la concentration s'exprime alors selon :

$$\delta(c) = \delta\left(\frac{V_0}{V}\right) = \delta(V_0) + \delta(V) \quad (\text{III.24})$$

$$\delta(c) \leq 10\% \quad (\text{III.25})$$

Cette estimation est prudente, car nous avons retenu à chaque fois l'erreur maximale quel que soit le rayon de la goutte. On peut considérer sans trop de risque que la mesure du volume initial se fait sur une goutte de grande taille ($R \approx 150 \mu\text{m}$), ce qui réduit grandement l'erreur liée à la détection du bord de la goutte, et augmente celle liée à la non-sphéricité des gouttes. A l'inverse, pour une goutte de petite taille l'erreur liée à la détection du bord est maximisée alors que celle liée à la forme des gouttes peut être négligée.

Chapitre 2

Systeme optique

Dans cette partie nous avons décrit le suivi du volume par mesure optique de son rayon. Dans ce chapitre nous décrirons le montage expérimental permettant le suivi optique des gouttes, ainsi que le protocole automatisé permettant le suivi du volume des gouttes et la mesure régulière de la viscosité.

2.1 Montage expérimental

La puce est placée sur un microscope inversé : l'objectif se situe en dessous de l'échantillon et la source de lumière blanche au-dessus. Ce type de montage est particulièrement utile en microfluidique, où les canaux d'une puce sont en général situés dans sa partie inférieure. Dans notre cas, une épaisseur de PDMS d'environ 1cm est collée sur une lame de verre épaisse d'1mm. Les objectifs de microscopes, surtout à fort grossissement, ont une distance de travail relativement faible, de l'ordre du millimètre. Il est donc préférable de positionner l'objectif sous la puce, pour éviter que l'épaisseur de PDMS ne se situe entre l'objectif et les canaux.

L'acquisition des trajectoires est réalisée via un objectif LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr. Il s'agit d'un objectif conçu pour travailler avec des échantillons épais, et donc adapté à la microfluidique.

Il possède en effet une grande distance de travail (2.9 mm), tout en conservant une ouverture numérique de 0.6.

Ce microscope est équipé d'une caméra CMOS (ORCA-Flash 4.0 LT, Hamamatsu), possédant un capteur 2048 x 2048 pixels et capable d'imager à 30 images par seconde en pleine résolution et jusqu'à 25000 images par seconde en résolution réduite¹⁷³.

En plus d'une LED permettant un éclairage en lumière blanche, le microscope est équipé d'un système de 4 LED et de filtres passe-bande associés permettant la microscopie de fluorescence (ZEISS Colibri).

Le microscope et la caméra sont contrôlés par une station de travail (Dell Precision Tower 5810) via le logiciel ZEN Blue (Carl Zeiss). Le transfert de données se fait par des liaisons USB 3.0.

Afin de limiter au maximum les vibrations du microscope, le montage est placé sur une table optique à isolation passive (PFP52502, Thorlabs).

2.2 Automatisation

L'acquisition des images est automatisée via le logiciel ZEN Blue qui contrôle le microscope. Décrit ci-dessous, le processus d'acquisition est également reproduit schématiquement en figure 37. Trois blocs d'acquisition distincts sont exécutés successivement :

- Une photographie multi-canaux de la goutte, en lumière blanche et en fluorescence rouge ($\lambda_{ex} = 538 - 562$ nm, $\lambda_{em} = 570 - 640$ nm)
- Un time-lapse en fluorescence verte (FITC, $\lambda_{ex} = 450 - 490$ nm, $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm) de 1000 images, avec un temps d'exposition de $\Delta t = 100$ ms. L'acquisition se fait en continu, la fréquence d'acquisition est donc de 10 Hz
- Une photographie selon la même méthode que la première acquisition

Le time-lapse permet la mesure de la viscosité. Les deux photographies en amont et en aval permettent de mesurer le volume de la goutte, et donc la concentration en soluté, avant et après la mesure de la viscosité. Avant les blocs 1 et 3, le microscope réalise une mise au point automatique en lumière blanche sur l'équateur de la goutte. Pour être sûr de suivre les traceurs situés au plus près de l'équateur de la

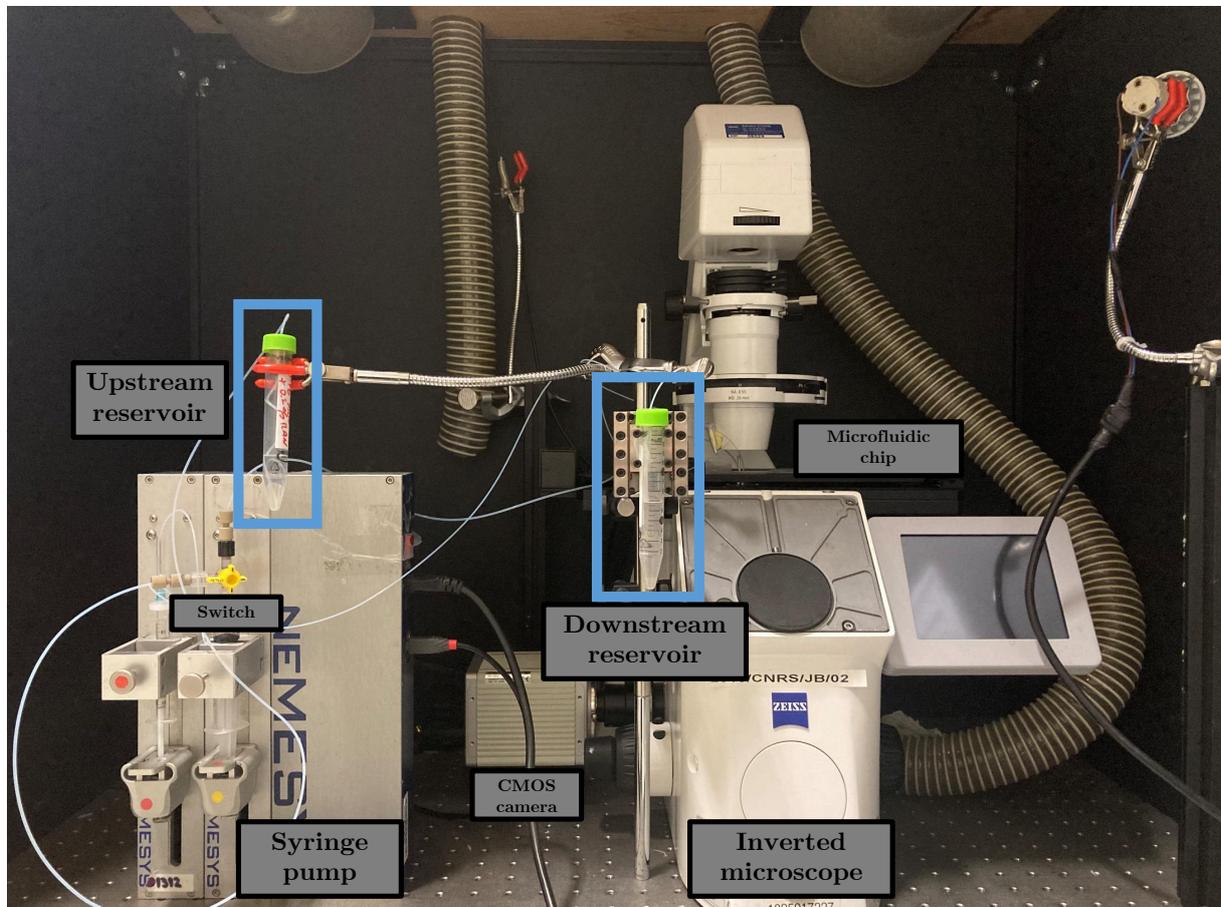


FIG. 36 – Photographie du montage expérimental. La puce microfluidique est placée sur un microscope inversé (Axio Observer 7, Carl Zeiss) et imagée à l'aide d'un objectif à air (LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr) ainsi que d'une caméra CMOS (ORCA-Flash 4.0 LT, Hamamatsu). Un pousse-seringue (Nemesys, Cetoni) permet l'injection des phases continues et dispersées. Une valve 3 voies permet de basculer la gestion de l'écoulement de phase continue sur le système de contrôle gravitationnel, à l'aide des réservoirs d'entrée et de sortie de hauteur ajustable. Non-visible sur cette photo : la pompe péristaltique imposant le flux d'air. Échelle : le pousse-seringue Nemesys en bas à gauche de l'image mesure 30 cm de hauteur.

goutte, la position de l'objectif du microscope ne varie pas entre les blocs 1 et 2.

Ces trois blocs d'acquisition sont répétés, avec éventuellement un délai entre chaque boucle, jusqu'à la fin de l'expérience.

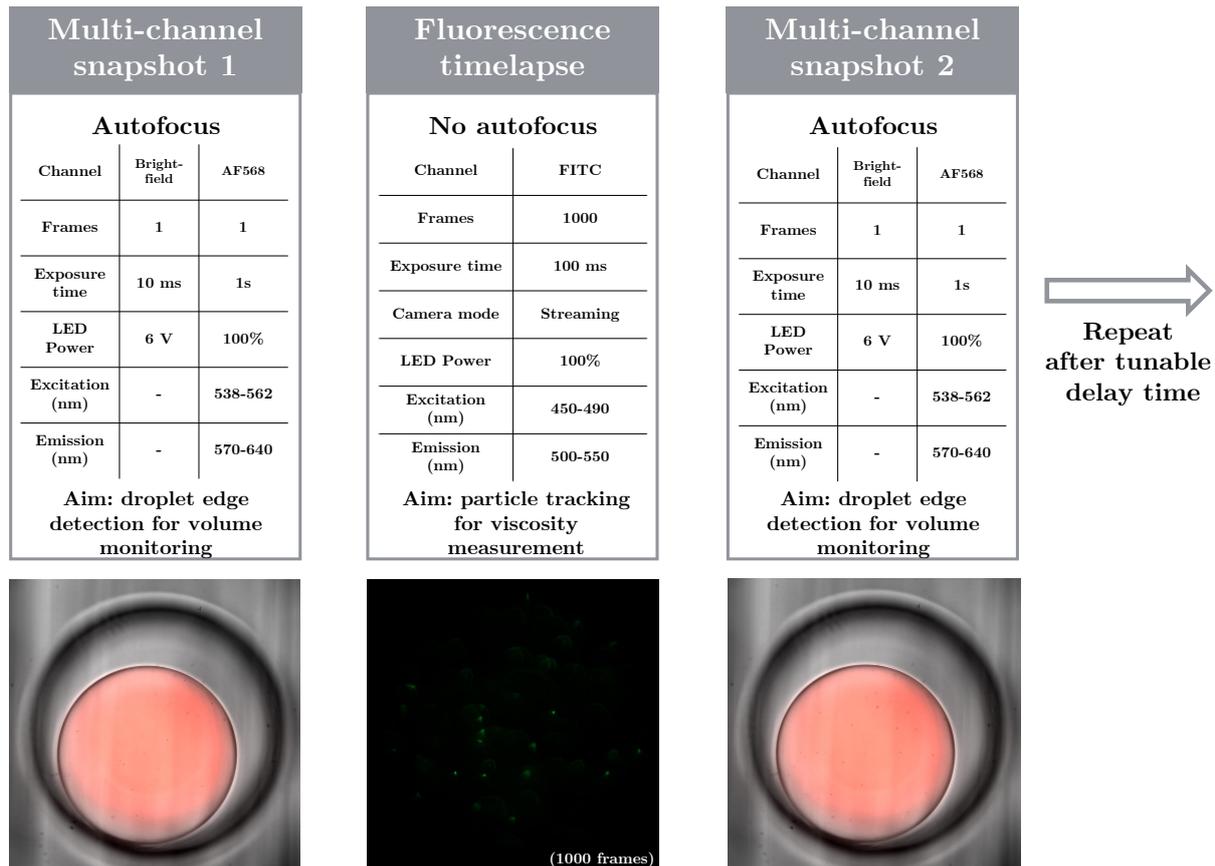


FIG. 37 – Processus automatisé d'acquisition des image. Chacun des trois blocs correspond à une acquisition automatisée, réalisée au moyen du logiciel ZEN Blue. L'ensemble est répétable, avec un délai d'attente réglable.

Le premier et le dernier bloc fournissent des images permettant la détection du bord de la goutte, et ainsi le suivi de son volume. Placés de part et d'autre du bloc central, ils permettent de mesurer les variations de volume pendant la mesure de la viscosité. (AF568: Alexa Fluor 568)

Le bloc central fournit un timelapse de 1000 images en fluorescence, permettant le suivi des particules, et ainsi la mesure de la viscosité.

Chapitre 3

Concentration et fraction massiques

Nous avons établi que la mesure du rayon de la goutte pendant son rétrécissement permettait un suivi de son volume, avec une précision suffisante.

Intéressons-nous maintenant à la composition de la goutte.

Son rétrécissement est le résultat de la diffusion d'une certaine masse d'eau. Principalement par pervaporation, comme nous l'avons vu en partie II, 3.1, mais également dans une moindre mesure par solubilisation de l'eau dans la phase continue.

Dans un premier temps, nous vérifierons que l'eau est la seule espèce à diffuser hors de la goutte, et que la masse de soluté qui s'y trouve peut être considéré comme constant.

Dans un second temps, nous nous intéresserons aux différentes manières d'exprimer la composition de la goutte, selon qu'on raisonne en termes de concentration massique, de fraction massique ou de fraction volumique. Nous verrons qu'à haute concentration ces grandeurs ne sont pas équivalentes. Nous introduirons la notion de volume partiel spécifique, nous permettant de considérer nos résultats selon l'une ou l'autre des conventions.

3.1 Conservation de la masse de soluté

C'est la première hypothèse sur laquelle repose notre raisonnement : on considère que la masse de soluté dans la goutte reste constante durant tout le processus de rétrécissement. Comme vu en partie II au chapitre 3, l'eau pervapore à travers le PDMS, qui agit comme une membrane semi-perméable.

Le PDMS n'est pas perméable aux protéines, aux sels ou aux polymères¹³⁷, on peut donc considérer qu'il n'y a pas de diffusion de soluté hors des canaux de la puce.

Le transport moléculaire au sein d'une émulsion microfluidique a été étudié en détail. Une des utilisations principales des émulsions microfluidiques est en effet leur capacité à constituer individuellement des micro-réacteurs indépendants.

Les conclusions de ces travaux¹⁶², que nous reprenons ici, indiquent que le transport de solutés aqueux est négligeable dans le cas d'une phase continue fluorée, comme le Novec 7500 que nous utilisons.

Cependant, les molécules de surfactant peuvent solubiliser certains solutés de petite taille, via des structures de type micelles ou vésicules.

Cet aspect est cependant virtuellement inexistant au sein de notre puce : le choix d'un émulsificateur à gradient de confinement permet de diviser par 10 la concentration de surfactant nécessaire pour une production de gouttes efficace. Cette observation empirique se justifie : les gouttes étant produites en quantités plus réduites et à une fréquence jusqu'à 1000 fois inférieure, la diffusion du surfactant n'est plus un facteur limitant.

Le piégeage des gouttes dans des puits cylindriques rend également possible le rinçage de la puce par de l'huile fluorée pure ou avec une concentration en surfactant inférieure à la concentration micellaire critique (CMC). Dans ces conditions, l'absence de micelles ou de vésicules élimine tout risque de transport micellaire.

Il nous est par conséquent possible d'écarter tout risque de transport quantitatif de soluté hors des gouttes, et ainsi de valider l'hypothèse de la conservation de la masse de soluté durant toute la durée de l'expérience.

3.2 Volume des mélanges

3.2.1 Définitions

On considère ici le mélange binaire d'un soluté et d'un solvant, dans une goutte microfluidique. Dans notre cas, le soluté est le composé étudié (protéines, sucrose, polymère, etc) et le solvant est l'eau.

On ne considère pas d'éventuels composants additionnels (sels, tampons, etc) mais ce raisonnement reste valable pour un mélange à n composants.

Dans la suite du raisonnement, les indices s et S feront référence au soluté et au solvant respectivement. Étudier la composition de la goutte, c'est comparer la quantité de soluté à la quantité de solvant.

Quel sens donner au terme quantité? Selon qu'on parle de volume, de masse ou de quantité de matière, il est possible de définir différentes grandeurs.

En laissant de côté la quantité de matière, on peut déjà définir deux grandeurs.

Concentration massique

La concentration massique d'un soluté est le rapport de la masse de soluté par rapport au volume total de la solution.

En considérant une goutte de volume V à un instant t , la concentration massique c au sein de la goutte s'exprime selon :

$$c(t) = \frac{m_s(t)}{V(t)} \quad (\text{III.26})$$

Par convention, on parle de concentration du soluté dans le solvant et non l'inverse. Les concentrations seront donc notées sans indice s mais concernent le soluté.

La définition stricte de la concentration est une quantité de matière par volume. On ne considère ici que la concentration massique, qui correspond à une masse par volume. Le raisonnement suivant ne faisant jamais référence à des quantités de matière, le terme concentration sera utilisé et fait référence à la concentration massique.

On a vu en section 3.1 que la masse de soluté dans la goutte était constante tout au long de l'expérience. On note donc $m_s(t) = m_s$, et la concentration peut s'exprimer selon :

$$c(t) = \frac{m_s}{V(t)} = \frac{m_s}{V(t)} \frac{V_0}{V_0} = c_0 \frac{V_0}{V(t)} \quad (\text{III.27})$$

c_0 et V_0 sont respectivement la concentration massique et le volume de la goutte à l'instant initial.

On considère que c_0 correspond à la concentration de la solution initiale injectée dans la puce. Cette concentration est connue. On peut donc, en ne mesurant que le volume de la goutte tout au long de l'expérience, connaître la concentration en soluté.

Si cette définition de la concentration est la plus élémentaire, elle n'est pas la plus utilisée.

Expérimentalement, il est en effet plus aisé et plus précis de mesurer une masse qu'un volume.

Dans la majorité des domaines, notamment l'étude des solutions de protéines, la convention retenue est celle de la fraction massique.

Fraction massique

La fraction massique ne considère plus le volume de la solution étudiée, mais uniquement les masses de soluté et de solvant qui la composent. Elle est définie selon :

$$c^{w/w} = \frac{m_s}{m_S + m_s} \quad (\text{III.28})$$

La fraction massique est parfois appelée en anglais *weight / weight concentration*, d'où l'indice w/w .

3.2.2 Volume partiel spécifique

S'il est nécessaire de distinguer ces deux définitions, c'est parce qu'elles ne sont pas équivalentes. Le volume d'un liquide dépend des interactions entre les molécules qui le composent. Lors de la dissolution, les molécules de soluté s'entourent d'une couche de solvation (appelée couche d'hydratation dans le cas d'une solution aqueuse), composée de molécules de solvant dont le comportement diffère de celui du solvant en absence de soluté. La structure et l'épaisseur de cette couche varient en fonction de la paire

soluté-solvant considérée.

Il n'y a donc pas conservation des volumes dans le cas général :

$$V_T \neq V_s + V_S \quad (\text{III.29})$$

La conservation de la masse est en revanche toujours vérifiée :

$$m_T = m_s + m_S \quad (\text{III.30})$$

Par définition, la fraction massique est donc indépendante de tout problème de variation du volume lors du mélange.

Comment dans ce cas trouver une relation entre la concentration massique et la fraction massique?

On introduit pour ce faire la notion de volume spécifique, détaillée dans la suite de notre raisonnement.

Volume spécifique

Le volume spécifique est une notion thermodynamique. Pour une substance donnée il correspond au ratio du volume sur la masse, et correspond à l'inverse de la masse volumique selon :

$$\nu = \frac{V}{m} = \frac{1}{\rho} \quad (\text{III.31})$$

Le volume spécifique s'exprime en $\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$.

Volume partiel spécifique

Dans un mélange de i composants, le volume partiel spécifique du composant i , noté \bar{v}_i , est défini comme la variation du volume total du mélange engendrée par l'ajout d'une masse infinitésimale de i , tous les autres paramètres restant inchangés :

$$\bar{v}_i = \left(\frac{\partial V}{\partial m_i} \right)_{T,P,m_j (j \neq i)} \quad (\text{III.32})$$

Pour un mélange binaire, on a alors :

$$V = \bar{v}_1 m_1 + \bar{v}_2 m_2 \quad (\text{III.33})$$

avec

$$\bar{v}_1 = \left(\frac{\partial V}{\partial m_1} \right)_{T,P,m_2}, \bar{v}_2 = \left(\frac{\partial V}{\partial m_2} \right)_{T,P,m_1} \quad (\text{III.34})$$

les volumes partiels spécifique du solvant et du soluté respectivement.

Le volume partiel spécifique d'un composant dépend de facteurs extérieurs tels que la température et la pression, mais aussi de la composition du mélange. On a vu précédemment que l'origine microscopique du volume partiel spécifique est la réorganisation des molécules due à des interactions entre composants. La nature et la résultante de ces interactions ne sera pas la même selon les proportions des composants.

Volume partiel spécifique apparent

Considérons à présent un mélange binaire de type soluté-solvant. Les relations (III.34) et (III.33) restent valables.

On introduit pour le soluté la notion de volume partiel spécifique apparent, noté ϕ et défini selon :

$$V = \nu_S m_S + \phi_s m_s \quad (\text{III.35})$$

Ici, ν_S correspond au volume spécifique du solvant, défini par la relation (III.31).

Par rapport à la relation (III.33), on voit ici que le problème a été réduit à une dimension. En effet ν_S ne dépend pas de la composition du mélange, contrairement à \bar{v}_S .

Lorsqu'on considère un mélange soluté-solvant, on peut faire l'hypothèse que les molécules de solvant seront toujours très majoritaires par rapport aux molécules de soluté.

Cette hypothèse est aisément vérifiée aux faibles fractions massiques, ou lorsque le soluté est de taille bien supérieure à celle du solvant. C'est le cas des solutions de sucrose ($M_w = 342 \text{ Da}$, quasiment 20 fois

plus lourd que l'eau), mais surtout pour les solutions aqueuses de macromolécules.

En effet la BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumine de sérum bovin), une protéine globulaire typique, a une masse moléculaire $M_w = 66.5$ kDa. Pour une solution de fraction massique 50% en BSA, déjà très concentrée, il y a une molécule de BSA pour 3694 molécules d'eau.

Dans ces cas là, on considère que le volume partiel spécifique de solvant ne varie pas en fonction de la fraction massique de soluté, et on vérifie les approximations suivantes :

$$\overline{v_S} \approx \nu_S \Rightarrow \overline{v_s} \approx \phi_s \quad (\text{III.36})$$

Pour les macromolécules, et pour les protéines en particulier, l'approximation (III.36) est valide sur toute la gamme de fractions massiques étudiées, et c'est le volume partiel spécifique apparent qui est communément utilisé.

Dans la suite de notre raisonnement, le volume partiel spécifique apparent ne concerne que le soluté et sera donc noté ϕ . De même, le volume spécifique du solvant sera noté ν .

La relation (III.35) nous permet donc de déterminer le volume total de la solution en fonction de la masse de ses constituants, et ainsi de passer de la concentration à la fraction massique.

Encore faut-il connaître la valeur de ϕ , qui a priori dépend de la composition du mélange.

Fort heureusement, on verra dans les paragraphes suivants que le volume partiel spécifique apparent des solutés courants est tabulé, et qu'il est indépendant de la concentration.

On verra également que pour des protéines distinctes les variations de ϕ sont faibles, voire insignifiantes au sein de groupes étendus.

3.2.3 Tabulation du volume partiel spécifique apparent

Comment déterminer le volume partiel spécifique apparent d'un soluté?

En divisant la relation (III.33) par la masse totale m de la solution, on obtient :

$$\frac{1}{\rho} = \nu(1-x) + \phi x \quad (\text{III.37})$$

avec x la fraction massique de soluté et ρ la masse volumique de la solution.

On peut alors exprimer ϕ en fonction de ρ et de ρ_S , les densités de la solution et du solvant pur respectivement, selon :

$$\phi = \frac{\rho_S - \rho}{x\rho\rho_S} + \frac{1}{\rho_S} \quad (\text{III.38})$$

Pour une fraction massique donnée, connaître la masse volumique du mélange revient à connaître le volume partiel spécifique apparent du soluté, et inversement.

Pour la majorité des solutés courants, la densité des mélanges a été mesurée avec précision, ce qui nous donne accès à une tabulation des volumes partiels spécifiques.

Volume partiel spécifique apparent du sucrose

Le sucrose est très répandu dans l'industrie agro-alimentaire, et la densité des solutions aqueuses qu'il forme a été mesurée avec précision pour différentes fractions volumiques et différentes températures au cours de précédents travaux^{1,2}.

Pour des solutions aqueuses de sucrose à 25°C, les variations du volume partiel spécifique sont négligeables pour notre application (cf tableau 6). Cela fait du sucrose le candidat idéal pour la validation de notre protocole expérimental (cf partie V, 3) : le volume partiel spécifique apparent du sucrose pouvant être considéré constant, on peut calculer la fraction massique de sucrose dans la goutte à chaque instant (cf 3.3.1).

Volume partiel spécifique des protéines

Pour les protéines ou plus généralement les macromolécules, la connaissance du volume partiel est également importante. La masse moléculaire des protéines est le plus souvent déterminée par ultracentrifugation. Ce qui est mesuré dans ce cas, c'est la poussée d'Archimède subie par la protéine lors de la centrifugation¹⁷⁴. La connaissance du volume spécifique est indispensable pour ensuite faire le lien avec la masse de la molécule.

Des caractérisations systématiques¹⁷⁴ ont été effectuées pour un grand nombre de protéines. Elle montrent une relativement faible variation des volumes spécifiques, l'immense majorité ayant un volume spécifique

Fraction massique (%)	Volume partiel spécifique molaire (mL.mol ⁻¹)	Volume partiel spécifique massique (mL.g ⁻¹)	Variation relative (%)
→ 0	211.75	0.61862	0
13.082	211.43	0.61768	-0.15
15.670	211.50	0.61789	-0.12
16.913	211.48	0.61783	-0.13
24.713	211.49	0.61786	-0.12
28.404	211.52	0.61794	-0.11
51.433	211.61	0.61821	-0.07
55.372	211.54	0.61800	-0.10

TAB. 6 – Volume spécifique du sucrose à différentes fractions massiques^{1,2}

compris entre 0.60cm³.g⁻¹ et 0.75 cm³.g⁻¹. Plus intéressant encore, au sein d'un même groupe de protéines ayant une structure similaire, les valeurs sont encore plus resserrées. Pour les anticorps par exemple, la valeur $\phi = 0.73$ cm³.g⁻¹ est le plus souvent retenue¹⁷⁵.

La concentration d'une protéine donnée peut avoir une influence sur son volume partiel spécifique, mais cette influence est le plus souvent négligeable. Pour reprendre l'exemple des anticorps monoclonaux, aucune variation significative n'est relevée pour des concentrations entre 1 et 350 mg.cm⁻³¹⁷⁴. Enfin, des facteurs tiers (concentration en autre solutés, pH, température) influent sur le volume partiel spécifique d'une protéine donnée, mais encore une fois avec un impact souvent négligeable.

3.3 Fraction massique dans la goutte

Nous avons défini la notion de volume partiel spécifique, permettant de relier concentration et fraction massiques entre elles.

Nous avons également établi que pour les protéines, et plus généralement pour les solutés étudiés au cours de ces travaux, le volume partiel spécifique était une grandeur connue, dont les variations sur la gamme de concentration explorée peuvent être négligées.

La spécificité de notre dispositif expérimental nous impose de suivre le volume de la goutte pour en déduire la composition, selon un raisonnement en concentration massique donc.

La connaissance du volume partiel spécifique et sa constance sur la gamme de concentration explorée nous permettent de raisonner en concentration massique ou en fraction massique selon la convention retenue : il nous est possible de préparer un échantillon de fraction massique connue et d'en déduire sa concentration massique, puis de suivre l'évolution de sa concentration massique à partir du suivi de son volume, et enfin de convertir ces valeurs de concentration en fractions massiques si nécessaire.

Dans cette section, nous détaillerons le calcul permettant cette conversion, et discuterons de l'influence de la non prise en compte du volume partiel spécifique sur les résultats expérimentaux.

3.3.1 Calcul de la fraction massique

Considérons une goutte de volume initial V_0 , produite à partir d'une solution initiale de fraction massique $c_0^{w/w}$, définie comme :

$$c_0^{w/w} = \frac{m_s}{m_S(0) + m_s} \quad (\text{III.39})$$

Le volume initial de la goutte s'exprime selon :

$$V_0 = \nu m_S(0) + \phi m_s \quad (\text{III.40})$$

Ce qui nous permet d'écrire la concentration initiale de la solution selon :

$$c_0 = \frac{m_s}{\nu m_S(0) + \phi m_s} \quad (\text{III.41})$$

Plaçons nous à présent à un instant t . La goutte ayant rétréci, son volume peut s'écrire comme :

$$V(t) = \frac{V_0}{r(t)} \quad (\text{III.42})$$

avec

$$r(t) \in [1, \infty]$$

le facteur de rétrécissement de la goutte.

On est toujours dans l'hypothèse d'une conservation de la masse de soluté. La goutte contient donc la même masse m_s de soluté qu'au début de l'expérience. En revanche la quantité d'eau a diminué, et on a $m_S(t) < m_S(0)$. Comme on fait l'hypothèse d'un volume partiel spécifique constant, on peut écrire :

$$V(t) = \nu m_S(t) + \phi m_s \quad (\text{III.43})$$

En combinant les équations (III.40), (III.42) et (III.43) on peut exprimer $m_S(t)$ selon :

$$m_S(t) = \frac{\frac{\nu m_S(0) + \phi m_s}{r(t)} - \phi m_s}{\nu} \quad (\text{III.44})$$

En reprenant l'équation (III), on peut exprimer la concentration massique selon :

$$c(t) = \frac{m_s}{\frac{\nu m_S(0) + \phi m_s}{r(t)} - \phi m_s + \phi m_s} = r(t) \frac{m_s}{\nu m_S(0) + \phi m_s} \quad (\text{III.45})$$

On retrouve alors la relation (III.27) :

$$c(t) = r(t)c_0$$

Enfin, la fraction massique s'écrit selon :

$$c^{w/w}(t) = \frac{m_s}{m_S(t) + m_s} = \frac{m_s}{\frac{\nu m_S(0) + \phi m_s}{r(t)} - \phi m_s + m_s} \quad (\text{III.46})$$

Dans le cas d'une solution aqueuse, on considère $\nu = 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. La concentration massique s'exprime alors selon :

$$c^{w/w}(t) = \frac{m_s}{\frac{m_S(0) + \phi m_s}{r(t)} + (1 - \phi)m_s}$$

$$c^{w/w}(t) = \frac{r(t)m_s}{m_S(0) + [\phi + (1 - \phi)r(t)]m_s} \quad (\text{III.47})$$

La relation (III.47) fait intervenir $m_S(0)$ et m_s , les masses de solvant et de soluté initialement présentes dans la goutte. Or ces masses nous sont inconnues, car seule la fraction massique initiale de soluté nous est connue, pas les masses individuelles.

Cependant cette relation peut être appliquée à une goutte de n'importe quelle taille sans perte de généralité. On peut donc l'appliquer en prenant pour $m_S(0)$ et m_s les masses mesurées lors de la préparation de la solution initiale.

Dans le cas d'un volume partiel spécifique $\phi = 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, on retrouve une relation de proportionnalité entre la fraction massique $c^{w/w}$ et la fraction massique initiale $c_0^{w/w}$, similaire à la relation (III.27) pour la concentration massique.

Dans le cas général, si la goutte a rétréci d'un facteur n , on ne peut pas considérer que la fraction massique a été multipliée par n .

3.3.2 Impact de la prise en compte du volume spécifique

Contrairement à d'autres erreurs potentielles évoquées dans ce manuscrit, la prise en compte du volume spécifique n'est pas une correction permettant d'augmenter la précision de nos mesures à la marge.

Considérons les deux expériences suivantes, réalisées avec des solutions initiales de sucrose, de fraction massique 5% et 40% respectivement, et dont les résultats sont visibles en figure 38.

En partant de ces fractions massiques initiales, la fraction massique à un instant t a été calculée à partir du ratio des volumes de la goutte, selon la relation (III.27) puis selon la relation (III.47).

On constate premièrement un décalage marqué entre les courbes avec et sans correction, mais également un décalage entre les courbes 5% et 40% pour les expériences non corrigées.

L'erreur commise sur la fraction massique dans la goutte est donc tout sauf négligeable. Rappelons que notre système a vocation à être utilisé avec des solutions initiales diluées et à appliquer des facteurs de rétrécissement allant jusqu'à 50. L'erreur dépend de la fraction initiale et du volume spécifique, elle n'est pas systématique. Pour pouvoir raisonner en fraction massique, il nous est donc indispensable de tenir compte du volume partiel spécifique.

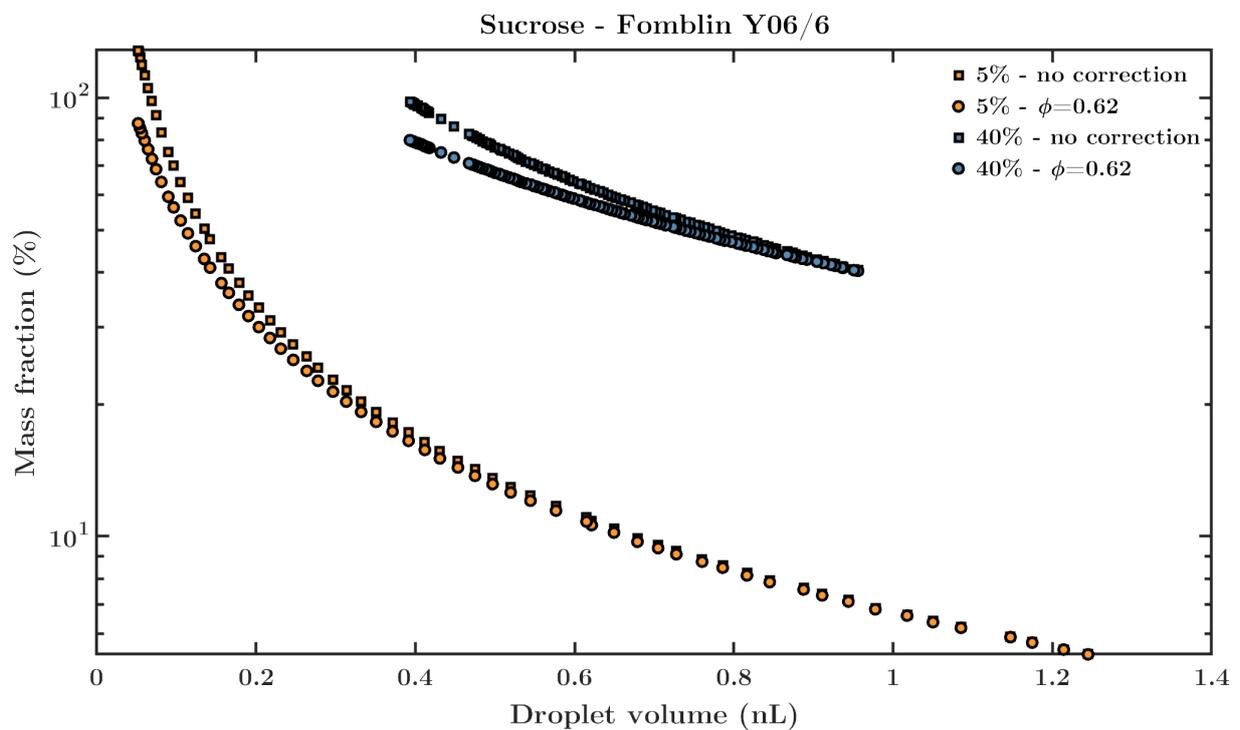


FIG. 38 – Courbes représentant la fraction massique en fonction du volume des gouttes pour des solutions de sucrose, avec ou sans prise en compte du volume spécifique du soluté. Par rapport aux courbes tenant compte de la correction liée au volume spécifique, représentées par des ronds, les courbes non corrigées, représentées par des carrés, montrent une déviation induite par une surestimation de la fraction massique dans la goutte. Cette déviation, et l'erreur commise sur la fraction massique, augmentent à mesure que la goutte rétrécit.

3.4 Conclusion

Notre système permet de mesurer une large gamme de viscosité en une seule expérience, et permet également de partir d'une solution diluée pour ensuite la concentrer d'un facteur pouvant aller jusqu'à 400. Le revers de la médaille, c'est une amplification par un même facteur des erreurs et approximations sur le contenu de la goutte à l'état initial.

Chaque domaine de recherche possède ses limitations et ses conventions propres. L'évolution de la viscosité d'un soluté donné est rarement un objectif de recherche en soi. C'est sa comparaison par rapport à des normes ou à d'autres composés qui a un intérêt scientifique ou industriel. On peut donc imaginer raisonner en concentration massique, pour comparer la viscosité de deux ou plusieurs composés par exemple.

Rappelons que le volume partiel spécifique apparent est le plus souvent tabulé. C'est le cas pour l'intégralité des solutés étudiés au cours de ces travaux.

Pour les protéines les valeurs du volume partiel spécifique apparent sont précisément tabulées pour une grande variété de conditions expérimentales, et leurs variations peuvent être négligées sur toute la gamme de concentrations à explorer.

Ainsi, notre dispositif expérimental permet un suivi précis de la composition des gouttes, exprimées aussi bien en concentration qu'en fraction massique.

Tout au long de cette partie, notre approche a consisté à estimer l'erreur sur la concentration ajoutée par l'impératif du suivi du volume.

Nous avons pour ce faire éliminé toute source d'erreur liée à la préparation de l'échantillon.

Ce raisonnement a cependant ses limites, et tend à surestimer l'erreur liée à notre approche.

En effet, la préparation d'une solution ne se résume pas toujours à peser une certaine quantité de soluté avant de le mélanger avec une certaine quantité de solvant.

Certaines protéines, et en particulier les biopharmaceutiques, ne sont pas suffisamment abondantes ou suffisamment stables¹⁷⁶ pour être formulées sous forme solide. Le plus souvent, ces protéines sont obtenues sous forme de solutions diluées. C'est le cas par exemple de la quasi-totalité des anticorps de recherche, qui sont rarement formulés à plus de 1 mg.mL^{-1} .

Ainsi, la préparation de solutions de protéines nécessite leur concentration par ultracentrifugation⁵². Cette étape nécessite un équipement adapté et prend un certain temps, il faut en effet la répéter pour chaque concentration étudiée. Elle s'accompagne également d'une incertitude non négligeable sur la concentration des échantillons, qui est mesurée par spectroscopie UV ou par diffusion dynamique de la lumière par exemple.

En partant d'une solution diluée, notre approche limite donc l'incertitude sur la concentration initiale des échantillons. Dans certains cas, la concentration par pervaporation des gouttes permet même d'obtenir des solutions sursaturées, atteignant des concentrations hors de portée des expériences macroscopiques, comme nous le verrons en partie V, 3.4.

Quatrième partie

Microrhéologie

Chapitre 1

Suivi de particules browniennes

Dans cette partie nous présenterons le mouvement brownien, phénomène physique de diffusion particulaire aléatoire, et sa formalisation statistique. Nous présenterons la technique de micro-rhéologie par suivi de particules multiples.

Au chapitre 2, nous détaillerons le calcul de l'erreur de localisation sur les particules suivies dans nos conditions expérimentales, avant d'estimer au chapitre 3 l'erreur sur la mesure du coefficient de diffusion.

1.1 Diffusion brownienne

L'agitation moléculaire échappe à notre perception directe comme le mouvement des vagues de la mer à un observateur trop éloigné. Cependant, si quelque bateau se trouve alors en vue, le même observateur pourra voir un balancement qui lui révélera l'agitation qu'il ne soupçonnait pas. Ne peut-on de même espérer, si des particules microscopiques se trouvent dans un fluide, que ces particules, encore assez grosses pour être suivies sous le microscope, soient déjà assez petites pour être notablement agitées par les chocs moléculaires?

Jean Perrin, in *Les Atomes*

Considérons un corps immergé dans un fluide. Il est en permanence impacté par les molécules constitutives de ce fluide. Pour un corps atomique ou moléculaire, de même taille que les molécules du fluide en ordre de grandeur, ce corps sera également soumis à l'agitation thermique, et se comportera sensiblement comme le fluide environnant.

Considérons à présent une particule colloïdale, de taille comprise entre 100 nm et 10 μm . A un instant donné, la résultante des forces d'impact sera non-nulle. La répartition des chocs étant aléatoire, la particule sera donc animée d'un mouvement stochastique de diffusion.

Cette diffusion aléatoire, c'est le mouvement brownien. D'origine moléculaire, il anime des colloïdes observables au microscope optique, permettant ainsi l'observation indirecte de la structure discontinue de la matière. Si la date et l'auteur de la première observation du mouvement brownien sont sujets à débat, c'est la description du mouvement de particules à l'intérieur de grains de pollen par le botaniste écossais Robert Brown qui a donné son nom à ce type de diffusion. En 1877, les physiciens Ignace Carbonelle et Joseph Delsaux sont les premiers à suggérer que le mouvement aléatoire des particules est lié à l'agitation thermique des molécules du fluide environnant.

Dans sa thèse de doctorat soutenue en 1905, Albert Einstein propose une théorie complète du mouvement brownien¹⁷⁷. Le physicien polonais Marian Smoluchowski et le français Paul Langevin publient en 1906 et 1908 des théories aboutissant aux mêmes conclusions, en suivant chacun des approches indépendantes. Ces théories permettent de quantifier le coefficient de diffusion d'une particule donnée, résultat de deux effets opposés : l'agitation thermique qui met la particule en mouvement via les chocs aléatoires, et la force de traînée qui s'oppose à ce mouvement.

La relation d'Einstein¹⁷⁷ permet d'exprimer la diffusivité d'une particule en fonction de sa mobilité M :

$$D = k_B T M \tag{IV.1}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, définie par le rapport de la constante des gaz parfaits et du nombre d'Avogadro, et T la température.

La mobilité est une propriété mécanique de la particule, dépendant de sa vitesse et de la force de traînée qui s'exerce sur elle.

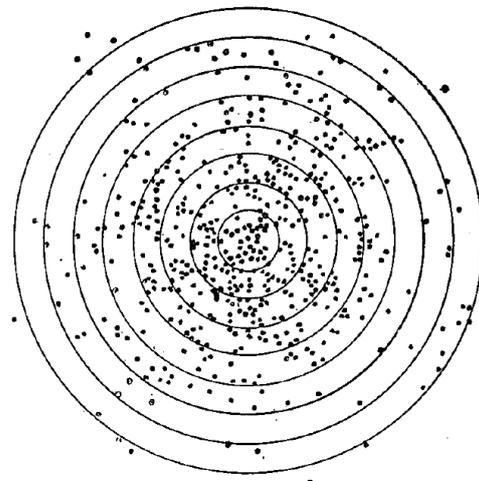
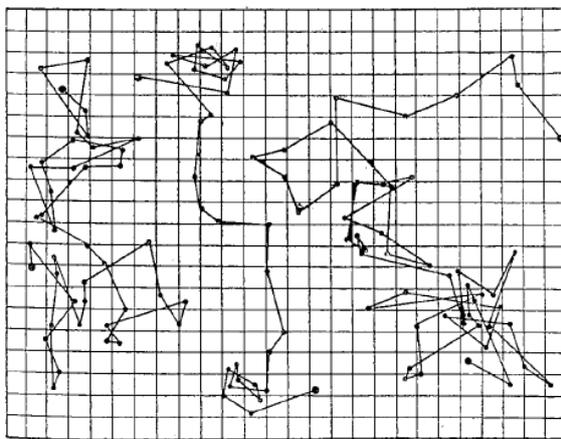
Pour une particule sphérique, la relation de Stokes exprime la mobilité en fonction de son rayon et de la viscosité du milieu :

$$M_S = \frac{1}{6\pi\eta r} \tag{IV.2}$$

η est la viscosité dynamique du milieu et r le rayon de la particule. Ainsi, le coefficient de diffusion d'une particule sphérique brownienne est donné par la loi de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \tag{IV.3}$$

Les expériences réalisées par Jean Perrin entre 1907 et 1909 permettent de valider la théorie d'Einstein. L'étude systématique de la diffusion aléatoire de particules et des équilibres de sédimentation qui en résultent permettent une estimation expérimentale du nombre d'Avogadro, et une validation de l'hypothèse atomique, prouvant ainsi l'existence des molécules après vingt-cinq siècles de débats. Les travaux de Jean Perrin sont récompensés par le prix Nobel de physique en 1926.



(a) Trajectoires d'une particule sphérique de 530 nanomètres de rayon, dont la position est repérée toutes les 30 secondes. Chaque section du quadrillage est un carré d'environ 2 micromètres de côté. Le champ de vision total est un carré de 50 micromètres de côté.
 (b) Distribution des déplacements de la particule. Chaque point correspond à l'extrémité d'un vecteur de déplacement de la particule, tous les vecteurs ayant été ramenés à une origine commune correspondant au centre des cercles. Chaque cercle concentrique est séparé de son voisin par une distance de 392 nanomètres

FIG. 39 – Étude du déplacement d'une particule sphérique en diffusion brownienne. Figures extraites du livre *Les Atomes*, de Jean Perrin¹⁷⁸

Considérons une particule en diffusion brownienne, dont la position est relevée à intervalles réguliers. Notons Δt la durée séparant deux observations, et Δx le déplacement de la particule entre deux observations.

La formalisation mathématique du mouvement brownien revient à considérer la loi décrivant les valeurs de la variable Δx .

Le mouvement brownien est d'abord un processus stochastique : Δx est une variable aléatoire. Chacun des déplacements de la particule est le fait du hasard et est indépendant des déplacements précédents.

La trajectoire d'une particule brownienne témoigne alors d'une « parfaite irrégularité », selon les mots de

Perrin. On le constate sur la figure 39a, qui montre trois trajectoires d'une particule unique telle qu'observée par Jean Perrin. Chaque point correspond à la position de la particule au moment d'observations successives et régulières.

Les segments de droite relient les positions successives, mais ne correspondent pas à la trajectoire de la particule entre ces deux positions.

Ensuite, le mouvement brownien est un processus gaussien, cas particulier de processus stochastique. La variable Δx est une variable aléatoire dont les réalisations suivent une loi normale. De manière générale, la densité de probabilité d'une loi normale s'exprime selon :

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (\text{IV.4})$$

Avec μ l'espérance de la loi, et σ son écart-type (cf 1.3). Dans le cas du mouvement brownien, la loi normale est centrée, son espérance est nulle.

Concrètement, cela signifie que la valeur moyenne des déplacements de la particule tend vers 0 aux temps longs : la particule se déplaçant au hasard dans toutes les directions, elle oscille autour de sa position initiale.

En revanche, l'écart-type σ des déplacements, ainsi que leur norme moyenne, dépendent de la durée Δt et du coefficient de diffusion de la particule selon :

$$\sigma(\Delta t) = \sqrt{2dD\Delta t} \quad (\text{IV.5})$$

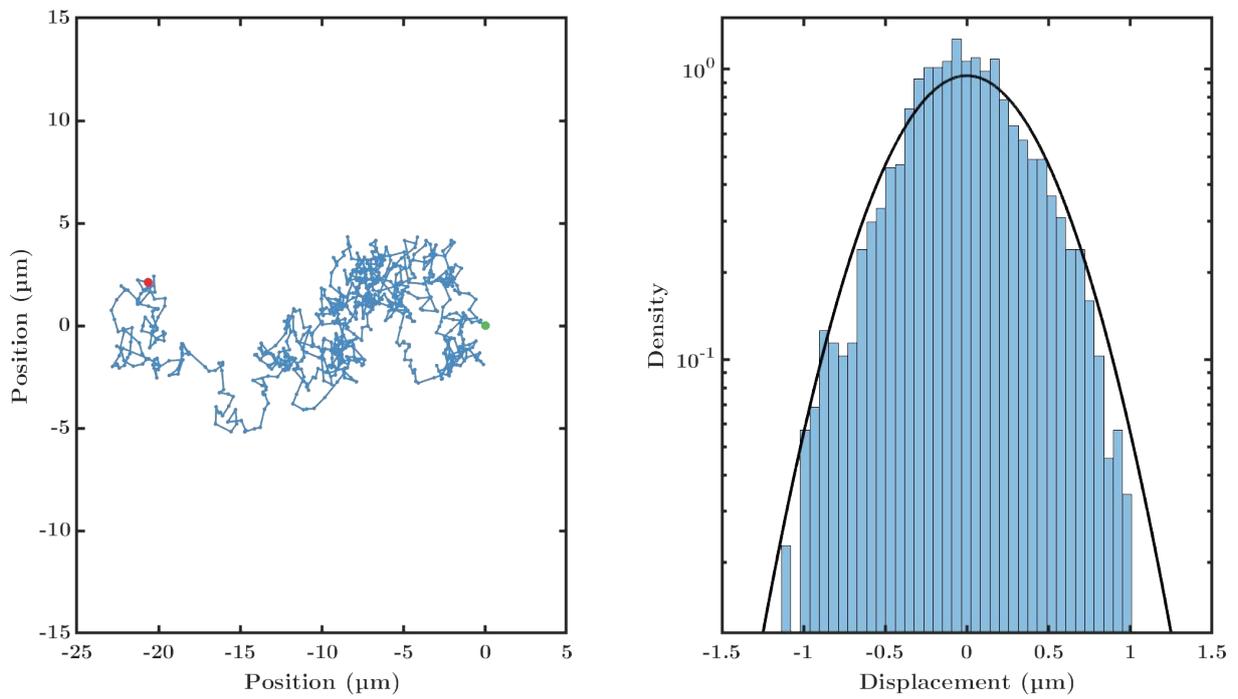
$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = 2dDt \quad (\text{IV.6})$$

d est la dimension de l'espace du mouvement.

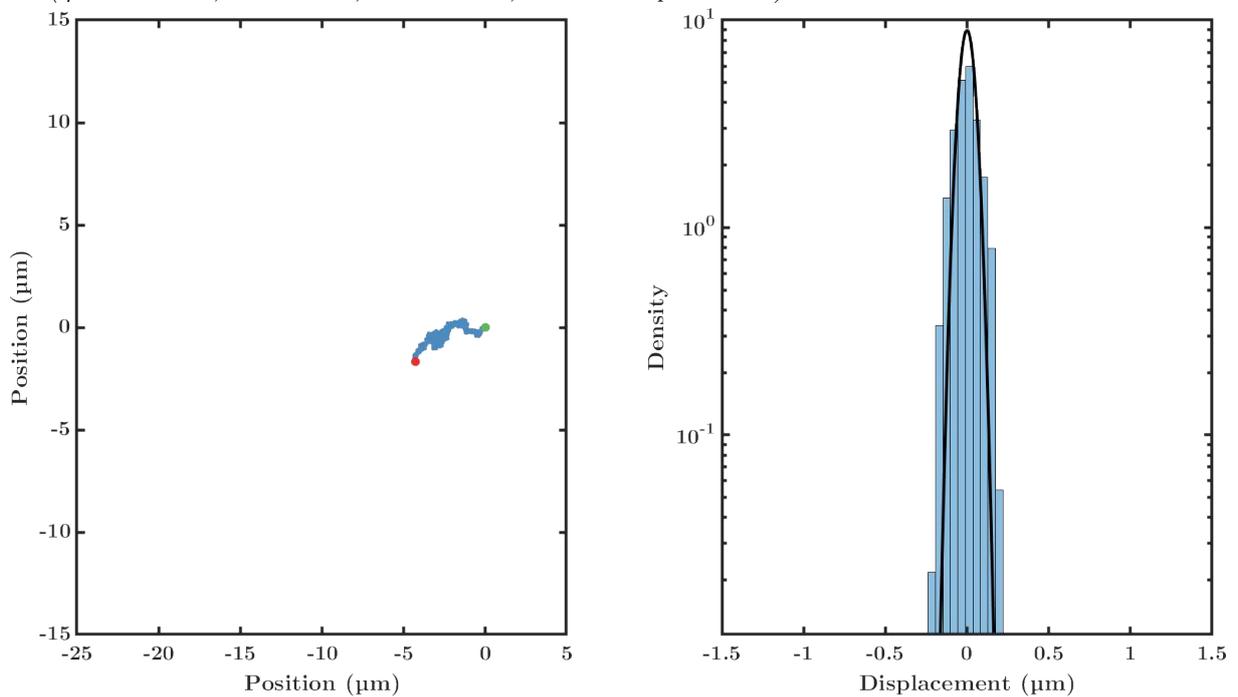
Le déplacement Δx d'une particule brownienne suit donc une loi normale centrée dont la densité de probabilité s'exprime selon :

$$f(\Delta x) = \frac{1}{\sqrt{4\pi dD\Delta t}} e^{-\frac{1}{2} \frac{\Delta x^2}{2dD\Delta t}} \quad (\text{IV.7})$$

L'écart-type σ correspond à la longueur caractéristique de déplacement d'une particule en diffusion brownienne. Il augmente logiquement avec la durée d'observation et la diffusivité des particules.



(a) Diffusion d'une particule dans un fluide de viscosité du même ordre de grandeur que celle de l'eau ($\eta = 1.1 \text{ mPa.s}$, $r = 250 \text{ nm}$, $\Delta t = 100 \text{ ms}$, $N = 755 \text{ displacements}$)



(b) Diffusion d'une particule dans un fluide de viscosité égale à dix fois celle de l'eau en ordre de grandeur ($\eta = 10.7 \text{ mPa.s}$, $r = 250 \text{ nm}$, $\Delta t = 100 \text{ ms}$, $N = 998 \text{ displacements}$)

FIG. 40 – Suivi bidimensionnel d'une particule sphérique en diffusion brownienne dans des fluides de viscosité différente. Dans chacun des cas, la courbe à gauche correspond à la trajectoire de la particule dans le plan d'observation, ensemble de ses positions relevées à intervalles Δt réguliers. La courbe de droite montre la densité de probabilité de la distribution des déplacements de la particule, ramenée à une dimension: les déplacements en x et en y sont regroupés dans une même distribution. La courbe continue correspond à la fonction de densité de probabilité pour une loi normale (cf (IV.7)) dont les paramètres ont été calculés à partir de la viscosité mesurée η . Les deux trajectoires ont été enregistrées à différents stades d'une expérience de mesure de la viscosité d'une solution de protéines

On le constate sur les exemples de trajectoires expérimentales relevées avec notre dispositif et reproduites en figure 40, qui correspondent au relevé des trajectoires de particules identiques, mais en suspension dans des fluides de viscosité différente.

L'amplitude du mouvement augmente avec la diffusivité des particules, elle-même inversement proportionnelle à la viscosité du milieu (cf (IV.3)). On constate que l'amplitude de mouvement de la particule est beaucoup plus réduite en figure 40b, quand la viscosité est dix fois supérieure.

Enfin, le mouvement brownien est un processus de Wiener : la moyenne quadratique du déplacement est proportionnelle au temps.

Il est intéressant de noter que la formalisation du mouvement brownien par Louis Bachelier (1901) précède la première description complète du phénomène physique (1905). En effet, un processus de Wiener est un objet statistique. Il peut être étudié comme objet mathématique, sans lien avec la diffusion particulaire. En l'appliquant à la modélisation des échanges boursiers, Louis Bachelier a d'ailleurs posé les fondements des mathématiques financières.

La formalisation de la diffusion brownienne étant l'application principale du processus de Wiener, il est couramment appelé mouvement brownien.

A travers les relations (IV.5) et (IV.6), le mouvement brownien fait intervenir d , la dimension de l'espace de diffusion.

C'est une autre propriété du mouvement brownien : pour un espace de dimension d , la projection du mouvement sur une dimension donnée est elle-même un mouvement brownien unidimensionnel.

Les dimensions sont donc indépendantes entre elles.

Expérimentalement, les particules observées diffusent dans un espace à trois dimensions. Ces particules étant observées au microscope, le mouvement qui est suivi est la projection du mouvement particulaire sur le plan d'observation du microscope, qui est un espace à deux dimensions.

Chacune des dimensions étant indépendante, cela n'affecte pas la précision du suivi : projetée dans le plan d'observation, la distribution des déplacements suit une loi normale bidimensionnelle, comme on le devine sur le schéma de Jean Perrin en figure 39b.

Il est aussi possible de ramener le problème à une dimension : les figures 40a et 40b montrent l'histogramme des déplacements pour la particule suivie. Selon chacune des dimensions de déplacement considérées, ici x et y , l'histogramme des déplacements paraît suivre une loi normale. Sur chacune des figures a été reproduit l'histogramme cumulé des déplacements en x et y , qui suit également une loi normale.

1.2 Microrhéologie passive

Ainsi, la diffusion de particules colloïdales en suspension dans un milieu est un processus dont les caractéristiques dépendent de la taille des particules, de la température et de la viscosité du milieu.

L'observation des trajectoires particulières permet d'en estimer le coefficient de diffusion.

Pour des particules de taille connue diffusant dans un milieu thermostaté, il devient alors possible de déduire la viscosité du milieu via la loi de Stokes-Einstein (IV.3).

L'inverse est également possible : pour des particules diffusant dans un milieu thermostaté et de viscosité connues, la relation de Stokes-Einstein permet d'accéder à la taille des particules.

Dans le premier cas de figure, on parle de microrhéologie, qui consiste à mesurer le mouvement de traceurs calibrés au sein d'un échantillon pour en déduire ses caractéristiques rhéologiques.

Lorsque le mouvement des particules n'est dû qu'au processus stochastique de diffusion brownienne, on parle de microrhéologie passive. A l'inverse, lorsqu'un champ extérieur participe au mouvement des particules, on parle de microrhéologie active.

Dans la suite de ce manuscrit, nous ne nous intéresserons qu'à la microrhéologie passive.

Une fois établie la correspondance entre le coefficient de diffusion des particules colloïdales et la viscosité du milieu, reste à définir une méthode expérimentale permettant de mesurer le coefficient de diffusion à partir de l'observation des trajectoires.

1.2.1 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) est une technique d'analyse spectroscopique.

Les particules colloïdales sont éclairées avec une source de lumière cohérente, et c'est la lumière diffusée par les particules à un angle fixé qui est étudiée.

Pour des particules petites devant la longueur d'onde ($d < \lambda/10$), la diffusion de la lumière est décrite par la théorie de Rayleigh. La diffusion est isotrope et l'intensité augmente fortement avec la taille des particules, selon $I \propto d^6$.

Pour des particules du même ordre de grandeur ou plus grande que la longueur d'onde, la théorie de Mie décrit une diffusion anisotrope et des fluctuations périodiques de l'intensité diffusée en fonction de la taille des particules.

Le signal diffusé par l'échantillon est enregistré à un angle fixé. Il est la superposition d'une multitude d'ondes, chacune correspondant à la diffusion de l'onde incidente par une des particules.

Le chemin optique jusqu'au détecteur étant différent pour chaque particule, la superposition de ces ondes produit des tavelures, motif d'interférences complexes.

Chaque particule suivant une trajectoire propre, ces tavelures fluctuent en permanence. Il est possible de relier le temps caractéristique de fluctuation de l'intensité détectée à la distance caractéristique moyenne parcourue par les particules, et d'en déduire ainsi leur coefficient de diffusion¹⁷⁹.

Une fois le coefficient de diffusion mesuré, la relation de Stokes-Einstein (IV.3) permet de relier la taille des particules et la viscosité du milieu.

La diffusion dynamique de la lumière est une méthode robuste et rapide. Par conséquent, les mesures de DLS sont devenues un standard d'analyse dans les laboratoires de recherche ou pour la caractérisation industrielle de particules.

En effet, dans la quasi-totalité des applications, la DLS est utilisée pour mesurer la taille de particules diffusant dans un fluide de viscosité connue.

Cependant, un nombre croissant de travaux utilisent la DLS comme outil de microrhéologie¹⁸⁰⁻¹⁸². L'étude de la diffusion de traceurs calibrés permet alors d'accéder aux propriétés rhéologiques de fluides complexes.

Cette dynamique de recherche, associée au besoin croissant de caractérisation de faibles volumes de solutions de protéines a entraîné la conception et la commercialisation d'appareils de DLS permettant l'analyse de volumes réduits (10-50 μL).

Il est important de noter que la DLS est une mesure d'ensemble.

Rappelons en effet que la correspondance est faite entre les fluctuations de l'intensité diffusée par les particules et leur déplacement.

Les particules étant éclairées sur un volume fini, les particules entrant ou sortant de la zone éclairée entraînent des fluctuations de l'intensité lumineuse, parasitant la mesure du coefficient de diffusion.

On estime à ≈ 1000 le nombre minimum de particules nécessaires dans le volume éclairé pour que la mesure de DLS soit pertinente¹⁸³.

La DLS n'a donc de sens que pour les échantillons homogènes.

Pour les échantillons inhomogènes, d'autres techniques permettent le suivi individuel de particules diffusantes, offrant ainsi l'accès à une mesure locale de la viscosité.

1.2.2 Suivi de particules

La relation (IV.6) établit une correspondance entre le mouvement d'une particule brownienne et son coefficient de diffusion. En enregistrant la trajectoire de cette particule, le relevé précis de ses positions successives permet donc d'estimer son coefficient de diffusion.

Il est donc possible de mesurer la viscosité du milieu dans une zone très restreinte, correspondant au périmètre de diffusion des particules suivies.

C'est cette résolution spatiale qui a popularisé l'utilisation de la microrhéologie par suivi de particules multiples (MPT), permettant l'étude d'échantillons inhomogènes et notamment la microrhéologie intracellulaire^{110,184}.

Si le principe de la microrhéologie MPT est relativement simple, son application l'est beaucoup moins. Lors des premières expériences de suivi, Jean Perrin repérait la position d'une particule par sa position sur un quadrillage de 2 μm de côté, couvrant un champ de vision total 50 μm de côté, toutes les 30 secondes. Dans ces conditions, la précision du suivi est fortement limitée, et il paraît impossible de suivre plusieurs particules simultanément.

Sur les 30 dernières années, de nombreux travaux de recherche ont optimisé le suivi de particules, aidé par l'amélioration continue des outils d'acquisition et de traitement des images.

S'il existe plusieurs méthodes de suivi^{185,186}, la plus populaire est le suivi vidéo de particules fluorescentes. Des traceurs sont imagés à intervalle régulier en microscopie de fluorescence. Les techniques actuelles per-

mettent une mesure entièrement automatisée : les particules sont imagées par une caméra rapide ; leur position est ensuite déterminée par un algorithme dédié (chapitre 2) ; un deuxième algorithme permet de reconstruire des trajectoires à partir des positions repérées (algorithme de Crocker-Grier, décrit en annexe partie VII, 3) ; à partir de l'ensemble des déplacements particuliers enregistrés, un dernier algorithme permet enfin de calculer le coefficient de diffusion (chapitre 3).

La microrhéologie MPT permet donc une mesure locale du coefficient de diffusion, se basant sur les trajectoires finies d'un nombre de particules limité.

Se pose par conséquent une question statistique. Comme nous nous apprêtons à le développer, une estimation sur un nombre réduit de mesures, qui plus est bruitées, entraîne nécessairement une incertitude dépendant de l'estimateur statistique employé.

Cette question ne se pose pas pour la DLS qui est, rappelons le, une mesure d'ensemble : la grandeur observée reflète déjà le comportement d'un grand ensemble de particules.

1.3 Statistique de la microrhéologie : définitions

Dans cette introduction, nous avons présenté la diffusion brownienne, et le principe de la microrhéologie par suivi vidéo de particules, technique expérimentale permettant de déterminer la viscosité d'un milieu à partir de l'observation de trajectoires particulières.

Comme toute technique expérimentale, la microrhéologie n'est pas d'une précision absolue. Dans cette partie du manuscrit, nous avons cherché à étudier chacune des sources d'erreurs possibles, et à en quantifier l'impact sur la précision du résultat final, soit la mesure de la viscosité. Pour ce faire, il nous faut préciser un formalisme statistique déjà évoqué précédemment.

Rappelons la modélisation mathématique du mouvement brownien introduit précédemment : le déplacement d'une particule brownienne est une variable aléatoire continue, pouvant prendre une infinité de valeurs, dont la distribution obéit à une loi de probabilité.

Variable aléatoire et estimateur statistique

Une variable aléatoire est définie sur un espace donné, et ses valeurs potentielles obéissent à une loi de probabilité.

Une série de mesures de cette variable correspond à un ensemble fini de valeurs. A partir de cette série, on peut chercher à évaluer un ou plusieurs paramètres de la loi de probabilité de la variable mesurée.

Un ensemble fini de réalisations d'une variable statistique contient nécessairement moins d'information que la loi de probabilité elle-même. Ce postulat est bien illustré en figure 40 : l'histogramme des déplacements y a été normalisé pour produire une estimation de la fonction de densité de probabilité. La courbe noire superposée correspond à une fonction de probabilité théorique correspondant à la viscosité mesurée. Sur la figure, la forme de l'histogramme épouse la courbe mais ne suffit pas à la décrire entièrement. En d'autres termes : la distribution suit la loi de probabilité, mais ne suffit pas à la déterminer exactement. L'évaluation d'un ou plusieurs paramètres de la loi est donc bien une estimation et pas un calcul absolu.

Un estimateur statistique est une fonction permettant d'évaluer un paramètre d'une loi de probabilité à partir d'un ensemble de valeurs mesurées d'une ou plusieurs variables aléatoires associées¹⁸⁷.

Pour un paramètre donnée, par exemple la viscosité η , on notera $\hat{\eta}$ l'estimation du paramètre. Comme la distribution d'une variable aléatoire, un estimateur possède lui-même une espérance et une variance.

L'espérance de l'estimateur, que l'on notera $\langle \hat{\eta} \rangle$, correspond à la moyenne pondérée des valeurs qu'il produit, selon :

$$\langle \hat{\eta} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \hat{\eta}_i \quad (\text{IV.8})$$

Avec $\hat{\eta}_i$ les valeurs produites, et N le nombre total d'estimations.

Le biais d'un estimateur est l'écart entre son espérance et la valeur du paramètre :

$$\text{Biais}(\hat{\eta}) = \langle \hat{\eta} \rangle - \eta \quad (\text{IV.9})$$

On définit la variance de l'estimateur comme l'écart quadratique moyen entre les valeurs estimées et son espérance :

$$Var(\hat{\eta}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{\eta}_i - \langle \hat{\eta} \rangle)^2 \quad (\text{IV.10})$$

A partir de la variance, on définit l'écart-type (ou erreur-type, ou encore simplement erreur), défini comme la racine carrée de la variance ; l'erreur relative, définie comme le ratio de l'écart-type et de l'espérance ; et enfin le biais relatif, défini comme le ratio du biais par la valeur du paramètre¹ :

$$\sigma(\hat{\eta}) = \sqrt{Var(\hat{\eta})} \quad (\text{IV.11})$$

$$\delta(\hat{\eta}) = \frac{\sigma(\hat{\eta})}{\langle \hat{\eta} \rangle} \quad (\text{IV.12})$$

$$\text{Biais relatif}(\hat{\eta}) = \frac{\hat{\eta} - \eta}{\eta} \quad (\text{IV.13})$$

La qualité d'un estimateur est principalement quantifiée par son biais, soit l'écart entre la valeur moyenne estimée et la valeur réelle, et sa précision, soit la distribution des valeurs estimées.

Le terme précision est un terme général, pouvant désigner la variance, l'écart-type ou l'erreur relative selon les cas.

Dans ces travaux, nous parlerons par exemple d'« erreur sur la localisation d'une particule », ou encore de « précision de la mesure de la viscosité ». Ces formulations, employées par simplicité, caractérisent la distribution de séries de mesure. La formulation exacte serait : « écart-type de la distribution des positions mesurées de la particule » et « erreur relative de la distribution des estimations de la viscosité ».

Un troisième critère de qualité sera pris en compte dans notre raisonnement : la puissance de calcul consommée par l'estimateur, qui n'affecte pas la qualité du résultat final mais peut avoir un grand impact sur la faisabilité d'une mesure.

Information de Fisher et borne de Cramér-Rao

La viscosité dépend de plusieurs paramètres (cf (IV.3)) dont le coefficient de diffusion, qui est lui même un paramètre de la distribution des déplacements moyen quadratiques de la particule (cf (IV.6)). Ici, les déplacements successifs de la particule sont autant de réalisations de la variable aléatoire Δx .

Rappelons le postulat précédent : une distribution finie de réalisations d'une variable aléatoire contient nécessairement moins d'information que la loi de probabilité associée à cette variable.

L'information de Fisher est une notion statistique quantifiant cette perte d'information. Elle dépend certes du nombre de réalisations considérées, mais aussi de la forme de leur distribution.

Cette quantification permet de définir une borne inférieure sur la variance d'un estimateur non biaisé.

Dit plus simplement, un estimateur ne peut pas faire apparaître de l'information manquante. Sa précision est limitée par l'information contenue dans la distribution.

Cette limite inférieure est la borne de Cramér-Rao¹⁸⁷. C'est à elle que sera comparée la performance des différents estimateurs présentés dans cette partie. Un estimateur dont la variance tend vers la borne de Cramér-Rao est qualifié d'optimal.

Les notions d'estimation et d'erreur développées jusqu'à présent sont purement statistiques, elles sont liées au caractère stochastique des phénomènes observés.

Les données que nous considérons ne sont pas des ensembles de réalisations de variables aléatoires définies dans un espace abstrait, mais bien des mesures expérimentales, affectées par diverses sources de bruit.

Ce bruit de mesure représente une incertitude supplémentaire, qui doit être prise en compte lors de l'étude de la qualité des estimateurs.

Dans cette partie nous présenterons en détail la mesure de viscosité par suivi vidéo de particules. À chacune des étapes présentées, nous étudierons les différentes sources de bruit affectant la mesure. Pour certaines d'entre elles, nous comparerons les performances de différents estimateurs statistiques.

Nous justifierons ainsi de l'adéquation de la méthode choisie à nos objectifs de précision et aux paramètres

1. Selon les conventions, l'erreur relative peut correspondre au biais relatif. Le ratio de l'écart-type sur l'espérance est alors appelé écart-type relatif. Dans cet ouvrage, nous utiliserons systématiquement la convention définie en (IV.12)

propres à notre dispositif, en présentant les données bibliographiques, calculs, simulations numériques ou expériences ayant abouti au développement de cette méthode.

Chapitre 2

Localisation des particules

La précision du suivi de particules diffusantes est d'abord conditionné par la précision de leur localisation.

La localisation des particules, invisibles à l'oeil nu, est rendue possible par l'utilisation d'un système optique, ici un microscope équipé d'une caméra. Du fait des limitations du système optique, la position des particules à un instant t n'est pas connue avec une précision absolue.

Pour estimer l'erreur de localisation, on formalise la position d'une particule comme une variable aléatoire, et l'on s'intéresse à sa distribution, et plus précisément à son écart-type σ . En effet, en l'absence d'erreur systématique comme c'est le cas ici, l'erreur de localisation correspond à σ .

Les limitations précédemment évoquées sont liées à la physique du système optique, ou induites par des méthodes de construction et de traitement d'images.

Au cours du raisonnement ci-dessous, nous détaillerons l'origine, et nous quantifierons l'influence sur σ de chacune de ces limitations.

A l'origine de l'ensemble de ces sources d'erreurs, il y a la fonction d'étalement du point (PSF, pour Point Spread Function), réponse impulsionnelle du système optique qui sera décrite dans la suite de notre raisonnement.

Depuis le début des années 1990, les progrès de la microscopie de fluorescence permettent l'observation de fluorophores uniques, permettant le développement de techniques de super-résolution telles que la microscopie PALM (Photo-Activated Localization Microscopy). Simultanément, les progrès en chimie et en biologie moléculaire permettent le greffage de fluorophores sur-mesure ou la production de protéines recombinantes fluorescentes, démocratisant la microscopie de molécule unique.

Par conséquent, de nombreux travaux ont cherché à évaluer l'impact de l'intensité du signal et du déplacement de particules faiblement émettrices sur la localisation de ces particules¹⁸⁸⁻¹⁹².

Ce chapitre se conclue par une estimation de l'erreur de localisation sur les particules dans les conditions de notre expérience.

Dans le chapitre suivant, nous évaluerons l'impact de cette erreur sur \hat{D} , l'estimation du coefficient de diffusion.

L'ensemble du raisonnement s'inspire des travaux de Christian L. Vestergaard visant à optimiser le suivi de particules diffusantes¹⁹³⁻¹⁹⁵.

Sauf mention contraire, les paramètres choisis pour nos calculs sont ceux retenus pour nos expériences (cf partie III, 2.2). Le suivi des particules est donc réalisé à partir de timelapses de 1000 images prises en continu, avec un temps d'exposition $\tau = 100$ ms. La durée totale du timelapse est donc de 100 secondes. Du fait de l'objectif et de la caméra utilisés, l'échelle est de $162.5 \text{ nm.pixel}^{-1}$.

2.1 Localisation d'une particule fixe

2.1.1 Fonction d'étalement du point

Sauf mention contraires, toutes les images présentées dans cette section sont des taches d'Airy simulées à l'aide des fonctions `psf2d.m` et `modelimage.m` (Raghveer Parthasarathy¹⁹⁶, The University of Oregon, Copyright 2011-2012).

On considère un objectif à air ($n = 1$) ayant une ouverture numérique $NA = 0.6$, et une longueur d'onde d'émission $\lambda = 515 \text{ nm}$. Chaque image est un carré de $3.25 \mu\text{m}$ de côté

Considérons un objet émetteur ponctuel, un point source émettant un signal infini, imagé par un microscope idéal dépourvu d'aberration.

Cet objet émet de la lumière dans toute les directions de l'espace. Seule une fraction des rayons émis sont captés par le microscope : les rayons collectés par la lentille de l'objectif. Ce phénomène est quantifié par l'ouverture numérique du microscope (NA , pour Numerical Aperture), définie comme¹⁹⁷ :

$$NA = n \sin i \quad (\text{IV.14})$$

Avec n l'indice de réfraction du milieu d'observation, et i l'angle que forme avec l'axe optique le rayon qui en est le plus éloigné.

En tant que système optique, le microscope agit ainsi comme un filtre passe bas : les fréquences spatiales les plus hautes sont éliminées de l'image formée.

L'image d'un émetteur ponctuel n'est pas un point, mais un motif constitué d'une tâche centrale élargie et d'anneaux concentriques de luminosité décroissante (cf figure 41a).

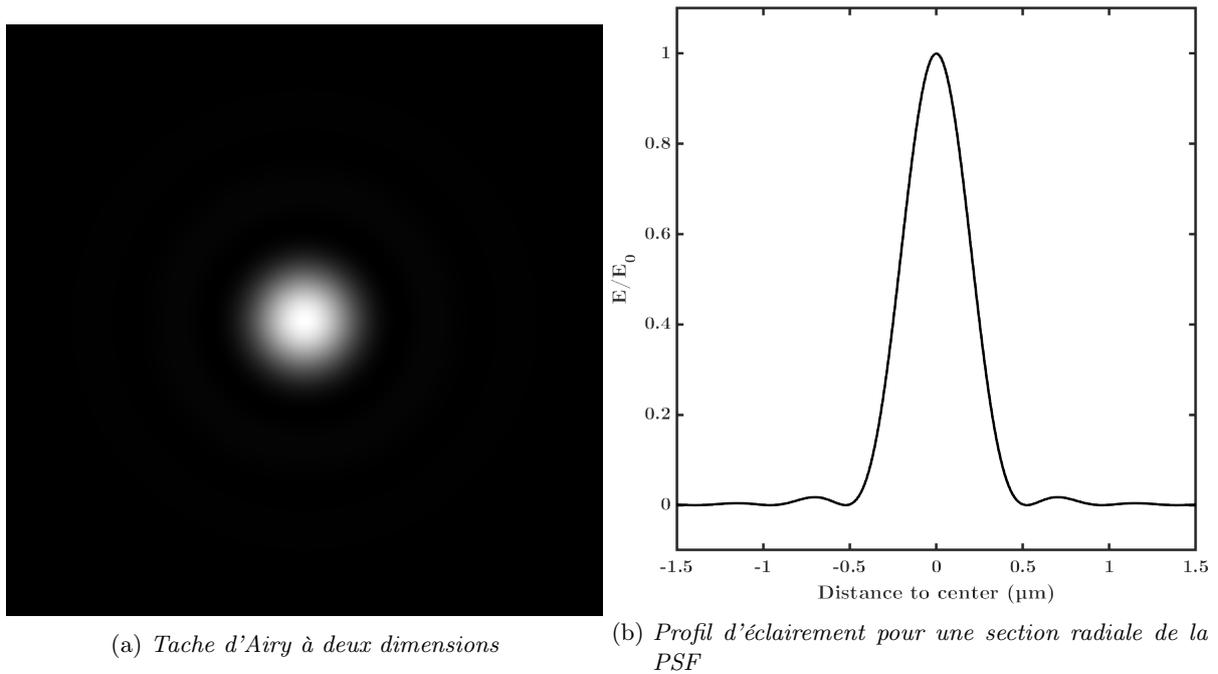


FIG. 41 – Fonction d'étalement du point simulée. Le profil d'éclairement normalisé montre l'allure caractéristique d'une fonction de Bessel du premier ordre.

Ce motif, c'est la tâche d'Airy, dont la distribution d'intensité dépend de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique du microscope, et est décrite par une fonction de Bessel du premier ordre selon¹⁸⁸ :

$$E(x) = E_0 \left(\frac{2J_1(x/s_0)}{\pi x} \right)^2 \quad (\text{IV.15})$$

E_0 est l'éclairement au centre de la figure, J_1 est la fonction de Bessel du premier ordre.

Le paramètre s_0 correspond à la largeur de la PSF, définie comme la position de la première annulation de la tâche d'Airy. Elle s'exprime selon¹⁸⁸ :

$$s_0 \geq \frac{\lambda}{2\pi NA} \quad (\text{IV.16})$$

On peut alors estimer la largeur de la PSF :

$$s_0 \geq 137 \text{ nm} \quad (\text{IV.17})$$

L'élargissement de l'image d'un émetteur ponctuel ne représente pas en soi une perte d'information quant à la position de l'émetteur : le centre de la PSF correspond à la position du point source.

Pour une particule de taille équivalente à la longueur d'onde suivie par microscopie optique, la détermination du centre de la PSF permet donc d'accéder à la position précise de son centre. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons que le nombre limité de photons détectés et le bruit de fond des images imposent l'utilisation d'estimateurs statistiques pour repérer le centre de la PSF, entraînant ainsi des erreurs de localisation que nous quantifierons.

2.1.2 Pixellisation

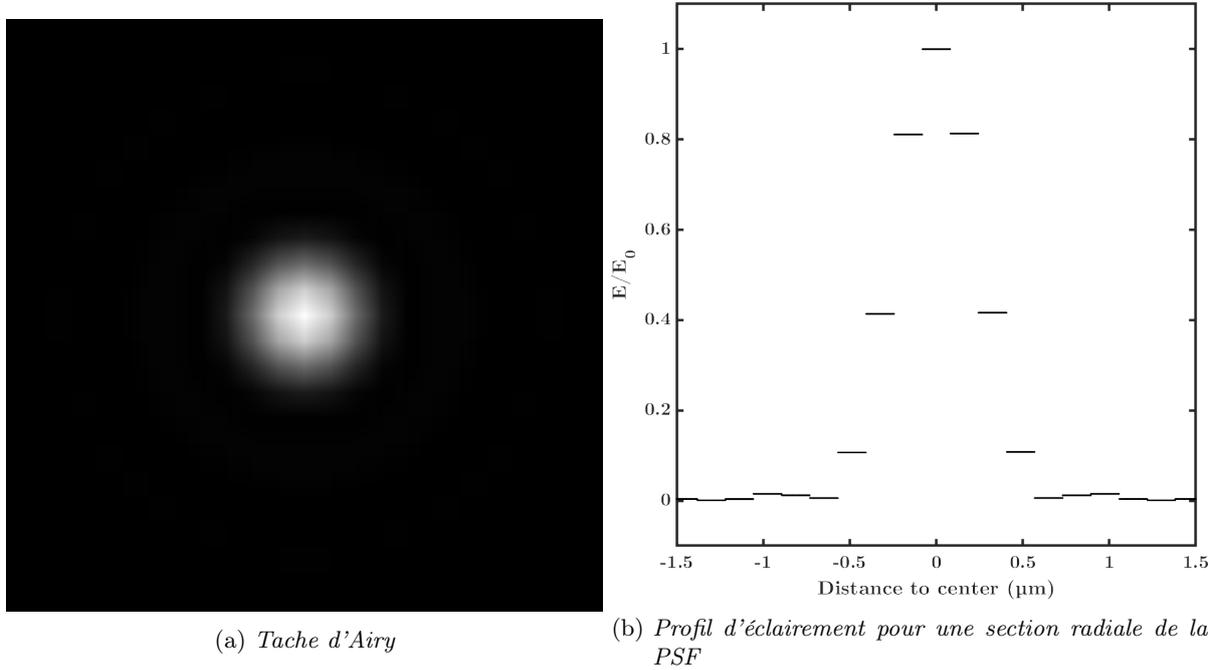


FIG. 42 – Fonction d'étalement du point simulée avec une pixellisation liée aux dimensions du capteur. Échelle : 1 pixel = 162.5 nm
La pixellisation produit un profil d'éclairement discret, composé de plateaux dont la largeur est celle des pixels.

L'image produite par le microscope est formée sur le capteur d'une caméra CMOS, composé de 2048x2048 photodiodes représentant autant de pixels. Par conséquent, l'information sur la position des photons détectés est limitée par la pixellisation du capteur. On n'a pas accès à la position de chaque photon, mais à la valeur du signal reçu par chaque pixel.

La pixellisation induit un élargissement de la fonction d'étalement du point, dont la largeur s'écrit alors¹⁹⁰ :

$$s_a = \sqrt{s_0^2 + \frac{a^2}{12}} \quad (\text{IV.18})$$

Dans notre cas, chaque pixel correspond à un carré de côté $a=162.5$ nm sur l'échantillon. On peut alors estimer s_a :

$$s_a \geq 149.5 \text{ nm} \quad (\text{IV.19})$$

En comparant avec le résultat (IV.17), on remarque que l'élargissement de la PSF par la pixellisation reste un effet mineur compte-tenu de la relative petite taille des pixels.

2.1.3 Statistique d'émission photonique

Nous avons jusqu'à présent étudié le cas idéal d'un point source émettant un signal infini, qui ne correspond malheureusement pas à la réalité.

Dans la pratique, le point source émet un nombre fini de photons, et seule une fraction d'entre eux est collectée par le système optique.

Notons N_{ph} le nombre de photons signaux, soit les photons participant à la formation de l'image.

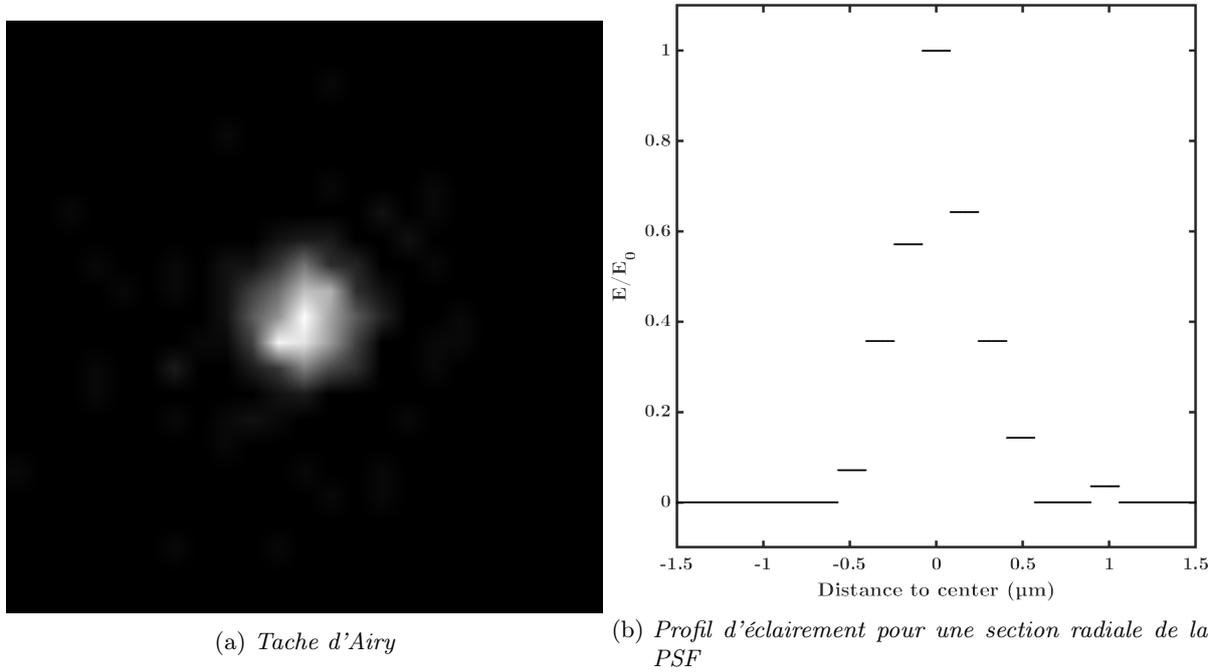


FIG. 43 – Fonction d'étalement du point simulée, pixellisée, avec un nombre de photons réduits (ici, $N_{ph} = 1.4 \cdot 10^7$). L'image et le profil radial montre un bruit de Poisson caractéristique de l'émission photonique.

Le processus d'émission lumineuse étant un processus stochastique, les N_{ph} photons signaux seront répartis aléatoirement sur l'image correspondante, selon une distribution de Poisson. La tache d'Airy correspondante apparaîtra bruitée (cf figure 43), ce qui affectera la précision de la détection de son centre. C'est la première source d'erreur de localisation d'une particule fixe, liée à la fonction d'élargissement du point et à la nature du processus d'émission de la lumière.

La localisation du centre de la PSF est donc le résultat d'une estimation, à partir de la distribution des positions des photons détectés.

On peut estimer l'erreur de localisation en caractérisant la distribution des positions estimées du centre de la PSF (cf 1.3). On définit σ l'écart-type de cette distribution.

Pour exprimer σ , commençons par considérer le cas d'un point source émettant un photon signal unique, soit $N_{ph} = 1$.

L'image résultante étant constituée d'un seul photon, la position détectée du centre correspondra à la position du photon.

L'écart-type de la distribution des positions mesurées du centre correspondra donc à l'écart-type de la distribution de Poisson gouvernant l'émission des photons. On définit cet écart-type comme la largeur s_a de la tâche d'Airy :

$$\sigma_1 = s_a \quad (\text{IV.20})$$

Rappelons que l'émission des photons est un processus stochastique : pour une particule ponctuelle émettant N_{ph} photons, la position x_i de chacun de ces photons est indépendante. Les variances étant additives pour des variables indépendantes, on peut écrire (cf (IV.10)) :

$$\sigma^2 \left(\frac{\sum_{i=1}^{N_{ph}} x_i}{N_{ph}} \right) = \frac{1}{N_{ph}} \sum_{i=1}^{N_{ph}} \sigma^2(x_i) = \frac{s_a^2}{N_{ph}} \quad (\text{IV.21})$$

Ainsi, l'écart-type de la distribution des positions détectée de son centre s'exprime enfin selon¹⁹⁵ :

$$\sigma = \frac{s_a}{\sqrt{N_{ph}}} \quad (\text{IV.22})$$

La diffraction au sein du système optique introduit donc un élargissement de l'image d'une particule ponctuelle. Pour un nombre de photons fini, cet élargissement induit une perte d'information sur la position du centre de la particule.

La pixellisation du capteur de la caméra représente une perte d'information supplémentaire sur la position des photons, et donc sur la position du centre de la PSF. Cette perte d'information peut être assimilée à un élargissement de la PSF.

Les relations (IV.18) et (IV.22) quantifient cette perte d'information. Elles ne considèrent pas la méthode à employer pour estimer la position du centre de la PSF à partir d'un signal parcellaire.

Les écarts-types qu'elles expriment représentent une borne inférieure atteignable par des estimateurs sans biais, la borne de Cramér-Rao présentée en 1.3.

2.1.4 Bruit de fond

Le signal détecté n'est pas seulement fini, il est également parasité par le bruit de fond de l'image. Ce bruit de fond est causé par plusieurs sources : les aberrations et les défauts d'isolation du système optique, le bruit numérique lié au capteur CMOS ou encore le signal d'émetteurs voisins éloignés du plan focal.

On définit le paramètre q comme le rapport entre le bruit de fond et le signal détecté (q est donc l'inverse du rapport signal sur bruit), selon¹⁹³ :

$$q = \frac{b^2}{a^2} \frac{2\pi s_a^2}{N_{ph}} \quad (\text{IV.23})$$

Le terme b^2/a^2 correspond à la densité de photons de bruit de fond, avec b l'intensité moyenne d'un pixel de fond et a la largeur des pixels déjà définie en (IV.18). Le terme $N_{ph}/2\pi s_a^2$ correspond lui à la densité de photons signaux au pic de la PSF.

On retrouve ainsi la problématique annoncée à la fin de l'introduction de ce chapitre (cf 1.3) : la position du centre de la PSF correspond exactement à la position de la particule, mais le caractère fini du signal et le bruit de fond induisent une incertitude sur son estimation.

2.1.5 Localisation du centre de la PSF

Les méthodes statistiques que nous allons présenter permettent, à partir d'un signal donné, d'estimer la position du centre de la PSF, et donc la position réelle de la particule.

La méthode la plus immédiate consiste à ajuster le signal reçu avec une expression exacte de la fonction d'étalement du point.

Non-biaisée, cette méthode offre théoriquement une précision maximale, atteignant la limite de Cramér-Rao, sous réserve d'une bonne modélisation initiale de la PSF.

L'expression (IV.15) est valable pour un système idéal, la PSF réelle est déformée par des aberrations géométriques propres à chaque microscope.

Il est possible de développer une expression de la PSF à partir d'images de points sources fixes dans des conditions maximisant le nombre de photons reçus, puis d'appliquer cette expression pour déconvoluer des images dont le signal est plus faible¹⁹⁰.

Cette solution n'est pas indiquée dans notre cas : lors de la mesure de la viscosité, les particules sont imagées à travers l'interface courbée de la goutte qui les contient. Agissant comme une lentille, cette interface est susceptible de déformer la PSF.

Dans la majorité des cas, le profil de la tache centrale de la PSF peut être ajusté avec une bonne précision par une fonction gaussienne¹⁹⁸.

Cette approche est plus simple que la précédente, car elle ne nécessite pas une connaissance a priori de l'expression de la PSF. Sa précision s'approche de la borne de Cramér-Rao pour une distribution gaussienne lorsque le nombre de photons devient important¹⁹⁵.

Il est également possible d'utiliser une moyenne pondérée pour calculer le barycentre de la PSF. La plus simple des trois, cette méthode est aussi la moins précise. Cet écart se réduit cependant pour un grand nombre de photons incidents¹⁹⁵.

Bien que moins précise, la méthode du barycentre dispose d'un avantage indéniable sur les deux précédemment citées : elle nécessite une puissance de calcul bien moins importante.

Qu'il s'agisse d'une gaussienne ou d'une expression plus complexe, l'ajustement de la PSF par un profil

donné nécessite une régression statistique. Plusieurs méthodes existent, comme par exemple la méthode des moindres carrés (LSF, pour Least Squares Fit) ou la plus performante méthode du maximum de vraisemblance (MLE, pour Maximum Likelihood Estimator). Quelle que soit la méthode retenue, la puissance de calcul nécessaire est beaucoup plus importante qu'un simple calcul de moyenne pondérée.

Compte-tenu du nombre important de photons détectés et du bon rapport signal sur bruit de nos expériences, la méthode du barycentre présente une précision équivalente, avec une puissance de calcul moindre et une meilleure tolérance aux éventuelles déformations de la PSF liées à la forme des gouttes.

Pour une détection du centre de la PSF par la méthode du barycentre, l'erreur de localisation pour une particule fixe s'exprime selon¹⁹⁵ :

$$\sigma = \frac{s_a}{\sqrt{N_{ph}}} \sqrt{1 + \frac{81}{8}q} \quad (\text{IV.24})$$

Avec s_a la largeur de la PSF pixellisée définie en (IV.18) et q le ratio défini en (IV.23). Pour notre système expérimental, nous avons mesuré les ordres de grandeurs suivants :

$$\begin{aligned} N_{ph} &\approx 6.5 \cdot 10^5 \\ b &\approx 7 \cdot 10^3 \end{aligned}$$

Ces ordres de grandeurs sont valables pour la configuration retenue lors de nos expériences, soit des FluoSpheres de rayon nominal 250 μm éclairées en continu et imagées via un objectif 40x avec un temps d'exposition $\Delta t = 100$ ms.

Les calculs et la méthode expérimentale aboutissant à ces ordres de grandeur sont détaillés dans le chapitre 1.1.2 de l'annexe (partie VII).

On peut alors estimer l'erreur de localisation pour une particule fixe :

$$\sigma \approx 11 \text{ nm} \quad (\text{IV.25})$$

L'erreur de localisation pour une particule fixe tient compte de l'erreur liée au processus d'émission des photons signaux, définie en (IV.22). A cette erreur s'ajoute celle liée à la pixellisation du capteur et celle liée à l'imperfection des méthodes de localisation du centre de la PSF, qui dépend du rapport signal sur bruit de fond q (cf (IV.24)).

La relation (IV.24) nous permet d'estimer l'erreur de localisation sur une particule fixe dans nos conditions expérimentales.

Cette erreur est du même ordre de grandeur que l'erreur mesurée expérimentalement lors de la caractérisation de notre système optique, à la fin de ce chapitre.

Le suivi de la diffusion particulaire nécessite cependant l'étude de particules en mouvement. A l'erreur de localisation dont nous avons jusqu'à maintenant discuté va s'ajouter une erreur de mouvement, dont nous allons estimer l'influence dans la prochaine section.

2.2 Erreur de localisation pour une particule diffusante

2.2.1 Flou de mouvement

Nous avons jusqu'à maintenant considéré une particule fixe. Il nous faut à présent tenir compte du mouvement particulaire et des erreurs qu'il induit.

Considérons une particule fluorescente dont le mouvement est uniquement induit par la diffusion brownienne. Durant le temps τ correspondant au temps d'exposition de la caméra, la particule va se déplacer d'une distance caractéristique définie par :

$$l_c(\tau) = \sqrt{2D\tau} \quad (\text{IV.26})$$

L'image de la particule ne sera donc plus ponctuelle, le flou de mouvement entraîne un élargissement de la PSF.

La largeur effective de la PSF s'exprime alors selon¹⁹³ :

$$s = \sqrt{s_a^2 + Rl_c(\tau)^2} \quad (\text{IV.27})$$

$$= \sqrt{s_a^2 + 2RD\tau} \quad (\text{IV.28})$$

R est le coefficient de flou cinétique, il s'exprime selon :

$$R = \frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} S(t)[1 - S(t)]dt \quad (\text{IV.29})$$

avec

$$S(t) = \int_0^t \varsigma(t')dt' \quad (\text{IV.30})$$

La fonction $\varsigma(t)$ est la fonction d'obturateur de la caméra, une fonction à valeurs positives dont l'intégrale sur toute la durée d'exposition vaut 1¹⁹¹. Ainsi, la fonction $S(t)$ correspond à la fraction de l'illumination totale advenant avant l'instant t . Il s'agit donc d'une fonction croissante, comprise entre $S(0) = 0$ et $S(\tau) = 1$ ¹⁹¹.

Pour notre expérience, l'illumination est permanente et constante, et l'obturateur de la caméra est ouvert en continu. On a alors :

$$R = \frac{1}{6} \quad (\text{IV.31})$$

Enfin, en reprenant la relation (IV.28), on a :

$$s = \sqrt{s_a^2 + \frac{D\tau}{3}} \quad (\text{IV.32})$$

Le déplacement de la particule pendant

2.2.2 Obturateur déroulant

La caméra utilisée pour l'observation des particules (cf 2) possède un capteur CMOS à obturateur déroulant (*rolling shutter*).

Afin d'optimiser le débit de transfert lors de la prise de vue les capteurs CMOS à obturateur déroulant expose les lignes de pixels de manière décalée. Sur la moitié supérieure de l'image, les lignes sont exposées l'une après l'autre en partant du centre de l'image. La moitié inférieure de l'image est exposée simultanément, selon le même procédé. Du fait de ce décalage, les capteurs à obturateur déroulant peuvent produire des images déformées lors de la prise de vue de sujets en mouvement.

Cet effet est cependant négligeable dans notre cas: le capteur CMOS FL-400 de notre caméra présente un décalage de 33 μs entre deux lignes successives. Dans nos conditions expérimentales, le déplacement caractéristique maximal des particules (correspondant à une diffusion dans l'eau) est de l'ordre de 400 nm, soit 3 pixels. Cela correspond à un décalage de 100 μs liée à l'obturation déroulante, négligeable devant la durée d'exposition de 100 ms.

2.2.3 Influence de la viscosité

En reprenant l'équation (IV.24) avec la largeur de PSF tenant compte du flou de mouvement (équation (IV.32)), on peut estimer l'erreur de localisation sur une particule diffusante selon :

$$\sigma^2 = \frac{s^2}{N_{ph}} \left(1 + \frac{81}{8}q\right) \quad (\text{IV.33})$$

Nous avons calculé l'erreur σ sur la localisation d'une particule diffusante pour différentes valeurs de viscosité. Les résultats, visibles en figure 44, montrent une nette augmentation de l'erreur pour les faibles viscosités. L'erreur liée au flou cinétique augmente en effet avec la diffusivité des particules.

Sur la figure 44, la courbe noire correspond à un temps d'exposition $\tau = 100$ ms, celui que nous avons retenu pour nos expériences. En rouge, la même courbe a été tracée pour un temps d'exposition plus court, $\tau = 10$ ms.

Dans les deux cas, on vérifie que l'erreur σ tend asymptotiquement vers l'erreur σ_0 correspondant à une particule fixe. La valeur de σ_0 diffère selon le temps d'exposition : nous sommes en effet dans des conditions d'éclairage maximum (cf partie III, 2). Une diminution du temps d'exposition s'accompagne donc d'une diminution du nombre de photons détectés et ainsi une augmentation de l'erreur de localisation.

Le temps d'exposition $\tau = 100$ ms offre ainsi une meilleure précision aux hautes viscosités, mais l'erreur liée au flou de mouvement devient rapidement prépondérante pour des viscosités inférieures à ≈ 15 mPa.s. Le choix de la durée d'exposition dépend donc de la gamme de viscosité ciblée.

Aux faibles viscosités, la contribution principale à l'erreur de localisation est l'erreur liée au flou cinétique. Dans ce cas-là, il est donc préférable de réduire le temps d'exposition pour minimiser cette erreur. La réduction du temps d'exposition s'accompagne d'une diminution du nombre de photons détectés. Aux hautes viscosités, lorsque la diffusivité des particules est faible, il est à l'inverse préférable d'augmenter le temps d'exposition pour minimiser l'erreur de localisation σ_0 . Dans notre cas, l'évolution continue de la viscosité dans les gouttes impose un compromis : la durée d'exposition maximisant la précision n'est pas la même selon qu'on mesure la viscosité de l'eau (0.89 mPa.s à 25°C) ou celle d'une solution concentrée d'anticorps monoclonaux (100-150 mPa.s).

Précisons enfin que cette estimation de l'erreur de localisation liée au flou cinétique est fondée sur l'hypothèse d'un élargissement de la PSF¹⁹⁵ (équation (IV.32)). Aux faibles viscosités, lorsque la diffusivité des particules augmente, il est possible que l'asymétrie de la PSF induise des erreurs de localisation supplémentaires.

La quantification de l'erreur de localisation n'est pour nous pas une fin en soi. Ce que l'on cherche à mesurer, c'est son impact sur la précision de la mesure de la viscosité. Il nous faut pour cela considérer les méthodes utilisées pour l'estimation du coefficient de diffusion.

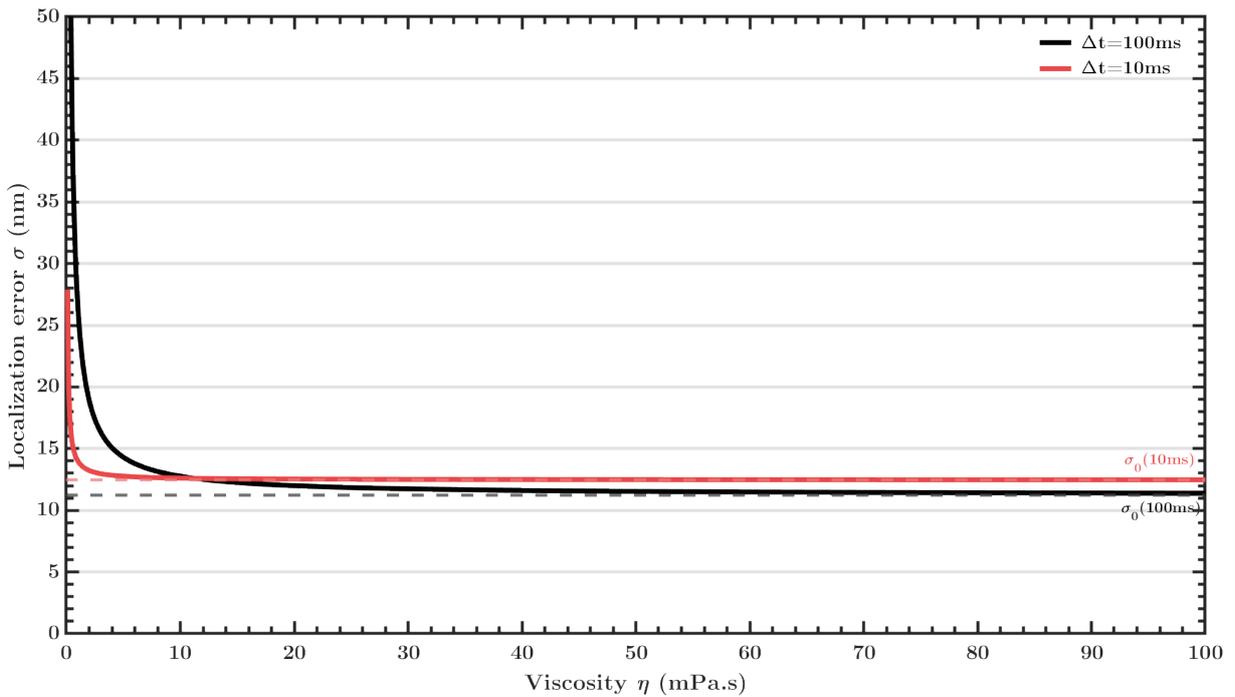


FIG. 44 – Erreur de localisation pour une particule diffusante. Aux faibles viscosités ($\eta \leq 10$ mPa.s) le flou cinétique est la contribution majeure à l'erreur de localisation. A l'inverse, aux hautes viscosités ($\eta \geq 20$ mPa.s), l'erreur liée au flou cinétique est quasi-négligeable et l'erreur de localisation tend vers σ_0 , l'erreur de localisation pour une particule fixe. En choisissant un temps d'exposition $\tau = 100$ ms nous privilégions la précision de la mesure à haute viscosité au détriment de la précision aux faibles viscosités. Nous verrons au chapitre suivant que, compte-tenu des limitations techniques liées à l'acquisition, le choix $\tau = 100$ ms offre une meilleure précision pour $\eta \geq 2$ mPa.s (figure 46)

2.3 Estimation expérimentale de l'erreur de localisation pour une particule fixe

Afin d'estimer expérimentalement l'erreur de localisation liée à notre système, nous avons imagé des particules fixes.

Pour ce faire, une goutte de solution très diluée de traceurs fluorescents (0.2 μL dans 10 mL d'eau) a été étalée sur une lame de verre. Après évaporation de l'eau, des particules fluorescentes isolées se sont

retrouvées collées sur la lame de microscope.

Les particules fixes ainsi obtenues ont été imagées avec les mêmes paramètres que ceux retenus pour la mesure de la viscosité : objectif x40, durée d'exposition $\tau = 100$ ms, LED d'excitation $\lambda_{ex} = 495$ nm réglée à une puissance de 100 %.

Les particules étant immobiles a priori, le mouvement observé est uniquement le résultat de perturbations. Nous avons imagé deux particules fixes voisines, pendant trois acquisitions successives, chaque acquisition ayant une durée de 1000 secondes, correspondant à 10000 images. Ainsi, chaque acquisition équivaut à 10 timelapses de mesure de viscosité.

Les trajectoires particulaires observées révèlent une dérive continue du microscope : en figure 45, on observe un mouvement d'ensemble identique pour les deux particules.

Sur ce graphique, les données issues des trois acquisitions successives ont été représentées, et dénotent un mouvement de dérive continu. Les espaces entre les trois segments discontinus pour la trajectoire d'une particule ne reflètent pas de discontinuité dans leur mouvement, mais correspondent à un temps de pause entre deux acquisitions.

Pour une particule fixe, le mouvement observé est donc le résultat de plusieurs sources de perturbations

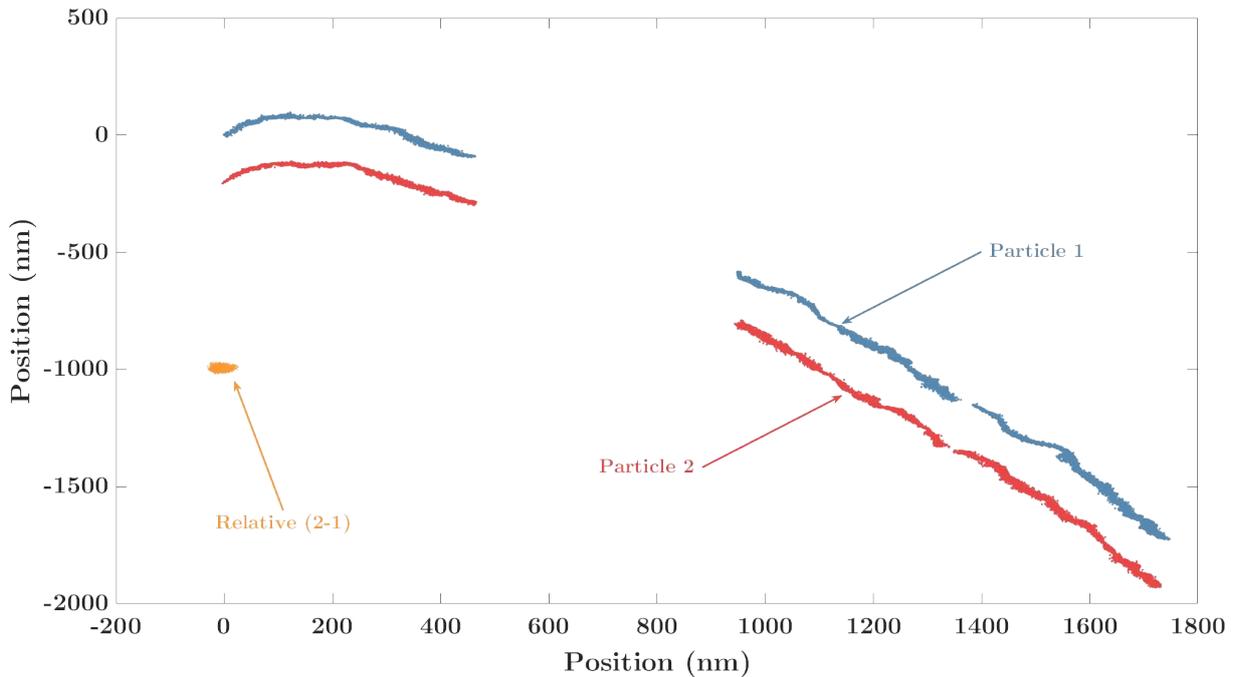


FIG. 45 – Trajectoires détectées pour 2 particules fixes. Les courbes bleue et rouge correspondent aux trajectoires des particules 1 et 2 respectivement, sur les trois acquisitions successives.

Le nuage de points jaune correspond à la trajectoire relative des deux particules, soit la différence des positions de leur centre.

N.B. : la distance réelle entre les particules est de $19 \mu\text{m}$. Les trajectoires ont été rapprochées pour plus de lisibilité, mais ne reflètent pas la position relative réelle des particules. De même, la trajectoire relative des deux particules correspond à des oscillations autour du point de départ. Le nuage de point a été décalé de 1000 nm en ordonnée pour plus de lisibilité.

distinctes.

Il y a premièrement la dérive éventuelle, se traduisant par un mouvement continu de translation.

Ensuite les vibrations, ou autres mouvements soudains du microscope. Ces perturbations sont a priori soudaines et discontinues.

Le mouvement de dérive correspond à la tendance générale de la trajectoire, et ses fluctuations locales correspondent a priori majoritairement aux vibrations du système.

La vitesse de déplacement moyenne mesurée liée à la dérive est de :

$$v_d = 700 \text{ pm.s}^{-1} \quad (\text{IV.34})$$

Le déplacement lié à la dérive est donc de l'ordre de la centaine de nanomètres sur la durée d'une mesure de viscosité (100 s). Entre deux images du timelapse, soit sur une durée $\Delta t = 100$ ms, le déplacement

caractéristique lié à la dérive du microscope est de l'ordre de la centaine de picomètres, négligeable devant le déplacement caractéristique lié à la diffusion ($\approx 1\mu\text{m}$ et $\approx 20\text{ nm}$ pour des viscosités de $0.1\text{ mPa}\cdot\text{s}$ et $500\text{ mPa}\cdot\text{s}$ respectivement).

Enfin, il y a l'erreur de localisation, lié à la résolution et aux performances du système optique (cf 2). Elle se traduit par un bruit aléatoire, élargissant le nuage de points des positions détectées.

Ce que nous cherchons à faire ici, c'est estimer d'une part les mouvements parasites du microscope, et d'autre part l'erreur de localisation des particules. Il nous faut donc décorrélérer les différentes sources d'erreur.

Pour ce faire, nous avons imagé deux particules fixes voisines. La dérive et les vibrations du microscope sont a priori des mouvements d'ensemble, affectant chaque particule de manière identique.

Notons $r_i(t)$ la position d'une particule i à un instant t .

Du fait de l'erreur de localisation, et tout phénomène de dérive exclu, $r_i(t)$ est une variable aléatoire d'écart-type σ_{loc} .

On fait l'hypothèse d'une dérive translationnelle uniquement. On peut donc écrire la position d'une particule i à un instant t selon :

$$r_i(t) = r_i(0) + R(t) + \sigma_{loc}\xi_i \quad (\text{IV.35})$$

Considérons à présent la différence des positions des deux particules imagées.

La dérive $R(t)$ étant la même pour chacune des particules, on a :

$$r_2(t) - r_1(t) = r_2(0) - r_1(0) + \sigma_{loc}(\xi_2 - \xi_1) \quad (\text{IV.36})$$

Avec $R(t)$ la position de la platine à un instant t et ξ_i une distribution normale.

Les erreurs de positions sur chacune des particules étant indépendantes, la variance de la différence des positions est la somme des variances individuelles, selon :

$$\sigma^2(r_2 - r_1) = \sigma^2(r_1) + \sigma^2(r_2) = 2\sigma_{loc}^2 \quad (\text{IV.37})$$

Ainsi, l'écart-type de la différence des positions nous permet de retrouver l'erreur de localisation selon :

$$\sigma(r_2 - r_1) = \sqrt{2}\sigma_{loc} \quad (\text{IV.38})$$

En considérant l'écart-type de la différence des positions des deux particules, on peut donc éliminer le phénomène de dérive et en déduire l'erreur de localisation.

La trajectoire relative des deux particules, visible en figure 45, montre un nuage de points beaucoup plus resserré.

Sur l'ensemble des expériences considérées, on trouve :

$$\sigma_{loc} \approx 7\text{ nm} \quad (\text{IV.39})$$

On retrouve une valeur de σ_0 proche de celle calculée en (IV.33).

Les raisonnements détaillés au cours de ce chapitre nous ont permis d'évaluer l'erreur de localisation liée à notre système optique. Validés expérimentalement, ces évaluations nous ont permis d'ajuster au mieux nos paramètres expérimentaux afin d'optimiser l'estimation du coefficient de diffusion. Comme nous le verrons au prochain chapitre, la précision de l'estimation dépend du rapport signal sur bruit de la localisation des particules.

Chapitre 3

Estimation du coefficient de diffusion

3.1 Définition du problème

Le déplacement de particules browniennes est une variable aléatoire, suivant une loi de probabilité dont le coefficient de diffusion D est un des paramètres.

Le suivi des trajectoires particulières nous donne accès à une distribution de valeurs prises par cette variable, un échantillon de données.

Il existe plusieurs estimateurs statistiques permettant d'approcher la valeur du coefficient de diffusion à partir d'un ensemble de valeurs de déplacement. Chacun présente un fonctionnement propre, et une précision dépendant des caractéristiques de l'ensemble de données considéré.

Au cours de ce chapitre, nous présenterons les estimateurs les plus couramment utilisés en microrhéologie^{108,195,199,200}, et nous évaluerons leur adéquation à notre problème.

3.1.1 Données expérimentales

Considérons une trajectoire particulière quelconque, obtenue lors d'une mesure de viscosité. Cette trajectoire correspond au suivi d'une particule brownienne sur N acquisitions, chaque acquisition étant séparée d'un temps Δt .

La reconstruction algorithmique nous donne accès à la matrice T des positions de la particule aux images $n \in [1, N]$ où la particule a été détectée :

$$T = \begin{pmatrix} x_1 & y_1 \\ x_2 & y_2 \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ x_N & y_N \end{pmatrix} \quad (\text{IV.40})$$

En différenciant la matrice T , on obtient les déplacements de la particule entre chaque image :

$$X = \begin{pmatrix} \Delta x_2 = x_2 - x_1 & \Delta y_2 = y_2 - y_1 \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ \Delta x_N = x_N - x_{N-1} & \Delta y_N = y_N - y_{N-1} \end{pmatrix} \quad (\text{IV.41})$$

Les dimensions de la diffusion brownienne sont indépendantes entre elles : projeté sur chacune d'entre elles, le mouvement de la particule est un mouvement brownien unidimensionnel.

Ainsi, que nous considérons un déplacement moyen en rassemblant les deux colonnes de la matrice X en une seule, ou que nous étudions chacune des dimensions indépendamment, le problème se ramène à l'étude d'un mouvement brownien unidimensionnel.

Sans perte de généralité, nous étudierons dans ce problème un mouvement brownien unidimensionnel, et nous considérerons les déplacements Δx de la particule.

3.1.2 Distribution des déplacements

L'estimation du coefficient de diffusion se fait donc à partir de la matrice X , ensemble des déplacements mesurés de la particule. On retrouve la problématique précédemment évoquée (cf 1.3) : l'estimation se

fait sur un échantillon de taille finie, dont la précision est limitée par un rapport signal sur bruit donné.

La taille de l'échantillon est conditionnée par la durée du timelapse. La durée $N\Delta t$ de l'acquisition est limitée par des contraintes expérimentales, principalement le rétrécissement de la goutte. Nous faisons l'hypothèse que la viscosité dans la goutte est constante pendant l'acquisition, il faut donc que la durée d'acquisition soit courte par rapport au temps caractéristique de rétrécissement.

L'autre facteur limitant la précision de l'estimation, c'est donc le rapport signal sur bruit. Le signal ici, c'est le déplacement de la particule. Le déplacement étant défini comme la différence de deux positions, il est affecté par le bruit de localisation des particules étudié au chapitre précédent (2). L'erreur caractéristique σ sur la localisation de la particule, le bruit, est donc à comparer avec le signal, soit les déplacements de la particule.

La longueur caractéristique de diffusion entre deux images consécutives, qui correspond au mouvement mesurable de la particule, s'exprime selon :

$$l_c(\Delta t) = \sqrt{2D\Delta t} \quad (\text{IV.42})$$

On retrouve l'expression (IV.26), mais avec un intervalle de temps Δt correspondant au délai entre deux images.

Pour une durée d'exposition donnée, le délai entre deux images est nécessairement supérieur au temps d'exposition, et on a $\Delta t \geq \tau$.

On définit le rapport signal sur bruit sur les déplacements de la particule, défini comme le ratio entre la longueur caractéristique de diffusion et le bruit de localisation, et s'exprimant selon :

$$SNR \equiv \frac{\sqrt{2D\Delta t}}{\sqrt{2}\sigma} = \frac{\sqrt{D\Delta t}}{\sigma} \quad (\text{IV.43})$$

Le coefficient de diffusion (équation (IV.3)) et l'erreur de localisation (équation (IV.32)) dépendent de la viscosité du milieu. Ainsi, le rapport signal sur bruit pour le déplacement des particules dépend également de la viscosité (cf figure 46).

La longueur caractéristique de diffusion est proportionnelle à $\sqrt{\Delta t}$. L'erreur de localisation ne dépend pas de Δt , mais de la durée d'exposition τ . Dans un cas théorique, l'idéal serait donc de minimiser le temps d'exposition τ pour minimiser l'erreur liée au flou cinétique, et de maximiser le délai Δt entre deux images. Dans la pratique le nombre de photons signaux détectés peut être un facteur limitant. De même, l'allongement du temps Δt allonge la durée de la mesure et complexifie la reconstruction des trajectoires (partie VII, 3).

Notre dispositif expérimental présente également une contrainte supplémentaire : pour des raisons détaillées en partie III 2.2, nous sommes obligés de remplir la condition $\tau = \Delta t$.

Compte-tenu de cette limitation, le choix $\tau = \Delta t = 100ms$ (courbe noire sur la figure 46) est le plus pertinent quelle que soit la viscosité. Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons différents estimateurs du coefficient de diffusion. Leur précision dépend de l'information disponible, ici quantifiée par le nombre de points N , et la qualité de cette information, quantifiée par le rapport signal sur bruit SNR .

Le rapport signal sur bruit défini en (IV.43) nous permet également de réaliser une première estimation théorique de la viscosité maximale mesurable par notre dispositif expérimental. Lorsque le déplacement caractéristique de la particule est équivalent au bruit de localisation, on considère que la mesure de la viscosité est impossible. Cela correspond à un rapport signal sur bruit de 1. Dans nos conditions expérimentales, on estime :

$$\eta_{loc}^{max} \approx 3.7 \text{ Pa.s} \quad (\text{IV.44})$$

3.2 Estimateurs de D

Nous allons ici présenter deux types d'estimateurs du coefficient de diffusion : ceux fondés sur l'étude du déplacement moyen quadratique (MSD, pour Mean Squared Displacement) et ceux fondés sur l'étude de la covariance des déplacements (CVE, pour Covariance Based Estimator).

L'étude du MSD est de loin la méthode la plus répandue pour l'estimation du coefficient de diffusion. Elle présente cependant des limitations inconciliables avec nos objectifs expérimentaux, comme nous le détaillerons. Dans un second temps, nous présenterons l'estimateur CVE, plus en adéquation avec nos

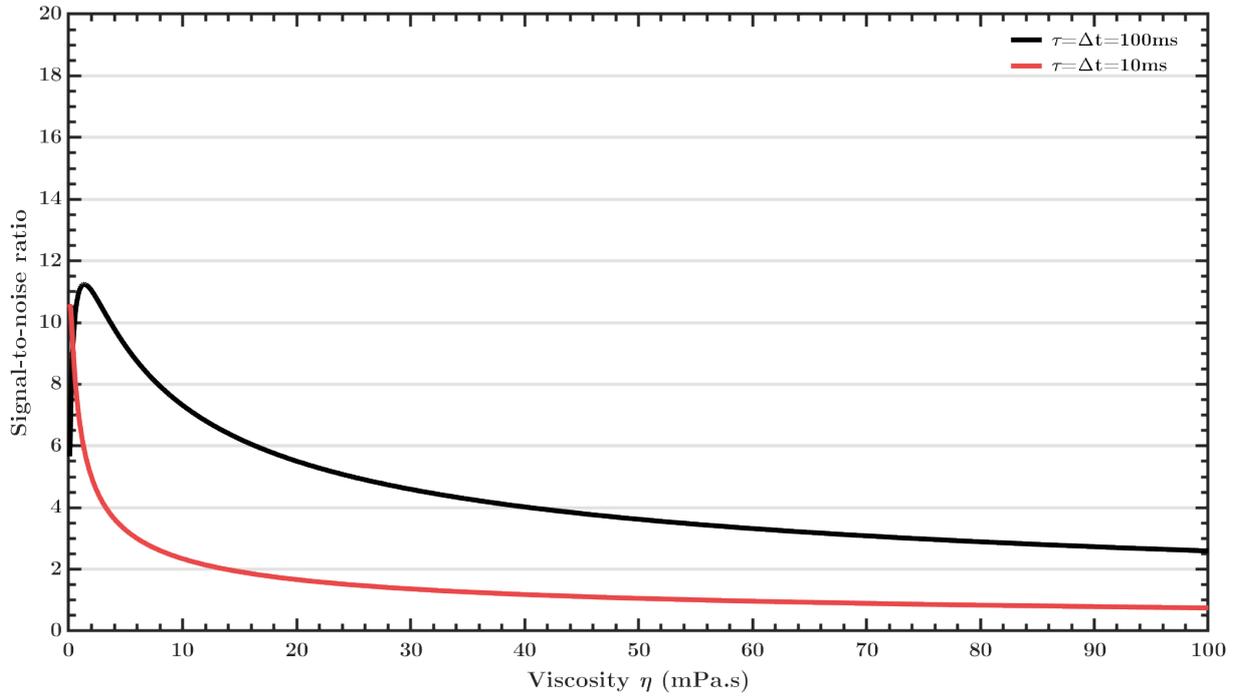


FIG. 46 – La précision de l'estimation du coefficient de diffusion dépend du rapport signal sur bruit entre le déplacement imagé des particules et le bruit de localisation. Notre dispositif expérimental nous impose une acquisition en continu, soit $\tau = \Delta t$. Dans ces conditions, le choix d'un temps d'exposition plus long offre un rapport signal sur bruit supérieur pour les viscosités $\eta \geq 2$ mPa.s

objectifs.

La précision des différents estimateurs a été évaluée à l'aide de simulations numériques. Pour ce faire, des trajectoires simulées ont été générées.

Chacune est un ensemble de positions x_n . La théorie du mouvement brownien développée par Paul Langevin²⁰¹ permet d'exprimer ces positions selon :

$$\begin{aligned} x_1 &= 0 \\ x_{n \in [2, N]} &= x_{n-1} + \xi_{disp} \cdot \sqrt{2D\Delta t} + \xi_{loc} \cdot \sigma \end{aligned} \quad (\text{IV.45})$$

ξ_{disp} et ξ_{loc} sont des variables aléatoires suivant une loi normale centrée réduite. Le terme $\xi_{disp} \cdot \sqrt{2D\Delta t}$ correspond au déplacement aléatoire de la particule entre deux observations, et le terme $\xi_{loc} \cdot \sigma$ correspond au bruit de localisation.

L'expérience est répétée pour 100 durées de trajectoires, réparties entre 10 et 10 000 points (avec $\Delta t = 100$ ms). Pour chaque durée de trajectoire, la simulation est répétée 1000 fois pour obtenir une distribution d'estimations.

La figure 48 reproduit la distribution des estimations du coefficient de diffusion pour ces expériences, pour l'estimateur CVE.

L'allure de la distribution des valeurs de \hat{D} permet alors d'évaluer la précision de l'estimation.

3.2.1 Estimateur MSD

Déplacement moyen quadratique

Notons $d(t)$ le déplacement d'une particule diffusante, non plus entre deux images du timelapse mais sur une durée t . $\langle d(t)^2 \rangle$ est le déplacement moyen quadratique de cette particule sur la même durée.

Pour un processus idéal, le déplacement moyen quadratique est donné par l'équation caractéristique du mouvement brownien (IV.6). En tenant compte de l'erreur de localisation et du flou cinétique, cette relation devient¹⁹⁴ :

$$\langle d(t)^2 \rangle = 2Dt + 2(\sigma^2 - 2DR\Delta t) \quad (\text{IV.46})$$

En calculant le déplacement moyen quadratique pour plusieurs valeurs de t , on peut donc obtenir la valeur de D par régression linéaire.

Dans notre cas, les valeurs de t accessibles sont conditionnées par les paramètres du timelapse. On a :

$$t = n\Delta t, \text{ avec } n \in [1, N] \quad (\text{IV.47})$$

On a donc accès à N valeurs du déplacement moyen quadratique, selon qu'on considère les déplacements de la particule après une durée Δt , $2\Delta t$, et ainsi de suite jusqu'à $N\Delta t$.

Pour ces N valeurs la relation (IV.46) s'écrit :

$$\langle d_n^2 \rangle = 2Dn\Delta t + 2(\sigma^2 - 2DR\Delta t) \quad (\text{IV.48})$$

Les positions successives de la particule (cf (IV.40)) permettent de calculer les différentes valeurs du déplacement moyen quadratique, selon :

$$\langle d_n^2 \rangle = \frac{1}{N-n+1} \sum_{i=0}^{N-n} (x_{i+n} - x_i)^2 \quad (\text{IV.49})$$

Ainsi le tracé des points $(n, \langle d_n^2 \rangle)$ permet d'obtenir le coefficient $2D\Delta t$ par régression linéaire, et donc d'estimer le coefficient de diffusion D .

Ajustement du MSD

Cette méthode, largement utilisée pour l'estimation de coefficients de diffusion^{139,202}, entraîne une variance importante sur l'estimation \hat{D} . L'ajustement non pondéré présente en effet un inconvénient majeur : en terme de qualité d'information, toutes les valeurs de $\langle d_n^2 \rangle$ ne se valent pas. Aux faibles valeurs de n , le calcul de $\langle d_n^2 \rangle$ se fait sur un grand nombre de déplacements. En revanche, selon les valeurs de D et de Δt , il est possible que le déplacement caractéristique de la particule durant un temps $n\Delta t$ ne soit pas assez important pour être distingué du bruit de localisation.

A l'inverse, pour des valeurs de n au voisinage de N , le déplacement de la particule est très grand devant l'erreur de localisation, mais le nombre de déplacements pris en compte est limité, jusqu'à $n = N$ où on ne considère qu'un seul déplacement.

La diminution du nombre de déplacement considéré augmente le risque d'erreur sur le MSD. On le constate en figure 47 : si l'évolution du MSD est initialement rectiligne, on observe d'importantes fluctuations aux grands déplacements.

Il existe des méthodes permettant d'optimiser l'ajustement du MSD, en déterminant l'intervalle de n au sein duquel l'erreur de localisation est minimisée sans que le nombre de déplacements observés ne devienne statistiquement trop faible¹⁹⁹, voire en ne considérant qu'une seule valeur de MSD possédant le poids statistique le plus significatif¹⁰⁸.

Sans même tenir compte de la complexité ajoutée par ces calculs statistiques, il a été démontré que ces ajustements dépendent du coefficient de diffusion, et donc de la viscosité du milieu¹⁹⁹, les rendant peu indiqués à nos expériences.

De plus, la précision des estimateurs MSD optimisés dépend fortement du nombre de points considérés dans la trajectoire. De manière contre-intuitive, leur précision s'effondre lorsque le nombre de points de mesure devient trop important.

On serait tenté de postuler qu'un plus grand nombre de points de mesure amène une plus grande quantité d'information. Rappelons par exemple que pour la localisation de la position d'un émetteur ponctuel, la précision augmente avec le nombre de photons détectés (cf (IV.22)).

Ce postulat s'applique à des points de mesure statistiquement indépendants. Le comportement de chacun des N_{ph} photons formant l'image d'un point source est indépendant des $N_{ph} - 1$ autres.

Les N valeurs de déplacement moyen quadratiques ne sont pas statistiquement indépendantes²⁰², car elles sont calculées à partir d'une même trajectoire.

Il faut donc optimiser le nombre de points pris en compte pour maximiser la précision de l'estimation de D . Dans le cas contraire, le coefficient D obtenu peut être plusieurs ordres de grandeur plus important que la valeur réelle²⁰⁰.

Là encore, des régressions statistiques permettent d'optimiser le nombre N de mesures à prendre en compte, mais là encore il a été démontré²⁰⁰ que ces valeurs optimales dépendent du coefficient de diffusion, et donc de la viscosité.

Sans optimisation statistique, un seul paramètre permet d'augmenter la précision de l'estimateur MSD : le nombre P de particules suivies simultanément. Les déplacements de particules distinctes sont

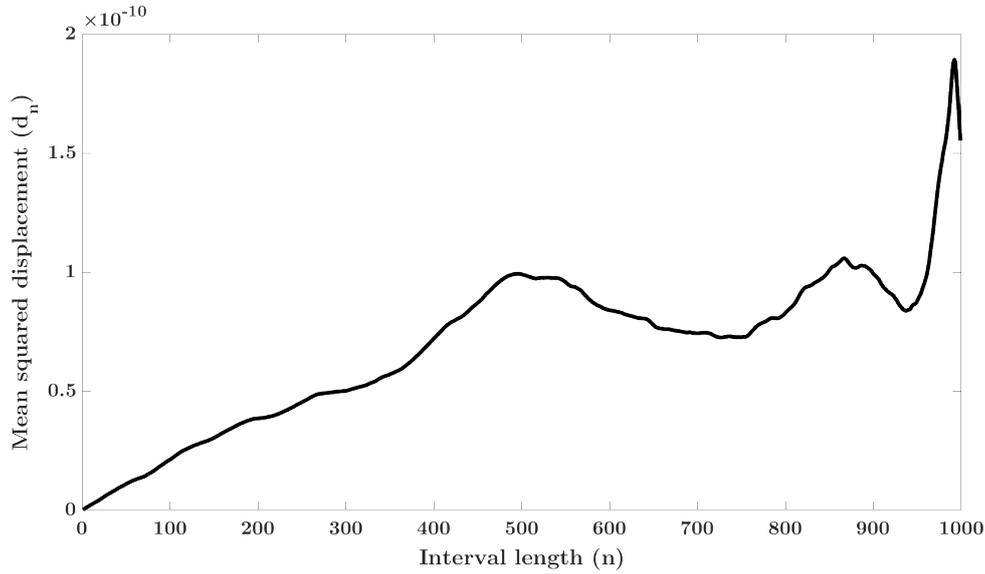


FIG. 47 – Évolution du déplacement moyen quadratique en fonction de la durée du déplacement considéré. Les différentes valeurs des déplacements moyens quadratiques $\langle d_n^2 \rangle$ (équation (IV.49)) à partir de la trajectoire simulée d'une particule brownienne (équation (IV.45)). À chaque valeur de n , un intervalle de déplacement $n\Delta t$ est considéré pour le calcul du MSD. Le début de la courbe $(n, \langle d_n^2 \rangle)$ suit une évolution rectiligne conforme à la relation (IV.48). Pour les déplacements long, le manque de précision entraîne d'importantes fluctuations du MSD, perturbant son ajustement.

statistiquement indépendants. Par conséquent, comme pour la statistique photonique, la précision de l'estimateur MSD est proportionnelle à \sqrt{P} . Les travaux de microrhéologie utilisant l'estimateur MSD^{108,139} font systématiquement mention d'un nombre minimum de particules à suivre simultanément pour obtenir une précision acceptable.

Les capacités des algorithmes de reconstruction des trajectoires imposent une densité maximum de particules, au-delà de laquelle le suivi n'est plus possible (cf partie VII, 3). Pour des expériences de microrhéologie en gouttes, a fortiori si celles-ci rétrécissent pendant l'expérience, l'utilisation de l'estimateur MSD impose une limite inférieure à la taille des gouttes^{108,139}.

3.2.2 Estimateur CVE

L'estimateur CVE (Covariance-Based Estimator), développé par Christian L. Vestergaard¹⁹³, se base sur la matrice de covariance des déplacements entre chaque image du time-lapse. En tenant compte des erreurs de localisation et du flou cinétique, la position imagée d'une particule sur une image n du timelapse s'exprime selon¹⁹⁵ :

$$x_n = \int_{(n-1)\Delta t}^{n\Delta t} x_{true}(n\Delta t - t)\zeta(t)dt + \sigma\xi_n \quad (\text{IV.50})$$

Avec $\zeta(t)$ la fonction décrivant l'état de l'obturateur, définie en (IV.29).

A partir de cette équation, il est possible de calculer la covariance de la matrice X des déplacements, définie en (IV.41), selon¹⁹³ :

$$\langle (\Delta x_n)^2 \rangle = 2D\Delta t + 2(\sigma^2 - 2DR\Delta t) \quad (\text{IV.51})$$

$$\langle \Delta x_n \Delta x_{n+1} \rangle = -(\sigma^2 - 2DR\Delta t) \quad (\text{IV.52})$$

$$\langle \Delta x_m \Delta x_n \rangle = 0, \text{ pour } |n - m| > 1 \quad (\text{IV.53})$$

L'équation (IV.52) paraît contraire au caractère stochastique du mouvement brownien. Rappelons-le, les déplacements successifs sont indépendants.

D'où vient la corrélation des variables Δx_n et Δx_{n+1} ?

En fait, si les déplacements réels de la particule sont bien indépendants, les déplacements imagés ne

le sont pas : comme expliqué au début de ce chapitre, l'erreur de localisation et le flou de mouvement affectent la position de la particule. Les déplacements successifs de la particule s'expriment selon :

$$\Delta x_n = x_n - x_{n-1} \quad (\text{IV.54})$$

$$\Delta x_{n+1} = x_{n+1} - x_n \quad (\text{IV.55})$$

$$(\text{IV.56})$$

Les deux déplacements successifs de la particule font donc intervenir la position x_n . Ainsi, l'existence d'une erreur sur cette position induit la corrélation des déplacements successifs.

La résolution du système d'équations (IV.51) et (IV.52) nous permet de définir des estimateurs non-biaisés pour D et σ ¹⁹³ :

$$\hat{D} = \frac{\langle (\Delta x_n)^2 \rangle}{2\Delta t} + \frac{\langle \Delta x_n \Delta x_{n+1} \rangle}{\Delta t} \quad (\text{IV.57})$$

$$\hat{\sigma}^2 = R\langle (\Delta x_n)^2 \rangle + (2R - 1)\langle \Delta x_n \Delta x_{n+1} \rangle \quad (\text{IV.58})$$

Ces équations témoignent de la simplicité et de la puissance de l'estimateur CVE. Défini par l'existence d'une corrélation entre déplacements successifs liée au bruit de localisation, cet outil statistique met à profit cette corrélation pour réduire l'influence du bruit sur l'estimation de D (équation (IV.57)), et permet également une estimation du bruit avec l'équation (IV.58).

En plus d'être non-biaisé et optimal¹⁹³, l'estimateur CVE ne fait pas intervenir de régression ou de calcul de distribution, contrairement aux estimateurs MSD précédemment évoqués. La puissance et le temps de calcul nécessaires s'en trouvent ainsi considérablement réduits, ce qui représente un avantage indéniable dans notre cas.

Également, la variance de l'estimateur CVE (détaillée en (IV.59) et visible en figure 48) est proportionnelle à $1/N$, avec N le nombre de déplacements observés. Ainsi, le nombre de particules suivies

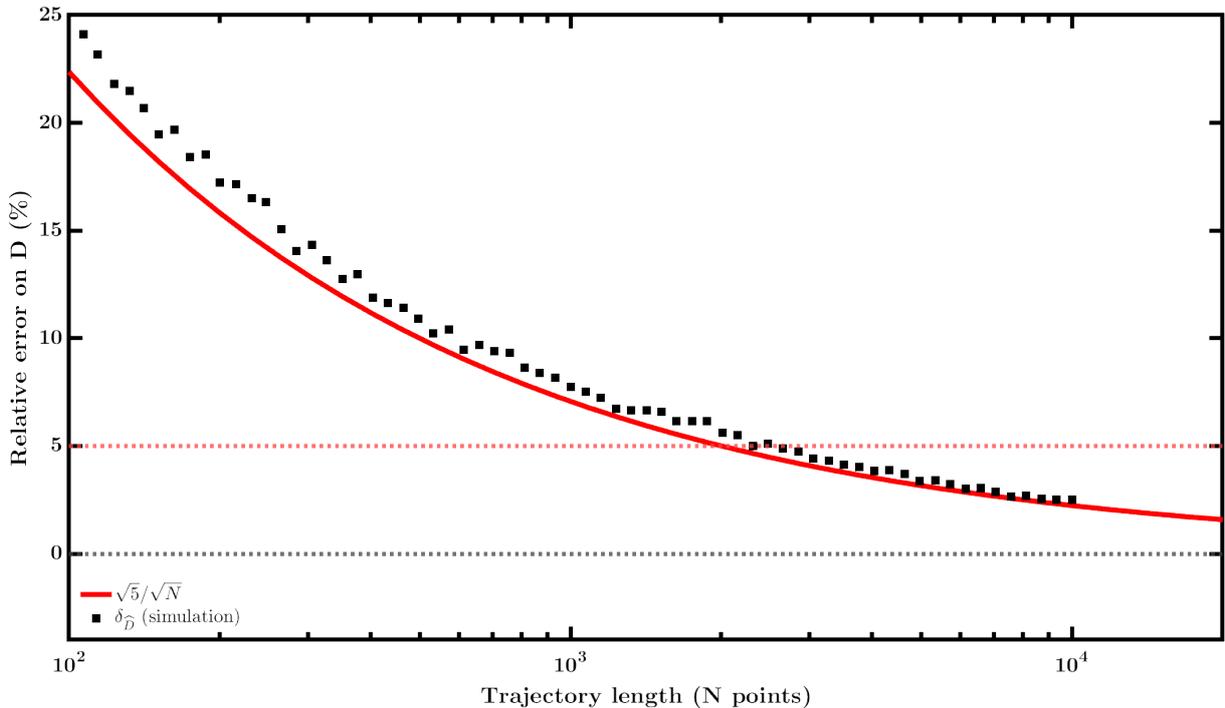


FIG. 48 – Erreur relative de l'estimateur CVE pour différentes longueurs de trajectoire. Chaque point (N, δ_{CVE}) correspond à l'erreur relative sur un échantillon de 1000 trajectoires simulées de longueur N . La courbe continue correspond à la variance théorique de l'estimateur, donnée par la relation (IV.59).

simultanément n'affecte plus la précision de l'estimation de D . Une particule suivie sur 1000 images aboutira théoriquement à la même précision que deux particules suivies sur 500 images ou 10 particules suivies

sur 100 images.

En réduisant le nombre de traceurs encapsulés dans les gouttes, nous pouvons mesurer la viscosité dans la goutte sur une gamme de volume étendue, sans que le faible nombre de particules impacte la précision de la mesure de D aux volumes importants, et sans que la reconstruction des trajectoires ne soit rendue impossible aux faibles volumes.

Cette propriété de l'estimateur CVE est donc cruciale pour la précision et les capacités de notre système. Ce raisonnement ne tient pas compte de l'erreur liée à la polydispersité des traceurs étudiés, qui varie comme $1/\sqrt{P}$, avec P le nombre de particules distinctes suivies simultanément.

3.3 Erreur sur D

Pour une particule suivie sur N observations avec une erreur de localisation σ , la relation (IV.57) permet d'exprimer la variance de l'estimateur CVE¹⁹³ :

$$\text{var}(\hat{D}) = D^2 \left[\frac{6 + 4\epsilon + 2\epsilon^2}{N} + \frac{4(1 + \epsilon)^2}{N^2} \right] \quad (\text{IV.59})$$

Avec :

$$\epsilon = \frac{\sigma^2}{D\Delta t} - 2R \quad (\text{IV.60})$$

Dans notre cas, compte-tenu du rapport signal sur bruit de la diffusion par rapport au bruit de localisation (cf (IV.43)), on vérifie la condition suivante jusqu'à $\eta \approx 400$ mPa.s :

$$\sigma^2 \ll D\Delta t \quad (\text{IV.61})$$

On peut ainsi faire les approximations suivantes :

$$\begin{aligned} \epsilon &\approx -2R \\ \text{var}(\hat{D}) &\approx D^2 \left(\frac{5}{N} + \frac{1}{N^2} \right) \\ \text{var}(\hat{D}) &\approx \frac{5D^2}{N} \end{aligned} \quad (\text{IV.62})$$

Ainsi, l'erreur absolue sur \hat{D} , correspondant à l'écart-type de sa distribution, est proportionnelle au coefficient de diffusion, selon :

$$\sqrt{\text{var}(\hat{D})} \propto \frac{D}{\sqrt{N}} \quad (\text{IV.63})$$

On exprime enfin l'erreur relative sur le coefficient de diffusion selon :

$$\delta_{\hat{D}} = \frac{\sqrt{\text{var}(\hat{D})}}{\langle \hat{D} \rangle} \propto \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (\text{IV.64})$$

Pour un nombre d'observations N fixé et dans le cadre de la condition (IV.61), on remarque que l'erreur relative ne dépend pas de la viscosité. Cette approximation est vérifiée numériquement, avec une variation de $\delta_{\hat{D}}$ inférieure à 0.05% sur la gamme 1-1000 mPa.s, pour $N = 1000$ images.

Pour une viscosité donnée, on vérifie bien (cf figure 49) que l'erreur relative décroît en $1/\sqrt{N}$.

Il est important de rappeler que pour l'estimateur CVE, le nombre d'observations correspond au nombre total de déplacements enregistrés, quel que soit le nombre de particules suivies ou la longueur des trajectoires. La précision de l'estimateur est équivalente, que l'on suive 10 particules sur 100 images ou une particule sur 1000 images par exemple.

Pour la majorité des expériences réalisées, le nombre total d'observations se situe entre 3000 et 7000, ce qui correspond à la zone grisée sur la figure 49.

Ainsi, l'erreur relative estimée sur \hat{D} est inférieure à 5% pour la quasi-totalité de nos expériences, atteignant l'objectif de précision que nous nous étions fixé.

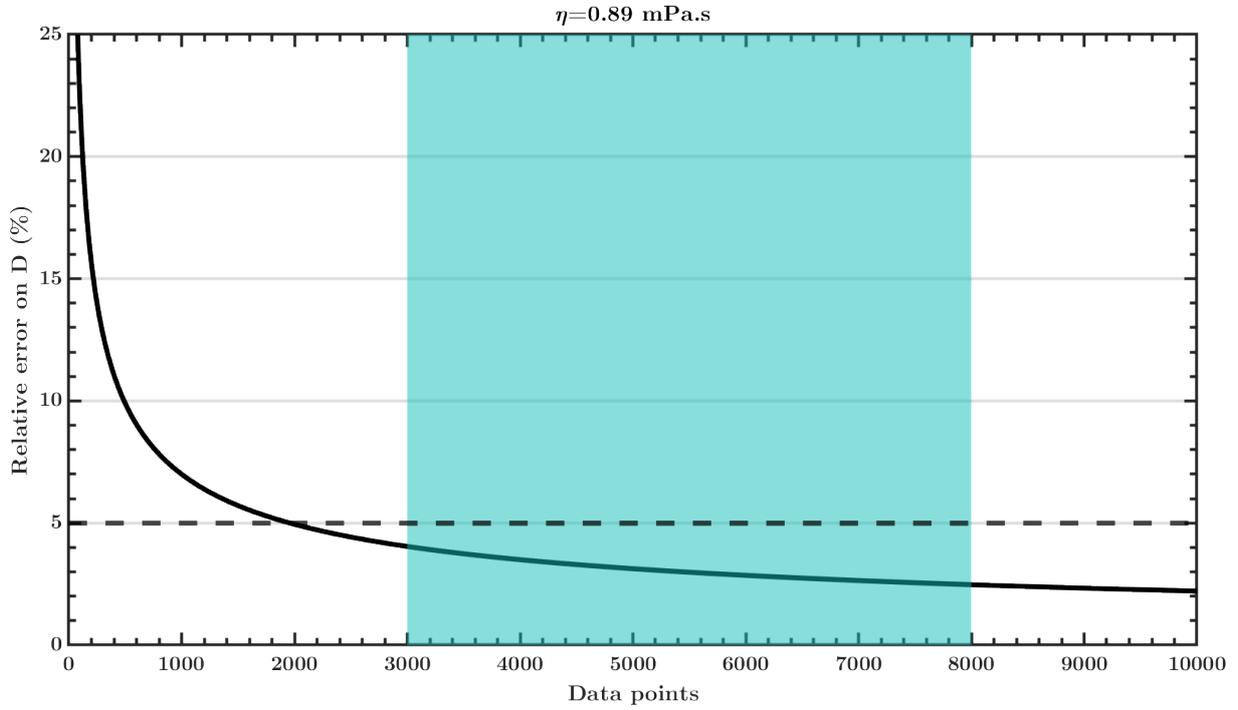


FIG. 49 – Erreur relative sur le coefficient de diffusion en fonction du nombre d’observations, pour une viscosité égale à celle de l’eau à 25°C. Le nombre d’observations correspond au nombre total de déplacements particuliers enregistrés. Pour nos expériences, le nombre total de déplacements est compris entre 3000 et 8000. Dans cet intervalle, représenté par la zone bleutée sur la figure, l’erreur relative sur D est inférieure à 5%. Rappelons que nous considérons les deux dimensions de diffusion de la particule indifféremment. Un déplacement particulière imagé en deux dimensions correspond donc à deux observations.

3.4 Pondération des trajectoires

Pour chacune des trajectoires détectées, la méthode ci-dessus nous permet donc d’estimer un coefficient de diffusion \hat{D}_i .

Rappelons ici la loi de Stokes-Einstein décrivant le coefficient de diffusion d’une particule brownienne :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{IV.65})$$

(avec $k_B \approx 1.38 \cdot 10^{-23} \text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité dynamique et r le rayon de la particule)

Pour chaque trajectoire $i \in [1, N]$ dont on a estimé le coefficient de diffusion, on peut donc définir une estimation de la viscosité :

$$\hat{\eta}_i = \frac{k_B T}{6\pi \hat{D}_i r} \quad (\text{IV.66})$$

Enfin, en calculant la moyenne pondérée des viscosités en fonction de longueur n_i de chaque trajectoire¹⁹⁴, on en déduit une estimation de la viscosité dynamique au sein de la goutte selon :

$$\hat{\eta} = \frac{\sum_{i=1}^N n_i \hat{\eta}_i}{\sum_{i=1}^N n_i} \quad (\text{IV.67})$$

Cinquième partie

Résultats et discussion

Chapitre 1

Introduction

Nous avons, au cours de ce manuscrit, présenté notre dispositif de mesure et détaillé les différentes caractéristiques et techniques lui permettant d'atteindre son objectif: mesurer la viscosité de solutions de protéines sur une gamme cible de 1-150 mPa.s et avec un facteur de concentration ≥ 50 .

Nous avons également discuté des sources d'erreur potentielles, susceptibles d'affecter la précision de nos mesures et le fonctionnement de notre dispositif. L'influence de certaines d'entre elles a été évaluée, analytiquement ou encore grâce à des simulations numériques.

Pour d'autres, notamment celles liées plus spécifiquement à notre méthode, l'impact réel n'a pas été évalué et nécessite donc une vérification expérimentale.

Les expériences réalisées pendant la durée de ce doctorat ont eu des objectifs multiples. Lors de la phase de conception, il a premièrement fallu s'assurer de la faisabilité des expériences envisagées, valider les choix réalisés lors de la conception de la puce, et aiguiller les choix à venir pour les versions suivantes.

Les résultats présentés dans ce chapitre proviennent d'expériences de validation, ayant pour objectif de démontrer la viabilité et les performances de notre système.

Une première série d'expériences, étudiant la viscosité de l'eau pure, permet une estimation de la précision de la microrhéologie par suivi de particules multiples, ainsi qu'une évaluation de l'influence de paramètres isolés sur la mesure de la viscosité.

Dans un second temps l'étude de la viscosité des solutions de sucrose permet d'évaluer la performance de notre dispositif dans son ensemble, en tenant compte du phénomène de concentration du soluté dans la goutte. La précision des mesures a pu être évaluée, en comparant les résultats d'un grand nombre d'expériences avec des valeurs tabulées.

Nous verrons également que l'utilisation de phase continue plus visqueuse permet d'étendre la gamme de viscosité mesurables un ordre de grandeur au-dessus de la gamme cible (1-150 mPa.s), confirmant le potentiel de notre approche pour la manipulation et la rhéologie de solutions très concentrées.

Enfin, nous avons démontré la capacité de notre système à travailler avec des volumes faibles de solutions de protéines en étudiant la viscosité de l'albumine et du lysozyme, deux protéines globulaires couramment utilisées comme modèle pour la rhéologie des solutions de protéines concentrées.

En l'absence de valeurs tabulées, nous avons comparé le comportement visqueux de l'albumine et du lysozyme à des modèles hydrodynamiques et à des tendances décrites dans la littérature.

Nous discuterons enfin des avantages offerts par notre dispositif, ainsi que de ses limites.

Chapitre 2

Microrhéologie

Les calculs et les simulations informatiques ont un avantage indéniable, celui de pouvoir évaluer chaque paramètre individuellement, et ainsi décorrélérer l'étude des différentes sources d'erreur.

Le rayon de la goutte, la densité et la répartition des particules ou la viscosité de la solution étudiée sont autant de paramètres ayant une influence potentielle sur la précision des mesures et donc l'impact a été discuté au cours de ce manuscrit. Ces paramètres ont un autre point commun : tous varient de manière importante au cours d'une expérience typique.

2.1 Rhéologie de l'eau

Nous avons cherché à étudier autant que faire se peut l'influence de chacun des paramètres considérés de manière indépendante.

L'étude de la viscosité de l'eau pure possède une avantage unique dans la poursuite de cet objectif : sa viscosité ne dépend pas du degré de rétrécissement des gouttes.

Cela permet d'éliminer toutes les erreurs liées à la mesure de la concentration dans la goutte (partie III), pour se concentrer sur la microrhéologie.

Rappelons le principe de la microrhéologie telle qu'appliquée dans notre dispositif : dans la goutte, les particules sont animées d'un mouvement brownien. Le suivi des trajectoires particulières permet l'estimation du coefficient de diffusion associé à ce mouvement brownien, coefficient que l'on peut ensuite relier à la viscosité du milieu via la relation de Stokes-Einstein.

En permettant l'acquisition d'un grand nombre de points de mesures au sein d'une même goutte de viscosité constante, l'étude de l'eau pure permet d'obtenir un échantillon de données de taille statistiquement significative, suffisamment importante pour évaluer la corrélation entre les viscosités mesurées et divers paramètres.

Pour ce faire, nous avons réalisé une première série d'expériences dans des gouttes sans rétrécissement.

En remplissant d'eau le canal latéral de la puce, ou en utilisant des puces sans canal latéral, ce protocole expérimental permet d'estimer la variance de la mesure de la viscosité avec des conditions expérimentales similaires : pour une série de mesures sur une même goutte, le diamètre de la goutte varie peu et on image généralement les mêmes particules.

Les résultats suivants proviennent du suivi de 996 trajectoires indépendantes dans un goutte de rayon fixe $R=140\mu\text{m}$, accumulées sur 20 acquisitions successives et représentant un total de 155635 points de mesure.

Le terme d'eau pure est employé par simplicité, il s'agit plus précisément de gouttes contenant une solution de NaCl à 10 mM dans de l'eau ultra-pure (milli-Q). L'ajout d'une quantité minimale de sel permet d'écranter les interactions électrostatiques, et est une pratique standard en DLS par exemple¹⁸³. Nous considérons sans trop de risque que la viscosité de l'eau n'en est pas affectée.

Notations

Pour la mesure de la viscosité de l'eau, et plus généralement pour tous les résultats présentés, on adoptera la notation suivante : au cours d'une acquisition correspondant à un timelapse de 100 secondes, un certain nombre de trajectoires sont détectées. On notera $\hat{\eta}_i$ la viscosité estimée pour une trajectoire donnée, et $\hat{\eta}$ la viscosité correspondant à l'ensemble de l'acquisition, obtenue par moyenne pondérée des

$\widehat{\eta}_i$ (relation (IV.67)).

L'ensemble des acquisitions réalisées sur une même goutte constitue une expérience, et on notera $\langle \widehat{\eta} \rangle$ la moyenne pondérée des viscosités mesurées.

Le cas échéant, la notation η fera référence à la viscosité attendue. Dans le cas de l'eau, il s'agira de la viscosité tabulée (13).

Dans certains cas, la dépendance de deux paramètres donnés a été évaluée au moyen d'une corrélation de Spearman²⁰³, quantifiant la monotonie de la relation entre deux variables. La valeur du coefficient ρ ($\rho = -1$ ou $\rho = 1$ dans le cas d'une monotonie parfaite, $\rho \rightarrow 0$ en l'absence totale de corrélation) et de la valeur-p associée (quantifiant significativité statistique d'un modèle) nous permettrons d'évaluer la corrélation éventuelle.

2.2 Estimateur CVE

Nous avons présenté en IV3.2.2 l'estimateur CVE (CoVariance-based Estimator), outil statistique mettant à profit la corrélation des déplacements imagés pour estimer le coefficient de diffusion des particules.

Distribution des viscosités mesurées

Notre approche expérimentale consiste à suivre des trajectoires particulières individuelles dans le plan équatorial de la goutte. Pour chaque trajectoire, un coefficient de diffusion est calculé par l'estimateur CVE. On obtient donc une viscosité par trajectoire mesurée, via la relation de Stokes-Einstein (IV.3).

En étudiant la distribution des viscosités mesurées en fonction de la longueur des trajectoires associées, on peut évaluer la performance de l'estimateur CVE.

La distribution des viscosités mesurées, visible en figure 50 montre l'adéquation des mesures à l'expression théorique de la variance (équation (IV.59)), représentée par une courbe en pointillés rouges. On constate également que la distribution des viscosités mesurées suit la même tendance que la distribution simulée numériquement, visible en figure 48.

Cette expérience nous permet de confirmer l'avantage majeur que représente l'estimateur CVE : pour le suivi d'une particule unique, la précision de l'estimation augmente avec le nombre de points de mesure, quels que soient les paramètres expérimentaux.

Estimation du rapport signal sur bruit

Rappelons qu'à partir des expressions de la covariance (IV.51) et (IV.52), l'estimateur CVE permet non seulement de calculer D (équation (IV.57)) mais également d'estimer le bruit σ sur la localisation des particules par la relation (IV.58). Il nous est ainsi possible d'estimer le rapport signal sur bruit sur la diffusion des particules, défini par l'équation (IV.43).

Pour l'expérience considérée, on trouve :

$$\widehat{D} \approx 1.1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1} \quad (\text{V.1})$$

$$\widehat{\sigma} \approx 6 \cdot 10^{-8} \text{ m} \quad (\text{V.2})$$

$$\widehat{SNR} \equiv \frac{\sqrt{\widehat{D}\Delta t}}{\widehat{\sigma}} \approx 6 \quad (\text{V.3})$$

L'erreur de localisation estimée est de 60 nm pour la mesure de la viscosité de l'eau pure. Cette valeur est cohérente avec l'estimation théorique définie par la relation (IV.33), qui était de ≈ 30 nm pour la viscosité de l'eau (figure 44). L'estimation théorique ne tenant pas compte des sources de bruit autres que la localisation des particules, il est normal que l'erreur réelle soit plus importante, notamment du fait de la polydispersité des particules comme nous aurons l'occasion d'en discuter.

De même, l'estimation du rapport signal à bruit réel (≈ 6) est légèrement plus faible que l'estimation théorique (≈ 10 , figure IV.43).

La mesure de viscosité plus élevées confirme les tendances visibles en figures 44 et 46 : pour une viscosité de 100 mPa.s, on trouve une erreur de localisation $\widehat{\sigma} \approx 20$ nm pour une estimation théorique $\sigma \approx \sigma_0 \approx 11$ nm, et un rapport signal sur bruit estimé à $\widehat{SNR} \approx 4$, légèrement en dessous de l'estimation théorique $SNR \approx 2.5$.

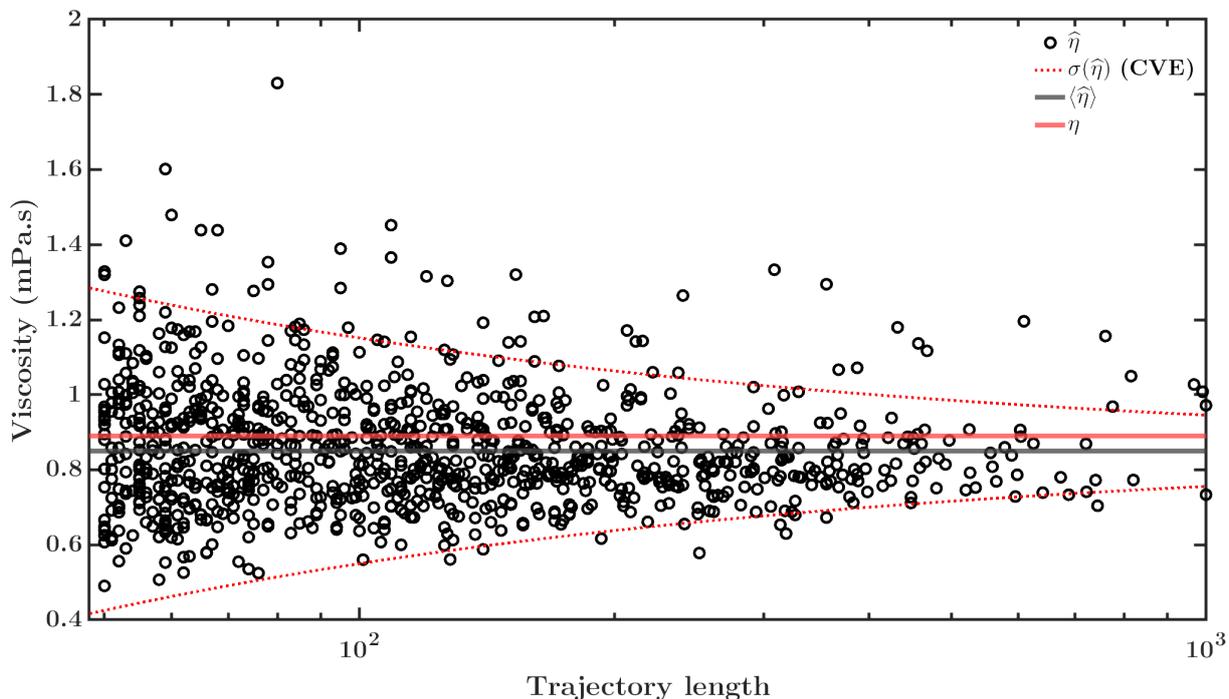


FIG. 50 – Répartition des viscosités mesurées pour 996 trajectoires (mêmes données que sur la figure 51, correspondant à l'expérience 2 du tableau 8). La précision de l'estimateur CVE semble converger en $1/\sqrt{N}$, confirmant l'expression théorique (équation (IV.59)) de la variance représentée par la courbe en pointillés rouges, et rappelant l'allure des estimations simulées numériquement (figure 48).

2.3 Diffusion des particules

Une fois confirmé notre choix pour l'estimateur du coefficient de diffusion, intéressons nous au calcul de la viscosité.

La relation de Stokes-Einstein compare la mobilité des particules à la force de traînée qu'elles subissent. En utilisant l'expression (IV.3), nous avons implicitement fait l'hypothèse d'une diffusion isotrope dans un milieu homogène.

La traînée de Stokes telle que définie en (IV.2) est valable pour une particule sphérique en mouvement dans un fluide homogène et infini, ce qui ne correspond à notre réalité expérimentale.

2.3.1 Confinement et effets de bord

N'étant pas solubles dans la phase continue, les traceurs ne sortent pas des gouttes (ce qui nous arrange par ailleurs). Ainsi, leur diffusion a lieu dans un milieu confiné. La présence de l'interface entre la goutte et la phase continue a un impact sur la diffusion des particules. De même, la trajectoire de chaque particule aura un impact sur celle des autres.

La proximité entre les traceurs et l'interface de la goutte a tendance à augmenter la norme de la force de traînée s'exerçant sur eux, diminuant ainsi leur coefficient de diffusion et entraînant enfin une surestimation de la viscosité mesurée par notre dispositif.

Une solution analytique permet de quantifier l'influence d'une interface infinie et plane sur le mouvement d'une particule sphérique. Au moyen d'approximations, nous avons estimé que l'erreur relative sur la viscosité pouvait atteindre les 5% pour des rayons de goutte inférieurs à 35 μm . (le raisonnement aboutissant à cette estimation est détaillé au chapitre 4, en partie VII).

Là encore, le grand nombre et la variété des trajectoires suivies lors de mesures répétées sur une goutte fixe permettent de confronter cette estimation à nos observations expérimentales.

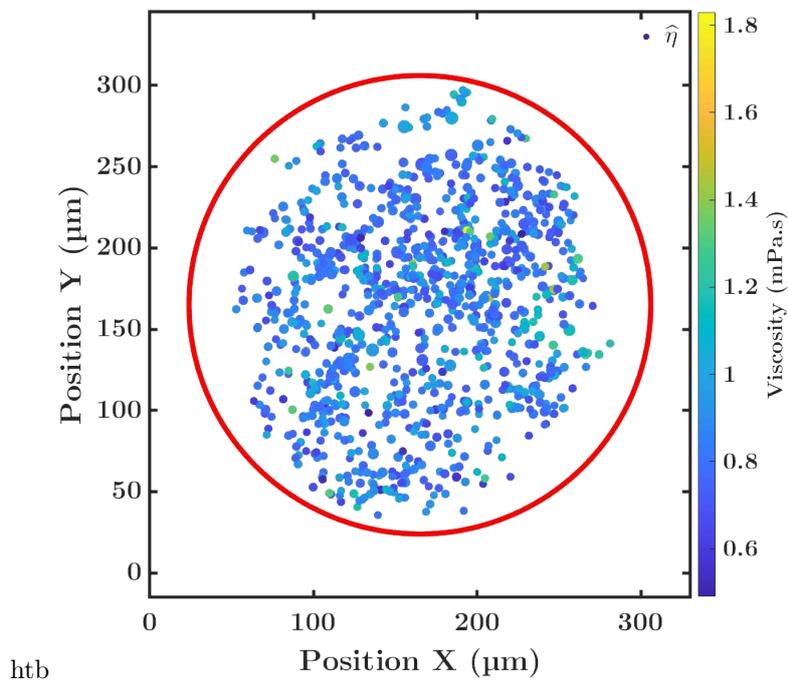
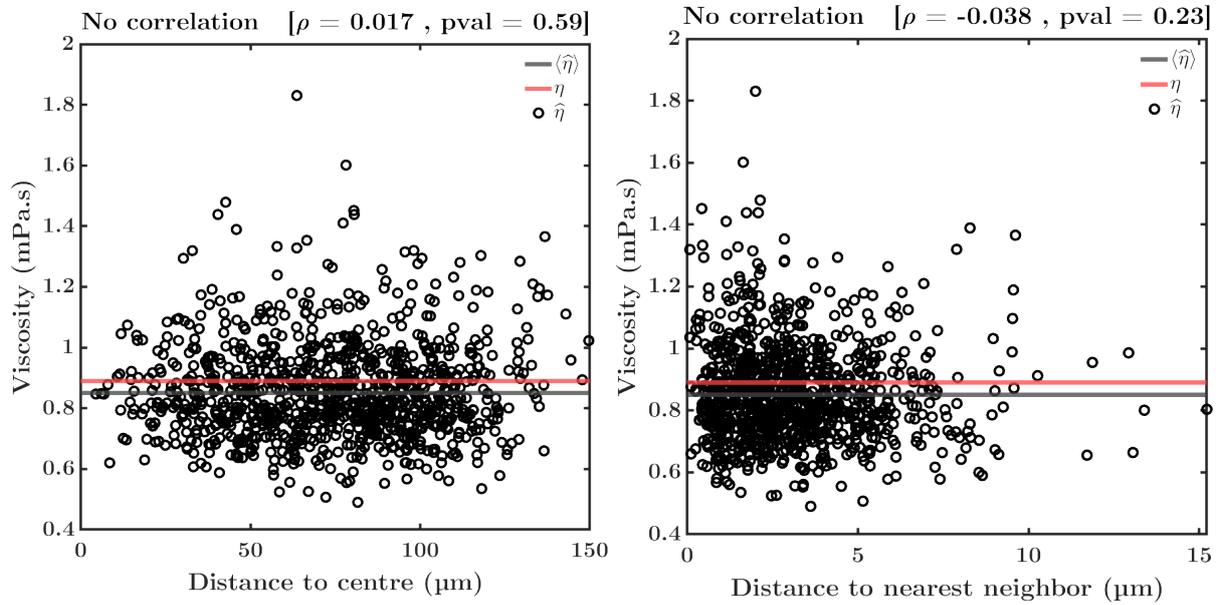


FIG. 51 – Carte de chaleur de la viscosité mesurée dans le plan équatorial de la goutte. La position de chaque point correspond à la position moyenne d'une particule sur l'une des 996 trajectoires mesurées. La couleur du point code pour la viscosité mesurée, et sa taille pour la longueur de la trajectoire. Le cercle rouge correspond à la position moyenne du bord de la goutte sur les 20 acquisitions. La goutte étant quasi-immobile, la marge d'erreur sur la position du bord est de 2-3 μm maximum. Les données correspondent au suivi cumulé de 996 trajectoires, sur un total de 20 acquisitions dans une goutte d'eau pure (NaCl 10 mM) de 140 μm de rayon (expérience 2 dans le tableau 8).

La figure 51 montre la répartition des viscosités mesurées dans le plan équatorial de la goutte, sous la forme d'une carte de chaleur. Chaque point est associé à une trajectoire, sa position correspond à la position moyenne de la particule au cours de son déplacement. La taille des points code pour la longueur de la trajectoire, et leur couleur pour la viscosité mesurée associée. Aucune tendance ne se dégage. Plus quantitativement, la figure 52a semble montrer une absence de corrélation entre la viscosité mesurée et la distance moyenne de la trajectoire par rapport au centre de la goutte (qui est elle-même directement corrélée à la distance de la particule par rapport au bord de la goutte). La figure 52b ne montre pas de corrélation entre la viscosité mesurée et la distance entre les traceurs et leur plus proche voisin. Dans les deux cas, la corrélation de Spearman conclut à l'absence de dépendance entre les paramètres.



(a) La position des particules par rapport au centre de la goutte ne semble pas avoir d'influence sur la viscosité mesurée. (b) La position des particules par rapport à leur plus proche voisine ne semble pas avoir d'influence sur la viscosité mesurée.

FIG. 52 – La position des particules dans la goutte semble ne pas avoir d'influence sur la viscosité mesurée. Les données correspondent au suivi cumulé de 996 trajectoires, sur un total de 20 acquisitions dans une goutte d'eau pure (NaCl 10 mM) de 140 μm de rayon (expérience 2 dans le tableau 8). Les coefficients ρ et les valeurs-p affichées en figures 52a et 52b ont été obtenus avec une corrélation de Spearman²⁰³.

Ces résultats nous permettent de conclure à une absence d'influence significative de l'interface de la goutte et des autres particules diffusantes dans les conditions expérimentales explorées.

La variabilité des viscosités mesurées dans la goutte peut être liée à l'erreur commise sur l'estimation du coefficient de diffusion comme nous l'avons discuté, mais également à la polydispersité des traceurs.

2.3.2 Rayon hydrodynamique des traceurs

La relation de Stokes-Einstein fait intervenir le rayon r des traceurs. La précision de la viscosité est donc directement liée à la précision sur la mesure de r .

Malgré la qualité des particules fluorescentes destinées à la microrhéologie, une certaine polydispersité de leur taille est inévitable. Les Fluosphères que nous utilisons sont calibrées, leur rayon nominal (240 nm dans notre cas) est spécifié par le fournisseur.

Ce rayon a été mesuré par microscopie électronique, caractérisation standard pour les particules sub-micrométriques²⁰⁴.

Cependant, il ne correspond pas au rayon r dont nous devons tenir compte pour le calcul de la viscosité. Plusieurs facteurs affectent la surface d'une particule colloïdale et son voisinage. La double couche électrique et les éventuels traitements de surface ont un impact sur la force de traînée s'exerçant sur la particule, et donc sur sa diffusion.

Dans ce cas quel rayon considérer pour notre modèle de diffusion des traceurs ?

Pour un colloïde donné, on introduit la notion de rayon hydrodynamique, qui correspond au rayon d'une sphère théorique ayant le même coefficient de diffusion que le colloïde étudié.

La méthode la plus indiquée pour la mesure de ce rayon est la diffusion dynamique de la lumière (DLS) présentée en IV.1.2.1. En plaçant les traceurs fluorescents en suspension dans une solution de viscosité connue, la mesure de leur coefficient de diffusion permet d'accéder à leur rayon hydrodynamique.

La mesure par diffusion dynamique de la lumière de la taille des traceurs a donc un intérêt double : estimer le rayon hydrodynamique permet de limiter le biais sur l'estimation de la viscosité. Également, l'estimation de la polydispersité des traceurs permet d'établir la limite de précision de notre approche. En effet, la variabilité de la viscosité mesurée liée à la polydispersité des traceurs est commune à toutes les expériences de microrhéologie et ne dépend pas de notre système expérimental.

Malgré la précision des équipements, la mesure de DLS présente une variabilité non négligeable. L'appareil utilisé, le protocole de préparation des échantillons et d'autres paramètres extérieurs peuvent grandement affecter la précision des mesures¹⁴⁷.

L'ensemble des mesures présentées ci-dessous ont été réalisées au moyen d'un même appareil (Malvern ZetaSizer, Malvern Panalytical) et suivant un protocole identique.

Les traceurs retenus pour nos expériences sont des FluoSpheres™ carboxylate, 0.5 μm , yellow-green (505/515). Deux lots de fabrication ont été utilisés, les lots 2110853 et 2247969. Ils seront respectivement désignés comme lot 1 et lot 2.

Pour ces deux lots, le diamètre nominal indiqué est de 0.48 μm .

Certaines particules du lot 2 ont été stabilisées par greffage de groupements polymères de grande taille (-PEG, $M_w = 20$ kDa²⁰⁵), pour pouvoir être utilisées comme traceurs dans des solutions de protéines chargées (cf VIII.2.3). La DLS permet d'évaluer la modification de rayon hydrodynamique associée à ce traitement de surface.

Particules	Milieu diffusant	Diamètre moyen (nm)	Écart-type (nm)	Polydispersité
Lot 1	NaCl 10 mM	511	55	11%
Lot 2	NaCl 10 mM	487	71	15%
Lot 2 -peg	NaCl 10 mM	541	75	14%

TAB. 7 – Estimation du rayon hydrodynamique des traceurs par diffusion dynamique de la lumière. Les lots 1 et 2 font référence à deux lots de particules FluoSpheres identiques, de rayon nominal 480 μm . Les mesures montrent une différence non négligeable de rayon hydrodynamique entre les deux lots, ainsi qu'une polydispersité de l'ordre de 10-15% au sein d'un même lot. Le greffage de la surface des particules par des chaînes -PEG entraîne une augmentation significative de leur rayon hydrodynamique. L'analyse a été réalisée selon la méthode des cumulants.

Expérience	1	2	3
Rayon de la goutte (μm)	95	140	62
Volume de la goutte (nL)	3.2	10.6	0.9
Viscosité moyenne $\langle\hat{\eta}\rangle$ (mPa.s)	0.88	0.85	0.87
Écart-type global $\sigma(\hat{\eta})$ (mPa.s)	$2.46 \cdot 10^{-2}$	$2.44 \cdot 10^{-2}$	$2.94 \cdot 10^{-2}$
Erreur relative globale $\delta(\hat{\eta})$	2.8%	2.9%	3.4%
Biais relatif $\frac{ \hat{\eta}-\eta }{\eta}$	1%	4.5%	2%
Écart-type moyen $\langle\sigma(\hat{\eta}_i)\rangle$	$1.60 \cdot 10^{-1}$	$1.43 \cdot 10^{-1}$	$1.51 \cdot 10^{-1}$
Erreur relative moyenne $\langle\delta(\hat{\eta}_i)\rangle$	18%	17%	17%
Nombre de répétitions	20	20	16
Nombre moyen de trajectoires suivies par répétition	45	50	25
Longueur moyenne des trajectoires	161	156	176

TAB. 8 – Mesure de la viscosité de gouttes d'eau contenant une solution de NaCl à 10 mM. Chaque répétition produit une estimation $\hat{\eta}$ de la viscosité, moyenne pondérée des estimations $\hat{\eta}_i$ réalisées sur chaque trajectoire de l'acquisition.

2.3.3 Précision et répétabilité des mesures

Reproduite sur des gouttes de rayons variés, la mesure de la viscosité de l'eau pure confirme l'ensemble des conclusions énoncées, et permet de s'assurer de la répétabilité de la mesure.

Regroupés dans le tableau 8, les résultats obtenus attestent d'une précision tout à fait acceptable, en accord avec les objectifs précédemment énoncés.

La précision de notre approche, que l'on assimilera ici à son erreur relative globale $\delta(\hat{\eta}) = \frac{\sigma(\hat{\eta})}{\langle\hat{\eta}\rangle}$, est de l'ordre de 3%. Deux facteurs principaux expliquent ces fluctuations. Premièrement, l'expression approximée de la variance de l'estimateur CVE (équation (IV.62)) nous permet d'exprimer l'erreur relative théoriquement due à l'estimateur CVE:

$$\delta_{\hat{D}} \approx \frac{\sqrt{5}}{\sqrt{N}} \quad (\text{V.4})$$

N correspond au nombre total de positions particulières mesurées. Pour les expériences présentées dans le tableau 8, on a $\langle N \rangle \approx 7800$. L'équation (V.4) nous donne alors $\delta_{\hat{D}} \approx 2.5\%$.

Une autre source d'erreur est la précision de la mesure du rayon hydrodynamique des traceurs, évoquée à la section précédent. On peut relier la polydispersité des traceurs σ_{poly} à l'erreur relative qu'elle entraîne selon:

$$\delta_{\text{poly}} \approx \frac{\sigma_{\text{poly}}}{P} \quad (\text{V.5})$$

Avec P le nombre de particules distinctes observées lors de l'acquisition. Pour les données du tabl8, on a $\sigma_{\text{poly}} \approx 15\%$ et $\langle P \rangle$. L'équation (V.5) donne alors $\delta_{\text{poly}} \approx 2.5\%$.

On constate ainsi que les deux sources d'erreur identifiées contribuent de manière équivalente à l'erreur relative sur la mesure de la viscosité.

Les mesures du tableau 8 présentent également un léger biais tendant à sous-estimer la viscosité de l'eau. Ce biais peut-avoir deux origines: une erreur sur la mesure du rayon hydrodynamique des traceurs ou une erreur sur la mesure de la température, toutes deux aboutissant à une erreur systématique sur la mesure de la viscosité.

La répétabilité et la précision obtenue lors de la mesure de la viscosité de l'eau sont donc tout à fait acceptables, et en accord avec nos objectifs. Rappelons également que les paramètres expérimentaux que nous avons retenus (temps d'exposition $\tau = 100$ ms) privilégient l'intensité lumineuse détectée au détriment de la réduction du flou cinétique, comme nous l'avons vu en partie IV, 2.2. Par conséquent, notre système n'est pas optimisé pour la mesure de viscosités aussi faibles que celle de l'eau pure, car nous l'avons adapté à l'étude de solutions concentrées de protéines, soit pour des viscosités 50 à 100 fois plus élevées.

2.3.4 Influence du rétrécissement des gouttes

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'influence du rétrécissement des gouttes sur la mesure de la viscosité.

Les gouttes ne contenant aucun soluté, elles rétrécissent jusqu'à un volume quasiment nul (figure 53).

La mesure de la viscosité dans la goutte tout au long du rétrécissement de la goutte nous permet donc

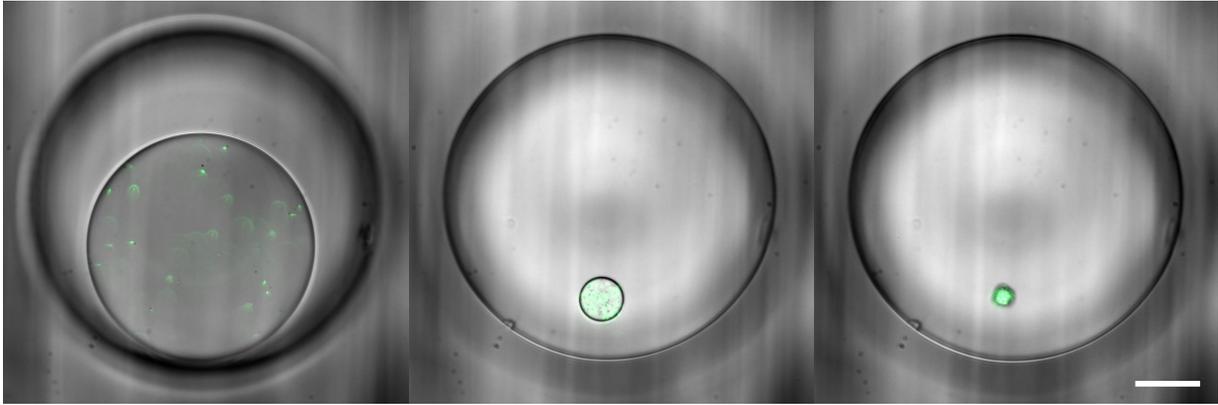


FIG. 53 – Goutte d'eau rétrécissant par évaporation. Dans le cas d'une goutte d'eau pure, la goutte rétrécit jusqu'à un volume quasi-nul, correspondant aux traceurs et à la quantité minimale de sel ajoutée pour écranter les interactions électrostatiques.

Comme on le constate sur ces images, le rétrécissement de la goutte entraîne une augmentation importante de la densité de traceurs imagés dans le plan équatorial de la goutte, surtout aux volumes les plus petits. Environ 2 heures séparent les deux premières images, et 15 minutes les deux dernières. Barre d'échelle : 50 μm

d'évaluer son impact sur la précision de la microrhéologie.

Rappelons les perturbations potentielles identifiées jusqu'à présent : le confinement des particules affecte leur diffusivité, comme nous l'avons précédemment évoqué. De plus, le rétrécissement de la goutte s'accompagne d'une augmentation de la densité de particules dans le plan équatorial imagé, affectant ainsi le suivi des particules et la reconstruction des trajectoires par l'algorithme de Crocker-Grier (3, en partie VII).

Sur une série de 5 expériences dont les résultats sont visibles en figure 54, on observe une augmentation de la viscosité pour les faibles rayons de goutte, avec un décalage de la distribution des viscosités moyennes $\hat{\eta}$ à partir de $R = 30 - 40 \mu\text{m}$. On remarque cependant qu'aux faibles rayons la viscosité moyenne est calculée à partir d'un plus faible nombre de mesures $\hat{\eta}_i$.

L'augmentation de la densité de particules dans la goutte perturbe la reconstruction des trajectoires, et donc la mesure de la viscosité. On constate ainsi que la mesure est quasiment impossible pour des rayons de goutte inférieurs à 20 μm .

Cette limite pourrait être repoussée en diminuant la quantité de particules encapsulées dans la goutte. Cela diminuerait cependant la précision de la mesure aux plus hauts rayons, et donc aux viscosités les plus faibles. Là encore, ce compromis est modulable en fonction de la portion de la courbe qui est la plus intéressante lors de la caractérisation visqueuse.

Pour ces expériences, la quantité de sel a été réduite (NaCl, 10 μM) afin de tenir compte de la concentration du milieu lors du rétrécissement de la goutte. Nous faisons ici l'hypothèse que la présence de sel a une influence nulle sur la viscosité de l'eau, et ce sur toute la gamme de concentrations explorées. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces considérations dans la suite de cette partie.

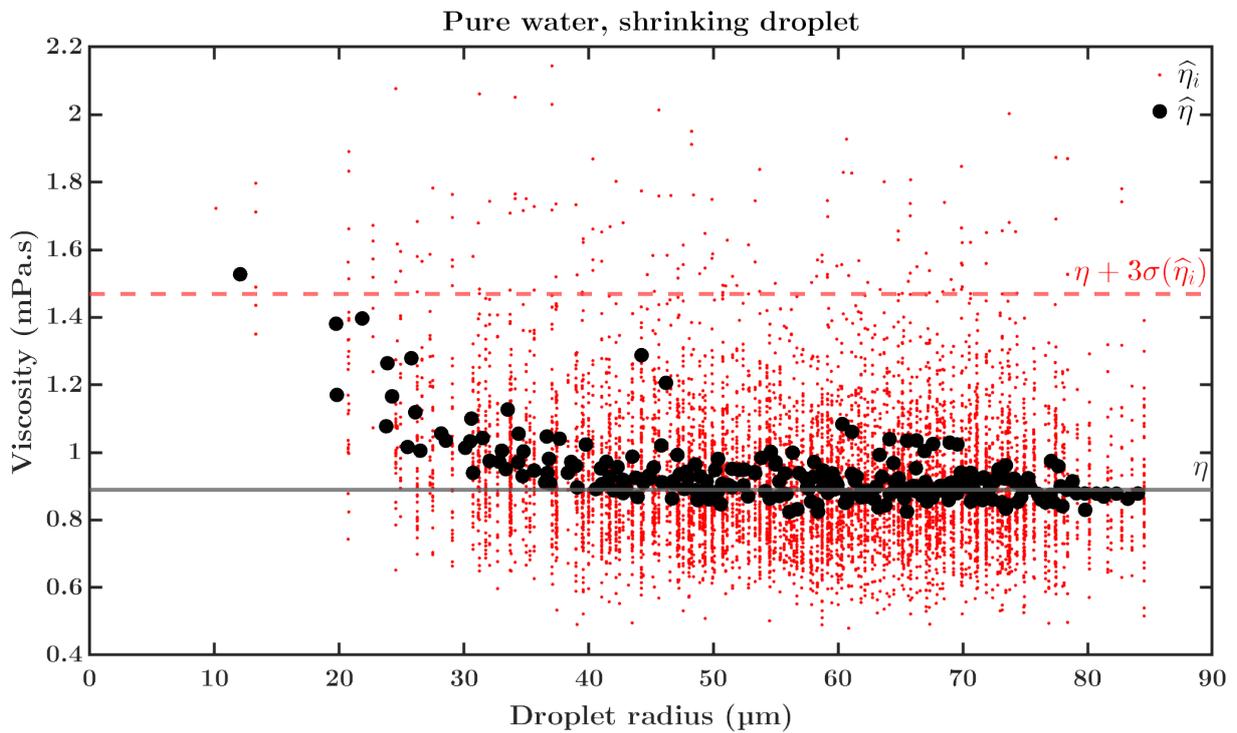


FIG. 54 – Viscosités mesurées pour des gouttes d'eau pure, avec rétrécissement.

Les résultats présentés ici correspondent à 219 mesures obtenues au cours de 5 expériences, pour un total de 7332 trajectoires suivies. A chaque point noir correspond une viscosité $\hat{\eta}$ estimée sur une mesure, et à chaque point rouge une viscosité $\hat{\eta}_i$ estimée sur une trajectoire.

Les valeurs de $\hat{\eta}$ semblent indiquer une augmentation de la viscosité mesurée pour les rayons en dessous de $40 \mu\text{m}$. Cependant, on remarque aussi qu'à ces valeurs correspondent un nombre plus faible de trajectoires suivies.

Une quantité minimale de sel (NaCl $100 \mu\text{m}$) a été ajoutée pour écranter les interactions électrostatiques. Compte-tenu des volumes de goutte étudiés, on considère que cette concentration n'influence pas la viscosité quelque soit le degré de rétrécissement.

Chapitre 3

Concentration dans la puce

3.1 Rhéologie du sucrose

Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser les avantages et les limitations apportées par la concentration des solutés au sein de la puce.

Pour ce faire, nous avons étudié un composé de référence, afin d'évaluer les performances de notre dispositif expérimental sur une large gamme de concentration et de viscosité.

La grande solubilité du sucrose dans l'eau permet d'étudier sa viscosité sur une gamme de viscosité étendue, sans risque de cristallisation.

Du fait de son rôle prépondérant dans l'industrie agro-alimentaire, les caractéristiques physiques du sucrose ont été tabulées avec une grande précision lors de nombreuses études^{1,2,206,207}, facilitant la comparaison avec nos valeurs expérimentales.

La viscosité du sucrose a été tabulée pour des fractions massiques de 1% à 75%, ce qui correspond à des variations entre 1 mPa.s et 1.5 Pa.s, ce qui nous permet de dépasser largement notre gamme cible. De plus, il a été montré que le sucrose a un comportement newtonien sur toute la gamme tabulée²⁰⁸, et sa viscosité varie continuellement sur toute la gamme, sans transition de phase.

3.2 Validation de l'approche expérimentale sur la gamme 1-150 mPa.s

Toutes les expériences présentées dans cette section ont été réalisées avec des solutions de sucrose concentrées par rétrécissement de la goutte au sein de la puce.

Différentes solutions initiales de sucrose ont été utilisées, de fractions massiques initiales variées (1%, 5% et 40%). Plusieurs raisons justifient ce choix :

Premièrement, une partie des erreurs potentielles sur la mesure de viscosité est liée à la taille de la goutte observée. À viscosité équivalente, les mesures réalisées à partir de solutions moins concentrées ont lieu dans des gouttes plus petites, permettant ainsi d'évaluer l'impact de la taille des gouttes.

Ensuite, par convention les valeurs tabulées pour le sucrose sont exprimées en fraction massique. Dans notre cas, une correction importante impliquant le volume spécifique du sucrose est nécessaire pour raisonner en fraction massique (cf partie III, 3.3). Étudier des solutions de fractions massiques variées permet ainsi de vérifier que cette conversion n'induit pas d'erreur.

Enfin, la dernière raison est technique : cette série d'expérience a été réalisé avec une version plus ancienne de la puce (v24), dont les puits sont de diamètre réduit (180 μm de diamètre au lieu de 300 μm). Le facteur de rétrécissement s'en trouve réduit à ≈ 11 (pour le passage d'une goutte de 90 μm à 40 μm de rayon).

Dans ces conditions, une seule expérience ne suffit pas toujours à réaliser des mesures efficaces sur toute la gamme de concentration explorable.

Sur chaque courbe présentée, la viscosité relative est tracée en fonction de la fraction massique de sucrose.

La viscosité relative correspond au ratio de la viscosité mesurée et de la viscosité de l'eau selon :

$$\eta_{rel} = \frac{\hat{\eta}}{\eta_0} \quad (\text{V.6})$$

Avec η_0 la viscosité de l'eau. Pour chaque expérience, la viscosité de l'eau correspondant à la température mesurée est relevée à partir de données tabulées, reproduites sur le tableau 13, en annexe (partie VII).

Les points correspondent à des mesures expérimentales, après prise en compte du volume spécifique du sucrose pour la conversion en fraction massique (cf partie III, III.31).

La courbe continue correspond aux valeurs tabulées²⁰⁶.

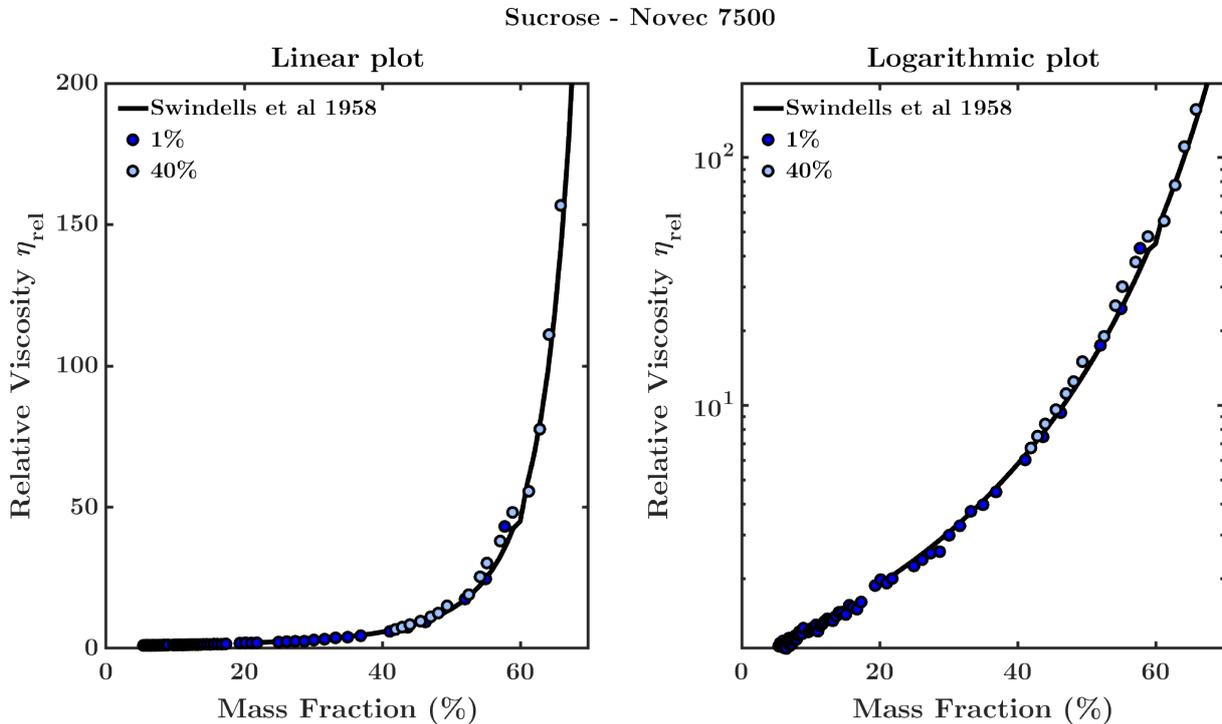


FIG. 55 – Viscosité relative de solutions de sucrose en fonction de la fraction massique, pour deux concentrations initiales distinctes. La courbe continue correspond aux valeurs tabulées²⁰⁶. Expériences réalisées avec une phase continue Novec 7500.

La figure 55 montre une courbe de caractérisation typique, réalisées en deux expériences (concentrations initiales de 1% et 40%) pour couvrir toute la gamme de concentration, sur la gamme de viscosité d'intérêt pour les biopharmaceutiques (0.1-150 mPa.s). On constate une bonne adéquation avec les valeurs tabulées.

Rappelons l'objectif énoncé lors de la conception du dispositif: caractériser le comportement visqueux de biopharmaceutiques sur une gamme de 1-150 mPa.s, si possible en une seule expérience.

Une partie de l'objectif est remplie, celle portant sur le suivi de la viscosité. L'autre ne l'est pas au sens strict car deux expériences ont été nécessaires pour réaliser une caractérisation totale. Nous verrons cependant dans la suite de cette partie que cette condition est remplie par la version finale de notre puce.

La mesure de la viscosité du sucrose a été répétée un grand nombre de fois (20) afin d'en évaluer la répétabilité.

La figure 56 montre la distribution du biais relatif par rapport aux valeurs tabulées²⁰⁶, obtenu par interpolation sur un total de 20 expériences distinctes. On constate un léger biais systématique aux faibles viscosités, rappelant celui observé pour la mesure de la viscosité de l'eau.

3.3 Extension de la gamme accessible

Une fois notre approche expérimentale validée sur la gamme cible de 1-150 mPa.s, nous avons évalué les limites de notre approche en étendant cette gamme cible vers les hautes viscosités.

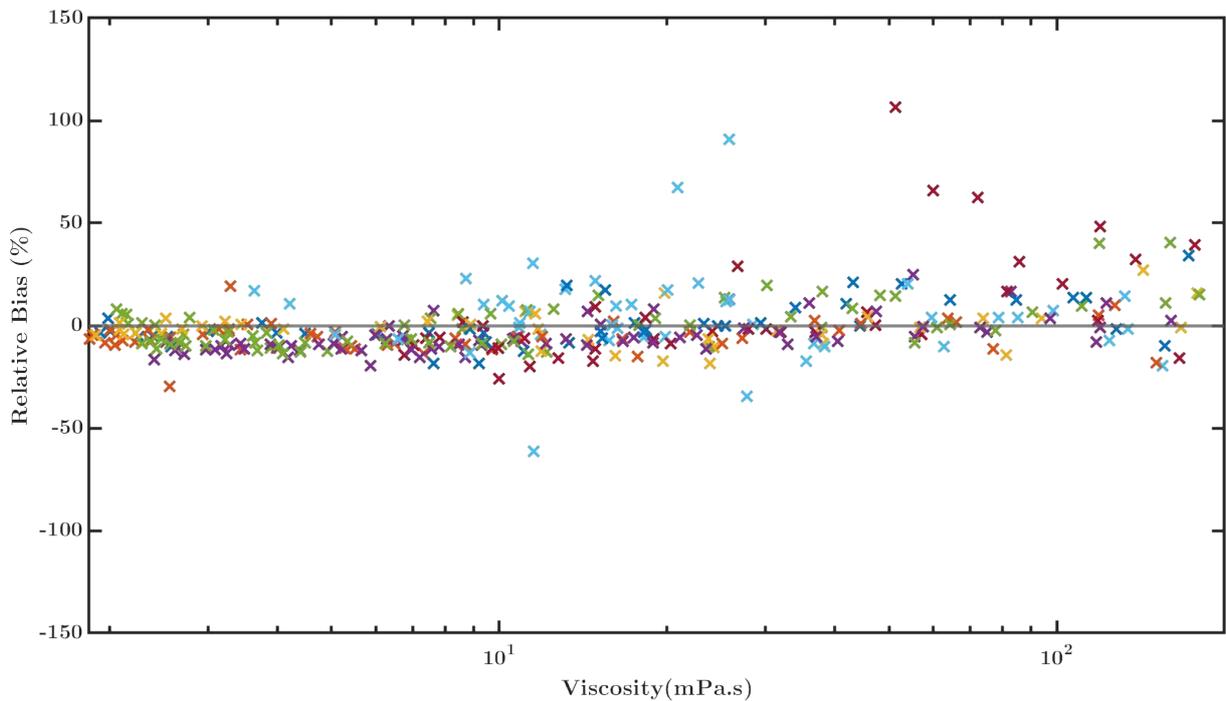


FIG. 56 – *Biais relatif sur la viscosité de solutions de sucrose en fonction de la viscosité mesurée. Chaque couleur correspond à une expérience. Les expériences, 20 au total, ont été réalisées avec des solutions de fraction massique initiale 1%, 5% ou 40%. Le biais relatif a été calculé par rapport aux valeurs tabulées par Swindells et al²⁰⁶, pour une série de 20 expériences distinctes. On constate un faible biais systématique aux faibles viscosités, rappelant celui observé pour la mesure de la viscosité de l'eau. Le biais relatif moyen est de -0.5%, l'écart-type du biais relatif est de 15%.*

Observées sur une gamme plus large, les courbes expérimentales réalisées dans du fluide Novec 7500 présentent une plus grande variabilité à haute concentration, comme on peut le voir sur la figure 57.

Pour des viscosités supérieures à 200 mPa.s, on constate un décrochage de certaines séries de mesures par rapport aux autres et par rapport aux valeurs tabulées. Cet effet peut être lié à la taille des gouttes étudiées.

3.3.1 Mouvement des gouttes

Dans la partie IV, nous avons fait l'hypothèse que la précision de l'estimation du coefficient de diffusion ne reposait que sur la précision du suivi du mouvement des particules et des méthodes statistiques employées.

Il nous faut à présent considérer une nouvelle source d'erreur : les mouvements observés non liés à la diffusion des particules.

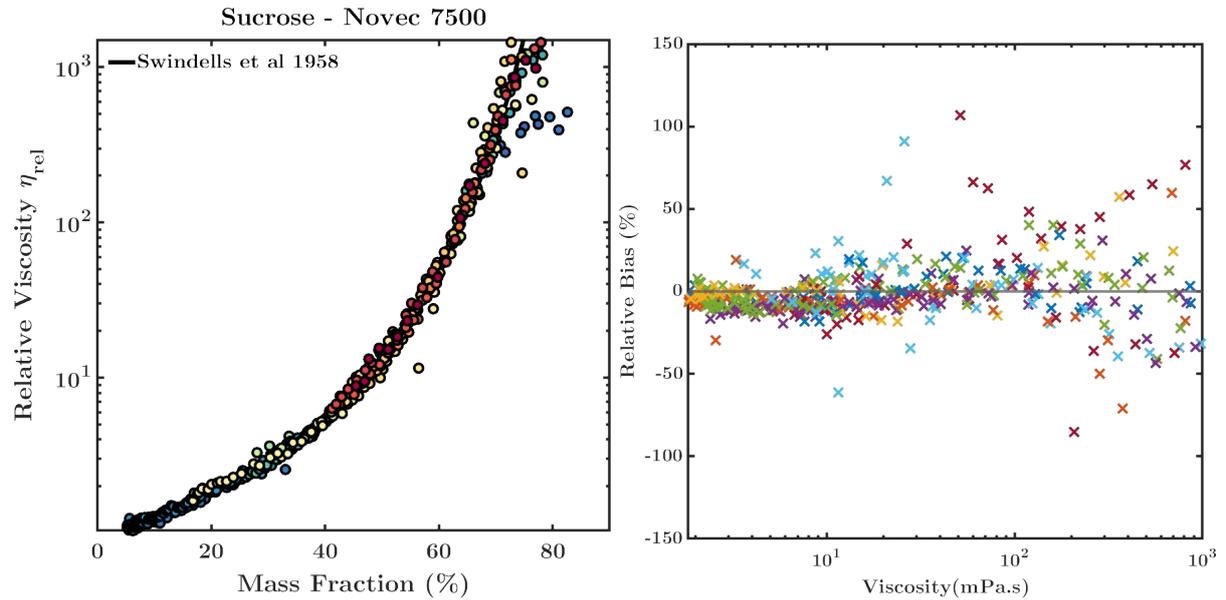
Les trajectoires imagées sont en effet la combinaison de plusieurs mouvements : la diffusion brownienne des particules certes, mais également les mouvements parasites liés à des facteurs extérieurs.

La puce microfluidique, son support, et la platine du microscope sont solidaires, mais avec des degrés de liberté liés à l'imperfection des fixations ou à la présence d'éléments mobiles. Les phénomènes de dérive liés au microscope sont discutés au chapitre 2.3, en partie IV. Leur influence est négligeable devant le mouvement des particules, et elle peut être facilement corrigée comme on le verra.

Il existe cependant une autre source de mouvements parasites, spécifique à notre système : les mouvements de la goutte. Cet aspect n'est pas pris en compte dans les précédents travaux sur la microrhéologie en goutte^{139,144} car les gouttes y sont confinées : leur mouvement est considéré comme négligeable.

Dans notre cas les gouttes ne sont pas confinées, mais en suspension dans la phase continue.

Les puits cylindriques permettent de piéger les gouttes, empêchant les mouvements de translation de la goutte. L'équilibre précis des flux, décrit en II2.2.2, permet de limiter au maximum les mouvements de



(a) Certaines expériences présentent un décrochage de la viscosité par rapport aux valeurs tabulées (b) Augmentation du biais relatif à haute viscosité

FIG. 57 – Viscosité relative de solutions de sucrose pour des fractions initiales de 1%, 5% et 40%. Expériences réalisées dans une phase continue Novec 7500. A partir de 200 mPa.s, on observe un décrochage de la viscosité mesurée pour certaines courbes. Cette déviation par rapport aux valeurs tabulées se traduit par une augmentation du biais relatif de la mesure.

rotation de la goutte. Cette constatation reste empirique : imagées sur un temps long et observées en accéléré, les gouttes ne montrent pas de mouvement de rotation. Cette observation est confirmée par les mesures de validation effectuées, qui montrent une grande répétabilité et un bon accord avec les valeurs tabulées, comme nous l'avons vu en 3.

Les mouvements parasites de la goutte ne sont pas uniquement liés aux écoulements résiduels dans la puce. La goutte en elle-même est une particule brownienne. Comme les traceurs, elle se déplace aléatoirement au gré des chocs moléculaires.

Ces mouvements perturbent la mesure de la viscosité : les trajectoires imagées deviennent la combinaison des déplacements particuliers et des déplacements de la goutte.

On peut définir un rapport signal sur bruit, comparant le déplacement caractéristique de la particule au déplacement caractéristique de la goutte, selon :

$$SNR \equiv \frac{\sqrt{2D\Delta t}}{\sqrt{2D_g\Delta t}} = \frac{\sqrt{D}}{\sqrt{D_g}} \quad (\text{V.7})$$

Pour une goutte de rayon R assimilée à une sphère, la loi de Stokes-Einstein (équation (IV.3)) permet d'estimer le coefficient de diffusion D_g . On néglige ici l'influence de la paroi supérieure du puits, en contact avec la goutte. L'influence d'une interface ayant tendance à réduire la longueur caractéristique de diffusion (cf VII4), elle ne peut avoir qu'un effet positif sur le rapport signal à bruit défini en (V.7). On considère sans trop de risque que la température est homogène à cette échelle. En revanche, les particules et la goutte n'ont pas le même rayon, et ne diffusent pas dans le même milieu. Ainsi, la relation (V.7) se simplifie :

$$SNR = \sqrt{\frac{\eta_c R}{\eta r}} \quad (\text{V.8})$$

r et R sont les rayons des particules et de la goutte respectivement. η_c et η sont les viscosités de la phase continue et de la phase dispersée respectivement.

De manière similaire à la relation (IV.44), on peut définir une viscosité η_g^{max} à partir de laquelle les mouvements de la goutte sont équivalents à ceux des particules, rendant la mesure imprécise.

Cette viscosité limite s'exprime selon :

$$\eta_g^{max} = \frac{\eta_c R}{r} \quad (\text{V.9})$$

Cette limite dépend de la taille des traceurs et de la viscosité de la phase continue, deux paramètres fixes pour une expérience donnée. Elle est également proportionnelle au rayon de la goutte, ce qui est problématique pour nos expériences : la limite diminue avec le rayon de la goutte, alors que c'est justement aux petits rayons que les viscosités mesurées seront a priori les plus élevées.

Le tableau 9 montre la viscosité maximum mesurable, estimée selon la relation (V.9), pour différentes valeurs de rayon de goutte, avec des traceurs de 250 μm de rayon et une phase continue Novec 7500 de viscosité 1.12 mPa.s.

R (μm)	100	80	60	40	20
η_g^{max} (mPa.s)	500	400	300	200	100

TAB. 9 – Estimation de la viscosité maximale mesurable pour différents rayons de gouttes, avec une phase continue Novec 7500 ($\eta_{N7500} = 1.2 \text{ mPa.s}$ à 25°C) et des traceurs de 250 μm de rayon

Cette viscosité est premièrement bien inférieure à la limite de viscosité liée à la localisation des particules (cf (IV.44)), sur toute la gamme de rayon de goutte explorée.

Plus problématique, elle se rapproche dangereusement de la borne supérieure de la gamme cible de viscosité pour les biopharmaceutiques (0.1-150 mPa.s).

Cette valeur limite est une estimation prudente : elle suppose la goutte animée d'un mouvement brownien idéal, comme si elle était en suspension dans une phase continue infinie. Même en l'absence de mouillage, le contact entre la goutte et le sommet du puits aura tendance à réduire l'amplitude de ce mouvement.

Cependant, sans aller jusqu'à empêcher complètement la mesure de la viscosité, ce mouvement risque d'affecter la précision de la mesure.

L'existence de cette viscosité limite pourrait expliquer les déviations de la viscosité du sucre, évoquées en 3 et visibles en figure 57. La tendance à l'apparition d'un plateau à partir d'une viscosité constante pourraient indiquer l'existence d'un bruit de mesure qui, à partir d'un certain stade, serait quantitativement plus important que les déplacements particulaires liés au mouvement brownien.

La série d'expériences sur le sucre a été réalisée avec des solutions de concentration initiale variée, encapsulées dans des gouttes de rayon varié. Cela pourrait expliquer le comportement différent des mesures à haute viscosité.

Aucun décrochage n'a été observé pour les solutions initiales concentrées (40%), pour lesquelles le rétrécissement s'arrête à des rayons relativement élevés (50-60 μm). Pour les gouttes atteignant la gamme 25-40 μm , il est difficile de tirer des conclusions définitives. La figure 58 montre les courbes de viscosité pour cinq de ces expériences. Dans chacun des cas, la ligne horizontale correspond à la viscosité limite estimée par la relation (V.8), en considérant le rayon final atteint par la goutte à la fin de l'expérience. Pour les deux séries de mesures représentées en figure 58a, le décrochage semble intervenir à partir de cette limite.

Pour les trois expériences en figure 58b en revanche, on n'observe pas de décrochage malgré une limite du même ordre de grandeur.

Il est par conséquent difficile d'attribuer avec certitude ces erreurs de mesures au bruit lié au mouvement brownien des gouttes, tant les dernières acquisition d'une série de données sont généralement les moins fiables.

D'autres facteurs peuvent en effet être à l'origine de ces déviations : dans certains cas, un léger déséquilibre des écoulements résiduels peut survenir, surtout après plusieurs heures d'expériences. Également, une importante réduction du volume des gouttes entraîne une augmentation de la densité de traceurs dans son plan équatorial, et donc une augmentation du risque d'erreur de suivi (cf VII3).

Malgré cela, il nous est impossible d'écarter toute influence du mouvement brownien de la goutte sur la mesure de la viscosité.

Cet effet représente une double limitation pour notre dispositif expérimental : il implique soit de réduire la viscosité maximale mesurée, soit d'augmenter la taille des gouttes, réduisant ainsi le facteur de concentration accessible.

3.3.2 Microrhéologie à deux points

Il existe une solution algorithmique permettant d'éliminer cette source d'erreur, en compensant ces mouvements parasites. Le mouvement brownien de la goutte est aléatoire, et donc impossible à prévoir

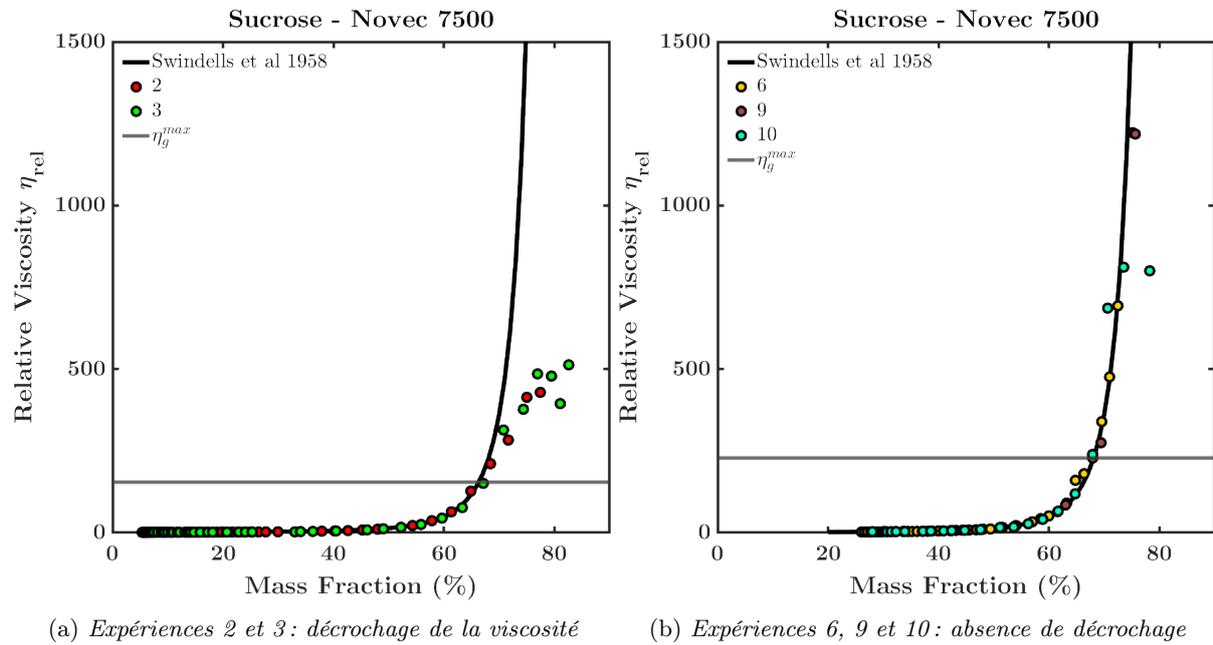


FIG. 58 – Viscosité relative de solutions de sucrose, pour des échantillons de fraction massique initiale 1%. Pour des gouttes de volume équivalent, le décrochage de la viscosité n'intervient pas au même moment, ne permettant pas d'établir un lien entre ce phénomène et l'erreur liée au mouvement de la goutte. A gauche, le décrochage semble intervenir au voisinage de la viscosité maximale mesurable estimée, représentée par une ligne horizontale. A droite, on observe pas de décrochage au voisinage de cette limite.

avec précision. Des modèles statistiques permettent d'estimer et de réduire l'erreur liée à la diffusion du substrat pour une trajectoire unique, mais ils ajoutent une source de complexité et d'imprécision non négligeable¹⁹³.

En revanche, le problème est différent pour le suivi de particules multiples. Bien qu'aléatoire, le mouvement brownien de la goutte n'en est pas moins un mouvement de translation, affectant l'ensemble des traceurs de la même manière. Ainsi, en considérant les déplacements particuliers non pas par rapport à une origine fixe mais relativement à la position d'une autre particule, il est possible d'éliminer l'erreur liée au mouvement de la goutte. Cette méthode, c'est la microrhéologie TPM (Two-Points Microrheology). Développée au début des années 2000, elle a été utilisée dans de nombreux travaux de recherche^{209,210}. Cette démarche a été appliquée pour l'estimation de l'erreur de localisation d'une particule fixe (cf IVIV.35) : la variance de la localisation a été calculée sur la position relative de deux particules voisines immobiles, pour compenser les effets de dérive du microscope.

Dans le cas des expériences de suivi de la viscosité en goutte, cette démarche représente une difficulté supplémentaire : du fait de la diffusion tridimensionnelle et des erreurs de suivi, les trajectoires particulières sont morcelées. Cela complique l'appariement des particules pour le suivi de leur position relative, mais reste tout à fait envisageable.

3.3.3 Phase continue Fomblin Y06/6

Une autre solution consiste à augmenter la viscosité de la phase continue, ce qui revient à limiter le mouvement brownien de la goutte.

Le lubrifiant Fomblin Y06/6 a une viscosité de 89 mPa.s à 25°C (100 fois la viscosité de l'eau, et environ 71 fois celle du Novec 7500), et une densité de 1.88.

Son utilisation permet théoriquement de repousser la viscosité maximale mesurable, comme en témoigne les estimations réalisées à partir de la relation (V.9) et reproduites dans le tableau 10.

Sur toute la gamme de rayons envisagés, la viscosité maximum mesurable est supérieure à celle liée à la localisation des particules (équation (IV.44)).

La viscosité de solutions de sucrose a été étudiée dans ces conditions, en suivant le même protocole que pour les mesures dans le Novec 7500. Comme pour ces dernières, ces expériences ont été réalisées avec la version 24 de notre puce microfluidique, présentant un facteur de rétrécissement réduit.

R (μm)	100	80	60	40	20
η^{max} (Pa.s)	24	19.2	14.4	9.6	4.8

TAB. 10 – Estimation de la viscosité maximale mesurable pour différents rayons de gouttes, avec une phase continue Fomblin Y06/06 ($\eta_{Y06} = 89$ mPa.s à 25°C) et des traceurs de 250 μm de rayon

Son utilisation dans la puce n’apporte pas de complication supplémentaire. Parmi les ajustement nécessaires, on peut citer une augmentation du temps d’ascension dans les puits (cf II2.2.1) nécessitant des débits d’écoulement encore plus faibles. La manipulation des gouttes est cependant plus aisée avec une phase continue visqueuse, car la forte augmentation de la résistance hydrodynamique (proportionnelle à la viscosité, cf équation (II.10)) entraîne une importante réduction des débits dans la puce à différence de pression égale.

Autre observation importante : un ralentissement notable du rétrécissement des gouttes, par un facteur 2-3, démontrant le rôle de la phase continue dans la diffusion de l’eau vers le canal latéral. Le coefficient de diffusion de l’eau dans la phase continue étant inversement proportionnel à la viscosité de cette dernière (cf loi de Stokes-Einstein, (IV.3)), cela semble plausible. Cependant, la solubilité de l’eau dans la Fomblin Y06/6 n’étant pas tabulée, il nous est impossible de conclure formellement.

La figure 59 montre les mesures réalisées pour deux solutions, de fraction massique initiale 5% et 40% respectivement.

Dans les deux cas, on constate une concordance avec les valeurs de référence sur toute la gamme tabulée, soit 20-75% en fraction massique et 1-1500 mPa.s en viscosité.

Pour la courbe correspondant à une fraction initiale de 40%, on observe aucune déviation aux hautes viscosités. Le rayon final de la goutte est de 45 μm pour cette expérience.

Pour la courbe correspondant à une fraction initiale de 5%, et dont le rayon final est de 23 μm , on remarque un décrochage de la viscosité, similaire à ceux observés en figure 58a.

La ligne horizontale représente la viscosité maximale mesurable pour la courbe 5%, estimée à 5.8 Pa.s par la relation (V.9). Le décrochage semble intervenir au voisinage de cette limite.

La mesure de la viscosité du sucrose sur une si large gamme de viscosité nous permet de montrer que, grâce à l’utilisation d’une phase continue visqueuse, ce n’est plus le mouvement brownien des gouttes mais la localisation des particules qui limite la viscosité maximale mesurable. Cette conclusion démontre l’importance des efforts décrits en partie IV et visant à réduire cette erreur de localisation.

3.4 Rétrécissement des gouttes

La capacité de notre dispositif à concentrer continuellement le soluté au sein des gouttes représente un gain majeur en terme de consommation d’échantillon et de simplicité d’utilisation.

L’inclusion d’un canal latéral dans le motif de la puce microfluidique nous permet de choisir l’épaisseur de la membrane de PDMS à travers laquelle l’eau pervapore, et ainsi de choisir la durée caractéristique de rétrécissement des gouttes.

Les résultats du suivi de la viscosité avec rétrécissement des gouttes nous permettent d’appuyer ce que nous avons déjà évoqué à la fin de la partie III.

La capacité de concentrer le soluté au sein de la puce ne représente pas uniquement un gain de temps et une réduction de la consommation d’échantillons.

La concentration par rétrécissement des gouttes nous a permis d’atteindre sans cristallisation des fractions massiques supérieures à 85%, bien au-dessus de la solubilité du sucrose dans l’eau à 25°C, estimée²¹¹ à 67%.

Les tables de calibration publiées par Swindells et al²⁰⁶ décrivent des solutions de sucrose allant jusqu’à 75% en fraction massique. Les mesures de Quintas et al²⁰⁸ vont jusqu’à 85%, quasiment cinquante ans plus tard. La complexité de la préparation et de la manipulation des solutions sursaturées n’est pas étrangère à cet écart. Le protocole décrit par Quintas et al utilise des cycles de chauffage micro-ondes permettant une montée rapide et homogène en température, suivis de périodes de refroidissement et d’agitation. Cette alternance permet la préparation de solutions de sucrose sursaturées, mais a nécessite la vérification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de la non-dégradation thermique du sucrose, ainsi que l’utilisation d’un titrateur de Karl-Fisher pour mesurer la concentration massique

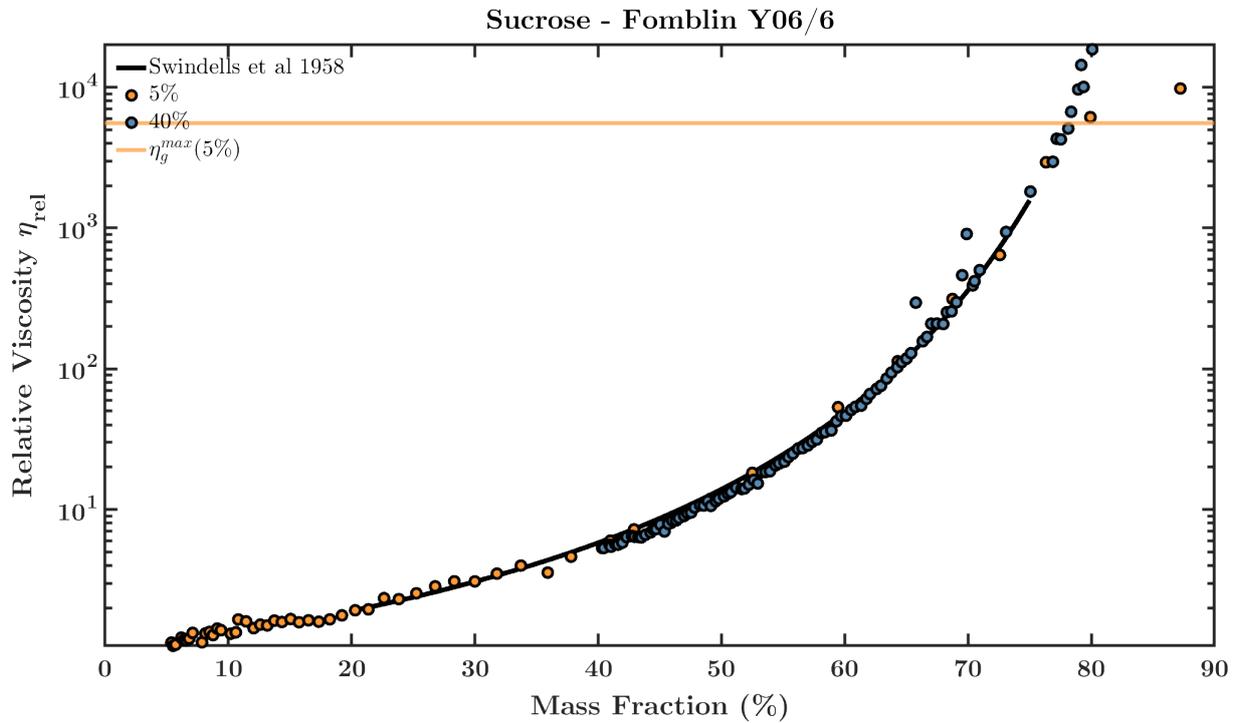


FIG. 59 – Viscosité relative de solutions de sucrose pour deux fractions initiales, 5% et 40%. Expériences réalisées dans une phase continue Fomblin Y06/6. On observe un décrochage de la viscosité mesurée pour la solution la moins concentrée à partir de 75%/5 Pa.s, une limite qui correspond à la viscosité maximale mesurable prédite par la relation (V.9), symbolisée par une ligne horizontale. La concentration du soluté dans la puce permet ainsi d'atteindre des concentrations très élevées (cf 3.4), et l'utilisation d'une phase continue visqueuse permet d'étendre la gamme de viscosité mesurable.

finale de la solution, les cycles de chauffage ayant modifié la quantité d'eau s'y trouvant.

Une fois les solutions préparées, leur manipulation et leur caractérisation dans un rhéomètre cone-plate sont grandement complexifiées, en effet la moindre perturbation peut déclencher la cristallisation. Le nombre d'expériences accessibles est donc très limité.

Pour l'étude des solutions de protéines, les étapes de concentration par ultracentrifugation ajoutent une complexité et une incertitude supplémentaires à la préparation de solutions concentrées.

Déjà évoquée à la fin de la partie III, l'ultracentrifugation semble être une étape incontournable des travaux de rhéologie des anticorps^{52,102,106,175,212}.

Les dimensions actuelles de notre puce permettent la production et l'étude de gouttes allant jusqu'à 150 μ m de rayon, soit un facteur de concentration de 400 en s'arrêtant à une goutte de 20 μ m de rayon. Il est donc possible de mesurer la viscosité de solutions concentrées à 400 mg.mL⁻¹ en partant d'une solution initiale à 1 mg.mL⁻¹, la concentration typique des anticorps monoclonaux non concentrés.

Chapitre 4

Viscosité de solutions de protéines

4.1 Étude de solutions de protéines concentrées

L'étude de la viscosité du sucrose a représenté un grand apport dans l'optimisation et la validation de notre dispositif expérimental.

L'étude de solutions de protéines modèles permet de se rapprocher de l'objectif de notre dispositif : l'étude de biopharmaceutiques, et plus spécifiquement d'anticorps thérapeutiques.

4.1.1 Stabilisation stérique des traceurs

L'interaction des protéines avec les traceurs est susceptible de perturber leur stabilité.

Du fait de leur charge globale et de leur caractère amphotère, les protéines peuvent avoir tendance à déstabiliser les suspensions colloïdales.

C'est ce que nous avons initialement observé : l'utilisation de FluoSphères greffées -carboxyle permet d'étudier la BSA, chargée négativement, mais pas le lysozyme, chargé positivement. La suspension de traceurs dans une solution de lysozyme mène en effet à leur agrégation.

Afin de pouvoir utiliser notre dispositif avec une gamme de protéines la plus diversifiée possible, quelles que soient leur taille, leur structure ou leur charge, nous avons greffé des groupements polymères -PEG sur les traceurs (selon le protocole de Gartin et Stradner²⁰⁵, détaillé en VII2).

En travaillant avec des protéines de charges opposées, nous avons démontré la stabilité de ces traceurs et la viabilité de notre système pour l'étude de protéines chargées.

4.1.2 Réduction du volume consommé

Ces expériences ont enfin été l'occasion de nous mettre en conditions réelles, en travaillant avec des volumes d'échantillons réduits au maximum.

L'abondance relative des protéines modèles nous a permis de préparer des échantillons de volume relativement important (500 μL), cependant les expériences présentées dans cette section ont toutes été réalisées avec une consommation d'échantillon inférieure à 5 μL , voire égale à 1 μL pour les plus récentes, démontrant ainsi la capacité de notre dispositif à fonctionner avec de tels volumes, limitant ainsi grandement la quantité de protéines consommée : 1 μL de solution initiale concentrée à 5% contiennent 50 μg de protéines.

Ces expériences ont été réalisées avec la version finale de la puce, permettant un facteur de rétrécissement plus important (50 pour le passage d'une goutte de 150 μm à 40 μm de rayon, 400 en descendant jusqu'à 20 μm).

4.2 Albumine

L'albumine est une protéine globulaire de taille moyenne, présente en quantité dans le plasma des mammifères. Chez l'être humain, elle est la protéine la plus abondante dans le plasma, représentant environ 60% de la masse des protéines plasmatique. Son rôle principal est le maintien de la pression osmotique du sang.

Grandeur	Symbole	Valeur tabulée
Rayon de Stokes	r_s	3.48 nm
Masse moléculaire	M_w	66.5 kDa
Point isoélectrique	pI	4.7
Viscosité intrinsèque	$[\eta]$	4.1 mL.g ⁻¹
Compacité maximale	ϕ_m	0.7

TAB. 11 – *Grandeurs tabulées retenues pour l'étude de l'albumine de sérum bovin*²¹³. Avec un point isoélectrique à 4.7, la BSA est chargée négativement aux pH auxquels nous travaillons (6.5-7).

L'albumine de sérum bovin (BSA, pour Bovine Serum Albumin) est une des protéines les plus utilisées en biologie. Parmi ses nombreuses applications, la principale est son rôle d'agent bloquant lors de tests immunologiques²¹⁴. En recherche fondamentale, la BSA est l'un des modèles les plus utilisés pour étudier des phénomènes tels que l'encombrement macromoléculaire^{97,215} ; la dénaturation^{216,217} ; l'agrégation^{218,219} ; ou encore la rhéologie des solutions de protéines^{8,139,213,220}.

La courbe 60 montre la viscosité de solutions de BSA sur une gamme de fraction volumique entre 0.02 et 0.6, correspondant à des viscosités entre 1 et 100 mPa.s.

Comme pour le sucre, tous les résultats sont exprimée en viscosité relative, définie selon la relation (V.6).

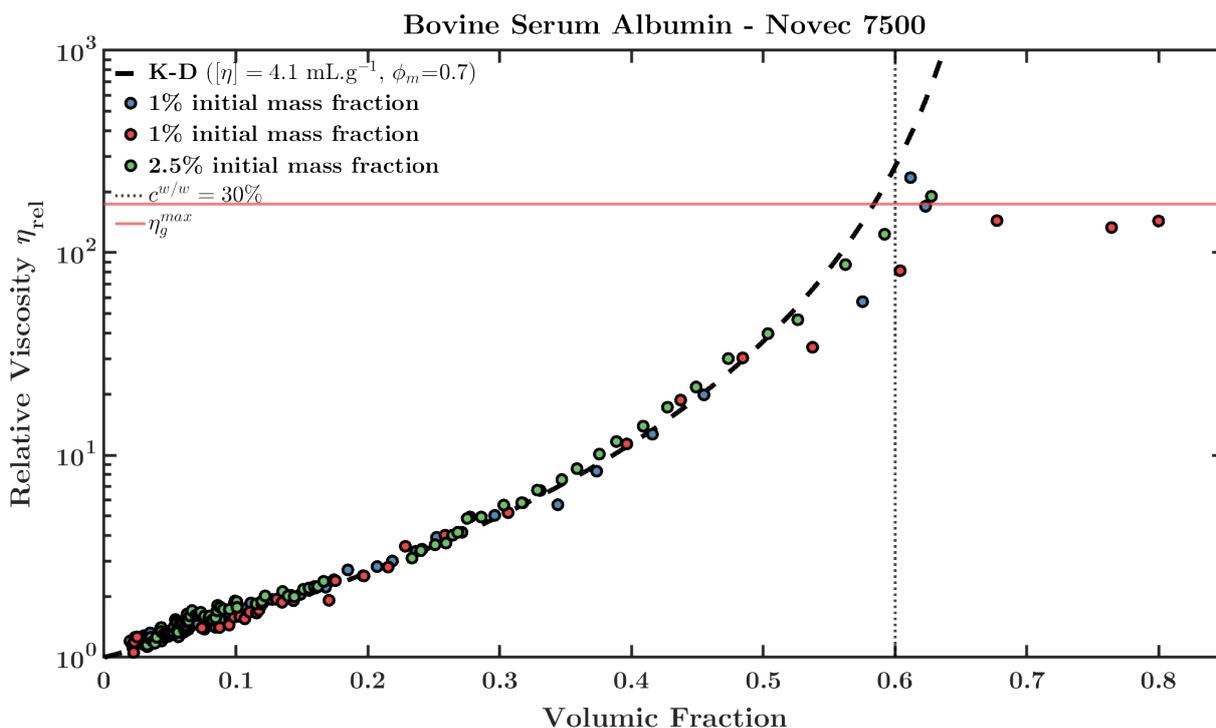


FIG. 60 – *Viscosité relative de solutions de BSA, pour des fractions massiques initiales de 1% et 2.5%. Aux faibles fractions volumiques, la viscosité est en accord avec le modèle de Krieger-Dougherty*²²¹. Aux alentours de $\phi = 0.6$, correspondant à une fraction massique de 30%, on observe une gélification de la BSA, correspondant à un début de transition vitreuse décrit dans la littérature²²⁰. Par ailleurs, le plateau de viscosité semble correspondre à la limite de viscosité maximale mesurable évoquée en 3.3.1 et représentée par une ligne horizontale rouge.

Du fait de leur grande taille, les protéines possèdent un volume exclu non négligeable. Leur viscosité peut donc être abordée sous le même angle que celle d'une solution colloïdale. Dans le cas idéal d'une solution colloïdale de sphères dures, sans interactions, c'est uniquement la fraction volumique occupée par les colloïdes leur fraction volumique qui déterminent la viscosité de la suspension²²².

L'approche colloïdale est retenue pour l'étude de la viscosité des solutions de protéines. Par convention, les concentrations de protéines sont donc exprimées en fraction volumique, qui est définie à partir de la

concentration massique selon :

$$\phi = \frac{4\pi r_s^3}{3} \frac{N_A}{M_w} c \quad (\text{V.10})$$

Cette grandeur correspond au ratio du volume occupé par le soluté sur le volume total de la solution. Les protéines sont assimilées à des sphères indéformables dont le rayon est leur rayon de Stokes r_s . Les protéines ne sont cependant pas des sphères indéformables et sans interactions. Leur forme, leur déformabilité et la complexité des interactions qu'elles développent vont affecter leur comportement visqueux.

Au vu de l'immense diversité des protéines, l'approche la plus pertinente consiste cependant à partir d'un modèle phénoménologique décrivant la viscosité de suspensions colloïdales, et d'étudier l'adéquation ou non du comportement visqueux des protéines à ce modèle.

Modèle de Krieger-Dougherty

Le modèle de Krieger-Dougherty est un modèle phénoménologique, décrivant la viscosité de suspensions colloïdales monodisperses et indéformables.

La viscosité s'y exprime selon :

$$\eta(\phi) = \eta_0 \left(1 - \frac{\phi}{\phi_m}\right)^{-[\eta]\phi_m} \quad (\text{V.11})$$

Les coefficients $[\eta]$ et ϕ_m dépendent de la forme du colloïde, et correspondent respectivement à la viscosité intrinsèque et à la compacité, fraction volumique maximale, du soluté.

Dans le cas de l'albumine, nous avons comparé en figure 60 l'évolution de la viscosité mesurée au modèle de Krieger-Dougherty, avec les paramètres tels qu'estimés dans la littérature : $t [\eta]^{BSA} = 4.1 \text{ g.mL}^{-1}$ pour la viscosité intrinsèque^{213,223}.

Les courbes de viscosité s'arrêtent systématiquement dans une zone de fraction $\phi \approx 0.5 - 0.6$. Au-delà, on semble observer une gélification de la goutte, avec une diminution brutale de la diffusion des particules. Cela semble correspondre aux phénomènes de transition vitreuse de la BSA décrits dans la littérature²²⁰. A partir d'une fraction massique $c^{w/w} = 30\%$ (correspondant pour nous à une fraction volumique $\phi = 0.6$, matérialisée par une ligne verticale sur la figure 60), la viscosité de la BSA augmente rapidement, s'écartant ainsi du modèle de Krieger-Dougherty. Au delà d'une fraction massique $c^{w/w} \approx 40\%$, la BSA se comporte comme un solide viscoélastique.

Également, il est probable que le décrochage observé corresponde à la limite de viscosité mesurable liée au mouvement des gouttes, évoquée en 3.3.1. Rappelons que la mesure de la viscosité de la BSA a été effectuée avec une phase continue Novec 7500. Il serait intéressant de reproduire l'expérience en utilisant de l'huile Fomblin.

4.3 Lysozyme

Grandeur	Symbole	Valeur tabulée
Rayon de Stokes	r_s	2 nm
Masse moléculaire	M_w	16.5 kDa
Point isoélectrique	pI	11
Viscosité intrinsèque	$[\eta]$	2.66 mL.g ⁻¹
Compacité maximale	ϕ_m	0.7

TAB. 12 – *Grandeurs tabulées retenues pour l'étude du lysozyme*²²⁴. Avec un point isoélectrique à 11, le lysozyme est chargé positivement aux pH auxquels nous travaillons (6.5-7).

Le lysozyme est une autre protéine globulaire, présente chez la majorité des vertébrés, mais aussi chez les insectes et les acariens par exemple.

Le lysozyme est une enzyme, catalysant l'hydrolyse du peptidoglycane²²⁵. Ce polymère de peptides et de glucides est l'un des constituants principaux de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif. Considéré comme une antibiotique naturel, le lysozyme participe à la lyse non spécifique de ces bactéries et appartient au système immunitaire inné.

Le type de lysozyme le plus couramment étudiée est extrait du blanc d'oeuf de poule.

Comme la BSA, le lysozyme est un modèle répandu pour l'étude des interactions protéiques^{99,226,227}.

Contrairement à la BSA, il est chargé positivement aux pH auxquels nous travaillons.

La courbe 61 montre les mesures de viscosité sur une gamme 1-1000 mPa.s (0.05-0.73 en fraction volumique), réalisées avec des solutions initiales de concentration massique 5%.

Le lysozyme est une protéine ellipsoïdale relativement petite. Du fait de sa forte charge globale positive,

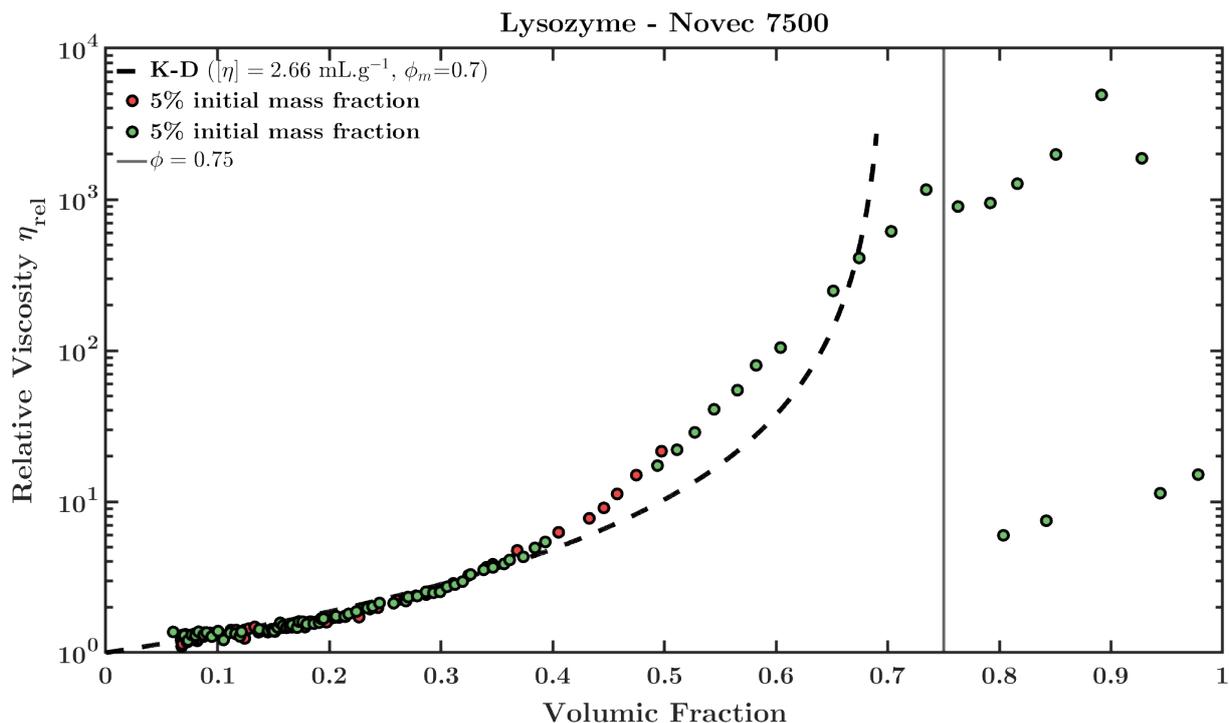


FIG. 61 – Viscosité relatives de solutions de lysozyme, pour des fractions massiques initiales de 5%. Aux faibles fractions volumiques, la viscosité est en accord avec le modèle de Krieger-Dougherty²²¹. On observe une augmentation de la viscosité à partir de $\phi = 0.4$, en décalage avec le modèle hydrodynamique. Cette déviation pourrait être due à la formation d'agrégats réversibles, s'accompagnant d'une augmentation de la viscosité. A partir d'une fraction volumique $\phi = 0.75$, repérée par une ligne verticale, le lysozyme cristallise.

les interactions inter-protéines à longue portée sont plus répulsives que dans le cas de la BSA par exemple. Nous avons également étudié l'adéquation du modèle de Krieger-Dougherty à la viscosité du lysozyme, en retenant la valeur $[\eta]^L = 2.66 \text{ g.m}^{-1}$ pour la viscosité intrinsèque²²⁴. Les viscosités mesurées montrent une bonne adéquation au modèle de Krieger-Dougherty pour les fractions massiques $\phi \leq 0.4$. Ensuite, on constate une augmentation plus rapide de la viscosité, potentiellement due aux interactions attractives liées au moment dipolaire du lysozyme et se développant à courte portée^{227,228}, ou encore aux dynamiques d'agrégation réversibles^{99,226} affectant la viscosité du lysozyme pour des fractions volumiques $\phi \geq 0.5 - 0.6$. Ce phénomène dépend de la température²²⁹, et est le plus marqué à des températures de 5-10°C. Il serait intéressant de reproduire cette expérience à des températures différentes, afin de mettre en évidence ces phénomènes d'organisation collective.

A partir d'une fraction volumique $\phi \approx 0.75$, on observe un début de cristallisation au sein de la goutte (figure 62). L'apparition de ce point de nucléation entraîne une inhomogénéité dans la goutte, et une contraction rapide du volume.

En effet, la cristallisation du lysozyme s'accompagne d'une diminution importante de son volume spécifique.

Les points de mesure situés après le point de nucléation, matérialisé par une ligne verticale sur la figure 61, ne reflètent donc ni la viscosité dans la goutte ni la fraction volumique en lysozyme.

L'étude de la viscosité de l'albumine et du lysozyme nous a permis de valider la viabilité de notre approche pour l'étude de solutions concentrées de protéines. La stabilisation stérique des traceurs fluorescents par greffage de chaînes -PEG permet l'étude de protéines chargées sans risque d'agrégation. La

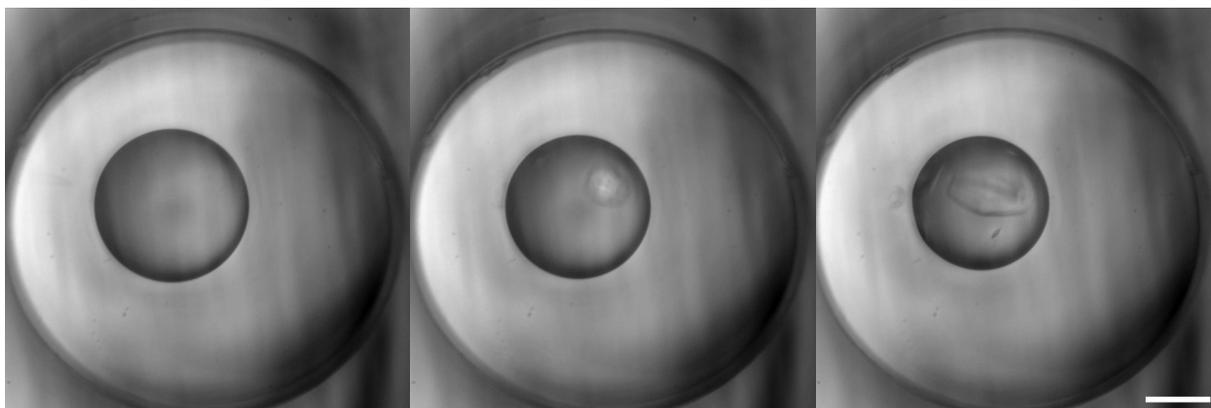


FIG. 62 – *Cristallisation du lysozyme dans la goutte. Observée à partir de fractions volumiques $\phi \approx 0.75$, la cristallisation entraîne une contraction brusque du volume de la goutte. Ces images ont été prises à 700 secondes d'intervalle. A gauche, la cristallisation n'a pas encore débuté. Sur l'image du milieu, on observe un premier point de nucléation. Sur l'image de droite enfin, on constate la formation d'un cristal.*
Barre d'échelle : 50 μm

réalisation d'expériences avec des volumes réduits à 1 μL permet de confirmer la grande efficacité de notre méthode de production des gouttes microfluidiques.

Dans un second temps, l'étude de modèles simples comme l'albumine et le lysozyme nous a tout de même permis d'observer des déviations par rapport aux modèles hydrodynamiques phénoménologiques, correspondant à des dynamiques d'organisation collectives et des transitions de phase décrites dans la littérature.

L'extension de la gamme de viscosité accessible laisse envisager le suivi d'augmentations importantes et discontinues de la viscosité, liées à des phénomènes tels que la transition vitreuse de l'albumine par exemple.

Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences en utilisant une phase continue visqueuse. Également, une étude de l'influence de la température sur le comportement visqueux des protéines serait intéressant, surtout dans le cas du lysozyme où l'augmentation de la viscosité liée à la formation d'agrégats dépend fortement de la température⁹⁹. Nous avons développé un dispositif de chauffage homogène de la puce permettant son observation au microscope. Initialement développé pour étudier la dénaturation des protéines, ce dispositif permet de chauffer jusqu'à 80°C, mais ne permet malheureusement pas l'abaissement de la température.

Une autre application intéressante de notre dispositif serait le criblage de l'influence de différentes conditions expérimentales sur la viscosité des protéines. Comme évoqué en introduction, la viscosité des protéines dépend en effet de facteurs comme le pH ou la concentration en sel. La réduction du volume des échantillons et les possibilités de parallélisation de notre système serait un avantage certain pour l'exploration de ces différents paramètres.

En revanche, la concentration du soluté dans la goutte est une limitation importante : elle implique la concentration du milieu dans son ensemble. Ainsi, la concentration en sel ou en solution tampon par exemple augmenterait fortement pendant l'expérience. Expérimentalement, les expériences réalisées avec des tampons fortement salés comme le tampon phosphate salin (PBS, Phosphate Saline Buffer) se termine par l'observation d'un cristal de sel en suspension dans le puits, perturbant la viscosité.

Des expériences de suivi de la viscosité ont été réalisées en milieu tamponné dans le cas de la BSA. L'utilisation de tampons faiblement salés initialement dilués (acide acétique-acétate de sodium, HEPES) a fourni des résultats satisfaisants, sans toutefois pouvoir établir avec certitude que la concentration du tampon dans la puce n'affecte pas la viscosité des protéines ou la diffusion des particules.

Enfin, la perspective la plus immédiate pour notre dispositif est son utilisation pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux. Après validation avec le sucrose et les protéines modèles, aucun obstacle majeur ne semble s'y opposer. L'application la plus immédiate serait de caractériser un grand nombre d'anticorps monoclonaux de séquence connue, afin de montrer la diversité de leurs comportements visqueux et de tenter d'en dégager des enseignements quant au lien entre séquence polypeptidique et viscosité.

Dans un second temps, le criblage de l'influence de la composition du milieu serait également instructive,

avec les mêmes réserves liées à la concentration du milieu dans les gouttes.

Sixième partie

Conclusion

La fonction biologique des protéines est liée à leur affinité sélective pour une ou plusieurs cibles moléculaires.

Cette affinité est la résultante d'interactions complexes développées par leurs blocs constitutifs, 22 acides aminés aux propriétés physico-chimiques variées. Leur agencement spatial est dicté par la structure tridimensionnelle des protéines. La grande diversité des fonctions biologiques remplies par ces macromolécules du vivant est par conséquent directement liée à leur diversité structurale. Au cours de ce manuscrit nous avons évoqué l'influence de l'environnement, et en particulier celle de la concentration macromoléculaire, sur les interactions interprotéiques.

Nous avons décrit l'activité biologique sous la forme d'interactions spécifiques entre des protéines et leurs cibles, influencées par une multitude d'interactions non-spécifiques. Les processus du vivant font le plus souvent intervenir plusieurs dizaines d'étapes et autant de protéines différentes. À chacune de ces étapes, des protéines de forme et de structure variées développent des interactions tout aussi diverses, expliquant la difficulté du développement de modèles analytiques décrivant le comportement de solutions de protéines, et notamment leur rhéologie comme nous l'avons discuté au cours de ce manuscrit. Les modèles phénoménologiques hydrodynamiques peinent à décrire le comportement visqueux de protéines globulaires parmi les plus simples : l'albumine et le lysozyme.

Le développement des modèles colloïdaux permet de décrire des interactions de plus en plus complexes. Certain·e·s pensent que les progrès de la synthèse colloïdale, en terme de forme de particules et de distribution de charge, font de ces modèles un outil indispensable⁷⁷. D'autres considèrent au contraire que la flexibilité structurale des protéines empêche leur modélisation pertinente par des particules colloïdales, quelle que soit leur complexité⁷⁶.

S'il est impossible de dire aujourd'hui qu'une de ces approches est plus valable que l'autre, elles amènent une certitude commune : qu'il s'agisse de développer des modèles colloïdaux ou qu'il faille caractériser empiriquement la vaste diversité des protéines, l'étude des solutions de protéines concentrées est indispensable.

Les biopharmaceutiques ne font que confirmer l'inévitabilité de ces études, et y ajoutent également un caractère urgent. L'emploi de macromolécules du vivant à des fins thérapeutiques offre des perspectives nouvelles dans le traitement de maladies lourdes. La grande spécificité des anticorps monoclonaux thérapeutiques permet le traitement sélectif de cancers, multipliant les chances de survie et diminuant fortement les effets secondaires des chimiothérapies agressives.

L'ingénierie protéique permet de limiter au maximum l'immunogénicité des biopharmaceutiques, permettant le traitement à vie de maladies auto-immunes et ainsi à des patient·e·s de mener une vie normale malgré des pathologies dégénératives incurables.

Ces perspectives prometteuses ne doivent pas masquer les difficultés et les défis rencontrés lors de la production et de la formulation des biopharmaceutiques, qui restent des traitements fragiles et onéreux, dont l'accessibilité est ainsi conditionnée par l'accès à des infrastructure médicales et à une couverture sociale.

La généralisation des formulations sous-cutanées et des auto-injecteurs permet de les rendre plus accessibles, passant de traitements hospitaliers lourds à des injections hebdomadaires réalisées à domicile. Les formulations sous-cutanées représentent un gain de temps pour les patient·e·s et une réduction du coût des traitements entraînant une amélioration du suivi thérapeutique.

En permettant leur administration à domicile et en réduisant le coût de leur développement, les méthodes de criblage de la stabilité ou du comportement visqueux des formulations concentrées des biopharmaceutiques sont donc un des leviers permettant de rendre ces traitements plus efficaces et plus accessibles.

Nous avons développé une plateforme intégrée, permettant la caractérisation visqueuse de solutés aqueux sur une large gamme de concentration, à partir d'échantillons de volume réduit. La concentration de solutés par rétrécissement des gouttes est rendue possible par la pervaporation de l'eau. La durée du rétrécissement est modulable car proportionnelle à l'épaisseur de la membrane de PDMS entre les deux canaux de la puce, permettant de minimiser la durée des expériences tout en garantissant l'homogénéité des échantillons étudiés.

Durant le rétrécissement, le piégeage des gouttes dans des puits cylindriques ainsi qu'un équilibrage précis des flux résiduels permettent la mesure de la viscosité dans la goutte, par suivi de particules multiples. L'utilisation d'un estimateur statistique avancé permet d'optimiser la précision des mesures sur une large gamme, tout en réduisant le nombre de particules nécessaires.

Ainsi, le facteur de rétrécissement peut être étendu à plus de 400, permettant d'observer la gélification de solutions de protéines ou la sursaturation de solutions de sucrose par exemple. La gamme de viscosité ac-

cessible couvre 3 décades entre 1 mPa.s et plus de 1 Pa.s. Notre puce permet la caractérisation visqueuse complète d'anticorps monoclonaux, à partir de formulations commerciales diluées et en minimisant jusqu'à 1-10 μg la quantité totale de protéines nécessaire.

Les performances de notre puce reposent sur l'utilisation de techniques microfluidiques, principalement la production et la manipulation de micro-gouttes ; la concentration de solutés par pervaporation de l'eau ; et la microrhéologie par suivi de particules multiples. Aucune de ces techniques n'est inédite. Leur maîtrise et leur mise en application a certes nécessité du temps, mais n'ont pas été le sujet principal de cette thèse.

L'adéquation de ces techniques entre elles a représenté une première difficulté, chacune ayant des impératifs différents. La microrhéologie est une technique éprouvée, permettant la caractérisation de fluides complexes, en particulier dans le domaine de la biologie. Son application à des micro-gouttes présente une difficulté en soi, du fait de l'influence potentielle du confinement sur la diffusion des gouttes et de la nécessité de stabiliser la goutte pour éviter tout mouvement parasite. Le rétrécissement des gouttes impose de nouvelles contraintes, limitant la quantité de particules encapsulables et générant des écoulements résiduels susceptibles de déstabiliser la goutte.

L'intégration de ces techniques au sein d'une plateforme a nécessité une réflexion sur l'architecture de la puce, et de nombreuses expérimentations rendues possibles par la rapidité de prototypage offerte par la lithographie douce. Dans un second temps, la puce a été optimisée afin de remplir au mieux les objectifs ambitieux de notre cahier des charges. Il en résulte une puce performante et simple d'utilisation, mais issue d'un développement technique ardu, nécessitant de nombreuses itérations et poussant dans leurs retranchements les performances de la micro-fabrication de moules multi-couches.

Une part importante de ce doctorat a ensuite été consacrée à une recherche systématique des sources de perturbation potentielles susceptibles d'affecter la précision des mesures. Pour chacune de ces sources, nous avons tâché d'en quantifier l'influence au moyen d'estimations analytiques, de simulations numériques ou encore d'expériences spécifiquement conçues pour décorrélérer au mieux les effets de divers paramètres.

Passer d'un facteur de rétrécissement de 50 à plus de 400 n'est pas uniquement un problème de taille des gouttes ou de géométrie de la goutte. Sur une telle gamme de concentration, l'amplification des incertitudes initiales impose une précision maximale des mesures. Il devient alors indispensable d'optimiser la mesure du volume et de prendre en considération l'effet du volume partiel spécifique des solutés.

Dans notre cas, il n'était a priori pas indispensable d'estimer au nanomètre près l'erreur de localisation des particules avant de concevoir un protocole d'acquisition des trajectoires. Les raisonnements développés dans la partie IV et l'estimateur CVE concernent a priori le suivi de particules uniques très faiblement émettrices¹⁹³. Dans notre cas, avec plusieurs particules suivies en parallèle et une quantité importante de photons détectés, il aurait été envisageable de faire de la microrhéologie sans optimisation statistique¹³⁹. Mais l'accumulation de ces optimisations nous permet de mesurer avec une bonne précision et dans les mêmes conditions expérimentales aussi bien la viscosité de l'eau que celle de solutions sursaturées de saccharose, 3 ordres de grandeur au-dessus. Nous avons montré qu'à ces viscosités, c'est l'erreur de localisation des particules qui devient limitante.

Ces optimisations sont donc indispensables à la performance globale de notre approche, et nous permettent d'étendre la gamme de viscosités et de concentrations accessibles.

La mesure de la viscosité de solutions commerciales de biopharmaceutiques est déjà une avancée en soi. La réduction du volume consommé, et la possibilité de réaliser une caractérisation visqueuse complète en partant d'un échantillon dilué contribuent à rendre accessible la rhéologie des solutions de protéines concentrées au plus grand nombre, sans avoir à recourir à des techniques de concentration et de purification complexes telles que l'ultracentrifugation. La possibilité de moduler la durée de nos expériences en jouant sur l'épaisseur de la membrane, ainsi que l'automatisation des expériences permettent d'envisager une parallélisation des mesures, démultipliant ainsi les conditions expérimentales explorées.

En rendant possible le criblage systématique d'une grande variété d'anticorps, notre dispositif participera à la compréhension du lien entre la séquence polypeptidique d'un anticorps et son comportement en solution^{55,85}, indispensable au développement de modèles prédictifs de la viscosité et de la stabilité des biopharmaceutiques^{73,230}.

Nous l'avons précédemment évoqué, la viscosité et la stabilité des biopharmaceutiques sont sensibles aux plus infimes mutations de la séquence peptidique⁵⁵ ainsi qu'à de nombreux paramètres extérieurs comme par exemple le pH, la présence d'excipients⁶⁹, ou encore la force ionique du milieu⁷⁰. Pour un anticorps donné, ces nombreux facteurs représentent autant de dimensions d'un espace paramétrique que notre ap-

proche peut aider à explorer, en tenant cependant compte de la limitation que représente le changement de composition du milieu lié au rétrécissement des gouttes.

Pour ces applications, la répétabilité offerte par notre dispositif et sa simplicité d'utilisation sont des atouts majeurs. L'objectif est d'évaluer la viabilité d'un biopharmaceutique et le cas échéant d'en optimiser la formulation. La mesure de la viscosité sert donc principalement à être positionnée par rapport à un seuil préétabli, par exemple la limite de seringabilité pour une formulation sous-cutanée, ou évaluer la qualité d'une formulation par rapport à une autre.

La précision de notre approche permet d'en étendre la portée. La concentration du soluté dans la puce représente in fine un gain de précision sur la mesure de la concentration pour l'étude de solutions très concentrées. En outre, elle permet sans complexité ajoutée la manipulation et la rhéologie de solutions sursaturées. L'étude du sucrose a démontré les capacités et la précision de notre système à haute viscosité. Ces capacités permettent d'envisager des applications pour la rhéologie de solutés visqueux comme les polymères par exemple, mais également une meilleure compréhension des transitions de phases de solutions de protéines concentrées.

La complexité des interactions interprotéiques transparaît dans les comportements visqueux des solutions de protéines concentrées. Les déviations par rapport aux modèles phénoménologiques hydrodynamiques et les discontinuités liées à la transition vitreuse de l'albumine et du lysozyme nous ont permis d'en avoir un aperçu. Ces phénomènes dépendant fortement de la température, l'utilisation de gouttes microfluidiques facilite également l'exploration d'une gamme étendue de températures.

En permettant l'étude d'échantillons à haute concentration à partir de solutions diluées, notre approche permet de se rapprocher au mieux des niveaux d'encombrement des milieux biologiques, préalable indispensable à la bonne compréhension de l'activité des protéines.

A ces concentrations, la caractérisation précise des phénomènes d'organisation collective et des interactions interprotéiques, rendue possible par l'extension de la gamme de viscosités accessibles, peut aider à une meilleure compréhension des mécanismes de déstabilisation à l'origine de certaines pathologies²³¹, ainsi qu'au développement de modèles et de méthodes expérimentales permettant de prédire le comportement de solutions concentrées à partir de l'étude de solutions diluées^{77,232}.

Septième partie

Annexe

Chapitre 1

Traceurs

La microrhéologie passive permet de déterminer la viscosité d'un milieu en suivant la diffusion brownienne de particules en suspension dans ce milieu.

Une mesure précise de la viscosité implique donc que les particules soit effectivement en suspension dans le milieu, qu'elles soient détectables, et que leur mouvement ne soit dépendent d'aucun autre phénomène que la diffusion libre.

Le choix des traceurs n'est donc pas anodin.

Sauf mention contraire, les mesures de viscosité présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec des traceurs en polystyrène ayant un diamètre nominal de 0.5 μm (FluoSpheres™ Carboxylate Modified MicroSpheres, 0.5 μm , yellow-green fluorescent (505/515), ThermoFisher Scientific).

Pour chacune des caractéristiques présentées dans ce chapitre, nous expliquerons les raisons qui ont motivé notre choix de traceurs.

1.1 Taille des traceurs

Le choix de la taille des fluorophores dépend premièrement de la viscosité du milieu à caractériser. Il s'agit de maximiser la diffusivité des traceurs pour gagner en précision lors du suivi des trajectoires, jusqu'à atteindre les limites imposées par la taille des gouttes, la puissance de l'algorithme de reconstruction des trajectoires et la sensibilité de détection du signal de fluorescence.

Rappelons que dans notre cas le rétrécissement de la goutte va s'accompagner d'une augmentation de la viscosité allant jusqu'à deux ordres de grandeur.

Nous avons à notre disposition des particules FluoSpheres™ avec les diamètres nominaux suivants : 0.2, 0.5 et 1 μm .

Dans cette partie, nous détaillons les différents effets induits par la taille des traceurs, et leur impact sur la mesure de la viscosité. Nous verrons que le choix d'un diamètre nominal de 0.5 μm résulte d'un compromis entre diffusivité et intensité lumineuse.

1.1.1 Diffusivité

Le coefficient D quantifiant la diffusion d'un traceur en suspension est inversement proportionnel à sa taille (cf (IV.3), dépendance en $\frac{1}{r}$ du coefficient de diffusion).

Diminuer la taille de la particule implique donc des déplacements plus importants, à viscosité égale.

Compte-tenu de la précision de la localisation des particules (cf partie IV, chapitre 2), augmenter le déplacement caractéristique de la particule permet d'augmenter la précision de la mesure de la viscosité. Pour une taille de traceur donnée, il existe également une viscosité maximale au dessus de laquelle la microrhéologie n'est plus pertinente.

Cependant, une trop grande diffusivité perturberait la mesure de la viscosité. Rappelons que la diffusion des particules est tridimensionnelle. Une diffusivité accrue augmente également le risque que la particules sorte du plan focal du microscope durant l'acquisition, produisant ainsi des trajectoires incomplètes.

Nous travaillons dans des gouttes microfluidiques, un milieu confiné. Avec la diffusivité, c'est aussi la probabilité que deux traceurs se croisent qui augmente, affectant la précision de l'algorithme de reconstruction des trajectoires.

La complexité de cet algorithme évolue en $N!$ à chaque image du timelapse (cf 3), avec N le nombre de

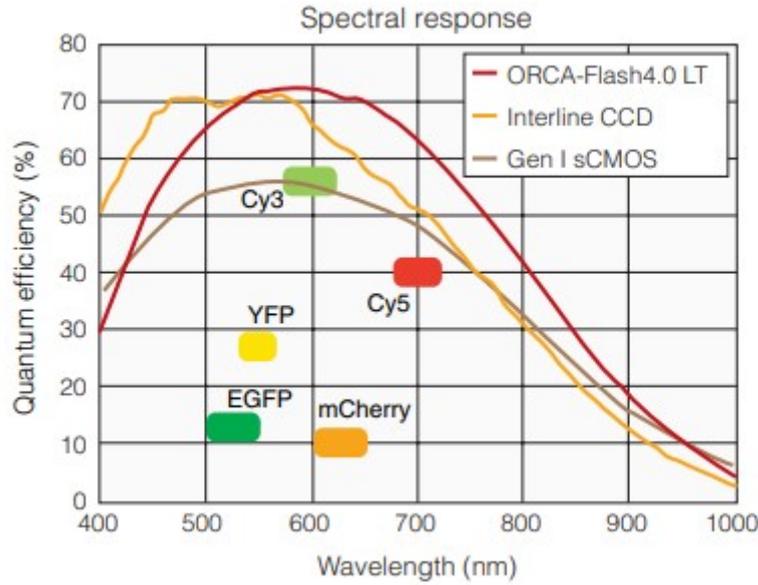


FIG. 63 – Rendement quantique de la caméra ORCA-Flash 4.0 LT.

Le rendement quantique γ représente le nombre d'électrons émis par le capteur CMOS pour chaque photon détecté. Il dépend de la longueur d'onde.

Figure extraite de la documentation fournie par Hamamatsu Photonics²³³

particules imagées. Afin de limiter la puissance de calcul nécessaire, il est indispensable de définir une distance L de déplacement maximal pour l'interpolation des trajectoires. Augmenter la diffusivité des traceurs impose donc d'augmenter cette distance L , au risque de rendre impossible la reconstruction des trajectoires.

1.1.2 Signal lumineux : estimation du nombre de photons détectés

L'intensité du signal de fluorescence émis par les traceurs est proportionnel à leur volume. Ainsi, si la diffusivité des traceurs évolue en $\frac{1}{r}$, l'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à r^3 . Diviser par deux la taille retenue reviendrait par exemple à multiplier par deux la diffusivité des traceurs, mais à diviser par huit le nombre de photons détectés.

Le nombre de photons détectés affecte la précision de la détection des particules (cf partie IV, 2), il dépend également des caractéristiques des dispositifs d'illumination et d'imagerie utilisés.

L'observation d'une particule fixe (partie IV, 2.3) nous a également permis d'estimer le nombre de photons reçus par la caméra lors du suivi.

L'image d'une particule fixe ne contient pas directement l'information du nombre de photons reçus par chaque pixel du capteur. Ce qui est contenu dans chaque pixel, c'est une valeur de signal adimensionnée. Dans notre cas, ce signal est encodé sur 16-bits, et a donc une valeur comprise entre 0 et $2^{16} - 1 = 65535$.

Relation entre photons incidents et signal

Pour estimer le nombre de photons incidents en fonction du signal, deux conversions sont nécessaires. La caméra que nous utilisons est équipée d'un capteur CMOS. Chaque pixel correspond à une photodiode, qui va convertir l'intensité lumineuse incidente en signal électrique. Cette conversion est quantifiée, selon :

$$N_{e^-} = \gamma N_{ph} \quad (\text{VII.1})$$

γ est le rendement quantique de la caméra. Il dépend du capteur, mais aussi de la longueur d'onde d'émission λ_{em} . Pour notre caméra, et avec un fluorophore émettant à $\lambda_{em} = 515$ nm, on retient la valeur $\gamma \approx 67.8$ % (cf figure 63).

Chaque photodiode correspond à un pixel, à qui une valeur de signal S est attribuée selon :

$$S = \frac{N_{e^-}}{c} + Off \quad (\text{VII.2})$$

c est le facteur de conversion de la caméra, également fourni par le constructeur¹⁷³. Dans notre cas, $c = 0.46$.

Off représente l'offset de la caméra, soit la valeur assignée à un pixel lorsqu'il ne reçoit aucune lumière. Pour notre caméra, $Off = 100$.

Estimations numériques

Pour l'image d'une particule isolée, on obtient un signal total $S \approx 10^6$. On calcule enfin le nombre moyen de photons reçus par particule :

$$N_{ph} \approx 6.5 \cdot 10^5 \quad (\text{VII.3})$$

Le même raisonnement nous permet d'estimer le nombre de photons pour le bruit de fond : une image sans particule fluorescente est réalisée dans les mêmes conditions. Le signal total sur une région d'intérêt de surface identique à celle retenue pour la particule vaut $S^{noi} \approx 10^4$, soit un nombre moyen de photons $b \approx 7 \cdot 10^3$.

Ces deux valeurs, N_{ph} et b , sont utilisées en partie IV pour estimer l'erreur de localisation des particules.

Dans les conditions d'illumination et de prise de vue retenus pour la mesure de la viscosité, nous avons mesuré un rapport signal sur bruit $SNR_{500nm} \approx 90$ pour les particules de 500 nm de diamètre.

En considérant que le nombre de fluorophores, et donc l'intensité émise, est proportionnel au volume de la particule, on en déduit les estimations suivantes pour les particules de 200 nm et 1 μm de diamètre :

$$\begin{aligned} SNR_{200nm} &\approx 6 \\ SNR_{1\mu m} &\approx 720 \end{aligned}$$

Les particules de 200 nm risquent donc de ne pas être assez lumineuses compte-tenu de notre dispositif d'imagerie et de détection des trajectoires.

1.1.3 Sédimentation

On cherche à étudier la diffusion des particules en suspension dans un milieu donné. On fait l'hypothèse d'une diffusion libre, ce qui revient à dire que les seules interactions à l'origine du mouvement de la particule sont les chocs résultants de l'agitation thermique du milieu environnant.

Rappelons qu'une particule subit en permanence une force liée au champ de gravité, s'exprimant selon :

$$\vec{F} = (\rho_p - \rho_m)V\vec{g} \quad (\text{VII.4})$$

Avec ρ_p et ρ_m les masses volumiques de la particule et du fluide respectivement, V le volume de la particule et \vec{g} le champ de pesanteur.

Les particules risquent alors de sédimenter ou de crêmer si elles sont trop lourdes ou trop légères par rapport au milieu environnant.

On aurait alors une accumulation de particules à l'interface de l'échantillon, et l'hypothèse de la diffusion libre ne serait plus valable.

Ce problème est récurrent dans les expériences de microrhéologie : les dimensions caractéristiques de l'échantillon étant microscopiques, même une vitesse de sédimentation faible peut aboutir à une accumulation de traceurs aux interfaces.

Pour éviter ce phénomène, il est préférable de limiter au maximum la différence de masse volumique entre la particule et le milieu environnant, afin que la suspension soit la plus stable possible.

Les FluoSpheresTM que nous utilisons sont des particules de polystyrène, de masse volumique $\phi_p = 1.05 \text{ g.cm}^{-3}$.

On peut estimer la vitesse caractéristique de sédimentation/crémage en considérant une particule se déplaçant à vitesse constante, sans tenir compte du mouvement lié à la diffusion brownienne.

L'accélération d'une telle particule est nulle, et on peut alors écrire :

$$\vec{0} = \Delta\rho V\vec{g} - 6\pi\eta r\vec{v}_s \quad (\text{VII.5})$$

Le premier terme correspond à la force gravitationnelle définie précédemment (cf relation (VII.4)), et le second est la traînée subie par la particule et définie selon la loi de Stokes (cf relation (IV.2)).

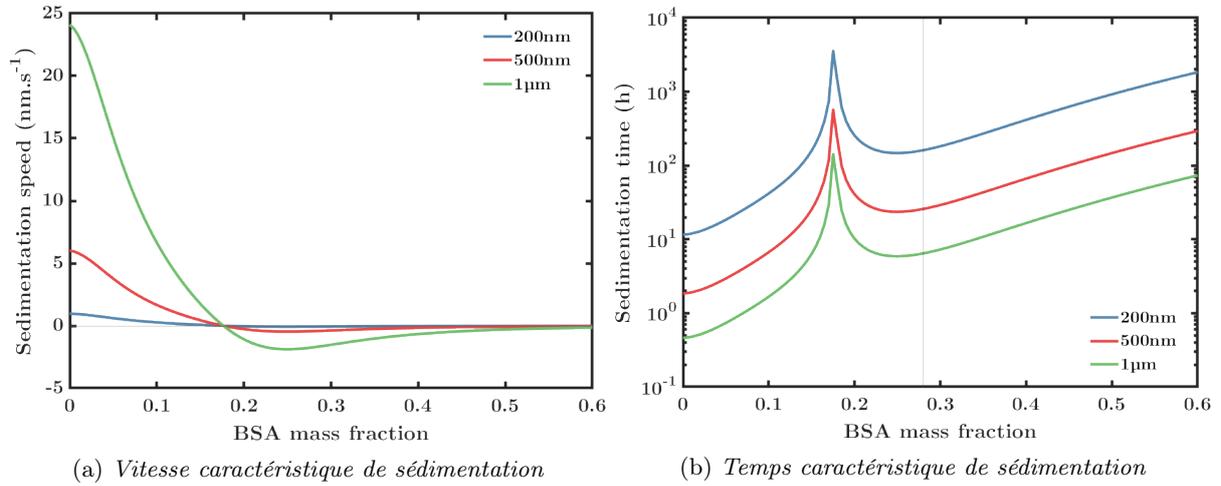


FIG. 64 – Sédimentation de particules de taille variable en fonction de la fraction volumique en protéine

En exprimant le volume de la particule selon $V = \frac{4}{3}\pi r^3$, la relation (VII.5) permet d'exprimer la vitesse de la particule selon :

$$\vec{v}_s = \frac{2}{9} \frac{\Delta\rho r^2}{\eta} \vec{g} \quad (\text{VII.6})$$

On définit le temps caractéristique de sédimentation / crémage comme le temps nécessaire pour parcourir une distance égale au rayon de la goutte R à une vitesse \vec{v} , soit :

$$\tau_s = \frac{9}{2} \frac{\eta R}{\Delta\rho g r^2} \quad (\text{VII.7})$$

On constate que le temps caractéristique de sédimentation dépend non seulement de la particule mais également de la masse volumique et de la viscosité du milieu contenu dans la goutte.

Pour les trois tailles de FluoSpheres™ à notre disposition (200 nm, 500 nm et 1 µm de diamètre), nous avons estimé la vitesse et le temps de sédimentation sur une goutte de rayon $R = 40$ µm en fonction de la fraction volumique d'une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (BSA).

On observe une fraction massique critique pour laquelle $\Delta\rho = 0$. Les particules sont alors en suspension. Au delà de cette fraction massique le milieu est plus dense que les particules, et la sédimentation se transforme en crémage.

Sur la figure 64a cela se traduit par un changement de signe de la vitesse de sédimentation, et sur la figure 64b par une divergence du temps de sédimentation.

Si on considère maintenant la diffusion brownienne, la statistique de Maxwell-Boltzmann nous permet d'estimer la hauteur caractéristique de la distribution des particules selon :

$$h_c = \frac{k_B T}{\Delta\rho V g} \quad (\text{VII.8})$$

Cette hauteur (cf figure 65) est à comparer avec la taille caractéristique des gouttes.

Elle correspond, en ordre de grandeur, à la position d'équilibre des particules à l'issue du processus de sédimentation. On en conclut que la sédimentation ne peut être négligée pour les particules de 1 µm de diamètre.

Pour des solutions diluées, la hauteur caractéristique de la distribution particulaire est de l'ordre du micromètre ou de la dizaine de micromètres, et le temps caractéristique de sédimentation est inférieur à la durée de l'expérience.

Pour les particules de 500 nm de diamètre, le problème peut être non négligeable pour des solutions très diluées, sur des temps caractéristiques de 1-2h.

Dans le cadre de notre expérience, cela ne devrait pas poser que problème car la solution de protéines dans la goutte a vocation à être concentrée.

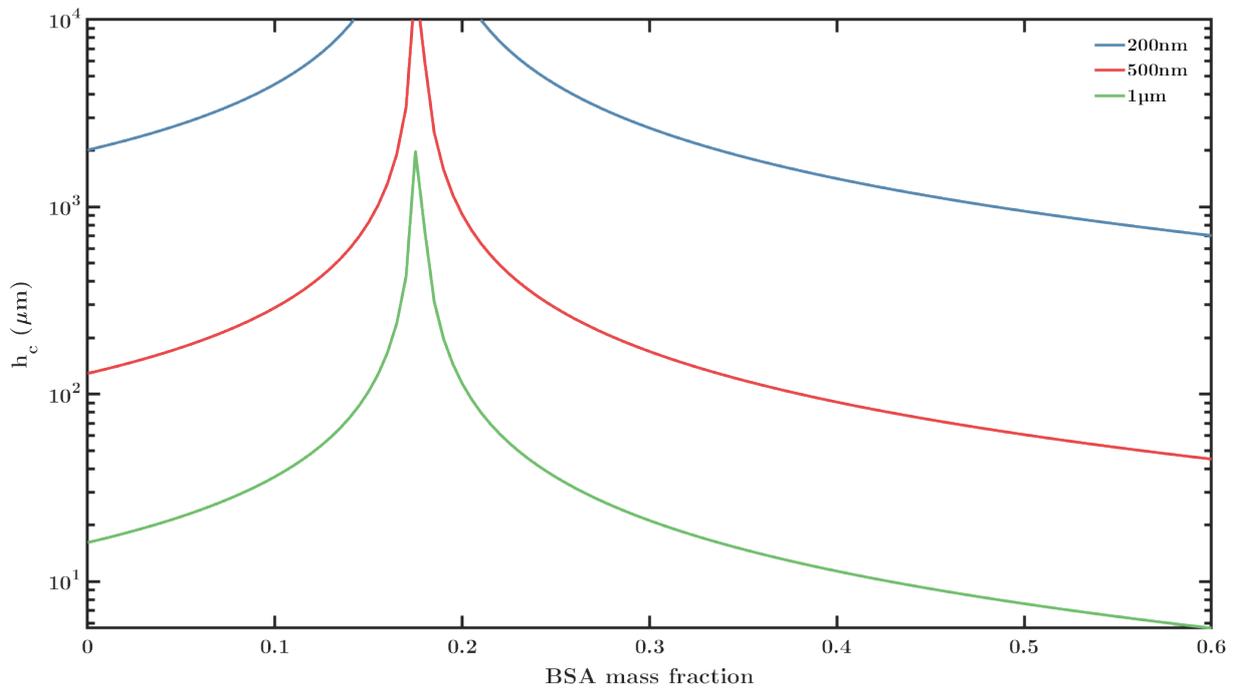


FIG. 65 – Hauteur caractéristique de la distribution particulaire

1.2 Stabilité

Les traceurs fluorescents sont commercialisés et stockés sous la forme d'une suspension colloïdale concentrée. Dans ces conditions, les particules sont susceptibles de s'agréger, ce qui est rédhibitoire pour notre expérience. En cas d'agrégation massive des traceurs (>100 particules par agrégat), il nous serait impossible d'encapsuler les particules dans les gouttes. Pour des agrégats de taille plus réduite, comme des dipôles ou des tripôles, la mesure de viscosité ne serait plus exacte, car on observerait alors la diffusion de particules non-sphériques de taille variable²³⁴.

La stabilité des colloïdes est le résultat d'un équilibre entre plusieurs interactions, liés à la forme et à la nature des particules colloïdales ainsi qu'à la composition du milieu environnant²³⁵

1.2.1 Double couche électrique

Considérons des particules colloïdales en suspension dans un milieu contenant des ions. Une fois en suspension, une double couche électrique se forme à la surface des colloïdes.

Une première couche d'ions, généralement négatifs, est adsorbée à la surface du colloïde²³⁶. Une seconde couche est constituée d'ions de signe opposés, attirés à la surface du colloïde par la première couche mais restant mobiles.

La superposition des deux couches fait qu'à une certaine distance, le colloïde apparaît globalement neutre. Cette distance, c'est la longueur de Debye λ_D , l'échelle de longueur sur laquelle les charges ioniques du milieu écrantent les charges surfaciques.

1.2.2 Ions et protéines

Longueur de Debye

La longueur de Debye varie grandement avec la composition du milieu. Dans le vide, elle est infinie : aucune charge ne vient écranter les champs électrostatiques. A l'inverse, plus le milieu est concentré en charges mobiles, plus l'écrantage est important et plus la longueur de Debye est réduite, affectant ainsi la stabilité colloïdale.

On le comprend en reprenant l'exemple précédent : la répulsion électrostatique entre deux particules commence lorsque qu'elle sont séparées d'une distance $d \leq 2\lambda_D$.

L'interaction électrostatique varie comme $1/d$. Si la longueur de Debye est réduite, les interactions de

Van der Waals variant comme $1/d^6$ risquent d'être supérieures, causant ainsi l'agrégation des particules.

Pour éviter l'agrégation en milieu ionique, une première stratégie consiste à augmenter la densité de charges surfacique des particules par traitement de surface.

Une autre solution consiste à développer une répulsion stérique, par exemple en greffant des chaînes polymères à la surface des particules. La répulsion stérique ne dépend pas de la longueur de Debye et reste donc efficace quelque soit la composition du milieu.

Les FluoSpheres™ que nous utilisons sont par greffées avec des chaînes polymères terminées par un ou plusieurs groupements -carboxylate.

Ce greffage entraîne a priori les deux interactions répulsives évoquées plus haut.

La longueur et les ramifications éventuelles de ces chaînes polymères ne sont pas rendues publiques. Il est cependant précisé[?] que la couche externe ajoutée par le traitement de surface a une épaisseur très faible (quelques Å) et une forte densité de charges (0.1-2.0 milliéquivalents/gramme).

La stabilisation électrostatique des Fluosphères montre ses limites pour des solutions avec une forte concentration en ions mais également, ce qui est plus problématique pour nous, pour des solutions de protéines.

Solutions de protéines

Les protéines sont des macromolécules amphotères, possédant plusieurs sites chargés répartis sur leur structure complexe.

Les protéines possèdent donc une charge globale (positive, négative ou neutre), mais également une répartition microscopique de charges. Aux pHs biologiques, la quasi-totalité des protéines possèdent des charges des deux signes.

La suspension de particules dans des solutions de protéines s'accompagnent par conséquent d'interactions complexes dépendant de la charge globale de la protéine et de la répartition microscopique des charges. Nous avons observé expérimentalement la déstabilisation engendrées par les protéines : les FluoSpheres™ sont stables dans une solution de BSA, mais pas dans une solution de Lysozyme. Ces deux protéines globulaires sont de structure assez similaire, mais dans l'eau pure la BSA est chargée négativement (pI=4.7). A l'inverse, le lysozyme est chargé positivement aux mêmes pH (pI=11.35).

Du fait de la grande répulsion électrostatique, cette déstabilisation a lieu sur des durées relativement longues (\approx 4-5 h).

Plusieurs techniques d'agitation permettent de remettre en suspension des solutions colloïdales. Les formulations commerciales de particules fluorescentes sont systématiquement agitées par un vortex, puis passées au sonicateur avant de les ajouter à une solution de protéines[?].

Ces méthodes ne sont cependant pas toujours applicable une fois la solution préparée : les protéines sont sensibles aux forces de cisaillement générées par ces dispositifs d'agitation.

L'ultrasonication²¹⁷ ou l'agitation par vortex²³⁷ peuvent causer des changements structurels altérant la fonctionnalité des protéines, allant jusqu'à la dénaturation.

Le temps caractéristique de stabilité des traceurs doit donc être suffisant pour que la préparation de la solution, son injection dans la puce et l'étude des gouttes ensuite formées puissent avoir lieu. Si il est toujours préférable de préparer les solutions immédiatement avant injection et caractérisation dans la puce, certaines conditions expérimentales peuvent exiger un stockage des solutions de protéines pendant plusieurs jours, auquel cas la stabilité des traceurs doit être améliorée.

Sans aller jusqu'à une déstabilisation de la suspension colloïdale, les interactions électrostatiques entre traceurs et protéines peuvent diminuer la précision des mesures de microrhéologie.

En effet les protéines vont avoir tendance à s'adsorber à la surface des particules.

L'adsorption des protéines entraîne une diminution de la concentration de protéines en solution. Cet effet est cependant négligeable dans notre cas, sauf pour des solutions extrêmement diluées.

1.2.3 Stabilisation stérique des traceurs

La stabilisation stérique des particules consiste à augmenter la longueur des chaînes polymères greffées tout en diminuant la densité de charges surfaciques. Ainsi, ce sont les interactions stériques qui deviennent majoritaires et stabilisent la suspension tout en limitant l'adsorption de protéines.

Le poly(éthylène glycol) (PEG) un des polymères les plus efficace pour ces applications²³⁸.

La démarche la plus utilisée consiste à utiliser des réactions de couplage de carbodiimides : des chaînes linéaires de PEG greffées avec un groupement amine terminal réagissent avec les sites carboxylates présents à la surface des particules, après passage par un ester intermédiaire²³⁹.

La longueur des chaînes greffées affecte non seulement la stabilisation stérique mais également l'adsorption des protéines²⁴⁰.

Les traceurs fluorescents que nous avons utilisés ont été greffés avec du CH₃O-PEG-NH₂ de poids moléculaire $M_w \approx 20$ kDa, selon un protocole issu de précédents travaux²⁰⁵ et présenté au chapitre suivant (2).

Chapitre 2

Protocoles Expérimentaux

Dans cette partie sont regroupés les principaux protocoles expérimentaux élaborés durant ce doctorat et employés dans cette thèse. Ils sont rédigés en anglais pour une meilleure diffusion au sein du laboratoire.

MASK DESIGN

Using AutoCAD & CleWin 5

Created by Paul Cochard-Marchewka (✉ paul.cochard-marchewka@espci.fr) on June 15, 2021

Last edit January 28, 2022

Protocol purpose:

Design microfluidic chips for mask manufacturing

Italics mean you have to type in the command

PROTOCOL

Step 1

[Time required 10 minutes]

Polyline (AutoCAD)

To be compatible with CleWin, the design must only contain closed lines in AutoCAD (closed polylines, polygons, circles, text, etc).

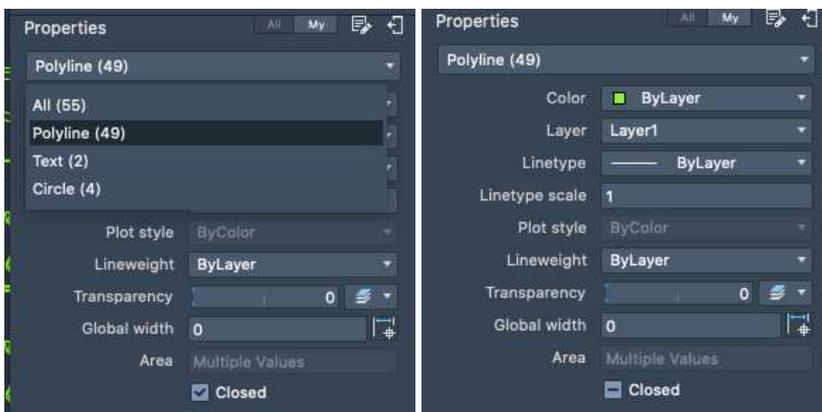
The following command sequence first breaks all the lines to make sure no arrays are left in the design, then converts all lines to polylines and join them.

- Select all
- *XPLODE*
- *PEDIT*
- *MULTIPLE*
- Select all
- *YES*
- *JOIN*
- 2

All objects on the design should now be either text, circles, or closed polylines. To make sure of that, you can check the objects properties with:

- Select all
- *PROPERTIES*

If the **Closed** property of polylines is set to ***VARIES***, there is a mistake on the drawing.



(a) Ok

(b) Not ok

Step 2

[Time required 5 minutes]

.dxf export (AutoCAD -> CleWin)

CleWin only reads specific .dxf (Drawing eXchange Format) files.

- Save file as an **AutoCAD 2007/LT2007 DXF** file
- Close the .dxf file in AutoCad

DESIGN

1 .dwg file per layer

SOFTWARE

AutoCAD

CleWin 5

- Open the .dxf file in CleWin

If CleWin says the .dxf file is invalid it means it is still open in AutoCAD

The mask, photoplotted or chromium, will always be used with their printed side down, in direct contact with the wafer. Any text you want to see exposed on the wafer then needs to be printed in reverse on the mask.

Do not bother reversing the text in AutoCAD, as CleWin will not understand the command and re-reverse the text while opening the .dxf. Write your text normally in AutoCAD, then select it, right click it and use **Transform->Mirror horizontally** to invert the text.

Step 3.1
minutes]

[Time required 10

XOR and export for photoplotting

CleWin sees your design as a succession of concentric closed lines. To build the mask design the XOR (eXclusive OR) function will compute the intersection between each closed pattern.

If you are designing a mask for photoplotting, your chips must be transparent and their surroundings must be colored, as colored areas will be covered by ink and thus opaque.

CleWin computes the polarity strating from outside. To switch the polarity of your design, you can add or substract a guide square at the edge of your design.

CleWin is NOT power-efficient: the computing time is exponentially correlated to the number of closed lines on your design. To avoid computing times that can reach days, remove any excess pattern on your design (filters, punching guide, etc).

- Select all
- Drag the design on the guide square
- Click XOR and wait. CleWin is likely to go in not responding mode, but keep waiting
- Check that your design came out ok
- *Export Layer*, and save your design as a .gbr (Gerber) file
- Send the .gbr file to the person in charge of photoplotting at IPGG

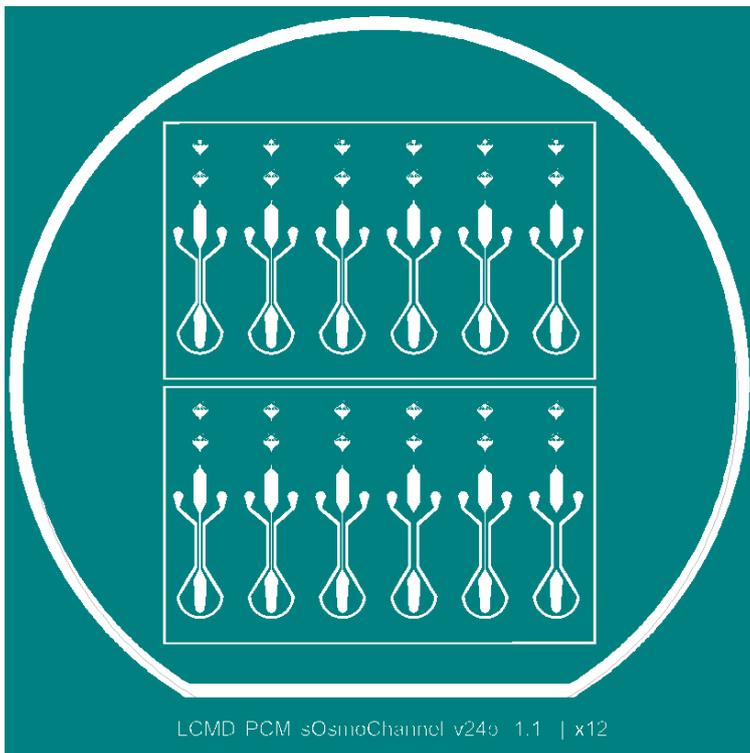


Figure 2: Example of .gbr design for photoplotting

XOR and export for chrome etching

CleWin sees your design as a succession of concentric closed lines. To build the mask design the XOR (eXclusive OR) function will compute the intersection between each closed pattern.

If you are designing a mask for chrome etching, your chips must be colored and their surroundings transparent, as colored areas will be laser exposed and thus transparent.

CleWin computes the polarity strating from outside. To switch the polarity of your design, you can add or subtract a guide square at the edge of your design.

CleWin is NOT power-efficient: the computing time is exponentially correlated to the number of closed lines on your design. To avoid computing times that can reach days, remove any excess pattern on your design (filters, punching guide, etc).

- Select all
- Drag the design on the guide square
- Click XOR and wait. CleWin is likely to go in not responding mode, but keep waiting
- Check that your design came out ok
- Select and delete any guiding line (border squares and circles) on your design. They are here to help the alignment of photoplotted masks, but for chrome masks they are just a waste of precious exposure time.
- *Export Layer*, and save your design as a .gbr (Gerber) file
- Open the .gbr file with CleWin
- Export layer as .cif (Crystal Information Format) file
- **Your file should be less than 1Mb in size. If it weighs around 10Mb it means it is invalid and will not be read by the μ -PG**
- See **Chrome Mask** protocol for mask manufacturing

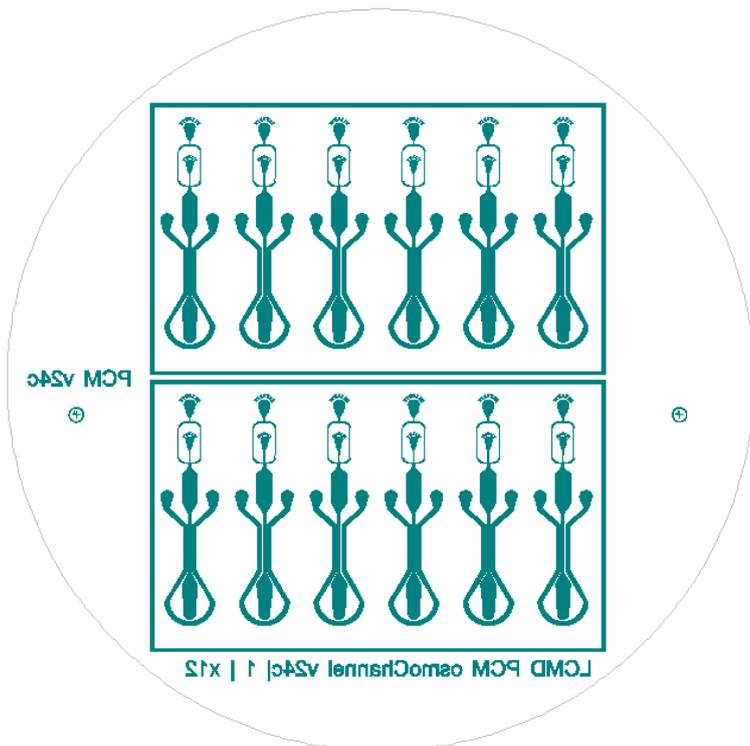


Figure 3: Example of .cif design for chrome etching

The μ -PG mask exposer only accepts .dxf or .cif files, and CleWin is full of mysteries. If you directly export your design as a .cif after XOR, it will produce an invalid .cif file that will not be readable by the exposer. Similarly, if you try to save your design as .dxf on Clewin it will crash.

CHROMIUM MASK

Using the micro-pg 101

Created by Paul Cochard-Marchewka (✉ paul.cochard-marchewka@espci.fr) on June 15, 2021

Last edit January 28, 2022

Protocol purpose:

Manufacture a chromium mask using the micro-pg 101 laser writer

PROTOCOL

Step 1 [Time required 2 minutes]

Mask loading

- Open the micro-pg 101
- Place the blank mask on the stage
- For a 5" chromium mask, align the bottom with the second row of screws, use pins
- Set vacuum (the valve is on the left). The vacuum region is defined with 2 screws, check manual. If the vacuum region is too big, the vacuum will be incomplete
- Using the command on the right side of the machine, set the laser filter to chromium
- Clean the stage & mask with compressed air

Step 2 [Time required 20 minutes]

Machine setting

- Open the "mpg wizard" software
- Load the .cif file
- Choose writing head (4mm -> $1\mu\text{m}$ resolution; 20mm -> $5\mu\text{m}$ resolution, faster)
- "Show control Panel" -> "To Center" -> "Focus"
- Set Laser Power (check excel table for reference)
- Set offset to (0,0)
- Set "Auto-Unload" to OFF
- Set "Uni-Directional" to OFF
- Expose

Step 3 [Time required 360-1200 minutes]

Exposure

- The exposure will take 6-20 hours depending on the design, do not trust the "Remaining Time" indicated by the machine
- Expose Overnight

Step 4 [Time required 5 minutes]

Photoresist development

- Place the exposed mask in a crystallizer
- Submerge the mask in AZ351 developer
- Manually agitate for 2 min (**do not over-develop**)
- Rinse the mask with distilled water
- Dry the mask with compressed air (do not use wipes)
- Discard the developer

WARNINGS



Chemical

AZR351 is CMR (reprotoxic category 1B)

EQUIPMENT

.dxf or .cif XOR chip design

Blank chromium mask (ask IPPG engineers)

Overnight booking on the micro-pg 101

CHEMICALS

AZ351 developer

Chrome etchant

mQ water

Acetone

2-propanol

DANGERS

Chemicals

Physical

Environmental



PROTECTIVE GEAR

Laboratory Coat

Gloves

Shoes Cover

Hat

Step 5

[Time required 5 minutes]

Chrome etching

- Place the exposed mask in a crystallizer
- Submerge the mask in chrome etchant
- Agitate until the chrome is fully removed (should take 1-2 min)
- Rinse the mask with distilled water

Step 6

[Time required 2 minutes]

Photoresist removal

- Rinse the mask with Acetone to remove the remaining photoresist
- Rinse the mask with 2-propanol
- Dry the mask with compressed air and/or wipes

MULTI-LAYERED SU-8 WAFER



Using the MJB4 aligner

Created by Paul Cochard-Marchewka (✉ paul.cochard-marchewka@espci.fr) on June 17, 2021

Last edit September 27, 2021

Protocol purpose:

SU-8, spin-coated on monocrystalline silicon wafers and selectively reticulated, creates molds for PDMS chips manufacturing.

PROTOCOL

Step 0

[Time required 10 minutes]

Experiment planning and setup preparation

- If necessary, turn on the MJB4 following the procedure indicated on the information sheet
- If necessary, turn the heating plates on. From left to right: 65°C, 95°C, 200°C
- If necessary, turn on the two hoods
- If necessary, turn on the computer immediately on the right after the door. Open the MJB4 log file
- For each layer, depending on the desired thickness, choose the adequate SU-8 x RPM (RPM=spin-coating speed) using the available SU-8 calibration curves → the higher the RPM, the more uniform the layer will be. It is then advised to choose the thickest SU-8 and the fastest RPM
- Check that you have a sufficient amount of each required SU-8 before starting the fabrication process. If not, ask the platform team
- For each layer, depending on the thickness, calculate the required Soft Bake (SB), exposure and Post-Exposure Bake (PEB) times. The SB and PEB time are indicated on the SU-8 calibration tables. The exposure time is calculated as $\Delta t_{exp} = \frac{E_{exp}}{P_{lamp}} \cdot 1.1$. E_{exp} is the exposure energy, indicated in the calibration tables and P_{lamp} is the lamp power, indicated on the log file. The 10% factor accounts for the attenuation caused by the quartz/soda lime layer, change it if you use a different material

Step 1

[Time required 20 minutes]

Spin-Coating

- Heat the blank wafer at 200°C for 20 minutes, to reduce the humidity. Adsorbed water on the wafer will alter SU-8 adherence. If the humidity level is above 60, postpone.
- Cool-down wafer 1 min then place it on the spin-coater.
- Launch the spin-coating recipe corresponding to the chosen RPM → **the process will not start until the vacuum is complete & the cover is closed, launching the recipe with the cover open allows to make sure the vacuum is good before pouring the SU-8.** If the vacuum is not correct, adjust the wafer position until it is. It is way easier to do this with a clean wafer than with a SU-8 covered one.
- Pour 4mL of SU-8 at the center of the wafer, try to cover the center-most half of the wafer. For very fluid SU-8s (<2015), use a pipette. For very viscous ones (2035 & 2075), storing the (closed) bottle horizontally helps pouring.
- Close the spin-coater cover. This will launch the process
- Wait until the wafer has completely stopped spinning before opening the cover

WARNINGS



MJB4

The MJB4 is fragile and prone to failure, especially the WEC sensor / adjustment dial. Be gentle.

EQUIPMENT

Photo-plotted or chrome mask

Blank silicon wafers

3h booking on the MJB4

3-channels timer

CHEMICALS

SU-8 20xx

PGMEA developer

2-propanol

DANGERS

Chemicals

Physical

Environmental



PROTECTIVE GEAR

Laboratory Coat

Gloves

Shoes Cover

Hat

Step 2

[Time required 10-60

minutes]

Soft Bake

- Heat the wafer at 65°C then 95°C following the previously calculated SB times. **For multi-layered, thick wafers, increase the 95°C SB time 2-3 fold.**

Step 3

[Time required 10 minutes]

Exposure

- If you are using a chrome mask, load it directly on the MJB4 using the vacuum frame
- If you are using a photoplotted mask, tape it on the blank quartz glass available in the top drawer on the right. Place the glass on the vacuum frame. The inked side of the mask must be in contact with the wafer. To find out which side is the inked one, scratch the surface. If the scratch is visible on both side, it is the inked side.
- Set the MJB4 to "Hard Contact" (hard contact time = 5 seconds), and set the calculated exposure time. (Set the MJB4 to 'Soft Contact" if the layer is $> 150\mu m$)
- Load the wafer on the MJB4.
- Set the WEC, following the guidelines provided on the MJB4 instruction sheet
- Expose

Step 4

[Time required 30 minutes]

Post-Exposure Bake

- Heat the wafer at 65°C then 95°C following the previously calculated PEB times

Step 5

[Time required 20 minutes]

Additional layers alignment (multi-layered wafers only)

- Repeat steps 1 and 2 to add additional layer on top of the baked wafer
- Load the additional layer mask on the MJB4
- Align the wafer with the mask, using the dedicated alignment targets. First align each of the microscope's objectives with the targets on the mask. Then remove the mask, load the wafer, move the wafer by hand to place the targets in the objectives field of view
- Load the mask, perform the WEC setting, then lower the wafer by 1-2 turns (if the wafer is not low enough, you will not be able to perform the alignment as it will stick to the mask)
- The targets on the mask and on the wafer should both be in the microscope's field of view. Using the MJB4 controls, finely align the targets.
- Set the height back to the value obtained after WEC setting. Check the targets are still aligned. If not, adjust it.
- Expose
- Repeat step 4

Step 6

[Time required 20 minutes]

Development and hard bake

- Immerse the wafer in PGMEA, on the agitator with a 120 RPM speed. Use just enough PGMEA to fully cover the wafer, any additional amount is useless.
- As soon as no uncured SU-8 is left on the wafer, remove it and rinse it, first with PGMEA then with 2-propanol. The calibrated development times are no use for multi-layered wafers

- Heat wafer for 2 min at 65°C, then 5 min at 95°C, then 5 min at 200°C. This step helps consolidating the SU-8 by briefly melting it, filing the cracks. The first two steps only help avoid heat shock. Do not leave the wafer at 200°C more than 10 min, as it might deform the patterns.

Step 7

[Time required 20 minutes]

Experiment log & setup cleaning

- Clean the spincoater thoroughly. Discard the aluminium sheet, and clean the chamber with PGMEA-soaked wipes.
- Log your parameters, the outcome and any remarks you have on the platform excel file
- If you are the last shift of the day, turn off the MJB4 following the procedure indicated on the information sheet (make sure there are no bookings after you, as the MJB4 takes 600s to cool down before restarting and shut off/on cycles shorten the UV lamp life)
- Turn off the hoods (these hoods are best left on but IPGG's facing neighbors complaints about the noise)

PDMS CHIP

IPGG grey room

Created by Paul Cochard-Marchewka (✉ paul.cochard-marchewka@espci.fr) on June 17, 2021

Last edit: January 28, 2022



Protocol purpose:

Manufacturing of PDMS chips for prototyping

PROTOCOL

Step 0

[Time required 1h minutes]

Mold silanization

- For better resolution and to avoid PDMS sticking to the mold, it is advised to silanize the mold before use. This is only done once
- **1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane** is in a blue bottle labeled "plateau" in the grey room fridge
- Activate the wafers by running the recipe 0 in the plasma oven
- During that time, place 1 petri dish in the vacuum chamber under the silanization hood. Open the valve at the beginning of the vacuum line. Close the other valve, the one closest to the chamber.
- Immediately after plasma, place the wafer in the petri dish. Place the provided reusable caps (2-3 max depending on the number of wafers) next to the wafer. Fill each cap with 20 μ L of **1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane**
- Close the vacuum chamber. Open the valve
- After 30 min, close the valve. If you can, let the wafer sit in the vacuum chamber for the night.
- *Although more efficient, 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane is too water sensitive to be used by vapor deposition*

Step 1

[Time required 10 minutes]

PDMS mixing

- **PDMS mixing is done in the PDMS area. Do not exit the area with liquid PDMS. If you spill uncured PDMS, ethanol is the preferred solvent to clean it**
- Weigh 45g of Sylgard PDMS and 4.5g of Sylgard curing agent (ratio 10:1) in a blue plastic dish. To make *hard PDMS*, weigh 40g of PDMS and 8g of curing agent (ratio 5:1). Sylgard is the preferred choice for PDMS-glass bonding. For PDMS-PDMS bonding, use RTV
- Mix thoroughly with a glass stick

Step 2

[Time required 30 minutes]

Air removal

- Fold a circular aluminium sheet around the wafer to create molding walls. Place the wafer in a Petri dish
- **PDMS can be centrifuged in Falcon tubes before pouring. It removes all trapped air bubbles, and helps prevent PDMS spilling in the vacuum chamber. It is an option if you want to be extra clean of if you are in a hurry, but keep in mind you will waste 1 falcon tube per 50mL of mix**
- Pour 45g of PDMS mix in each wafer
- Place the closed Petri dishes in the vacuum chambers. It is ok to stack them. Open the vacuum.

WARNINGS



Silane

Silane is highly corrosive, it can cause acute skin and lung damage. Wear protective gear and do not open the silane outside of the designated hood.

EQUIPMENT

Silicon wafer or NOA mold

Scalpel

Biopsy Punch

2 1mL syringe + 0.2 μ m filters

2mL eppendorf

Tubing

CUTE plasma oven (no need to book unless you need it)

1h booking of a PDMS area

2h booking of a laminated flux hood

1h booking of the silane hood

CHEMICALS

1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane

Sylgard PDMS

Sylgard curing agent

1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane

ethanol

2-propanol

DANGERS

Chemicals

Physical

Environmental



PROTECTIVE GEAR

Laboratory Coat

Gloves

Shoes Cover

- If you want to avoid PDMS spilling, you can either play with the vacuum (on-off-break, etc.) or use an air gun to softly remove surface air bubbles
- Close the valve, break the vacuum and remove the wafers once the air bubbles are gone (the problematic air bubbles are the one stuck to the wafer, on your design. Bubbles trapped above, in the PDMS volume, will disappear during curing. No need to wait for all air bubbles to be gone if you are in a hurry)
- If no other vacuum chambers are connected, turn off the pump. Running vacuum with all valves closed will damage the pump

Step 3
minutes]

[Time required 120

Curing

- Place the wafers in the 70°C oven for 2 hours at least
- If you can, leave the wafers in the oven for the night. It will help obtain hard PDMS

Step 4

[Time required 30 minutes]

Cutting, punching and cleaning

- Under a laminar flow hood, use a scalpel to cut your chips, and biopsy punches to create the inlets and outlets
- Be extra cautious with dust. Use scotch tape to remove dust on your designs before punching. After punching, spray 2-propanol on you design, dry it with an air gun, then tape your chips again.
- Clean glass slides with 2-propanol and scotch tape
- Place the chips and the slides in the 90°C oven for 10-20 min. This helps removing residual humidity which improves plasma bonding

Step 5

[Time required 20 minutes]

Plasma Bonding

- Place as many chips and slides as you can fit in the plasma oven, bonding side up
- Launch recipe 0
- Immediately after the recipe is done, bond the chips and slides together. Press with your fingers to eliminate air bubbles. If you have large designs (like 2D chambers), be careful not to cave the designs in by pressing too hard.
- Place the chips in the oven for at least 5 minutes before silanization

Step 6

[Time required 30 minutes]

Silanization

- Prepare a 2% solution of **1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane** in HFE 7500. Using a micro-pipette, mix 1960µL of HFE 7500 then 40µL of silane in a 2mL eppendorf.
1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane is highly sensitive to air. minimize air contact as much as possible
- Prepare 2 1mL syringes. Fill the first one with HFE 7100, and the second one with silane mix. Affix each syringe with a 0.2µL filter, a needle and tubing. **Mark one or both of the syringes to keep track of their content. Tag them with a marker or use a scalpel to cut the guard of one**
- Take one chip out of the oven. Fill each design with silane, then clear them with the nitrogen gun. Rinse each design with HFE 7100, then clear them again with nitrogen.
- Put the chip back in the oven. Repeat the procedure for each chip

PEGYLATED TRACERS

Inspired from Garting & Stradner 2019

Created by Paul Cochard-Marchewka ✉ paul.cochard-marchewka@espci.fr on June 17, 2021

Last edit January 28, 2022



Protocol purpose:

Covalent bonding of -PEG chains to latex beads to provide steric stabilization

PROTOCOL

Step 1

[Time required 1 day]

Tracers rinsing

Fluorescent tracers may be formulated with stabilizers and surfactant such as Tween 20 that can prevent -PEG grafting by shielding the -carboxylate groups. To maximize grafting efficiency, it is recommended to wash the tracers thoroughly.

- Place 0.5 mL of tracers suspension and 0.5 mL of mQ water in a 1.5 mL Eppendorf tube
- Centrifuge the sample at 5555 g for 60 min
- Remove the supernatant
- Resuspend the tracers in 1 mL mQ (0.5 mL if it is the last time you are performing this step)
- Repeat 5 times

Step 2

[Time required 2 days]

Tracers dialysis

- Place the 0.5 mL of particle suspension in a 100KDa dialysis membrane (at LCMD use a Float-A-Lyzer® or a Slide-A-Lyzer®). Refer to the device's instructions.
- Fill a 500 mL beaker with mQ water, and let the sample dialyse for 48h. Renew the mQ exchange every 1-2h (if possible, no need to change the buffer for overnight dialysis).

Step 3

[Time required 30 minutes]

MES buffer preparation

- Prepare 50 mL of 0.1M MES solution
- Prepare 20 mL of 0.1M NaOH solution
- Add 25 mL of MES solution in a beaker. Add NaOH solution mL by mL until the pH reaches 6.0 (usually 8-10 mL).
- Filter the buffer using a 0.2 µm syringe filter

Step 4

[Time required 10 minutes]

NaN₃ solution preparation

SODIUM AZIDE (NaN₃) IS AN ACUTE POISON: INGESTION, INHALATION OR DERMAL CONTACT WITH MINIMAL AMOUNTS CAN BE FATAL

Read SDS before manipulation.

Use disposable containers & discard after use.

- Prepare 50 mL of 0.02wt% NaN₃ solution
- Filter the solution using a 0.2 µm syringe filter

WARNINGS



Poison

Sodium Azide (NaN₃) is acutely poisonous. Use with maximum caution. EDC is highly poisonous. Use with caution.

EQUIPMENT

Centrifuge (D1.27)

pH-meter (D1.67)

µg-scale (D1.67)

100K dialysis membrane (E.103)

CHEMICALS

Polystyrene beads 2 wt% F8813, ThermoFisher

Amine-PEG 1220000-2, Rapp Polymere

MES-Hydrate M2933, Sigma-Aldrich

Sodium Hydroxide S8045, Sigma-Aldrich

EDC E7750, Sigma-Aldrich

Glycine G8898, Sigma-Aldrich

Sodium Azide S8032, Sigma-Aldrich

Sodium Chloride S9888, Sigma-Aldrich

Purified Water, Milli-Q grade

DANGERS

Chemicals

Physical

Environmental



PROTECTIVE GEAR

Laboratory Coat

Gloves

FFP2 mask

Step 5 [Time required 10 minutes]

PEG-NH₂ solution preparation

- PEG-NH₂ is stored in the -20°C freeze. Allow the polymer to reach room temperature before opening.
- Mix 100 mg of polymer in 1.5mL of mQ water
- Vortex the solution until dissolution
- Do not filter the solution

Step 6 [Time required 1 day]

PEG-crosslinking

- EDC is stored in the -20°C. Allow the container to reach room temperature before opening.
- Place 1.5 mL of PEG-NH₂ solution in a 5mL glass tube
- Add 100 µL of dialyzed particle suspension
- Wrap the tube in aluminium, as EDC is light sensitive.
- Add 10 mg of EDC to the glass tube
- Vortex to ensure proper mixing
- Place the tube on a rotary agitator at 20 RPM for 24h

Step 7 [Time required 20 minutes]

Glycine solution preparation

- Prepare 10 mL of 0.1M Glycine solution
- Filter the solution using a 0.2 µm syringe filter

Step 8 [Time required 2 hours]

EDC neutralization

- Add 1 mL of Glycine solution in the glass tube
- Vortex to ensure proper mixing
- Place the tube on a rotary agitator at 20 RPM for 2h

Step 9 [Time required 1 day]

Tracers rinsing

- Repeat step 1
- After the fifth and final wash, redisperse the particles in 100 µL of NaN₃ solution. Depending on the desired concentration, the volume can be adjusted.

Chapitre 3

Algorithme de Crocker-Grier

Une fois les positions des particules détectées pour chaque image du time-lapse, reste à construire les trajectoires individuelles.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser un algorithme de Crocker-Grier, qui est le standard en micro-rhéologie. La description de son fonctionnement a été publiée en 1996²⁴¹, et est résumée ci-dessous :

Considérons une image extraite du time-lapse, prise à un instant t et sur laquelle les positions de N traceurs ont été détectées.

Ces positions se présentent sous la forme d'une matrice de taille $N \times 2$ contenant les coordonnées en x et y des particules.

Considérons à présent l'image suivante, prise à l'instant $t + \Delta t$, sur laquelle N positions ont été détectées. Le rôle de l'algorithme de construction des trajectoires, c'est de faire correspondre à chacune des positions à l'instant t une position à l'instant $t + \Delta t$. En d'autres termes, l'algorithme attribue un identifiant unique à chacune des particules détectées et tente de la suivre au cours du time-lapse.

Les particules sont a priori identiques, et donc non identifiables par l'algorithme sur des critères de taille ou de couleur par exemple. Seule leur position peut être utilisée pour les discriminer, ainsi que deux hypothèses : le mouvement des particules est brownien, et les particules n'interagissent pas entre elles.

La probabilité $P(\delta|\Delta t)$ qu'une particule brownienne se déplace d'une distance δ dans le plan au cours d'un intervalle de temps Δt s'exprime selon :

$$P(\delta|\Delta t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\Delta t}} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\Delta t}\right) \quad (\text{VII.9})$$

D est le coefficient de diffusion brownienne de la particule.

Pour un ensemble de N particules, la distribution de probabilités s'exprime selon :

$$P(\delta_i|\Delta t) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi D\Delta t}}\right)^N \exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\Delta t}\right) \quad (\text{VII.10})$$

Une manière des trajectoires revient à maximiser la distribution de probabilités $P(\delta_i|\Delta t)$, ce qui revient à minimiser le terme $-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\Delta t}$, et donc à minimiser globalement la distance parcourue par l'ensemble des particules au cours d'un instant Δt .

Calculer ce terme pour toutes les combinaisons possibles résulterait en une complexité de $N!$, ce qui dépasserait rapidement les capacités de calcul disponibles.

On indique alors à l'algorithme une distance L maximale pour l'interpolation des trajectoires, ce qui revient à tronquer la distribution de probabilité en imposant la condition $\delta < L$.

Du fait de cette condition, le suivi des particules n'est envisageable que si le déplacement caractéristique δ_c au cours d'un instant Δt est inférieur à la distance interparticulaire caractéristique a_c . Pour optimiser le temps de calcul, il faut choisir un paramètre L tel que :

$$\delta_c < L < \frac{a_c}{2} \quad (\text{VII.11})$$

Ici encore, le rétrécissement de la goutte pose problème. Quelque soit l'estimateur choisi (cf partie IV, 3), la précision de l'estimation du coefficient de diffusion augmente avec le nombre de particules suivies. Dans une expérience de micro-rhéologie classique, on a intérêt à maximiser le nombre de particules, jusqu'à

atteindre la limite $\delta_c = \frac{a_c}{2}$. Intenable dans notre cas : à mesure que la goutte va rétrécir, la densité particulaire va augmenter, et donc la distance interparticulaire moyenne va diminuer. Le risque est donc d'avoir un nombre insuffisant de particules diffusant dans le plan équatorial aux faibles concentrations, lorsque le volume de la goutte est maximal, ou à l'inverse d'avoir des particules trop rapprochées aux volumes les plus faibles, empêchant l'algorithme d'identifier des trajectoires claires.

Chapitre 4

Influence de la taille des gouttes

Dans ce chapitre sont présentés l'estimation de l'influence théorique de l'interface de la goutte évoquée en partie V.

4.1 Effets de bord

Considérons une particule diffusant au sein de la goutte, dont la trajectoire ne rencontre pas l'interface. Même si elle ne subit pas de confinement directe, la diffusion de cette particule est affectée par la présence de l'interface, qui représente une discontinuité du milieu et de ses propriétés. L'influence de l'interface se traduit par une variation de la force de traînée subie par la sphère en mouvement. Pour une translation dans un milieu infini, homogène et isotrope, la force de traînée s'exprime selon la loi de Stokes, vue en (IV.2) et rappelée ci-dessous :

$$\vec{F} = -6\pi\eta r\vec{v} \quad (\text{VII.12})$$

Même pour les plus petites gouttes observables par notre système, la taille des traceurs est négligeable devant celle de la goutte. On peut ainsi faire l'hypothèse que la goutte ne subit l'influence que du bord de la goutte dont elle est le plus proche.

Par souci de simplicité on considère qu'à l'échelle des déplacements de la particule la courbure de l'interface est négligeable. On considère donc que le bord de la goutte est plan.

On considère que la particule diffuse dans le plan équatorial de la goutte, ou dans son voisinage immédiat (cf partie III, 1.3).

Pour une particule à une distance l de l'interface, un coefficient correctif Λ quantifie l'influence de l'interface²⁴². L'équation (VII.12) devient alors :

$$\vec{F} = 6\pi\eta r v \Lambda(\vec{l}) \quad (\text{VII.13})$$

La modification de la force de traînée ne sera pas la même selon que la particule se déplace perpendiculairement à l'interface ou tangentiellement. L'influence de l'interface est anisotrope, et par conséquent la diffusion de la particule le sera également.

On définit alors deux coefficients $\Lambda_{\parallel}(l)$ et $\Lambda_{\perp}(l)$ tels que :

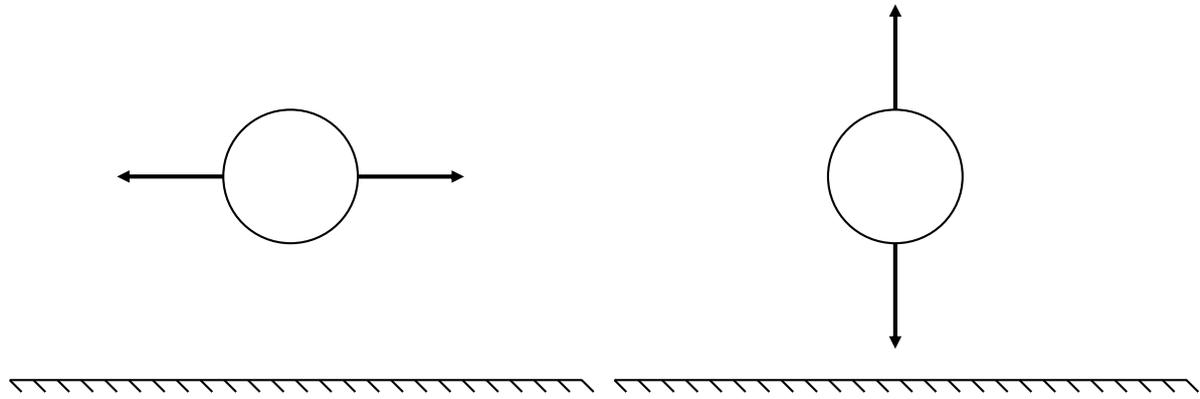
$$D_{\parallel}(l) = \frac{D_0}{\Lambda_{\parallel}(l)} \quad (\text{VII.14})$$

$$D_{\perp}(l) = \frac{D_0}{\Lambda_{\perp}(l)} \quad (\text{VII.15})$$

Avec D_{\parallel} et D_{\perp} les coefficients de diffusion dans les directions parallèles et perpendiculaires respectivement (cf figure 66).

Notre approche expérimentale consiste à calculer la viscosité à partir d'une estimation du coefficient de diffusion d'une ou plusieurs particules sur une ou plusieurs trajectoires.

Sans tenir compte des erreurs de localisation des particules (cf partie IV, 2), l'influence de l'interface va être source d'imprécisions sur la mesure de la viscosité. Nous faisons l'hypothèse d'une diffusion homogène et isotrope. La variation du coefficient de diffusion mesuré va ainsi entraîner une variation inverse de la



(a) Diffusion parallèle à l'interface

(b) Diffusion perpendiculaire à l'interface

FIG. 66 – Directions de diffusion pour une particule au voisinage de l'interface

viscosité mesuré.

On pourrait imaginer appliquer un correctif permettant de tenir compte de la présence de l'interface, mais cela nécessiterait de connaître avec précision la direction du déplacement de la particule et sa distance à l'interface à chaque instant, ce qui revient à connaître la position exacte du bord de la goutte à chaque instant.

L'influence de l'interface, et donc les coefficients définis en VII.14 et (VII.15), dépendent de la nature de l'interface, notamment du rapport des viscosités entre les deux fluides qu'elle sépare. On définit :

$$\lambda = \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (\text{VII.16})$$

η_1 est la viscosité du fluide dans lequel la diffusion a lieu, dans notre cas la phase dispersée, et η_2 est la viscosité du fluide composant l'interface, dans notre cas la phase continue.

Dans le cas général, les expressions approchées des coefficients $\Lambda_{\parallel}(l)$ et $\Lambda_{\perp}(l)$ en fonction de λ permettent d'évaluer l'influence de l'interface sur la diffusion particulaire selon²⁴³ :

$$\Lambda_{\parallel}(l) = 1 - \left(\frac{3}{16} \frac{2 - 3\lambda}{1 + \lambda} \right) \frac{r}{l} + \left(\frac{3}{16} \frac{2 - 3\lambda}{1 + \lambda} \right)^2 \frac{r^2}{l^2} + O\left(\frac{r^3}{l^3}\right) \quad (\text{VII.17})$$

$$\Lambda_{\perp}(l) = 1 + \left(\frac{3}{8} \frac{2 + 3\lambda}{1 + \lambda} \right) \frac{r}{l} + \left(\frac{3}{8} \frac{2 + 3\lambda}{1 + \lambda} \right)^2 \frac{r^2}{l^2} + O\left(\frac{r^3}{l^3}\right) \quad (\text{VII.18})$$

Rigidité de l'interface

Pour le calcul des coefficients de traînées, nous avons traité deux cas de figures correspondant à deux valeurs de λ :

- $\lambda \approx 1.4$, ce qui correspond au ratio des viscosités pour une phase dispersée d'eau pure et une phase continue de Novec 7500, à 25°C
- $\lambda = \infty$, ce qui correspond au cas d'une interface solide. En effet l'interface de la goutte n'est pas uniquement constituée fluides purs : elle est recouverte d'un assemblage compact de molécules surfactant, qui la rigidifie^{244,245}. Ne pouvant quantifier cet effet avec exactitude, nous avons choisi de considérer le cas limite d'une interface solide.

On constate que l'impact de l'interface est plus important pour une diffusion normale que pour une diffusion tangentielle (figure 67). Pour la diffusion normale, on remarque également que la valeur de λ a

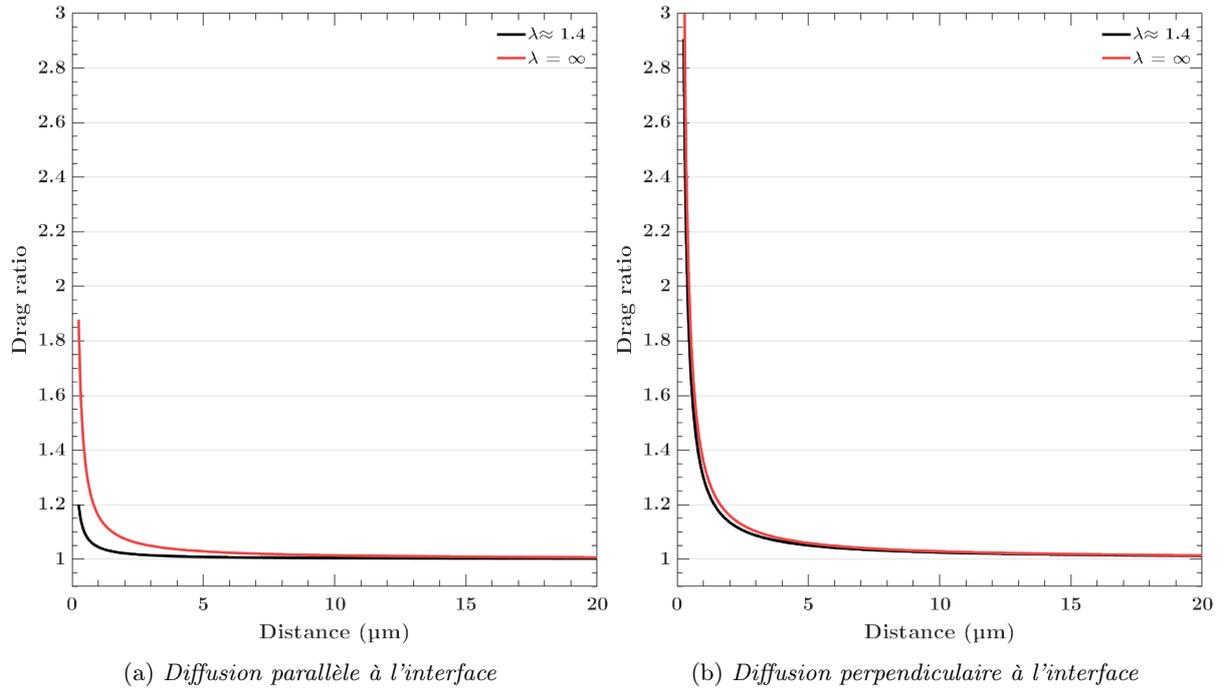


FIG. 67 – Coefficient de traînée pour une particule diffusant au voisinage de l'interface

peu d'influence sur la valeur de Λ_{\perp} (figure 67b).

On peut s'interroger sur la distance relativement importante jusqu'à laquelle l'interface a une influence non négligeable sur les mouvements de la particule. Cette particularité est liée au caractère laminaire de l'écoulement.

En se déplaçant dans le fluide, la particule perturbe son écoulement. Cette perturbation c'est la traînée de la particule. A cette traînée correspond une certaine quantité de mouvement, proportionnelle à la force de traînée s'exerçant sur la particule.

Dans le cas d'un écoulement laminaire, la diffusion est le seul phénomène permettant de transporter cette quantité de mouvement loin de la particule. Du fait de sa moindre efficacité, le champ de vitesse de la traînée décroît en $1/r$, avec r la distance par rapport à la particule, contre $1/r^3$ dans le cas d'un écoulement turbulent²⁴⁶.

Cette décroissance en $1/r$ explique la portée relativement longue de l'influence de l'interface sur la diffusion de la particule.

Il est difficile d'estimer numériquement l'influence de l'interface de la goutte sur la viscosité mesurée. Nous avons vu que cette influence dépend de la position de la particule et de la direction de son mouvement.

Pour une estimation rudimentaire de l'erreur, nous avons envisagé de considérer qu'en tout point de la goutte et quelle que soit sa direction, la diffusion de la particule était impactée par un facteur Λ_{\perp} .

En supposant une répartition homogène des particules sur le plan équatorial, on peut alors faire l'approximation suivante :

$$\widehat{D} = \langle \Lambda \rangle \langle D \rangle \quad (\text{VII.19})$$

\widehat{D} est la valeur mesurée du coefficient de diffusion, et $\langle D \rangle$ est sa valeur moyenne. Cette relation ne tient pas compte des erreurs discutées en partie IV au chapitre 3.3.

Le coefficient $\langle \Lambda \rangle$ est la valeur moyenne du coefficient de traînée sur le plan équatorial, défini par :

$$\begin{aligned} \langle \Lambda \rangle &= \int_0^R \int_0^{2\pi} \Lambda_{\perp}(l) dl d\theta \\ &= 2\pi \int_0^R \Lambda_{\perp}(l) dl \end{aligned} \quad (\text{VII.20})$$

En calculant numériquement la valeur de Λ_{perp} pour différentes valeurs de R , on peut estimer l'erreur maximale sur le coefficient de diffusion.

Dans nos conditions expérimentales, la relation (VII.20) donne une valeur $\Lambda_{perp} \geq 1.05$ pour des rayons $R \geq 35 \mu\text{m}$.
Ainsi, l'erreur sur la viscosité atteindrait les 5% pour des diamètres de goutte inférieurs à 70 μm .

Chapitre 5

Viscosités tabulées

5.1 Viscosité de l'eau

Température (°C)	Viscosité (mPa.s)
20	1.0016
21	0.9775
22	0.9544
23	0.9321
24	0.9107
25	0.89
26	0.8701
27	0.8509
28	0.8324
29	0.8145
30	0.7972

TAB. 13 – Viscosité dynamique de l'eau en fonction de la température. (Source : IAPWS²⁴⁷ (International Association for the Properties of Water and Steam))

5.2 Viscosité du sucre

Fraction massique (%)	Viscosité dynamique (mPa.s)	Fraction massique (%)	Viscosité dynamique (mPa.s)
20	1.695	48	10.15
21	1.769	49	11.2
22	1.846	50	12.4
23	1.931	51	13.78
24	2.021	52	15.37
25	2.118	53	17.23
26	2.223	54	19.39
27	2.336	55	21.93
28	2.459	56	24.92
29	2.592	57	28.48
30	2.735	58	32.73
31	2.892	59	37.83
32	3.062	60	40.03
33	3.246	61	51.6
34	3.448	62	60.92
35	3.67	63	72.49
36	3.914	64	87
37	4.182	65	105.4
38	4.476	66	128.8
39	4.803	67	159.1
40	5.164	68	198.7
41	5.565	69	251.1
42	6.014	70	321.6
43	6.515	71	417.8
44	7.077	72	551
45	7.71	73	738.9
46	8.423	74	1009
47	9.231	75	1405

TAB. 14 – Viscosité dynamique du sucrose en fonction de la fraction massique. (Source : J. F. Swindells et al²⁰⁶)

Bibliographie

- [1] J. E. Garrod and T. M. Herrington, *The Journal of Physical Chemistry*, 1970, **74**, 363–370.
- [2] A. F. Fucaloro, Y. Pu, K. Cha, A. Williams and K. Conrad, *Journal of Solution Chemistry*, 2007, **36**, 61–80.
- [3] D. Goodsell, *RCSB Protein Data Bank*, 2011.
- [4] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, NY, Sixth edition edn., 2015.
- [5] E. A. Padlan, *Molecular Immunology*, 1994, **31**, 169–217.
- [6] K. Murphy and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology*, Garland Science, Ninth edn., 2016.
- [7] D. Arzenšek, D. Kuzman and R. Podgornik, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, **384**, 207–216.
- [8] S. Yadav, S. J. Shire and D. S. Kalonia, *Pharmaceutical Research*, 2011, **28**, 1973–1983.
- [9] R. J. Ellis, *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 6.
- [10] J. A. Dix and A. Verkman, *Annual Review of Biophysics*, 2008, **37**, 247–263.
- [11] Y. Y. Kuttner, N. Kozler, E. Segal, G. Schreiber and G. Haran, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 15138–15144.
- [12] G. Schreiber, G. Haran and H.-X. Zhou, *Chemical Reviews*, 2009, **109**, 839–860.
- [13] A. Zotter, F. Bäuerle, D. Dey, V. Kiss and G. Schreiber, *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**, 15838–15848.
- [14] D. Tsiapalis and D. I. Zeugolis, *Biomaterials*, 2021, **275**, 120943.
- [15] D. A. Jackson, R. H. Symons and P. Berg, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1972, **69**, 2904–2909.
- [16] M. Eisenstein, *Nature Biotechnology*, 2020, **38**, 1113–1115.
- [17] S. Wright, *Osiris*, 1986, **2**, 303–360.
- [18] I. S. Johnson, *Science*, 1983, **219**, 632–637.
- [19] J. Yun, S.-H. Lee, S.-Y. Kim, S.-Y. Jeong, J.-H. Kim, K.-H. Pyo, C.-W. Park, S. G. Heo, M. R. Yun, S. Lim, S. M. Lim, M. H. Hong, H. R. Kim, M. Thayu, J. C. Curtin, R. E. Knoblauch, M. V. Lorenzi, A. Roshak and B. C. Cho, *Cancer Discovery*, 2020, CD-20-0116.
- [20] R. Linke, A. Klein and D. Seimetz, *mAbs*, 2010, **2**, 129–136.
- [21] S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I. E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D.-Y. Oh, V. Diéras, E. Guardino, L. Fang, M. W. Lu, S. Olsen and K. Blackwell, *New England Journal of Medicine*, 2012, **367**, 1783–1791.
- [22] X.-z. Wang, V. W. Coljee and J. A. Maynard, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2013, **2**, 405–415.
- [23] R. I. Aminov, *Frontiers in Microbiology*, 2010, **1**, year.
- [24] D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes and D. L. Pompliano, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, **6**, 29–40.
- [25] N. M. Kudoyarova-Zubavichene, N. N. Sergeev, A. A. Chepurinov and S. V. Netesov, *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, **179**, S218–S223.
- [26] D. Montelongo-Jauregui, T. Vila, A. S. Sultan and M. A. Jabra-Rizk, *PLOS Pathogens*, 2020, **16**, e1008735.
- [27] G. Köhler and C. Milstein, *Nature*, 1975, **256**, 495–497.
- [28] P. Mayrhofer and R. Kunert, *Human Antibodies*, 2019, **27**, 37–51.
- [29] A. L. Nelson, E. Dhimolea and J. M. Reichert, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, **9**, 767–774.
- [30] F. A. Harding, M. M. Stickler, J. Razo and R. DuBridge, *mAbs*, 2010, **2**, 256–265.

- [31] M. Brüggemann, C. Spicer, L. Buluwela, I. Rosewell, S. Barton, M. A. Surani and T. H. Rabbitts, *European Journal of Immunology*, 1991, **21**, 1323–1326.
- [32] G. Smith, *Science*, 1985, **228**, 1315–1317.
- [33] A. Frenzel, T. Schirrmann and M. Hust, *mAbs*, 2016, **8**, 1177–1194.
- [34] A. Pedrioli and A. Oxenius, *Trends in Immunology*, 2021, **42**, 1143–1158.
- [35] A. Gupta, Y. Gonzalez-Rojas, E. Juarez, M. Crespo Casal, J. Moya, D. R. Falci, E. Sarkis, J. Solis, H. Zheng, N. Scott, A. L. Cathcart, C. M. Hebner, J. Sager, E. Mogalian, C. Tipple, A. Peppercorn, E. Alexander, P. S. Pang, A. Free, C. Brinson, M. Aldinger and A. E. Shapiro, *New England Journal of Medicine*, 2021, **385**, 1941–1950.
- [36] M. Zhao, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, **55**, 105982.
- [37] S. Loganathan, S. N. Athalye and S. R. Joshi, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2020, **20**, 1025–1031.
- [38] B. Reipert, *The Journal of Men's Health & Gender*, 2004, **1**, 334–340.
- [39] K. Almutairi, J. Nossent, D. Preen, H. Keen and C. Inderjeeth, *Rheumatology international*, 2021, **41**, 863–877.
- [40] E. Sagonowsky, *The Top 20 Drugs by Worldwide Sales in 2020*, <https://www.fiercepharma.com/special-report/top-20-drugs-by-2020-sales>, 2021.
- [41] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton, *New England Journal of Medicine*, 2001, **344**, 783–792.
- [42] G. L. Beatty and W. L. Gladney, *Clinical Cancer Research*, 2015, **21**, 687–692.
- [43] L. Khoja, M. O. Butler, S. P. Kang, S. Ebbinghaus and A. M. Joshua, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2015, **3**, 36.
- [44] S. Bai, K. Jorga, Y. Xin, D. Jin, Y. Zheng, L. A. Damico-Beyer, M. Gupta, M. Tang, D. E. Allison, D. Lu, Y. Zhang, A. Joshi and M. J. Dresser, *Clinical Pharmacokinetics*, 2012, **51**, 119–135.
- [45] J. R. Birch and A. J. Racher, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58**, 671–685.
- [46] E. K. Tetteh and S. Morris, *Health Economics Review*, 2014, **4**, 26.
- [47] A. Kivitz and O. G. Segurado, *Expert Review of Medical Devices*, 2007, **4**, 109–116.
- [48] C. Wynne, V. Harvey, C. Schwabe, D. Waaka, C. McIntyre and B. Bittner, *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, **53**, 192–201.
- [49] E. Besada, *Patient Preference and Adherence*, 2014, 1051.
- [50] A. Allmendinger, S. Fischer, J. Huwyler, H.-C. Mahler, E. Schwarb, I. E. Zarraga and R. Mueller, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, **87**, 318–328.
- [51] C. Duchêne, V. Filipe, S. Huille and A. Lindner, *Soft Matter*, 2020, **16**, 921–928.
- [52] S. Yadav, J. Liu, S. J. Shire and D. S. Kalonia, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **99**, 1152–1168.
- [53] J. Liu, M. D. Nguyen, J. D. Andya and S. J. Shire, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, **94**, 1928–1940.
- [54] B. D. Connolly, C. Petry, S. Yadav, B. Demeule, N. Ciaccio, J. M. R. Moore, S. J. Shire and Y. R. Gokarn, *Biophysical Journal*, 2012, **103**, 69–78.
- [55] S. Yadav, A. Sreedhara, S. Kanai, J. Liu, S. Lien, H. Lowman, D. S. Kalonia and S. J. Shire, *Pharmaceutical Research*, 2011, **28**, 1750–1764.
- [56] S. Yadav, T. M. Laue, D. S. Kalonia, S. N. Singh and S. J. Shire, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **12**.
- [57] V. Kayser, N. Chennamsetty, V. Voynov, K. Forrer, B. Helk and B. L. Trout, *Biotechnology Journal*, 2011, **6**, 38–44.
- [58] C. J. Roberts, *Trends in Biotechnology*, 2014, **32**, 372–380.
- [59] M. Vázquez-Rey and D. A. Lang, *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, **108**, 1494–1508.
- [60] A. A. Shukla and J. Thömmes, *Trends in Biotechnology*, 2010, **28**, 253–261.
- [61] M. Zidar, D. Kuzman and M. Ravnik, *Soft Matter*, 2018, **14**, 6001–6012.
- [62] A. S. Rosenberg, *The AAPS Journal*, 2006, **8**, E501–E507.
- [63] M. K. Joubert, M. Hokom, C. Eakin, L. Zhou, M. Deshpande, M. P. Baker, T. J. Goletz, B. A. Kerwin, N. Chirmule, L. O. Narhi and V. Jawa, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**, 25266–25279.
- [64] S. Kumar, S. K. Singh, X. Wang, B. Rup and D. Gill, *Pharmaceutical Research*, 2011, **28**, 949–961.

- [65] B. Demeule, R. Gurny and T. Arvinte, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, **62**, 121–130.
- [66] *Immune Aspects of Biopharmaceutics and Nanomedicines*, ed. R. Bawa, J. Szebeni, T. J. Webster and G. F. Audette, Jenny Stanford, 1st edn., 2019, pp. 537–583.
- [67] T. Hong, K. Iwashita and K. Shiraki, *Current Protein & Peptide Science*, 2018, **19**, 746–758.
- [68] P. Kolhe, E. Amend and S. K. Singh, *Biotechnology Progress*, 2010, **26**, 727–733.
- [69] T. W. Patapoff and O. Esue, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2009, **14**, 659–664.
- [70] R. M. Fesinmeyer, S. Hogan, A. Saluja, S. R. Brych, E. Kras, L. O. Narhi, D. N. Brems and Y. R. Gokarn, *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**, 903–913.
- [71] W. Wang, A. A. Ignatius and S. V. Thakkar, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, **103**, 1315–1330.
- [72] F. He, C. E. Woods, E. Trilisky, K. M. Bower, J. R. Litowski, B. A. Kerwin, G. W. Becker, L. O. Narhi and V. I. Razinkov, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, **100**, 1330–1340.
- [73] C. C. Lee, J. M. Perchiacca and P. M. Tessier, *Trends in Biotechnology*, 2013, **31**, 612–620.
- [74] X. Wang, S. K. Singh and S. Kumar, *Pharmaceutical Research*, 2010, **27**, 1512–1529.
- [75] T. M. Lauer, N. J. Agrawal, N. Chennamsetty, K. Egodage, B. Helk and B. L. Trout, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, **101**, 102–115.
- [76] P. S. Sarangapani, S. D. Hudson, R. L. Jones, J. F. Douglas and J. A. Pathak, *Biophysical Journal*, 2015, **108**, 724–737.
- [77] A. Stradner and P. Schurtenberger, *Soft Matter*, 2020, **16**, 307–323.
- [78] M. Zidar, P. Rozman, K. Belko-Parkel and M. Ravnik, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, **580**, 308–317.
- [79] S. J. Shire, *Monoclonal Antibodies: Meeting the Challenges in Manufacturing, Formulation, Delivery and Stability of Final Drug Product*, 2015.
- [80] B. Bittner, W. Richter and J. Schmidt, *BioDrugs*, 2018, **32**, 425–440.
- [81] S. J. Shire, Z. Shahrokh and J. Liu, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **93**, 1390–1402.
- [82] V. Burckbuchler, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, **6**.
- [83] W. Wang, S. Singh, D. L. Zeng, K. King and S. Nema, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, **96**, 1–26.
- [84] A. Saluja and D. S. Kalonia, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **358**, 1–15.
- [85] F. He, C. E. Woods, J. R. Litowski, L. A. Roschen, H. S. Gadgil, V. I. Razinkov and B. A. Kerwin, *Pharmaceutical Research*, 2011, **28**, 1552–1560.
- [86] S. K. Singh, P. Kolhe, A. P. Mehta, S. C. Chico, A. L. Lary and M. Huang, *Pharmaceutical Research*, 2011, **28**, 873–885.
- [87] V. Joshi, T. Shivach, V. Kumar, N. Yadav and A. Rathore, *Biotechnology Journal*, 2014, **9**, 1195–1205.
- [88] J. H. Chon and G. Zarbis-Papastoitsis, *New Biotechnology*, 2011, **28**, 458–463.
- [89] J. K. H. Liu, *Annals of Medicine and Surgery*, 2014, **3**, 113–116.
- [90] M. S. Hong, K. A. Severson, M. Jiang, A. E. Lu, J. C. Love and R. D. Braatz, *Computers & Chemical Engineering*, 2018, **110**, 106–114.
- [91] A. M. Fathallah, R. B. Bankert and S. V. Balu-Iyer, *The AAPS Journal*, 2013, **15**, 897–900.
- [92] A. M. Fathallah, M. Chiang, A. Mishra, S. Kumar, L. Xue, C. Russell Middaugh and S. V. Balu-Iyer, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, **104**, 3691–3702.
- [93] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr and D. Braun, *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**, 2238–2241.
- [94] S. A. I. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun and P. Baaske, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 10656–10659.
- [95] C. Wang, X. Zhong, D. B. Ruffner, A. Stutt, L. A. Philips, M. D. Ward and D. G. Grier, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, **105**, 1074–1085.
- [96] P. N. Kasimbeg, F. C. Cheong, D. B. Ruffner, J. M. Blusewicz and L. A. Philips, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, **108**, 155–161.
- [97] M. Heinen, F. Zanini, F. Roosen-Runge, D. Fedunová, F. Zhang, M. Hennig, T. Seydel, R. Schweins, M. Sztucki, M. Antalík, F. Schreiber and G. Nägele, *Soft Matter*, 2012, **8**, 1404–1419.
- [98] A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf and P. Schurtenberger, *Nature*, 2004, **432**, 492–495.

- [99] F. Cardinaux, E. Zaccarelli, A. Stradner, S. Bucciarelli, B. Farago, S. U. Egelhaaf, F. Sciortino and P. Schurtenberger, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, **115**, 7227–7237.
- [100] G. Foffi, G. Savin, S. Bucciarelli, N. Dorsaz, G. M. Thurston, A. Stradner and P. Schurtenberger, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**, 16748–16753.
- [101] S. D. Hudson, P. Sarangapani, J. A. Pathak and K. B. Migler, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, **104**, 678–685.
- [102] W. Cheng, S. B. Joshi, N. K. Jain, F. He, B. A. Kerwin, D. B. Volkin and C. Russell Middaugh, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, **102**, 4291–4304.
- [103] G. V. Barnett, W. Qi, S. Amin, E. Neil Lewis and C. J. Roberts, *Biophysical Chemistry*, 2015, **207**, 21–29.
- [104] M. S. Patel, Y.-K. Yong and M. Tanaka, *International Journal of Solids and Structures*, 2009, **46**, 1856–1871.
- [105] J. A. Pathak, R. R. Sologuren and R. Narwal, *Biophysical Journal*, 2013, **104**, 913–923.
- [106] F. He, D. H. Phan, S. Hogan, R. Bailey, G. W. Becker, L. O. Narhi and V. I. Razinkov, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **99**, 2598–2608.
- [107] B. Lonetti, E. Fratini, S. H. Chen and P. Baglioni, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 1388–1395.
- [108] L. L. Josephson, W. J. Galush and E. M. Furst, *Biomicrofluidics*, 2016, **10**, 043503.
- [109] M. Gardel, M. Valentine and D. Weitz, in *Microscale Diagnostic Techniques*, ed. K. S. Breuer, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 1–49.
- [110] T. G. Mason and D. A. Weitz, *Physical Review Letters*, 1995, **74**, 1250–1253.
- [111] T. G. Mason, K. Ganesan, J. H. van Zanten, D. Wirtz and S. C. Kuo, *Physical Review Letters*, 1997, **79**, 3282–3285.
- [112] B. Abécassis, C. Cottin-Bizonne, C. Ybert, A. Ajdari and L. Bocquet, *New Journal of Physics*, 2009, **11**, 075022.
- [113] P. Bacchin, J. Leng and J.-B. Salmon, *Chemical Reviews*, 2022, **122**, 6938–6985.
- [114] H. P. Le, *Progress and Trends in Ink-jet Printing Technology*, IS&T edn., 1999, vol. II.
- [115] S. Terry, J. Jerman and J. Angell, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1979, **26**, 1880–1886.
- [116] Y. Xia and G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition*, 1998, **37**, 550–575.
- [117] G. Velve-Casquillas, M. Le Berre, M. Piel and P. T. Tran, *Nano today*, 2010, **5**, 28–47.
- [118] A. K. Au, H. Lai, B. R. Utela and A. Folch, *Micromachines*, 2011, **2**, 179–220.
- [119] J. Zilz, R. J. Poole, M. A. Alves, D. Bartolo, B. Levaché and A. Lindner, *Journal of Fluid Mechanics*, 2012, **712**, 203–218.
- [120] C. Cottin-Bizonne, S. Jurine, J. Baudry, J. Crassous, F. Restagno and Charlaix, *The European Physical Journal E*, 2002, **9**, 47–53.
- [121] C. Cottin-Bizonne and R. Ferrigno, in *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*, ed. A. Elaissari, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2008, pp. 199–222.
- [122] E. Crestel, L. Derzsi, H. Bartolomei, J. Bibette and N. Bremond, *Physical Review Fluids*, 2019, **4**, 073602.
- [123] M. A. Quail, H. Swerdlow and D. J. Turner, *Current Protocols in Human Genetics*, 2009, **62**, year.
- [124] S. L. Anna, N. Bontoux and H. A. Stone, *Applied Physics Letters*, 2003, **82**, 364–366.
- [125] K. Eyer, R. C. L. Doineau, C. E. Castrillon, L. Briseño-Roa, V. Menrath, G. Mottet, P. England, A. Godina, E. Brient-Litzler, C. Nizak, A. Jensen, A. D. Griffiths, J. Bibette, P. Bruhns and J. Baudry, *Nature Biotechnology*, 2017, **35**, 977–982.
- [126] A. M. Klein, L. Mazutis, I. Akartuna, N. Tallapragada, A. Veres, V. Li, L. Peshkin, D. A. Weitz and M. W. Kirschner, *Cell*, 2015, **161**, 1187–1201.
- [127] K. Matuła, F. Rivello and W. T. S. Huck, *Advanced Biosystems*, 2020, **4**, 1900188.
- [128] A. Gérard, A. Woolfe, G. Mottet, M. Reichen, C. Castrillon, V. Menrath, S. Ellouze, A. Poitou, R. Doineau, L. Brisenro-Roa, P. Canales-Herrerias, P. Mary, G. Rose, C. Ortega, M. Delincé, S. Essono, B. Jia, B. Iannascoli, O. Richard-Le Goff, R. Kumar, S. N. Stewart, Y. Pousse, B. Shen, K. Grosselin, B. Saudemont, A. Sautel-Caillé, A. Godina, S. McNamara, K. Eyer, G. A. Millot, J. Baudry, P. England, C. Nizak, A. Jensen, A. D. Griffiths, P. Bruhns and C. Brenan, *Nature Biotechnology*, 2020, **38**, 715–721.
- [129] N. Bremond, A. R. Thiam and J. Bibette, *Physical Review Letters*, 2008, **100**, 024501.
- [130] L. Boitard, D. Cottinet, C. Kleinschmitt, N. Bremond, J. Baudry, G. Yvert and J. Bibette, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**, 7181–7186.

- [131] J. Watson and M. Baron, *Journal of Membrane Science*, 1996, **110**, 47–57.
- [132] E. Verneuil, A. Buguin and P. Silberzan, *Europhysics Letters (EPL)*, 2004, **68**, 412–418.
- [133] G. C. Randall and P. S. Doyle, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, **102**, 10813–10818.
- [134] C. Loussert, A. Bouchaudy and J.-B. Salmon, *Physical Review Fluids*, 2016, **1**, 084201.
- [135] C. L. Hansen, S. Classen, J. M. Berger and S. R. Quake, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 3142–3143.
- [136] J.-u. Shim, G. Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, Y. Jia, K. Piattelli and S. Fraden, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 8825–8835.
- [137] S. Morais, G. Clisson, T. F. Mastropietro, M. L. Briuglia, J. H. ter Horst, J. Leng and J.-B. Salmon, *Crystal Growth & Design*, 2021, **21**, 3469–3476.
- [138] M. R. G. Kopp, M. Linsenmeier, B. Hettich, S. Prantl, S. Stavarakis, J.-C. Leroux and P. Arosio, *Analytical Chemistry*, 2020, **92**, 5803–5812.
- [139] D. Yang, M. Daviran, K. M. Schultz and L. M. Walker, *Pharmaceutical Research*, 2021, **38**, 1765–1775.
- [140] V. Studer, G. Hang, A. Pandolfi, M. Ortiz, W. French Anderson and S. R. Quake, *Journal of Applied Physics*, 2004, **95**, 393–398.
- [141] J. Liu, C. Hansen and S. R. Quake, *Analytical Chemistry*, 2003, **75**, 4718–4723.
- [142] A. R. Wu, J. B. Hiatt, R. Lu, J. L. Attema, N. A. Lobo, I. L. Weissman, M. F. Clarke and S. R. Quake, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 1365.
- [143] Z. Zhang and Y. Liu, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2017, **16**, 48–55.
- [144] L. L. Josephson, E. M. Furst and W. J. Galush, *Journal of Rheology*, 2016, **60**, 531–540.
- [145] L. Shang, Y. Cheng and Y. Zhao, *Chemical Reviews*, 2017, **117**, 7964–8040.
- [146] G. F. Christopher and S. L. Anna, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2007, **40**, R319–R336.
- [147] K. Langer, N. Bremond, L. Boitard, J. Baudry and J. Bibette, *Biomicrofluidics*, 2018, **12**, 044106.
- [148] S. Sugiura, M. Nakajima, S. Iwamoto and M. Seki, *Langmuir*, 2001, **17**, 5562–5566.
- [149] S. Sugiura, M. Nakajima, N. Kumazawa, S. Iwamoto and M. Seki, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**, 9405–9409.
- [150] N. Mittal, C. Cohen, J. Bibette and N. Bremond, *Physics of Fluids*, 2014, **26**, 082109.
- [151] I. Kobayashi, Y. Wada, K. Uemura and M. Nakajima, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2010, **8**, 255–262.
- [152] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press, Oxford ; New York, 2008.
- [153] A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. deMello, C. Abell and F. Hollfelder, *Lab Chip*, 2009, **9**, 692–698.
- [154] H. L. Frisch and S. A. Stern, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 1983, **11**, 123–187.
- [155] J. M. Watson, G. S. Zhang and P. A. Payne, *Journal of Membrane Science*, 1992, **73**, 55–71.
- [156] J. Watson and M. Baron, *Journal of Membrane Science*, 1995, **106**, 259–268.
- [157] J. Wijmans and R. Baker, *Journal of Membrane Science*, 1995, **107**, 1–21.
- [158] J. de Jong, R. G. H. Lammertink and M. Wessling, *Lab on a Chip*, 2006, **6**, 1125.
- [159] A. Mata, A. J. Fleischman and S. Roy, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2006, **16**, 276–284.
- [160] M. H. Rausch, L. Kretschmer, S. Will, A. Leipertz and A. P. Fröba, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2015, **60**, 3759–3765.
- [161] 3M, *3M™ Novac™ 7500 Engineered Fluid Technical Data Sheet*, 2009.
- [162] P. Gruner, B. Riechers, B. Semin, J. Lim, A. Johnston, K. Short and J.-C. Baret, *Nature Communications*, 2016, **7**, 10392.
- [163] S. Zholob, A. Makievski, R. Miller and V. Fainerman, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2007, **134–135**, 322–329.
- [164] P. V. C. Hough, *Proceedings of the International Conference on High Energy Accelerators and Instrumentation*, 1959, 5.
- [165] T. Atherton and D. Kerbyson, *Image and Vision Computing*, 1999, **17**, 795–803.
- [166] N. Otsu, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, **9**, 62–66.

- [167] F. Gómez, R. Dutra, L. Pires, G. R. d. S. Araújo, B. Pontes, P. M. Neto, H. Nussenzveig and N. Viana, *Physical Review Applied*, 2021, **15**, 064012.
- [168] F. A. Merchant and K. R. Castleman, in *The Essential Guide to Image Processing*, ed. A. Bovik, Academic Press, Boston, 2009, pp. 777–831.
- [169] S. Pertuz, D. Puig and M. A. Garcia, *Pattern Recognition*, 2013, **46**, 1415–1432.
- [170] L. Firestone, K. Cook, K. Culp, N. Talsania and K. Preston Jr., *Cytometry*, 1991, **12**, 195–206.
- [171] W. Böcker, W. Rolf, W.-U. Müller and C. Streffer, *Physics in Medicine and Biology*, 1997, **42**, 1981–1992.
- [172] S. Pertuz, *Focus Measure*, 2021.
- [173] H. Photonics, 2016, 55.
- [174] *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, ed. H.-J. Hinz, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1986.
- [175] D. Yang, J. J. Correia, W. F. Stafford III, C. J. Roberts, S. Singh, D. Hayes, R. Kroe-Barrett, A. Nixon and T. M. Laue, *Protein Science*, 2018, **27**, 1334–1348.
- [176] J. F. Carpenter and M. C. Manning, *Rational Design of Stable Protein Formulations Theory and Practice*, 2002.
- [177] A. Einstein, *Annalen der Physik*, 1905, **322**, 549–560.
- [178] J. Perrin, *Les Atomes / Par Jean Perrin,...*, 1913, vol. Source: gallica.bnf.fr / Bibliothèque Nationale de France.
- [179] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology and Physics*, Dover Publications, Inc., 2013.
- [180] F. Cardinaux, L. Cipelletti, F. Scheffold and P. Schurtenberger, *Europhysics Letters (EPL)*, 2002, **57**, 738–744.
- [181] P. A. Hassan, K. Bhattacharya, S. K. Kulshreshtha and S. R. Raghavan, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, **109**, 8744–8748.
- [182] R. Gupta, R. Mitishita, I. A. Frigaard and G. J. Elfring, *Journal of Rheology*, 2021, **65**, 1065–1080.
- [183] P. A. Hassan, S. Rana and G. Verma, *Langmuir*, 2015, **31**, 3–12.
- [184] Y. Tseng, T. P. Kole and D. Wirtz, *Biophysical Journal*, 2002, **83**, 3162–3176.
- [185] V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research*, 2010, **27**, 796–810.
- [186] M. A. Escobedo-Sánchez, J. P. Segovia-Gutiérrez, A. B. Zuccolotto-Bernez, J. Hansen, C. C. Marciniak, K. Sachowsky, F. Platten and S. U. Egelhaaf, *Soft Matter*, 2018, **14**, 7016–7025.
- [187] S. M. Kay, *Fundamental of Statistical Signal Processing*, Pearson Education, Inc. edn., 1993, vol. 1.
- [188] R. J. Ober, S. Ram and E. S. Ward, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 1185–1200.
- [189] T. Savin and P. S. Doyle, *Biophysical Journal*, 2005, **88**, 623–638.
- [190] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich and H. Flyvbjerg, *Nature Methods*, 2010, **7**, 377–381.
- [191] A. J. Berglund, *Physical Review E*, 2010, **82**, 011917.
- [192] H. Deschout, K. Neyts and K. Braeckmans, *Journal of Biophotonics*, 2012, **5**, 97–109.
- [193] C. L. Vestergaard, P. C. Blainey and H. Flyvbjerg, *Physical Review E*, 2014, **89**, 022726.
- [194] C. L. Vestergaard, J. N. Pedersen, K. I. Mortensen and H. Flyvbjerg, *The European Physical Journal Special Topics*, 2015, **224**, 1151–1168.
- [195] C. L. Vestergaard, *Physical Review E*, 2016, **94**, 022401.
- [196] R. Parthasarathy, *Nature Methods*, 2012, **9**, 724–726.
- [197] J.-P. Goure, *L'optique Dans Les Instruments*, Lavoisier edn., 2013.
- [198] B. Zhang, J. Zerubia and J.-C. Olivo-Marin, *Applied Optics*, 2007, **46**, 1819–1829.
- [199] X. Michalet, *Physical Review E*, 2011, 26.
- [200] X. Michalet and A. J. Berglund, *Physical Review E*, 2012, **85**, 061916.
- [201] P. Langevin, *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences / Publiés... Par MM. Les Secrétaires Perpétuels*, <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3100t>, 1908.
- [202] H. Qian, M. Sheetz and E. Elson, *Biophysical Journal*, 1991, **60**, 910–921.
- [203] C. Wissler, *Science*, 1905, 309–311.
- [204] P.-J. De Temmerman, J. Lammertyn, B. De Ketelaere, V. Kestens, G. Roebben, E. Verleysen and J. Mast, *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, **16**, 2177.

- [205] T. Garting and A. Stradner, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, **181**, 516–523.
- [206] J. F. Swindells, C. F. Snyder and R. C. Hardy, *National Bureau of Standards - United States Department Of Commerce*, 1958, 8.
- [207] V. Vand, *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 1948, **52**, 314–321.
- [208] M. Quintas, T. Brandão, C. Silva and R. Cunha, *Journal of Food Engineering*, 2006, **77**, 844–852.
- [209] J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh and D. A. Weitz, *Physical Review Letters*, 2000, **85**, 888–891.
- [210] J. C. Crocker and B. D. Hoffman, in *Methods in Cell Biology*, Elsevier, 2007, vol. 83, pp. 141–178.
- [211] M. Mathlouthi and P. Reiser, *Sucrose: Properties and Applications*, Springer Science & Business Media, 1995.
- [212] J. Jezek, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 11.
- [213] V. Sharma, A. Jaishankar, Y.-C. Wang and G. H. McKinley, *Soft Matter*, 2011, **7**, 5150.
- [214] Y. Xiao and S. N. Isaacs, *Journal of Immunological Methods*, 2012, **384**, 148–151.
- [215] A. A. Nikitin, A. Y. Yurennya, R. R. Gabbasov, V. M. Cherepanov, M. A. Polikarpov, M. A. Chuev, A. G. Majouga, V. Y. Panchenko and M. A. Abakumov, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2021, **12**, 6804–6811.
- [216] V. A. Borzova, K. A. Markossian, N. A. Chebotareva, S. Y. Kleymenov, N. B. Poliansky, K. O. Muranov, V. A. Stein-Margolina, V. V. Shubin, D. I. Markov and B. I. Kurganov, *PLoS ONE*, 2016, **11**, year.
- [217] İ. Gülseren, D. Güzey, B. D. Bruce and J. Weiss, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, **14**, 173–183.
- [218] Z. Sahin, Y. K. Demir and V. Kayser, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, **86**, 115–124.
- [219] J. I. Austerberry and D. J. Belton, *Dynamic Measurements of Bovine Serum Albumin Aggregation Using Small Angle Neutron Scattering*, Biophysics preprint, 2018.
- [220] G. J. Brownsey, T. R. Noel, R. Parker and S. G. Ring, *Biophysical Journal*, 2003, **85**, 3943–3950.
- [221] I. M. Krieger and T. J. Dougherty, *Transactions of the Society of Rheology*, 1959, **3**, 137–152.
- [222] H. M. Shewan and J. R. Stokes, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2015, **222**, 72–81.
- [223] C. Tanford and J. G. Buzzell, *The Journal of Physical Chemistry*, 1956, **60**, 225–231.
- [224] W. Fredericks, M. Hammonds, S. Howard and F. Rosenberger, *Journal of Crystal Growth*, 1994, **141**, 183–192.
- [225] G. P. Manchenko, *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, Boca Raton, Fla. : CRC Press, 1994.
- [226] A. Stradner, F. Cardinaux and P. Schurtenberger, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**, 21222–21231.
- [227] V. L. Dharmaraj, P. D. Godfrin, Y. Liu and S. D. Hudson, *Biomicrofluidics*, 2016, **10**, year.
- [228] Y. Liu, L. Porcar, J. Chen, W.-R. Chen, P. Falus, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong and P. Baglioni, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, **115**, 7238–7247.
- [229] K. Monkos, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1997, **1339**, 304–310.
- [230] K. E. Tiller and P. M. Tessier, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2015, **17**, 191–216.
- [231] G. Foffi, G. Savin, S. Bucciarelli, N. Dorsaz, G. M. Thurston, A. Stradner and P. Schurtenberger, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**, 16748–16753.
- [232] T. Gibaud, F. Cardinaux, J. Bergenholtz, A. Stradner and P. Schurtenberger, *Soft Matter*, 2011, **7**, 857–860.
- [233] H. Photonics, *C-11440-42U Brochure*, 2015.
- [234] J. A. McGlynn, N. Wu and K. M. Schultz, *Journal of Applied Physics*, 2020, **127**, 201101.
- [235] S. Badaire, C. Cottin-Bizonne and A. D. Stroock, *Langmuir*, 2008, **24**, 11451–11463.
- [236] O. Stern, *Zeitschrift fur Elektrochemie*, 1924, 9.
- [237] I. B. Bekard, P. Asimakis, J. Bertolini and D. E. Dunstan, *Biopolymers*, 2011, **95**, 733–745.
- [238] I. Banerjee, R. C. Pangule and R. S. Kane, *Advanced Materials*, 2011, **23**, 690–718.
- [239] M. T. Valentine, Z. E. Perlman, M. L. Gardel, J. H. Shin, P. Matsudaira, T. J. Mitchison and D. A. Weitz, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 4004–4014.
- [240] K. Holmberg and J. M. Harris, in *K. Holmberg and J. M. Harris*, VSP International Science Publishers, 1998, pp. 443–460.
- [241] J. C. Crocker and D. G. Grier, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, **179**, 298–310.

- [242] H. Brenner, *Chemical Engineering Science*, 1961, **16**, 242–251.
- [243] S. H. Lee, R. S. Chadwick and L. G. Leal, *Journal of Fluid Mechanics*, 1979, **93**, 705.
- [244] J. Meunier, *Journal de Physique Lettres*, 1985, **46**, 1005–1014.
- [245] L. Champougny, B. Scheid, F. Restagno, J. Vermant and E. Rio, *Soft Matter*, 2015, **11**, 2758–2770.
- [246] É. Guyon, J.-P. Hulin and L. Petit, *Hydrodynamique physique: 3e édition*, EDP Sciences, 2020.
- [247] M. L. Huber, R. A. Perkins, A. Laesecke, D. G. Friend, J. V. Sengers, M. J. Assael, I. N. Metaxa, E. Vogel, R. Mareš and K. Miyagawa, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2009, **38**, 101–125.

RÉSUMÉ

La microfluidique en gouttes permet l'étude d'échantillons individuels dans des volumes de l'ordre du nanolitre. Les possibilités de parallélisation et de suivi individuel offertes par la manipulation de micro-gouttes ont été exploitées dans de nombreux domaines, tels que l'étude de cellules uniques par exemple. Parallèlement, un effort de recherche grandissant cherche à permettre la caractérisation de solutions de protéines hautement concentrées, pour mieux comprendre les effets d'encombrement macromoléculaire par exemple, ou pour cribler le comportement visqueux de protéines thérapeutiques dans diverses conditions. La rareté et le coût des solutions de protéines restreint le plus souvent la faisabilité de ces études expérimentales, motivant le développement de techniques de caractérisation à faible volume. Nous avons conçu un dispositif microfluidique permettant la rhéologie de protéines et plus généralement de tout composé soluble dans l'eau. L'élément central de ce dispositif est une puce microfluidique permettant la production in-situ, la sélection et le suivi de gouttes individuelles. Le rétrécissement des gouttes entraîne la concentration du soluté au sein de la puce, jusqu'à un facteur 400. Pendant le processus de concentration, la viscosité au sein des gouttes est mesurée continuellement sur une large gamme accessible (0.1-1000 mPa.s). Ainsi, la caractérisation rhéologique complète de biopharmaceutiques est réalisable en une seule expérience, avec une consommation limitée à 1 μ L de solution diluée. Le manuscrit commence par une introduction à la rhéologie des protéines et à la microfluidique. L'architecture et le fonctionnement de la puce sont ensuite détaillés. Sont notamment présentés le choix d'un émulsificateur à gradient de confinement et la réduction de volume consommé qui en découle, ainsi que le phénomène de pervaporation de l'eau permettant le rétrécissement des gouttes et la concentration des solutés. Les contraintes techniques participant à ces choix sont également discutées. Les processus permettant le suivi de la concentration et la microrhéologie par suivi vidéo de particules sont ensuite présentés. Pour chaque étape, une estimation systématique de l'erreur de mesure est réalisée, aboutissant à une estimation de la précision globale du système. Plusieurs expériences de validation ont été réalisées, étudiant des solutés au comportement visqueux connu comme le sucrose ou des protéines globulaires modèles comme l'albumine de sérum bovin ou le lysozyme. Leurs résultats sont présentés, permettant la démonstration des capacités expérimentales de notre dispositif et la discussion de ses limites. Après une conclusion synthétisant l'ensemble de ces travaux et ouvrant de nouvelles perspectives, des informations techniques et des données additionnelles sont regroupées en annexe.

MOTS CLÉS

Anticorps Monoclonaux - Protéines - Viscosité - Microfluidique - Gouttes

ABSTRACT

Droplet-based microfluidics allow the study of individual samples in nanoliter-sized compartments. The possibilities offered by the manipulation of droplets have been exploited in many fields such as single-cell biology, requiring massive parallelization and individual tracking. Moreover, there is a growing interest in studying protein samples at high concentrations to better understand the effect of macromolecular crowding, or to screen the viscosity of biopharmaceuticals under various conditions. In many cases, the scarcity and cost of such proteins limit or prohibit the use of standard rheological techniques. As such, there is a pressing need to lower the required sample volume. We have designed a specific microsystem for investigating viscous features of various hydrophilic compounds. Our experimental strategy, combining microfluidics and emulsion droplets, allows in-situ production, selection and monitoring of water droplets in a PDMS chip. Droplet shrinking causes in-chip solute concentration by a factor of 400. During the concentration process, rheological study of the sample is made possible by continuous viscosity measurements in the range of 1 mPa.s - 1 Pa.s, allowing full characterization of biopharmaceuticals in just one experiment and requiring as low as 1 μ L of dilute solution. After introducing the fields of high-concentration protein rheology and microfluidics, this manuscript presents the design and operating ways of our chip. More specifically, the minimization of required volume through the choice of step-dropmaking is detailed, as well as the use of pervaporation-induced shrinking for solute concentration, with discussion on the technical challenges posed by those choices. Subsequently, both the concentration monitoring and multi-particle tracking microrheology techniques are introduced, with a particular interest in quantitative error estimation at each step to evaluate the global precision of the system. Various validation experiments have been conducted, using calibrated samples such as sucrose or model globular proteins such as bovine serum albumin or lysozyme. Their results are used to showcase the capabilities of our experimental system and discuss its limits. After a conclusion summarizing the aforementioned work and opening new perspectives, an appendix gathers technical information and additional data such as detailed experimental protocols.

KEYWORDS

Monoclonal Antibodies - Proteins - Viscosity - Microfluidics - Droplets