

# THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Toulouse**  
délivré par l'**Université Toulouse III – Paul Sabatier**

École doctorale : Génie électrique, électronique, télécommunications  
Spécialité : Conception des circuits microélectroniques et microsystèmes

soutenue par

**Guillaume PAUMIER**

le 6 novembre 2008 à Toulouse

## Technologies PNIPAM pour les laboratoires sur puce

### Jury :

Anne-Marie Gué	Directrice de thèse
Jan Sudor	Directeur de thèse
Hervé Cottet	Rapporteur
Sedat Tardu	Rapporteur
Alain-Michel Boudet	Examinateur, président du jury
Françoise Vinet	Examinateuse
Mohamed Maftouh	Invité

LAAS – CNRS  
Groupe Nano-ingénierie et intégration des systèmes



# Remerciements

*Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes du CNRS (LAAS-CNRS), à Toulouse, dans le groupe Microsystèmes et intégration de systèmes (MIS), plus tard rebaptisé en Nano-ingénierie et intégration de systèmes (N2IS). Merci à Malik Ghallab et Raja Chatila, directeurs successifs du laboratoire, de m'y avoir accueilli, ainsi qu'à Jean-Yves Fourniols, responsable du groupe (N2IS), pour sa capacité à écouter et à s'affranchir des barrières hiérarchiques.*

*Merci à Anne-Marie Gué et Jan Sudor, directeurs de thèse, pour leur encadrement pendant ces trois années, ainsi que la confiance et la liberté qu'ils m'ont accordées ;*

*Merci à Hervé Cottet et Sedat Tardu d'avoir accepté la tâche de rapporteur, permettant ainsi d'observer le travail effectué avec un recul bienvenu ;*

*Merci à Alain-Michel BouDET d'avoir présidé le jury de thèse et apporté un regard interdisciplinaire sur des travaux qui ne l'étaient pas moins ;*

*Merci à Françoise Vinet et Mohamed Maftouh d'avoir participé au jury de thèse et fourni leur éclairage original sur mes travaux ;*

*Merci à mes collègues du groupe N2IS avec qui j'ai particulièrement travaillé et interagi, en particulier Aurélien, Pierre, Gustavo, Hélène, Marine, Jean-Marie, Georges, Marie, Elisabeth, Cédric, Deka et Gabor ;*

*Merci à l'équipe TEAM, en particulier Véronique, pour leur soutien dans la réalisation de dispositifs en salle blanche ;*

*Merci à l'équipe de la documentation, en particulier Arlette et Émilie, pour leur efficacité et leur rapidité ;*

*Many thanks to Jorge Cham for going on Piling Higher and Deeper, thus bringing thousands of grad students across the world their daily fix ; OMG it's all so true ;*

*Enfin, merci à Leslie Lamport et *ETEX2ε*, compagnons de route depuis six ans déjà, qui ont beaucoup contribué à l'esthétique et l'organisation de ce document.*



# Sommaire

<b>Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>1 Enjeux des laboratoires sur puce</b>	<b>11</b>
1.1 Introduction . . . . .	11
1.2 Panorama des microsystèmes pour le vivant . . . . .	12
1.2.1 Réduction des dimensions . . . . .	12
1.2.2 De la microfluidique aux laboratoires sur puce . . . . .	16
1.2.3 Conclusions . . . . .	24
1.3 État des possibilités et applications du PNIPAM . . . . .	25
1.3.1 État des connaissances sur le PNIPAM . . . . .	25
1.3.2 Aperçu des applications du PNIPAM . . . . .	27
1.3.3 Conclusions . . . . .	32
1.4 Conclusion . . . . .	32
<b>2 Technologie PNIPAM</b>	<b>35</b>
2.1 Introduction . . . . .	35
2.2 Conception du dispositif . . . . .	36
2.2.1 Fonctionnalités souhaitées . . . . .	36
2.2.2 Choix des matériaux . . . . .	36
2.2.3 Assemblage et intégration . . . . .	37
2.3 Conception et réalisation des éléments chauffants . . . . .	39
2.3.1 Lignes chauffantes simples . . . . .	39
2.3.2 Éléments chauffants adressables . . . . .	51
2.3.3 Conclusions . . . . .	53
2.4 Fonctionnalisation de surface et greffage du PNIPAM . . . . .	54
2.4.1 Chimie de greffage du PNIPAM . . . . .	54
2.4.2 Caractérisation chimique de la fonctionnalisation . . . . .	56
2.4.3 Modifications du protocole . . . . .	66
2.4.4 Conclusions . . . . .	68
2.5 Conclusion . . . . .	68
<b>3 Applications</b>	<b>71</b>
3.1 Introduction . . . . .	71
3.2 Contrôle électrocinétique . . . . .	71
3.2.1 Contexte et principe . . . . .	71
3.2.2 Mesure et modification du flux électro-osmotique . . . . .	75
3.2.3 Contrôle du flux électro-osmotique par le PNIPAM . . . . .	78
3.2.4 Conclusions . . . . .	81
3.3 Accrochage et décrochage contrôlé de protéines . . . . .	82

3.3.1	Contexte et expériences préliminaires . . . . .	82
3.3.2	Adsorption et désorption de protéines fluorescentes . . . . .	87
3.3.3	Conclusions . . . . .	92
3.4	Conclusion . . . . .	92
<b>Conclusion générale</b>		<b>95</b>
<b>A Publications</b>		<b>97</b>
<b>B Assemblage SU-8</b>		<b>99</b>
<b>C Notes de droit d'auteur</b>		<b>101</b>
C.1	Droits régissant ce document . . . . .	101
C.2	Crédits . . . . .	101
C.3	GNU Free Documentation License . . . . .	103
<b>Références</b>		<b>109</b>
<b>Résumé</b>		<b>131</b>

# Table des figures

1	Exemples de laboratoires sur puce d'utilisation courante . . . . .	9
1.1	Comparaison des objets biologiques et technologiques à l'échelle micro-nano . . . . .	15
1.2	Réseau microfluidique naturel : structure veineuse d'une feuille d'érable . . . . .	16
1.3	Évolution de la production scientifique en microfluidique . . . . .	18
1.4	Molécule de <i>N</i> -isopropylacrylamide. . . . .	25
1.5	Évolution de la production scientifique concernant le PNIPAM . . . . .	26
1.6	Schéma de transition du PNIPAM . . . . .	27
1.7	Schéma d'application du PNIPAM au filtrage optique . . . . .	28
1.8	Immuno-test par précipitation par affinité basée sur le PNIPAM . . . . .	29
1.9	Culture de cellules sur PNIPAM . . . . .	31
2.1	Images MEB de piliers gravés au fond d'un microcanal . . . . .	39
2.2	Schéma de la géométrie de piégeage des microbilles . . . . .	39
2.3	Vue d'ensemble 3D du dispositif . . . . .	40
2.4	Puce PDMS après fabrication . . . . .	40
2.5	Maillage du modèle de simulation de la ligne chauffante sur verre . . . . .	42
2.6	Résultat de la simulation de la ligne chauffante sur verre . . . . .	43
2.7	Maillage du modèle de simulation de l'effet Joule dans la ligne chauffante seule . . .	44
2.8	Résultat de la simulation de l'effet Joule dans la ligne chauffante seule . . . . .	44
2.9	Maillage du modèle de simulation du transfert thermique . . . . .	46
2.10	Dynamique thermique du transfert de chaleur dans l'assemblage . . . . .	47
2.11	Simulation : évolution de la température pendant la première seconde de chauffage .	48
2.12	Simulation : évolution de la température pendant le chauffage . . . . .	49
2.13	Montage de caractérisation par thermographie infrarouge . . . . .	50
2.14	Visualisation du chauffage par thermographie infrarouge . . . . .	50
2.15	Caractérisation des lignes chauffantes par thermographie infrarouge . . . . .	51
2.16	Schéma d'un élément individuel du dispositif chauffant adressable . . . . .	52
2.17	Schéma et photo de l'ensemble d'éléments chauffants . . . . .	52
2.18	Caractérisation des éléments chauffants adressables par thermographie infrarouge .	53
2.19	Molécule de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate . . . . .	54
2.20	Molécule d'acrylamide . . . . .	55
2.21	Schéma d'une goutte en mouillage sur une surface solide . . . . .	57
2.22	Schéma de mesures dynamiques d'angle de contact . . . . .	58
2.23	Évolution de l'angle de contact d'avancement sur PNIPAM en fonction de la température	58
2.24	Évolution de l'hystérésis entre l'angle d'avancement et de recul sur PNIPAM en fonction de la température . . . . .	59
2.25	Schéma d'un montage de spectroscopie infrarouge ATR . . . . .	60
2.26	Schéma du montage de spectroscopie infrarouge MIR à deux prismes . . . . .	61
2.27	Spectre IR-ATR d'un échantillon silanisé . . . . .	61

2.28 Spectre IR-ATR d'un échantillon fonctionnalisé avec du PNIPAM . . . . .	62
2.29 Spectre FTIR d'un échantillon silanisé . . . . .	64
2.30 Spectre FTIR d'un échantillon fonctionnalisé avec du PNIPAM . . . . .	65
2.31 Fonctionnalisation du PDMS (angle de contact) . . . . .	67
2.32 Molécule de (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane . . . . .	68
3.1 Limite du mélange par diffusion à faible nombre de Reynolds . . . . .	72
3.2 Principe d'un mélangeur électrocinétique à technologie PNIPAM . . . . .	73
3.3 Modèle de la double couche électrique . . . . .	73
3.4 Illustration schématique d'un flux électro-osmotique dans un canal . . . . .	74
3.5 Masquage de la double couche électrique par le PNIPAM . . . . .	75
3.6 Schéma de la mobilité électro-osmotique par observation du courant . . . . .	76
3.7 Courbe typique de mesure d'électro-osmose . . . . .	77
3.8 Expérience de mesure du flux électro-osmotique. . . . .	77
3.9 Influence du poly(acrylamide) sur le flux électro-osmotique . . . . .	78
3.10 Réduction du flux électro-osmotique par le PNIPAM . . . . .	79
3.11 Évolution de $\mu_{EO}$ selon $T$ sur du PNIPAM, tampons 1× et 0,5× . . . . .	80
3.12 Cycles de mesure de courant afin de favoriser la reproductibilité. . . . .	80
3.13 Évolution de $\mu_{EO}$ selon $T$ sur du PNIPAM . . . . .	81
3.14 Schéma d'interaction PNIPAM-molécules biologiques . . . . .	82
3.15 Montage complet de microscopie à fluorescence . . . . .	83
3.16 Capillaire pendant une expérience de fluorescence . . . . .	85
3.17 Puce PDMS pendant une expérience de fluorescence . . . . .	85
3.18 Billes dans un capillaire non fonctionnalisé . . . . .	86
3.19 Billes dans un capillaire fonctionnalisé avec de l'acrylamide . . . . .	86
3.20 Accumulation de billes dans une puce . . . . .	87
3.21 Adsorption et désorption de protéines fluorescentes sur des microbilles . . . . .	88
3.22 Profil de fluorescence d'une bille au cours d'une expérience . . . . .	88
3.23 Fluorescence de billes lors d'une analyse de saturation en protéines . . . . .	89
3.24 Comparaison du phénomène d'adsorption – désorption sur les deux types de couches chimiques . . . . .	90
3.25 Adsorption de protéines fluorescentes sur billes dans une puce PDMS . . . . .	90
3.26 Fluorescence d'une bille lors de l'adsorption – désorption de streptavidine . . . . .	91
B.1 Schéma de l'assemblage Silicium/SU-8//SU-8/Pyrex. . . . .	99

# Introduction générale

En France, un test de grossesse peut être obtenu en pharmacie, sans ordonnance, pour quelques euros (FIG. 1, à gauche). Cet outil d'auto-diagnostic permet à une femme de déterminer si elle est enceinte ; il repose généralement sur le dosage de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). Ce système miniaturisé analyse en quelques minutes un échantillon brut, l'urine, et propose une lecture simple du résultat : symboles +/−, barres colorées ou affichage de texte. Ce test jetable, rapide, peu coûteux, de manipulation simple, est annoncé fiable à plus de 99% par les fabricants.

Moins répandus, les systèmes d'automesure de la glycémie sont utilisés par les diabétiques pour contrôler leur niveau de glucose dans le sang (FIG. 1, à droite). Un autopiqueur permet d'obtenir une goutte de quelques microlitres, déposée sur une bande de test, couplée au système de mesure. En quelques secondes, le taux de glucose est affiché sur l'écran numérique. Le dispositif de mesure est disponible à partir de douze euros ; les bandes jetables coûtent environ soixante-dix centimes d'euro l'unité et sont vendues par paquets.

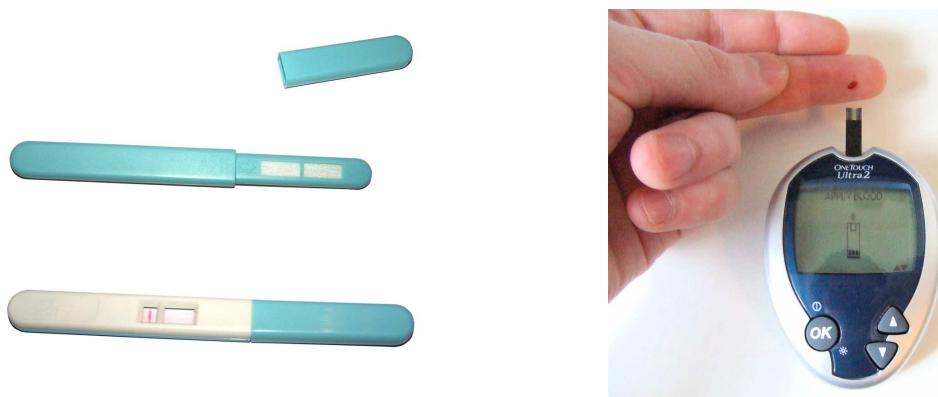


FIG. 1 – Exemples de « mini-laboratoires » d'utilisation courante : à gauche, un test de grossesse ; à droite, un dispositif d'automesure de la glycémie.

Ces mini-laboratoires, ou laboratoires sur puce, sont des dispositifs miniaturisés d'analyse biologique. D'utilisation simple, basés sur des échantillons bruts, ne demandant pas de préparation préliminaire, ils sont destinés à des non-spécialistes. Ils fournissent rapidement, pour un coût raisonnable, un résultat fiable et immédiatement exploitable. Les marchés ciblés par ce type de dispositifs d'analyse sont multiples ; ainsi, un test de potabilité de l'eau, accessoire des randonneurs de pays industrialisés, peut s'avérer extrêmement utile aux populations des pays en développement.

De nombreux efforts sont actuellement faits pour développer des systèmes similaires ; le principal domaine d'application est celui de la recherche en biologie et santé. Ces dispositifs permettent par exemple la manipulation d'objets tels que les protéines ou les cellules. La recherche pharmaceutique est également très intéressée par des outils miniaturisés de criblage haut-débit. Ces systèmes de

poche autorisent aussi un diagnostic rapide sur site, notamment dans des pays ne disposant pas d'instruments hospitaliers modernes.

Les travaux présentés dans ce document s'insèrent dans le cadre général des laboratoires sur puce. Ils concernent plus précisément l'étude de l'intégration, dans de tels systèmes, d'un polymère aux propriétés originales, le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Le premier chapitre présente les enjeux des laboratoires sur puce, les microsystèmes fluidiques et le PNIPAM de façon approfondie. Le deuxième chapitre est dédié au développement d'une technologie d'intégration du PNIPAM dans des systèmes miniaturisés. Le troisième et dernier chapitre est consacré à deux applications de cette technologie pour les dispositifs d'analyse.

# Chapitre 1

## Enjeux des laboratoires sur puce et problématiques

*“If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants.”*

**Isaac Newton**, Lettre à Robert Hooke, 5 février 1676.

### 1.1 Introduction

**Biosanté.** Le séquençage du génome humain a été le résultat d'une collaboration scientifique mondiale impliquant des dizaines de partenaires publics et privés ; ce défi a notamment pu être accompli grâce au perfectionnement des outils d'analyse et à l'automatisation des manipulations. La publication de la séquence du génome humain n'a cependant pas marqué la fin du criblage haut-débit : l'ère « post-génomique » est caractérisée par une complexification des systèmes étudiés. La génomique a laissé la place à la transcriptomique, la protéomique [1], la métabolomique, la cellomique<sup>1</sup> [2, 3, 4] et aux autres sciences en « -omique » (*-omics*), qui sont les nouveaux défis de la biologie moléculaire [5]. Les besoins de ces domaines plus complexes rejoignent cependant ceux de la génomique : criblage haut débit, processus automatisés, analyses chimiques performantes, etc. Outre la compréhension des phénomènes fondamentaux en biologie systémique, une large part de ces recherches est dédiée à la recherche de nouveaux traitements et au diagnostic.

**Diagnostic et miniaturisation.** Le traitement intervient une fois que la maladie a été identifiée. La tendance actuelle est à la miniaturisation des dispositifs de diagnostic, de façon à les rendre portables, rapides, jetables et autonomes. La notion sous-jacente est celle de diagnostic en « point de service » (*point-of-care testing*, POCT), c'est à dire le plus près possible du patient. Une fois l'analyse effectuée, le patient peut éventuellement transmettre automatiquement les résultats à son médecin par le réseau informatique. Le développement de dispositifs de diagnostic jetables et faciles d'utilisation n'a pas pour seul objectif de faciliter la vie des patients ; une autre priorité est l'amélioration des soins dans les pays qui ne disposent pas des équipements de diagnostic coûteux des

<sup>1</sup>Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers produits dans une cellule ou une population de cellules ; le protéome est l'ensemble des protéines exprimées par un génome ; le métabolome est l'ensemble des petits métabolites (tels que les hormones) d'un échantillon biologique ; le cellome est l'ensemble des cellules d'un organisme et de leurs composants.

pays les plus riches [6]. La miniaturisation des systèmes pour le vivant a fait converger les biologistes, chimistes, physiciens et technologues vers l'échelle commune du micro- et nanomètre [7, 8, 9] ; nos recherches se situent précisément à cette interface. Dans ce chapitre, j'esquisse tout d'abord un panorama des développements effectués dans le domaine des microsystèmes pour le vivant ; j'aborde les particularités de la réduction des dimensions, notamment en fluidique, avant de présenter en détail le concept de laboratoire sur puce. Dans une deuxième partie, je dresse un état des connaissances actuelles sur le polymère « intelligent » dont l'intégration est le sujet de nos travaux.

## 1.2 Panorama des microsystèmes pour le vivant

### 1.2.1 Réduction des dimensions

#### 1.2.1.1 Intérêts de la miniaturisation

**Économie de réactifs et de temps.** Les potentialités des dispositifs d'analyse miniaturisés sont généralement présentées dans la littérature comme une petite révolution [10, 11, 12, 13]. Des dispositifs miniaturisés impliquent des volumes plus faibles, des distances plus courtes. Ainsi, on n'utilise que de faibles volumes d'échantillons et de réactifs, qui peuvent être rares ou coûteux [14]. LION *et al.* passent en revue les implications de la miniaturisation dans le cadre de l'analyse des protéines ; ils proposent trois principaux indicateurs visant à déterminer si un dispositif miniaturisé est plus avantageux : les performances, la quantité d'échantillon nécessaire et le temps d'analyse [15] ; la miniaturisation n'est d'ailleurs pas obligatoirement la meilleure solution dans tous les cas.

**Gain en performances.** Dans les analyses de séparation, la théorie prévoit une plus grande efficacité [10], notamment en électrophorèse capillaire [11]. Des canaux miniaturisés réduisent les distances de diffusions moléculaire et thermique. Le temps de diffusion sur une distance  $d$  varie comme l'inverse du carré de la distance ( $1/d^2$ ) : s'il faut 17 minutes à une espèce pour diffuser sur 1 mm, il ne lui faut que 100 ms pour diffuser sur  $10\ \mu\text{m}$  [16] ; en réduisant le libre parcours moyen des espèces, on favorise également les réactions [13]. À titre d'exemple, l'analyse d'un échantillon de sérum humain par chromatographie liquide et spectrométrie de masse a été réalisée en puce et en capillaire par HORVATOVICH *et al.* : le dispositif sur puce a une résolution double pour un volume d'échantillon consommé trente fois inférieur [17].

**Intégration sur puce et diminution des coûts.** La miniaturisation des systèmes d'analyse vise également le regroupement de plusieurs fonctions sur le même support, voire des chaînes complètes d'analyse (§ 1.2.2.2). En regroupant les fonctions, la connectique est simplifiée, les canaux sont réduits et les volumes morts minimisés. Les systèmes fabriqués, en étant miniaturisés, sont beaucoup plus portables ; cette caractéristique est particulièrement intéressante, que ce soit pour le diagnostic à domicile ou les urgences sanitaires à grande échelle, dans des zones avec peu d'infrastructures médicales [6]. Par ailleurs, l'intégration de systèmes miniaturisés d'analyse sur puce permet de profiter des mêmes avantages que la fabrication en masse de la micro-électronique (*very large scale integration, VLSI*) : la fabrication à grande échelle assure une excellente reproductibilité et des coûts limités. La reproductibilité est nécessaire à l'utilisation de dispositifs de façon hautement parallélisée pour du criblage haut-débit [18]. La baisse des coûts de fabrication permet d'envisager des dispositifs jetables, à utilisation unique, supprimant par la même occasion les problèmes de contamination croisée.

### 1.2.1.2 Défis et verrous

**Réduction d'échelle.** La miniaturisation des systèmes d'analyse chimique et biologique est porteuse d'autant de potentialités d'applications que de défis technologiques et scientifiques à relever. En effet, la réduction d'échelle (*downscaling*) rend nécessaire la prise en compte de nombreux effets physiques et chimiques lors de la conception. Il ne suffit pas de réduire homothétiquement les dimensions des dispositifs macroscopiques [13]. Il est également important de se poser la question de l'influence de la réduction des dimensions sur les différents modes de détection chimique et biologique [19].

**Prépondérance des surfaces.** La miniaturisation des dispositifs d'analyse entraîne une forte augmentation du rapport surface-sur-volume. Elle favorise par exemple l'adsorption des analytes sur les parois [20] et l'évaporation des liquides, en particuliers des gouttes [19] ; dans le domaine des biopuces, le glycérol est utilisé pour limiter cet effet. L'influence des surfaces devient prépondérante ; il est nécessaire de contrôler précisément les divers phénomènes physiques et chimiques qui s'y déroulent. La fonctionnalisation chimique de surface a donc une importance cruciale dans la miniaturisation des systèmes d'analyse.

**Fluidique.** La miniaturisation permet de réduire le temps de diffusion, mais elle entraîne également des écoulements laminaires qui ne favorisent pas le mélange (§ 1.2.2.1). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches pour mélanger les fluides dans les microsystèmes. La connexion du microsystème avec le monde extérieur est également un défi que je détaillerai plus loin. La « barrière du microlitre » correspond à l'ensemble des problèmes engendrés par la dispense et la manipulation de volumes de liquides inférieurs au microlitre [18, 21, 22].

### 1.2.1.3 Interdisciplinarité

**Perspective historique.** Interdisciplinarité et recherche scientifique ont longtemps été liées. Aristote est à l'origine des principales subdivisions de la connaissance ; non seulement il étudie l'ensemble des disciplines possibles, mais il y participe activement et influence notablement la plupart d'entre elles [23]. D'autres polymathes marquent l'histoire de la connaissance : Léonard de Vinci, Galilée, Thomas Young, etc. Ces « hommes d'esprit universels » étudient et excellent dans plusieurs disciplines différentes. Cependant, avec l'évolution des sciences et des techniques, la somme des connaissances augmente de façon telle que les scientifiques sont de moins en moins capables de maîtriser autant de domaines de compétences. Au xx<sup>e</sup> siècle, l'interdisciplinarité n'est plus que rarement présente dans la recherche scientifique. On ne rencontre alors le concept de façon régulière que dans le domaine de la santé, où il fait généralement référence aux différentes spécialisations [24, 25]. La miniaturisation des dispositifs d'analyse a cependant, dès les années 1990, incité au rapprochement des biologistes, chimistes, physiciens et technologues [7].

**Terminologie.** On entend parfois les termes de multidisciplinarité ou pluridisciplinarité ; ces notions ne sont pas équivalentes à l'interdisciplinarité. *Multi* et *pluri* signifient que plusieurs disciplines sont mises en jeu ; par exemple, le cursus primaire, collège et lycée est très pluridisciplinaire : de nombreuses disciplines différentes y sont étudiées. En revanche, *interdisciplinaire* indique que plusieurs disciplines sont abordées *ensemble*. L'interdisciplinarité fait intervenir des disciplines différentes sur la même problématique, avec des angles d'approche différents.

**Interdisciplinarité à l'échelle micro et nano.** La taille typique d'une cellule est  $10\text{ }\mu\text{m}$ ; une chaîne d'ADN mesure quelques nanomètres de large : il est naturel que biologie et micro-nanotechnologies aient convergé (FIG. 1.1). Les physiciens et chimistes peuvent ainsi aider les biologistes à réaliser de nouveaux outils d'analyse et de manipulation d'échantillons ; réciproquement, les scientifiques peuvent s'inspirer de l'étude des systèmes biologiques micro- et nanométriques pour améliorer ou créer de nouveaux dispositifs [26] ; la nature est encore un bien meilleur nano-architecte que l'homme, notamment en ce qui concerne les systèmes auto-assemblés [27]. Le travail de recherche interdisciplinaire n'est pas facile ; les intervenants, physiciens, technologues, chimistes et biologistes, utilisent notamment des vocabulaires très différents. Les structures administratives existantes ne favorisent pas non plus l'interdisciplinarité, du moins en France ; peu d'efforts sont d'ailleurs faits en ce sens, malgré les promesses et les réformes des responsables politiques [28]. Ce sont donc les chercheurs qui doivent prendre l'initiative, malgré les obstacles institutionnels, administratifs et budgétaires, de la collaboration interdisciplinaire. C'est grâce à cette volonté d'interdisciplinarité qu'ont pu être développés les microsystèmes pour la biologie et la santé, en particulier les systèmes microfluidiques et les laboratoires sur puce.

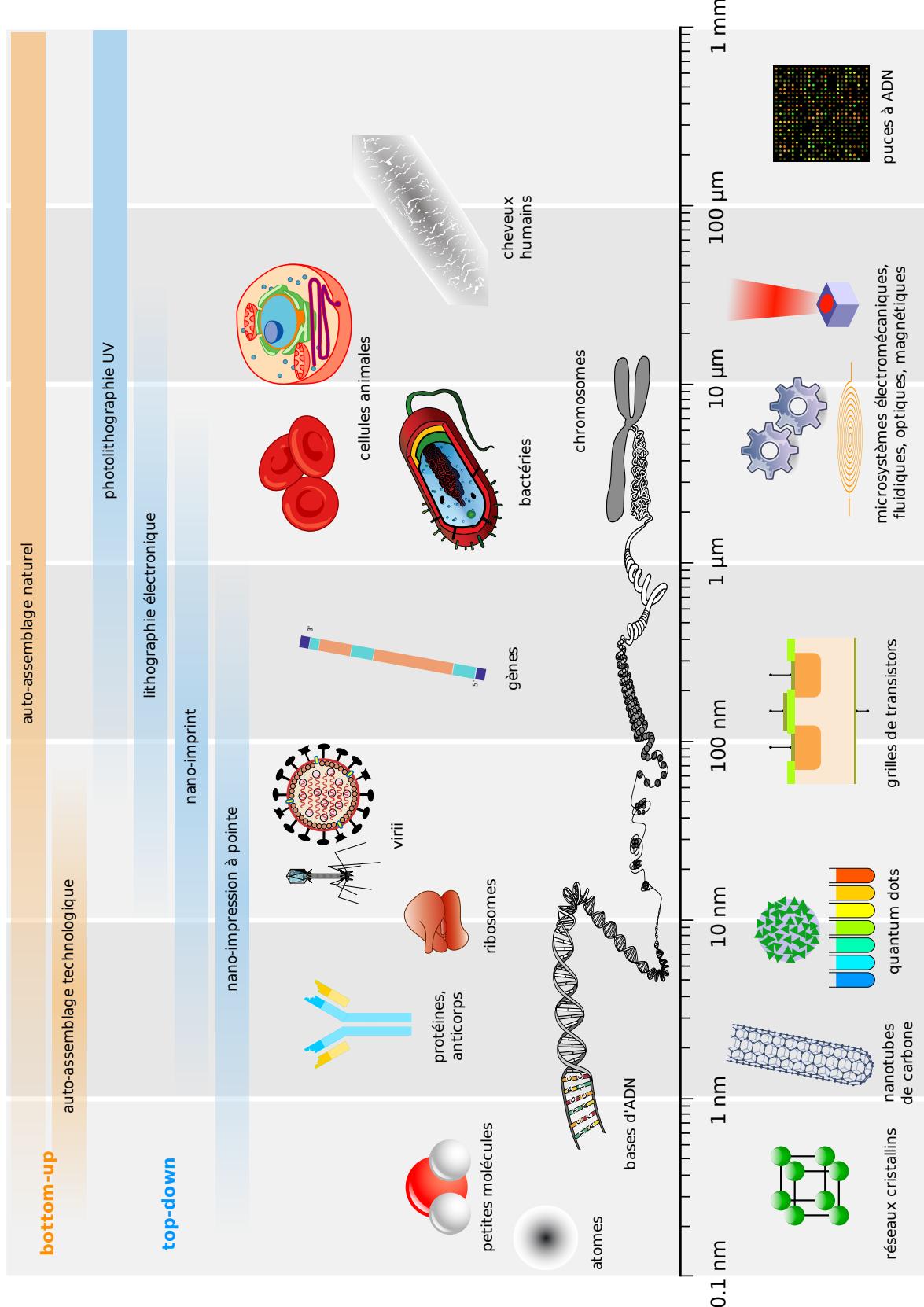


FIG. 1.1 – Comparaison des objets biologiques et technologiques de l'Angström au millimètre.

## 1.2.2 De la microfluidique aux laboratoires sur puce

### 1.2.2.1 Introduction à la microfluidique

**Définition.** G.M. WHITESIDES définit la microfluidique comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides ( $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  litres), en utilisant des canaux de quelques dizaines de micromètres » [29]. Selon P. TABELING, « on peut définir la microfluidique comme [une discipline] portant sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels, c'est-à-dire fabriqués à l'aide des nouvelles technologies<sup>2</sup> » [30]. La première définition fait bien apparaître la dualité de la microfluidique : en tant que science, elle englobe l'étude des phénomènes et la physique des fluides à l'échelle micrométrique ; en tant que technologie, elle contient également une dimension applicative. Cependant, la définition de WHITESIDES fait porter le préfixe *micro* sur la dimension de canaux<sup>3</sup> ; or, certains systèmes microfluidiques, par exemple les dispositifs d'électromouillage sur diélectrique, fonctionnent en gouttes, sans canaux [31, 32]. TABELING donne quant à lui une définition d'ingénieur qui, comme il le souligne lui-même, exclut l'ensemble des systèmes microfluidiques naturels, tels que les capillaires sanguins ou le transport de sève dans les plantes (FIG. 1.2). Je préfère définir la microfluidique de façon plus large, comme la science et la technologie des systèmes manipulant des fluides et dont au moins l'une des dimensions caractéristiques est de l'ordre du micromètre.



FIG. 1.2 – Exemple de réseau microfluidique naturel : structure veineuse d'une feuille d'érable. Le reste de la feuille a été dissout par gravure pour ne conserver que les veines.

<sup>2</sup>TABELING précise qu'il entend essentiellement par « nouvelles technologies » les technologies de microfabrication héritées de la micro-électronique.

<sup>3</sup>Ce préfixe ne concerne pas les volumes de fluides qui, dans la définition de WHITESIDES, sont compris entre le nanolitre et l'attolitre.

**Écoulements des fluides à l'échelle micro- et nanométrique.** Aux petites dimensions, les phénomènes physiques macroscopiques ne subissent pas seulement une diminution linéaire de leurs effets. Certains phénomènes négligeables deviennent prépondérants, comme la capillarité ; inversement, d'autres forces telles que la gravité deviennent négligeables [33]. L'utilisation de grandeurs sans dimension permet d'appréhender plus facilement les caractéristiques d'un système microfluidique [34]. La plus répandue est probablement le nombre de Reynolds Re, proposé en 1883 [35], qui caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité (Eq. 1.1). Les systèmes microfluidiques sont généralement caractérisés par un petit nombre de Reynolds : les forces de viscosité sont prépondérantes. Ce comportement se traduit par des flux laminaires. On peut également citer le nombre de Péclet Pe, liant convection et diffusion, et le nombre de Knudsen Kn, permettant de classifier les milieux continus. SQUIRES et QUAKE décrivent en détail la physique et les nombres adimensionnels à l'échelle du nanolitre [34].

$$\text{Re} = \frac{\rho \ell V}{\eta} = \frac{\ell V}{\nu} \quad (1.1)$$

Avec :

- $\rho$  la masse volumique du fluide ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) ;
- $\ell$  la taille caractéristique du système (m) ;
- $V$  une vitesse caractéristique ( $\text{m.s}^{-1}$ ) ;
- $\eta$  la viscosité dynamique du fluide ( $\text{kg.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Pa.s, ou Pl) ;
- $\nu$  la viscosité cinématique du fluide ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) .

**Développement.** La microfluidique est un domaine de recherche particulièrement dynamique, comme en témoigne une rapide analyse de la production scientifique mondiale<sup>4</sup> (FIG. 1.3). WHITESIDES relie ce dynamisme à quatre thématiques principales<sup>5</sup> : la chimie analytique, la biodéfense, la biologie moléculaire et la micro-électronique [29] ; tout d'abord, le succès des méthodes analytiques au format capillaire (chromatographie liquide à haute performance, électrophorèse) a conduit à miniaturiser davantage les dispositifs, afin d'améliorer la sensibilité et la résolution des analyses. Le développement de la microfluidique a également été abondamment subventionné par les agences militaires, afin de répondre au risque des armes chimiques et biologiques. Par ailleurs, la course au séquençage du génome humain, rapidement suivi par le protéome et le métabolome, a rendu nécessaire le développement d'outils d'analyse haut débit hautement parallélisables. Enfin, la microfluidique a largement profité des technologies de microfabrication, développées à l'origine pour la micro-électronique et les microsystèmes. On peut néanmoins s'étonner du fait que, malgré ces facteurs et ce dynamisme, la microfluidique n'ait pas encore envahi notre quotidien, en particulier dans le domaine de la santé. La raison principale que je vois à cette latence est que la microfluidique reste une discipline relativement jeune ; de très nombreux dispositifs ont été développés, enrichissant d'autant la boîte à outils microfluidique. Cependant, le problème reste leur intégration, leur assemblage cohérent et la possibilité d'utilisation du dispositif final par une personne non avertie. En ce sens, les tests de grossesse jetables, bien que plus simples, sont un exemple à suivre [37]. Je suis cependant confiant dans l'avenir de la microfluidique, qui a d'ailleurs été choisi en 2001 par la

<sup>4</sup>Recherche effectuée le 12 juin 2008 sur le mot-clef *microfluidics* dans la base de données CAplus avec l'outil SciFinder Scholar. Il faut garder à l'esprit que cette base de données est principalement orientée sur le domaine de la chimie et la santé ; le compte total des publications concernant la microfluidique est donc probablement encore plus élevé.

<sup>5</sup>A. van den BERG attribue le développement de la microfluidique aux mêmes « origines », mais ne cite pas l'impulsion donnée par la recherche en biodéfense [36].

*Technology Review* du M.I.T. comme l'une des « dix technologies émergentes qui vont changer le monde » [38].

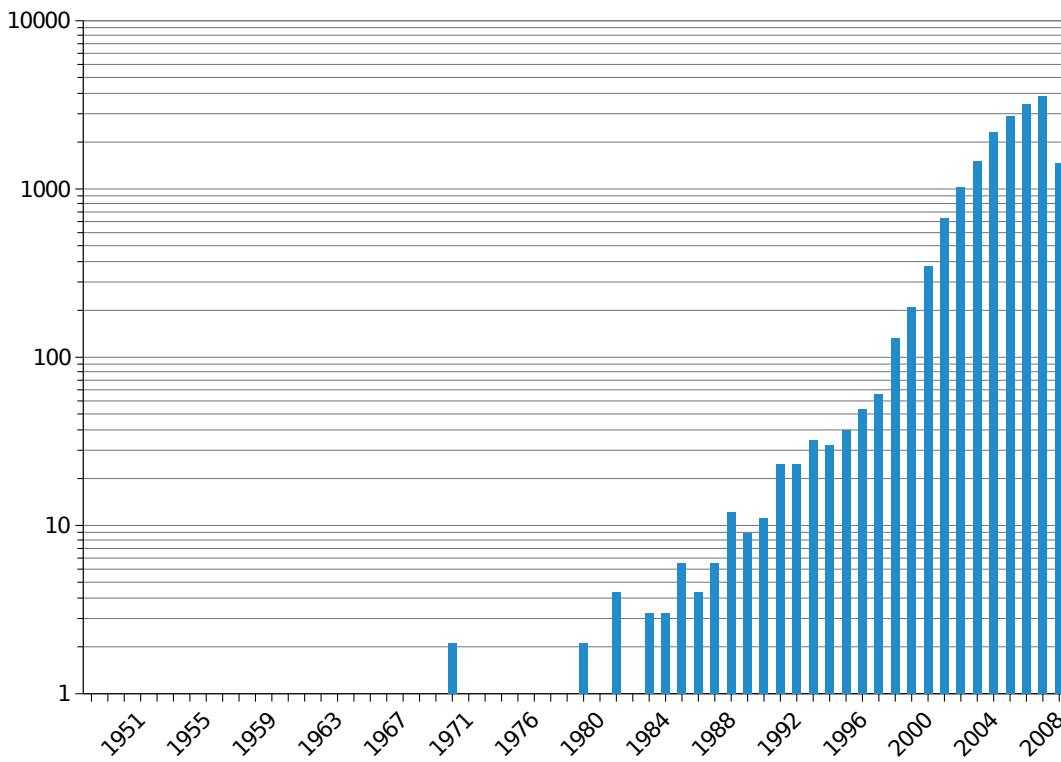


FIG. 1.3 – Évolution annuelle du nombre de références indexées dans CAS concernant la microfluidique. L'axe des ordonnées utilise une échelle logarithmique.

**Fonctions de base.** La technologie microfluidique comporte plusieurs facettes ne se limitant pas à « l'écoulement des fluides ». On peut identifier plusieurs composantes d'un système microfluidique : les zones d'écoulement, les dispositifs d'actionnement et l'interface avec le monde extérieur. Les zones d'écoulement sont généralement des microcanaux fabriqués en technologie polymère [39, 40]. Les techniques de micro-électronique fournissent de nombreuses technologies d'usinage de volume et de surface ; d'autres technologies, telles que le laminage de films secs, ont été développées plus spécifiquement pour les systèmes microfluidiques [41]. La géométrie et le design des zones d'écoulement est également à prendre en compte : canaux droits simples, en forme de T [42] ou même biomimétiques [26]. Une autre fonction microfluidique de base est l'actionnement des fluides [43] : ce terme recouvre l'injection, le déplacement contrôlé et les différentes opérations effectuées sur le fluide, comme le mélange. Ces fonctions sont implémentées par une variété de composants microfluidiques élémentaires : pompes [44, 45, 46], valves [47, 48], mélangeurs [49]. Le dernier aspect de la technologie microfluidique, et non le moindre, est la connexion entre le système micrométrique et le monde extérieur [30, 50]. La connectique entre le système microfluidique et le macromonde s'apparente à de la microplomberie ; il s'agit de développer des interfaces, si possible standardisées [51], entre des systèmes d'échelles très différentes. Tous ces aspects ne recouvrent que les fonctions de base, que l'on rencontre généralement dans tout système microfluidique ; d'autres fonctions plus évoluées sont souvent ajoutées.

**Éléments magnétiques et optiques intégrés.** En plus des fonctions de base, la boîte à outils du technologue en microfluidique est riche de nombreux éléments, notamment magnétiques et optiques. Les bobines et autres éléments magnétiques ont été intégrés à l'échelle micrométrique lors du développement des microsystèmes électromécaniques (*micro-electromechanical systems, MEMS*) [52] ; l'application la plus connue de MEMS magnétiques est probablement les têtes d'enregistrement pour disques durs, fonctionnant sur le principe de la magnétorésistance géante. En microfluidique, les éléments magnétiques servent principalement à la manipulation d'échantillons : pompes, valves, mélangeurs, triage, séparation, etc. [53] Les particules magnétiques (notamment les billes) sont particulièrement utilisées comme support solide pour les tests biologiques [54]. Plus rarement, des fonctions magnétiques peuvent servir à la détection ; TRUMBULL *et al.* ont ainsi intégré sur puce un système de résonance magnétique nucléaire [55]. À l'inverse, les composants optiques sont généralement utilisés pour la détection et plus rarement pour la manipulation d'échantillons [56, 57, 58] ; l'une des possibilités pour la détection intégrée est le couplage avec une fibre optique [59, 60]. Pour finir, on peut remarquer que, parfois, les rôles sont inversés : la microfluidique se met au service de l'optique ; PSALTIS *et al.* ont ainsi détaillé différentes applications d'« optofluidique », faisant ainsi référence aux systèmes optiques contrôlés par des composants microfluidiques [61] ; les fibres optiques microfluidiques ont d'ailleurs été mises en avant en 2004 par la *Technology Review* du M.I.T. comme l'une des « dix technologies émergentes qui vont changer le monde » [62].

### 1.2.2.2 Microfluidique pour le vivant : $\mu$ TAS et laboratoires sur puces

**Historique et définitions.** L'analyse du vivant regroupe trois des quatre raisons majeures, évoquées précédemment, ayant entraîné le développement de la microfluidique ; il est donc naturel qu'elle représente une large part des applications. On considère généralement que le premier dispositif microfluidique d'analyse est celui développé par TERRY *et al.* ; ceux-ci réalisent en 1979 un système miniaturisé d'analyse de gaz par chromatographie sur un substrat de silicium [63]. Ils réduisent les dimensions du dispositif de trois ordres de grandeur, tout en intégrant une colonne de séparation d'1,5 m de long, capable de séparer des mélanges gazeux hydrocarbonés en moins de dix secondes. Ce travail est tellement novateur qu'il faut attendre dix ans pour voir émerger des travaux analogues et la rationalisation du concept : MANZ *et al.* proposent en 1990 la notion de « systèmes miniaturisés d'analyse chimique complète<sup>6</sup> » (*miniaturized total chemical analysis systems*), plus tard abrégé en « microTAS » (*micro total analysis systems*) [10]. Ce terme regroupe les systèmes miniaturisés, possédant généralement une dimension micrométrique, qui intègrent la séquence complète d'analyse d'un échantillon brut jusqu'à la lecture du résultat. Le concept de « laboratoire sur puce » (*lab-on-a-chip, LOC*), plus général, a émergé plus tard, quand il s'est avéré que les technologies de microTAS avaient d'autres applications que l'analyse chimique. La notion de laboratoire sur puce est moins restrictive que celle de microTAS : un laboratoire sur puce ne contient pas nécessairement l'intégralité de la chaîne d'analyse, alors que c'est la définition d'un microTAS ; les laboratoires sur puce de synthèse chimique ne sont par exemple pas des microTAS [64]. On peut définir un laboratoire sur puce comme un dispositif intégré rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions de laboratoire.

**Débuts.** Les premiers travaux des années 1990 consistent en la miniaturisation de dispositifs d'analyse chimique. MANZ *et al.* utilisent des techniques de photolithographie, d'oxydation et de gravure pour réaliser des puces d'électrophorèse capillaire sur silicium [11]. L'application de plus fortes tensions, nécessaire pour rendre l'analyse plus rapide et performante, incite rapidement à se

---

<sup>6</sup>Je préfère cette traduction à celle, souvent rencontrée, d'« analyse totale ». Cette dernière, sans réellement être un barbarisme, me semble toutefois moins adaptée.

tourner vers le verre. HARRISON *et al.* développent ce concept en réalisant, sur une puce en verre, un système intégré d'électrophorèse capillaire, comprenant des pompes électro-osmotiques [65, 66]. Ces travaux novateurs démontrent à l'époque les potentialités des systèmes d'analyse miniaturisés ; de nombreuses équipes de recherche décident alors de développer de tels dispositifs, entraînant de nombreuses avancées technologiques [16].

**Développement récent.** Les travaux sur les laboratoires sur puce et les microTAS ont rapidement trouvé leur place. Des journaux comme *Electrophoresis* ou *Analytical Chemistry* les ont accueilli à bras ouverts. La conférence internationale annuelle microTAS (*International conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences*) existe depuis 1994 [36] ; le journal *Lab on a Chip*, publié par RSC Publishing, a été créé en 2001. Les travaux récents dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes d'analyse complète font régulièrement l'objet de revues de la littérature [12, 67, 68]. L'objectif n'est donc pas ici de réaliser une analyse exhaustive de ces travaux ; il est plutôt de proposer un panorama général et représentatif. Le lecteur, s'il souhaite approfondir ces notions, pourra se rapporter aux références, en prêtant un intérêt particulier aux revues de la littérature, signalées dans la bibliographie par la mention Revue.

**Applications.** La chimie analytique et la biologie moléculaire ont fortement participé au développement de la microfluidique et des laboratoires sur puce. La majorité des applications relève donc de ces domaines. En 2002, AUROUX *et al.* en proposent une revue assez complète, en particulier concernant les opérations standard d'analyse chimique [69]. Des laboratoires sur puce sont actuellement développés pour l'étude de la plupart des molécules et macromolécules biologiques : ADN [70, 71], protéines et peptides [72, 73], cellules [3, 74], anticorps et antigènes [42, 75], sucres [76, 77]. Les applications visées en recherche et développement sont le diagnostic clinique (grippe aviaire [78], cancer [79]), notamment en « point de service », et la recherche pharmaceutique [80] : les techniques miniaturisées permettent de réaliser des criblages parallélisés haut débit pour la découverte de médicament. Les techniques de surveillance biomédicale en point de service sont également généralisées à l'analyse alimentaire et environnementale, afin de contrôler la qualité de la nourriture ou la pollution des cours d'eau [81]. Par ailleurs, une part non négligeable des financements de recherche sur les laboratoires sur puce provient des fonds alloués à la lutte contre le bioterrorisme ; on voit par exemple apparaître des dispositifs de détection du gaz Sarin dans le sang [82]. Les *Sandia National Laboratories* jouent un rôle important dans le domaine de la biodéfense. Pour finir, les laboratoires sur puce ne sont pas limités à l'analyse biologique ; ils peuvent également servir de réacteurs chimiques. Les dimensions réduites des systèmes microfluidiques permettent en effet un meilleur contrôle et une meilleure détection des réactions chimiques, notamment du mélange de réactifs [64, 83].

**Protéomique.** La recherche protéomique est un domaine de recherche post-génomique très actif ; de nombreux travaux menés en microfluidique et sur les laboratoires sur puce sont liés à l'analyse des protéines et de leurs fonctions [73, 84, 85, 86]. La miniaturisation de l'analyse protéomique est motivée par le gain de performance du « triangle analytique » présenté plus haut [15] (p. 12). FREIRE *et al.* identifient quatre fonctions majeures indispensables à la protéomique sur puce : le traitement chimique, la préconcentration et le nettoyage, les séparations chimiques et les interfaces avec la spectrométrie de masse (pour analyse) [87]. Ils rappellent eux aussi l'importance (et la difficulté) de développer les différents modules et de les intégrer sur un même support. Les opérations typiques réalisées sur puce sont la séparation rapide et l'analyse de digestes de protéines [88] ; des résultats très encourageants sont obtenus, notamment par LI *et al.* : cette équipe a développé une réelle

plate-forme protéomique d'analyse SPE-CE-MS<sup>7</sup> de digests de protéines ; la plate-forme, équipée d'une dispense d'échantillons automatisée, est capable de traiter douze échantillons par heure [89].

**Laboratoires sur puce commercialisés.** Malgré les nombreux efforts des laboratoires de recherche, les laboratoires sur puce ayant atteint la maturité nécessaire à leur commercialisation sont rares. STMicroelectronics (<http://www.st.com>) a développé une plate-forme générique, baptisée In-Check, basée sur une puce en silicium<sup>8</sup>. Elle inclut toutes les fonctions nécessaires à l'identification de séquences données d'oligonucléotides, y compris la PCR et une biopuce intégrée. ST a ensuite travaillé avec plusieurs laboratoires spécialisés pour développer des applications particulières basées sur In-Check. Ainsi, ST et la société finlandaise Mobidiag ont lancé en septembre 2005 un laboratoire sur puce pour le diagnostic rapide de bactéries à l'origine de la septicémie<sup>9</sup>. En mars 2008, ST annonce la commercialisation d'une nouvelle application, réalisée en collaboration avec Veredus Laboratories<sup>10</sup>. La puce, nommée « VereFlu », a pour objectif le diagnostic rapide de la grippe (*flu*) en point de service ; elle permet de détecter les principaux types de grippe, y compris la souche H5N1 de la grippe aviaire, en un seul test. La société Agilent Technologies (<http://www.agilent.com>), quant à elle, a développé un système d'identification de protéines, couplant une puce de chromatographie liquide haute performance à un spectromètre de masse (HPLC-Chip/MS)<sup>11</sup>. La puce microfluidique a la dimension d'une lame de microscope et intègre un colonne de préconcentration, une colonne analytique et une pointe d'électronébulisation<sup>12</sup>.

### 1.2.2.3 Intégration des briques technologiques en microTAS

**Briques technologiques.** Les laboratoires sur puce destinés à l'analyse biologique sont des assemblages de briques technologiques pouvant être classées en familles, dont principalement : la préparation d'échantillon (pouvant inclure la concentration), la manipulation (des fluides et des analytes, y compris le mélange), la réaction (avec divers réactifs chimiques ou biologiques), la séparation chimique (chromatographie, électrophorèse) et la détection (fluorescence, spectrométrie de masse). Le principal défi consiste en l'assemblage final de ces briques technologiques de façon homogène<sup>13</sup>. De nombreux efforts ont ainsi été faits afin d'intégrer les dispositifs de détection sur puce : la détection représente une étape incontournable et critique dans tout dispositif d'analyse. Les trois techniques principales de détection utilisées dans les laboratoires sur puce sont les méthodes optiques, électrochimiques et d'analyse de masse [56, 91]. Les deux premières peuvent être intégrées dans les microsystèmes, à l'instar des lasers à cavité verticale émettant par la surface (*vertical cavity surface emitting lasers*, VCSEL) développés par THRUSH *et al.* [92]. Les spectromètres de masse, quant à eux, ne peuvent pas être intégrés sur puces ; c'est donc principalement l'interfaçage qui a fait l'objet de développements.

<sup>7</sup>*Solid-phase extraction, capillary electrophoresis and mass spectrometry* : extraction en phase solide, séparation en électrophorèse capillaire et analyse par spectrométrie de masse.

<sup>8</sup><http://www.st.com/stonline/products/technologies/labonchip/technolo.htm>

<sup>9</sup><http://www.st.com/stonline/press/news/year2005/fra/t1695ffra.htm>

<sup>10</sup><http://www.st.com/stonline/stapp1/cms/press/news/year2008/t2277.htm>

<sup>11</sup><http://www.chem.agilent.com/EN-US/PRODUCTS/INSTRUMENTS/MS/HPLC-CHIPMSPROTEINIDENTIFICATIONSOLUTION/Pages/default.aspx>

<sup>12</sup>Vidéo de présentation : <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lc/1200serieshplc-chipmssystem/pages/gp15389.aspx>

<sup>13</sup>Des assemblages complexes ne sont pas toujours nécessaires : JACOBSON *et al.* ont par exemple réalisé, sur une puce simple en forme de croix, la séparation électrophorétique d'un échantillon binaire en moins d'une milliseconde ; cela représente un gain de deux ordres de grandeur par rapport à la même opération en capillaires [90].

**Intégration.** MINC et VIOVY distinguent l'intégration spatiale, au sens de l'intégration à très grande échelle rencontrée en micro-électronique (*very large scale integration*, VLSI), et l'« intégration verticale<sup>14</sup> », c'est à dire le regroupement de fonctionnalités différentes [93]. Les puces réalisées par QUAKE et son équipe, contenant des milliers de valves miniaturisées fonctionnant en parallèle, appartiennent par exemple à la première catégorie [47]. À l'heure actuelle, beaucoup de briques technologiques de base ont été développées ; cependant, l'assemblage de dispositifs complètement intégrés est lent ; plusieurs dispositifs « réellement microTAS » ont néanmoins été présentés ces dernières années.

**MicroTAS d'analyse génomique.** LIU *et al.* ont développé une puce complètement intégrée et automatisée comprenant mélangeurs, valves, pompes, canaux, chambres et une biopuce à ADN [94]. Ce dispositif permet d'effectuer toutes les étapes, de la préparation d'échantillon brut à la détection électrochimique, en passant par la PCR. La puce doit néanmoins être insérée dans un instrument fournissant l'énergie électrique, l'interface de lecture, un élément Peltier et un aimant permanent ; ces fonctions sont cependant, à défaut d'être embarquées dans la puce, assez légères pour assurer la portabilité de l'instrument. La puce est suffisamment bas-coût pour être jetable : cela permet à la fois de s'affranchir de tout problème de contamination croisée et de simplifier son design, par exemple en utilisant des valves en paraffine à usage unique. L'analyse totale dure moins de trois heures (dont 90 min de PCR et une heure d'hybridation ADN).

**MicroTAS d'analyse protéomique.** L'analyse protéomique est plus difficile à miniaturiser dans son intégralité, car elle comprend souvent une étape finale d'analyse utilisant un gros instrument. TRUMBULL *et al.* sont toutefois parvenus à réaliser un véritable microTAS d'analyse protéomique en intégrant, sur une puce microfluidique, un dispositif d'électrophorèse capillaire couplé à une détection par résonance magnétique nucléaire intégrée [55]. Bien qu'il ait fallu faire des compromis en terme de sensibilité, ces travaux restent l'un des meilleurs exemples de preuve de concept des microTAS pour la protéomique. D'autres résultats, tels que ceux de MOON *et al.*, méritent également d'être soulignés. Ces derniers ont réalisé une puce utilisant une technique microfluidique discrète (électromouillage sur diélectrique) [95] ; la puce permet d'effectuer la préparation d'échantillon et le mélange avec les réactifs. Les données sont ensuite collectées par un spectromètre de masse.

**Compatibilité et connectivité.** L'assemblage des briques technologiques ne doit pas faire oublier que le dispositif final doit être connecté au monde extérieur [96]. Les systèmes microfluidiques basés sur la centrifugation cumulent sur ce point plusieurs avantages [97]. Outre les qualités intrinsèques du dispositif d'analyse (parallelisme, reproductibilité, haut débit) [98], certains « laboratoires sur CD » sont directement utilisables sur des lecteurs CD ou DVD commerciaux : le laser, habituellement utilisé pour la lecture des données informatiques, sert alors de source d'excitation de fluorescence [99]. Ces dispositifs constituent un excellent exemple de volonté de compatibilité des briques technologiques avec un matériel existant et répandu.

**Conclusions.** Le développement de briques technologiques assemblées ne doit pas faire oublier que l'une des particularités des microTAS est l'analyse d'échantillons bruts : salive, urine, sang, etc. Cette caractéristique, destinée à faciliter l'analyse par le manipulateur, implique néanmoins des étapes de préparation d'échantillons ; ces étapes sont nécessaires afin d'extraire du liquide brut les molécules d'intérêt et d'en retirer les éventuelles espèces parasites pour l'analyse.

---

<sup>14</sup>Ce terme me paraît mal choisi : « intégration verticale » fait davantage penser à un assemblage de plusieurs briques, empilées pour former un dispositif hybride en volume, qu'à un dispositif planaire intégrant des fonctions différentes.

### 1.2.2.4 Préparation d'échantillons

**Échantillons non idéaux.** Le maillon faible des systèmes de détection microfluidiques reste la préparation d'échantillon [37]. La nécessité d'intégrer des dispositifs de préparation d'échantillons découle directement du concept de microTAS. La plupart des laboratoires sur puces sont testés avec des échantillons idéaux, préparés spécifiquement pour que la caractérisation soit la meilleure possible. Dans les microTAS, l'analyse est effectuée à partir d'un échantillon brut ; dans le domaine de la santé, il peut s'agir de sang, d'urine, de sérum ou de salive. Les échantillons réels, non idéaux, doivent nécessairement être traités et préparés pour l'analyse [100]. Les recherches se concentrent généralement sur les échantillons sanguins [101], notamment provenant de sérum ou de plasma [102]. LIMA *et al.* ont par exemple étudié l'écoulement et le profil de vitesse d'un échantillon de sang dans un canal PDMS [103]. CREVILLÉN *et al.* ont publié en 2007 une revue de la littérature consacrée à l'analyse d'échantillons réels dans des dispositifs microfluidiques d'analyse biochimique, environnementale et nutritionnelle [104] ; ils insistent notamment sur l'importance de la préparation des échantillons. Par exemple, certaines conditions biologiques, nécessaires à la manipulation des échantillons, sont incompatibles avec les limites des instruments ; ainsi, le tampon phosphate saline (*phosphate buffer saline*, PBS) est très utilisé en biologie, mais les sels doivent être éliminés de la solution pour analyser les échantillons par spectrométrie de masse.

**Familles de techniques.** En 2002, LICHTENBERG *et al.* dressent une revue assez complète sur les travaux réalisés dans le domaine de la préparation d'échantillon dans des microdispositifs [100]. Six ans après, des progrès ont été effectués, mais la lecture en reste intéressante. Les auteurs classifient les techniques de préparation d'échantillon en quatre grandes familles : la dérivatisation (conjugaison de molécules ou macromolécules, marquage), les traitements biochimiques (amplification par PCR, digestion enzymatique), la séparation (dialyse, électrophorèse, lyse de cellule) et la préconcentration (extraction en phase solide, isotachophorèse).

**Microsystèmes de préparation d'échantillons.** L'objectif final est l'intégration de fonctions de préparation d'échantillons dans un dispositif complet d'analyse ; LIU *et al.* ont ainsi réalisé un microTAS d'analyse ADN comprenant notamment une séquence de capture, préconcentration, purification, lyse de cellules et PCR [94]. Ces dispositifs complets sont cependant encore peu répandus ; on rencontre néanmoins des microsystèmes entièrement dédiés à la préparation d'échantillons [105]. LEGENDRE *et al.* ont par exemple réalisé l'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de sang et son amplification, sur la même puce, par PCR [14] ; la détection n'est pas intégrée au dispositif. Une large part des microsystèmes de préparation d'échantillon est dédiée à la préparation et l'amplification d'ADN à partir de cellules [106] ; cependant, avec l'avènement de l'ère post-génomique, l'identification des protéines (notamment par spectrométrie de masse) a entraîné le développement de systèmes de préparation d'échantillons spécialisés pour la protéomique.

**Spectrométrie de masse.** L'une des méthodes d'analyse les plus utilisées pour la protéomique est la spectrométrie de masse [87] ; sa sensibilité, notamment aux sels, nécessite cependant plusieurs étapes de préparation d'échantillon (préconcentration, désalage) [107]. LION *et al.* ont ainsi développé un élément intégré de désalage et préconcentration de protéines, dont l'objectif est de servir d'interface entre une puce d'injection et un spectromètre de masse [108]. Les protéines sont adsorbées sur une membrane, puis éluées directement dans la solution de nébulisation ; elles sont ainsi à la fois désalées et préconcentrées. Cette approche fonctionne pour de nombreuses molécules (peptides et protéines) ; la même équipe a ensuite intégré ce système sur une puce microfluidique et a obtenu une préconcentration encore plus efficace [109]. GUSTAFSSON *et al.* ont réalisé cette préparation

sur un disque compact Gyros modifié [110] ; cependant, seule la préparation d'échantillon est réellement effectuée sur le CD ; celui-ci est ensuite découpé pour être introduit dans un spectromètre de masse classique. LUQUE-GARCIA *et al.* identifient trois étapes principales dans la préparation d'échantillons pour l'identification, par spectrométrie de masse, de marqueurs biologiques<sup>15</sup> provenant de sérum ou de plasma [102]. La première étape rassemble la collecte de l'échantillon, sa manipulation et sa conservation. La seconde étape est la réduction de la concentration des protéines les plus abondantes, dont les dix premières constituent près de 90% en masse du protéome du sérum ; elles gênent ainsi la détection des protéines moins abondantes. La dernière étape est celle qui est souvent intégrée en dispositif microfluidique : le fractionnement de l'échantillon en sous-ensembles, notamment en les sélectionnant en fonction de leur affinité avec un support particulier. Il s'agit généralement d'extraction en phase solide ou de chromatographie en phase liquide.

**Extraction en phase solide.** La préparation d'échantillon requiert généralement la rétention des objets biologiques d'intérêt sur une phase solide permettant leur extraction. Des protéines peuvent ainsi être adsorbées sur une phase solide hydrophobe (matériau poreux, microbilles tassées). Une fois les molécules extraites, il est nécessaire de les décrocher ; cette étape est par exemple réalisée par des injections de solvant comme l'acétonitrile. Ces solvants sont cependant susceptibles de dénaturer les objets biologiques ; des méthodes de décrochage doux sont préférables.

### 1.2.3 Conclusions

**Enjeux.** L'avènement de l'« ère post-génomique » a provoqué la réorientation de tout un domaine de recherche vers des systèmes plus complexes en biologie moléculaire ; protomique, cellomique et biologie systémique sont les enjeux actuels du vivant ; les principales applications concernent le diagnostic et la recherche pharmaceutique. Tous ces domaines sont demandeurs de technologies nouvelles permettant d'obtenir plus de résultats, plus fiables, plus facilement, plus vite et moins cher. Cette demande a entraîné le développement de systèmes (notamment d'analyse) miniaturisés, intégrés, portables et bas-coût.

**Microfluidique.** La réduction des dimensions des systèmes d'analyse promet des économies de réactifs, d'échantillons et de temps ; la théorie prédit des systèmes plus performants, dont la fabrication à grande échelle réduit les coûts. La microfluidique a principalement émergé des besoins grandissants en systèmes miniaturisés pour le vivant. La réduction d'échelle entraîne cependant de nouvelles prédominances d'effets physiques comme la capillarité, dues notamment à la prépondérance des surfaces et l'augmentation du rapport surface sur volume. La microfluidique est un domaine de recherche particulièrement dynamique ; les développements technologiques concernent aussi bien les fonctions fluidiques de base, comme le mélange, que des fonctions plus spécialisées.

**Laboratoires sur puce.** De la réduction des systèmes d'analyse a émergé l'idée d'intégrer sur un dispositif miniaturisé « microTAS » l'ensemble de la chaîne d'analyse, de l'échantillon brut au résultat. Le développement de ces laboratoires complets sur puce est un domaine très interdisciplinaire ; il fait intervenir la conception de briques technologiques individuelles, mais également leur intégration cohérente sur des substrats miniaturisés. L'une des étapes incontournables des microTAS est la préparation des échantillons non idéaux, indispensable afin de les rendre prêts à être analysés. Le développement des briques technologiques passe notamment par l'étude de nouveaux principes actifs, compatibles avec une intégration facile dans les systèmes miniaturisés. C'est dans ce contexte

---

<sup>15</sup>Les marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, sont définis par ADKINS *et al.* comme des « protéines qui subissent un changement de concentration ou d'état en fonction d'un processus biologique spécifique ou d'une maladie » [111].

que nous avons souhaité explorer les possibilités des polymères actifs, en particulier le PNIPAM, pour des applications en laboratoires sur puce.

## 1.3 État des possibilités et applications du PNIPAM

### 1.3.1 État des connaissances sur le PNIPAM

#### 1.3.1.1 Introduction aux polymères

**Polymères.** Un polymère est une macromolécule, en général organique, constituée de molécules élémentaires ayant la même nature chimique, les monomères. La réaction de polymérisation conduit à la formation de macromolécules, ayant une structure tridimensionnelle, par établissement de liaisons covalentes entre les monomères. Un polymère actionnable (*stimuli-responsive polymer*) est un polymère subissant une modification de ses propriétés physiques sous l'action d'un stimulus extérieur : pH, température, force ionique, champ électrique, rayonnement lumineux, etc.

#### 1.3.1.2 Poly(N-isopropylacrylamide)

**PNIPAM.** Le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM, FIG. 1.4, CAS : 25189-55-3) est un polymère subissant une transition macromoléculaire réversible, d'un état hydrophile à un état hydrophobe, autour de sa température inférieure critique de solution (*lower critical solution temperature, LCST*) [112] ; cette transition est rapide et située entre 30 °C et 35 °C [113]. Sous sa LCST, le PNIPAM est soluble dans l'eau, visqueux et gonflé. Au-delà de sa température de transition, il devient hydrophobe et insoluble dans l'eau ; il expulse l'eau et se replie sur lui-même afin de présenter une surface minimale à l'eau. Ce changement de conformation le rend opaque, solide et réduit drastiquement son encombrement stérique [114].

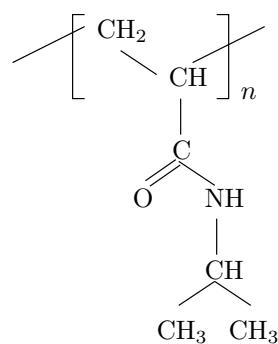


FIG. 1.4 – Molécule de *N*-isopropylacrylamide. La structure entre crochets constitue, en se répétant, le squelette des chaînes du polymère.

**Production scientifique.** En 1991, H. SCHILD dresse une revue extrêmement complète des travaux effectués sur le PNIPAM [115]. Il commence cette revue de 87 pages par un diagramme retraçant le nombre de publications concernant le PNIPAM entre 1955 et août 1991 (FIG. 1.5, en insert). Avec un total d'environ 300 références, il qualifie la croissance du nombre de publications de « plutôt explosive ». En mai 2008, la même recherche effectuée selon le même protocole<sup>16</sup> donne un total de

<sup>16</sup>SCHILD a effectué sa recherche sur les *Chemical Abstracts online Search* (CAS) le 7 août 1991 ; sa recherche était basée sur 25189-55-3 (identifiant CAS du polymère) ou 2210-25-5 (identifiant CAS du monomère) ou [polymer? et

3645 références et une progression réellement « explosive », comme le montre la FIG. 1.5. Face à cette littérature prolifique, il est impossible d'être exhaustif sur les travaux effectués en rapport avec le PNIPAM ; dans la suite de cette section, je me concentre donc sur les travaux les plus significatifs et ceux proches du domaine d'application qui intéressent nos travaux.

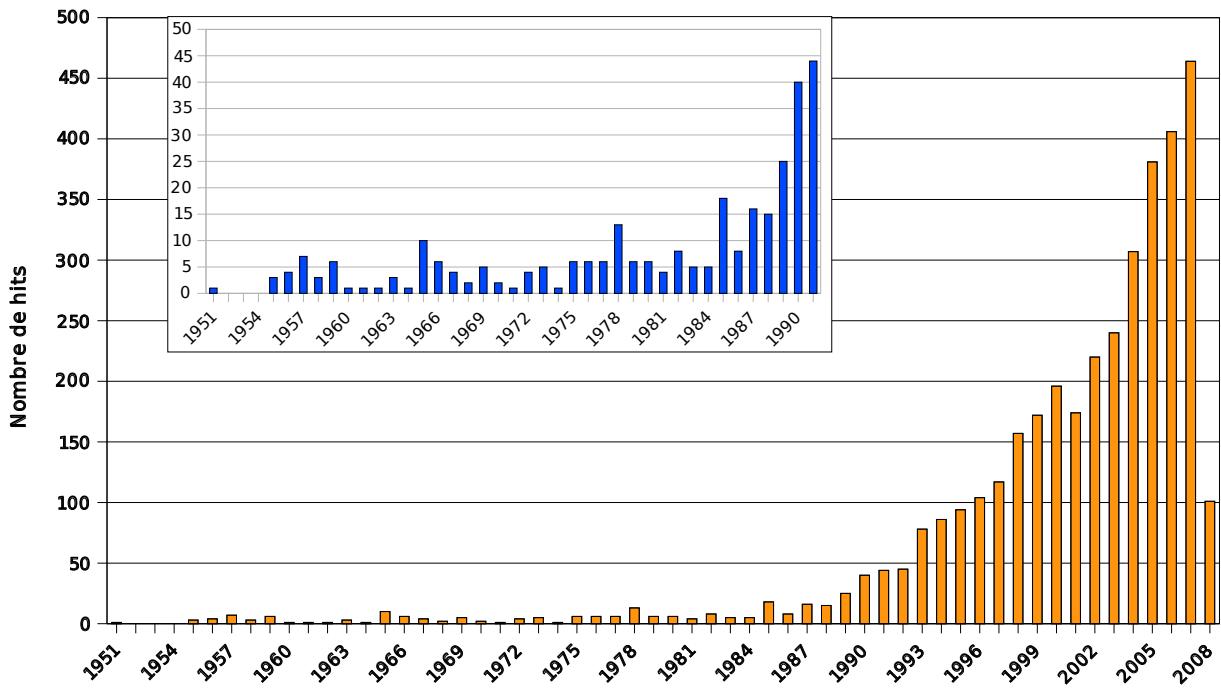


FIG. 1.5 – Évolution annuelle du nombre de références indexées dans CAS concernant le PNIPAM.

**Polymérisation.** Le *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) est un monomère basé sur l'acrylamide ; il peut être polymérisé en PNIPAM de nombreuses façons : initiation par des radicaux libres en solution organique, initiation redox en solution aqueuse, polymérisation ionique, etc. [115, 116] ; la polymérisation par plasma est plus récente [117]. La polymérisation peut être effectuée en solution ou sur une surface ; dans ce cas, il est généralement greffé par l'intermédiaire d'une couche de type silane. Le PNIPAM peut également être fixé sur du polystyrène, du PET (polyéthylène téréphthalate) [118] et du PEG (polyéthylène glycol) [119]. Je détaille au chapitre 2 les mécanismes et le protocole de polymérisation que nous avons utilisée.

### 1.3.1.3 Bascule conformationnelle

**Mécanisme réversible.** La principale caractéristique du PNIPAM, qui en fait un polymère très utilisé, est sa transition d'un état gonflé et hydrophile, sous sa température de transition, à un état replié et hydrophobe au-delà (FIG. 1.6). En 1968, HESKINS *et al.* attribuent cette « transition de phase » à un effet entropique, dû à la formation de liaisons hydrophobes [112]. GRAZIANO *et al.* comparent la transition du PNIPAM à la renaturation à froid des petites protéines globulaires [120], considérée comme une transition moléculaire du premier ordre. ESTÈVE *et al.* modélisent en 2007 les mécanismes de transition du PNIPAM ; en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (*density*

*N*-isopropylacrylamide] sur les bases de données CA et CAOLD. J'ai effectué la recherche avec SciFinder Scholar le 13 mai 2008 sur la base de données CAplus en utilisant les identifiants CAS du polymère et du monomère. Les doublons ont été enlevés automatiquement.

*functional theory*, DFT), ils montrent que le phénomène de transition du PNIPAM dépend fortement des conditions de synthèse du polymère, notamment de sa tacticité [121]. La transition du PNIPAM a été observée par de nombreuses techniques de caractérisation, notamment par microbalance à quartz (*quartz crystal microbalance*, QCM) [122, 123, 124, 125].

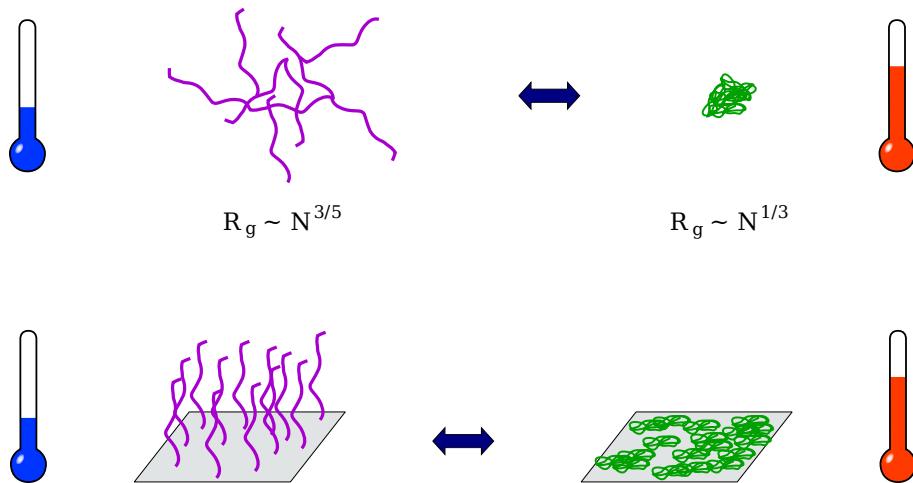


FIG. 1.6 – Schéma de la transition du PNIPAM en solution et sur une surface.  $R_g$  indique le rayon de giration.

**Modification de la LCST.** La température de transition du PNIPAM (LCST) dépend fortement des conditions de polymérisation [126] ; PLUNKETT *et al.* montrent en 2006 l'influence du poids moléculaire et de la densité de greffage [127]. Des facteurs extérieurs influent également sur la LCST, comme le pH [128], la nature du solvant [129] et les sels présents dans la solution [130, 131]. Il est possible de modifier la température de transition en combinant le PNIPAM à d'autres polymères comme l'acrylamide [132] ; ROLLASON *et al.* ont ainsi formulé un copolymère NIPAM/*N*-t-butylacrylamide (NTBAM) avec une LCST de 8 °C [133]. D'autres équipes ont étudié plusieurs copolymères de NIPAM et remarqué que leur LCST augmente lorsque la fraction de PNIPAM diminue [134].

**Composante thermosensible.** La copolymérisation de NIPAM avec d'autres monomères permet de synthétiser des gammes de copolymères thermosensibles ayant des températures de transition différentes [134]. L'association du NIPAM avec d'autres monomères est souvent utilisée pour leur adjoindre un comportement thermosensible [135, 136] ; il est ainsi possible de combiner les caractéristiques de plusieurs polymères : un copolymère NIPAM-acide méthacrylique est sensible à la fois à la température et au pH [137]. Cette démarche consistant à greffer le NIPAM sur un micro-objet pour le rendre thermosensible est aussi utilisée dans les applications biologiques du PNIPAM : on conjugue par exemple le PNIPAM à des cellules, des protéines ou de l'ADN.

## 1.3.2 Aperçu des applications du PNIPAM

### 1.3.2.1 Applications en optique

**Diffractio**n. Les propriétés originales du PNIPAM permettent d'envisager son intégration dans des systèmes nécessitant des actionneurs réversibles ; c'est notamment le cas en optique. WEISSMAN *et al.* explorent ainsi l'intégration de PNIPAM dans un réseau colloïdal cristallin (*crystalline colloidal*

*array, CCA*). Les particules de PNIPAM gonflé, organisées en réseau cubique centré, n'entraînent qu'une faible diffraction de Bragg des rayonnements infrarouge, visible et ultraviolet, tandis qu'un réseau de PNIPAM replié les diffracte beaucoup plus. Ils étudient d'autre part l'intégration d'un CCA de sphères de polystyrène dans un hydrogel de PNIPAM : le changement conformationnel du PNIPAM entraîne un changement de la constante de réseau ; la température permet ainsi de contrôler la longueur d'onde diffractée sur tout le spectre visible [138].

**Filtrage.** Le repliement du PNIPAM lors de sa transition entraîne également une modification optique : il passe d'un état transparent à un état opaque ; il est envisageable de développer des filtres à base de PNIPAM. MIAS *et al.* ont ainsi étudié la transmission d'un signal à 365 nm à travers une couche de PNIPAM (FIG. 1.7) ; ils observent une atténuation de 38 dB entre le PNIPAM gonflé et le PNIPAM replié.

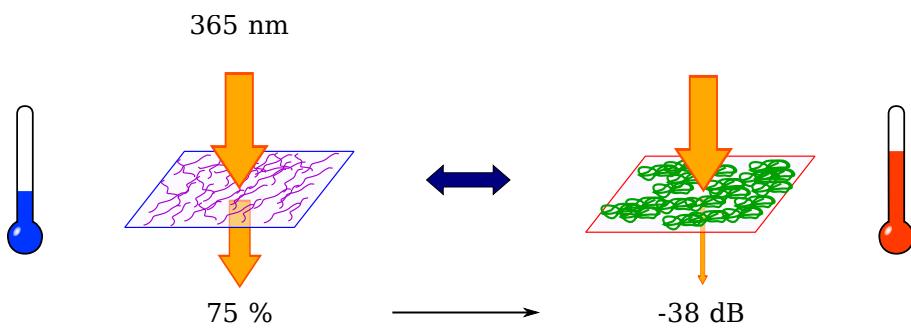


FIG. 1.7 – Schéma d'interaction entre le PNIPAM et un faisceau optique. Pour  $T < LCST$ , le PNIPAM est transparent et laisse passer la majorité du signal lumineux. À  $T > LCST$ , le PNIPAM se replie et devient opaque, provoquant une forte atténuation du signal (ordres de grandeur d'après [139]).

### 1.3.2.2 Applications biomédicales

**Introduction.** Le principal domaine d'application du PNIPAM est celui du vivant et de la recherche biomédicale [140] : les chercheurs ont rapidement réalisé l'intérêt que représentait sa transition réversible, d'autant plus à une température proche de celle du corps humain. Les principaux travaux concernent les tests immunologiques (notamment la précipitation et la séparation), l'administration de médicaments (*drug delivery*), la culture de cellules et la conjugaison avec toutes sortes d'objets biologiques, tels que des protéines.

**Tests immunologiques.** En 1987, K. AUDITORE-HARGREAVES, N. MONJI *et al.* rapportent l'utilisation de PNIPAM comme phase dans un immuno-test [134, 141]. Les anticorps, greffés sur des chaînes de PNIPAM, réagissent avec les antigènes ; un deuxième anticorps fluorescent permet la visualisation ; en augmentant ensuite la température, la « précipitation thermique » a lieu : des particules de PNIPAM non soluble se forment et concentrent la fluorescence, qui est proportionnelle à la quantité d'antigènes en solution (FIG. 1.8). Les anticorps testés n'ont pas d'influence sur la LCST [134]. Cette technique a ensuite été étendue à un immuno-test sur membrane [142] et la formulation du polymère a été perfectionnée [143]. L'avantage des tests immunologiques en solution par rapport aux tests sur supports est qu'il n'y a pas de problème de limitation de la diffusion [144]. La précipitation par affinité repose sur des bioconjugués thermosensibles [145, 146, 147] ; les objets biologiques utilisés sont généralement des anticorps, plus rarement des protéines [148]. Une fois la

réaction spécifique effectuée, le polymère est stimulé afin d'entraîner la précipitation ; il peut s'agir de PNIPAM ou de copolymères de NIPAM [149]. Par ailleurs, le PNIPAM est aussi utilisé pour la concentration de virus [150] et la purification d'anticorps [151].

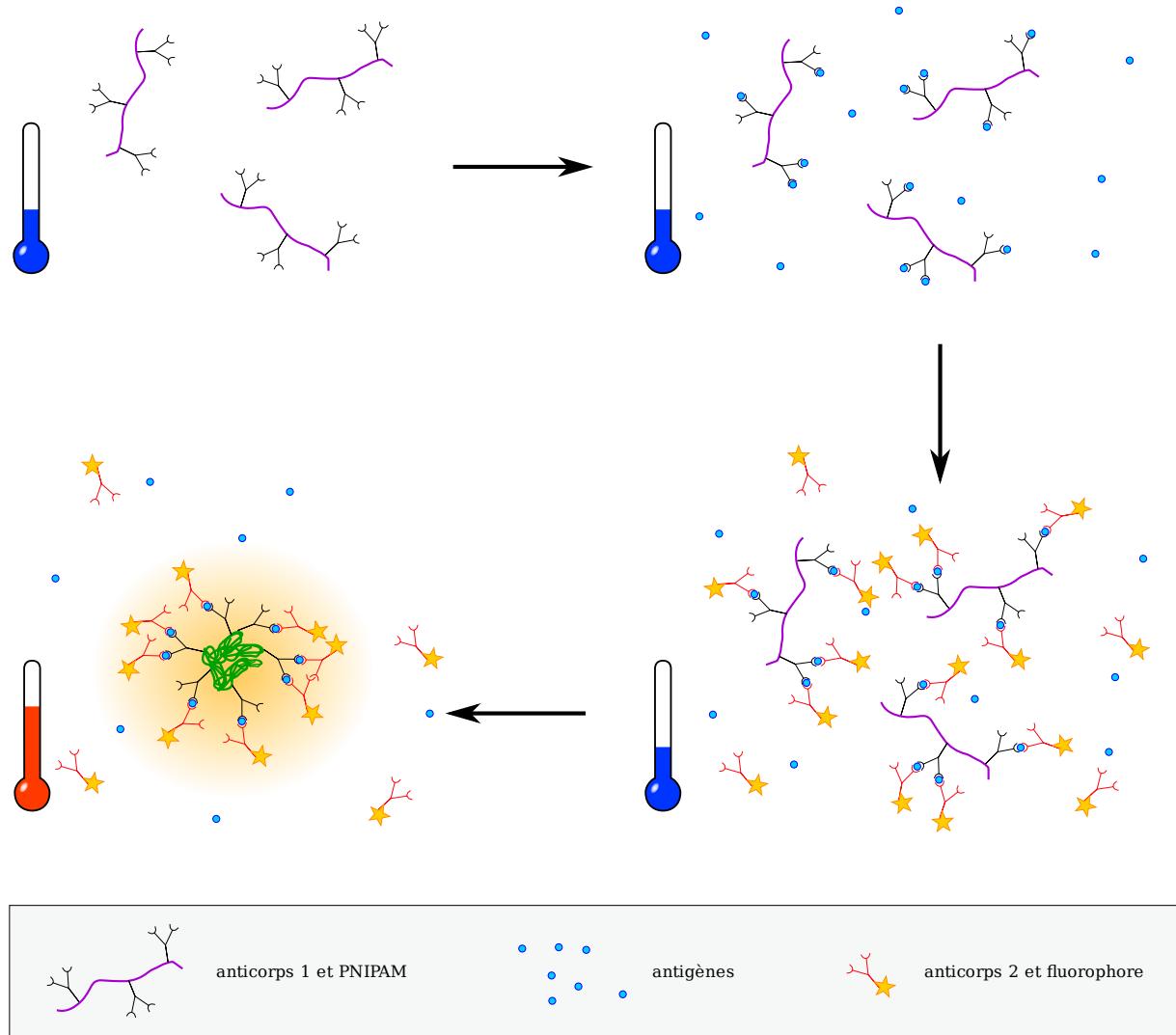


FIG. 1.8 – Schéma d'un immuno-test utilisant la précipitation par affinité basée sur un bioconjugué de PNIPAM. Des anticorps sont conjugués à du PNIPAM ; lorsqu'ils sont mis en présence d'antigènes complémentaires, ils s'accrochent spécifiquement. Un autre anticorps complémentaire de l'antigène, marqué avec un fluorophore, sert à révéler l'interaction. L'augmentation de la température entraîne le repliement du PNIPAM et la concentration de la fluorescence [134].

**Administration de médicaments.** La transition du PNIPAM autour de 32 °C permet de piéger des solutés dans des capsules de PNIPAM, progressivement activées par la température du corps humain [152, 153, 154, 155]. Des études *in vivo* d'administration d'héparine, un anticoagulant, sont réalisées dès 1995 [156]. LIN *et al.* ont également conçu un pansement pour blessures utilisant le PNIPAM pour l'administration de médicament [157]. Les résultats prometteurs d'encapsulation et libération de solutés ont suscité des études sur les effets de l'environnement (éventuellement physiologique) sur les propriétés du PNIPAM et sa LCST [131] : les sels ont une tendance générale à

diminuer la LCST ; chaque surfactant a une influence particulière. La salive et les sécrétions gastro-intestinales ont probablement un effet limité sur la LCST du PNIPAM, rendant ainsi possible son utilisation pour l'ingestion orale de médicaments. L'influence des sels sur la LCST a d'ailleurs été mise à profit pour concevoir un composé incluant des sels qui retardent la distribution de médicament dans le milieu [158].

**Culture de cellules.** Les cellules ont une affinité particulière pour les surfaces hydrophobes ; à l'inverse, les surfaces hydrophiles ont tendance à les repousser. Il est donc intéressant d'utiliser les surfaces de PNIPAM comme substrat de culture de cellules [159, 160]. Les conditions environnementales nécessaires à la culture de cellules humaines, notamment la température de 37 °C, sont compatibles avec l'état replié du PNIPAM ; par ailleurs, la couche chimique de PNIPAM sert d'interface souple entre la surface et les cellules. Celles-ci s'accrochent sur le PNIPAM hydrophobe et y prolifèrent ; quand la culture arrive à terme, une baisse de la température sous la LCST du PNIPAM entraîne le décrochage des cellules (FIG. 1.9) ; cette libération douce permet de s'affranchir des méthodes de digestion enzymatique à base de trypsine [161]. Les cellules cultivées sur PNIPAM conservent des caractéristiques fonctionnelles très proches de celles des cellules originales ; elles peuvent également conserver des phénotypes différenciés [162, 163] ; au contraire, l'utilisation de trypsine peut endommager les cellules ou perturber leur métabolisme [164, 165]. Il est même possible de dessiner des motifs pour réaliser une coculture de deux types de cellules [166]. Le NIPAM peut être associé à un ou plusieurs autres monomères pour former des substrats de culture copolymères [167, 168], parfois recouverts d'une couche intermédiaire de protéines [169]. OKANO *et al.* ont par ailleurs démontré que le métabolisme des cellules a une influence sur le détachement des cellules [170].

**Conjugaisons.** Le PNIPAM est conjugué avec de multiples objets biologiques, pour leur conférer un caractère thermosensible. C'est par exemple le cas de l'ADN [171], dont le conjugué est notamment utilisé pour la séparation d'enzymes [172] ; des copolymères de NIPAM sont également utilisés comme vecteurs d'ADN [173, 174]. Les enzymes comme la trypsine peuvent, elles aussi, être conjuguées à du PNIPAM [175, 176, 177], tout en conservant une grande partie de leur activité [178]. À l'inverse, SIGOLAEVA *et al.* ont montré qu'une enzyme incluse de façon covalente dans la matrice d'un gel de PNIPAM voit son activité réduite au-delà de la LCST [179].

**Protéines.** Le PNIPAM peut aussi être conjugué à des protéines, qui n'ont généralement pas d'influence sur la LCST [180]. Le PNIPAM a ainsi été fixé à des macromolécules de streptavidine près du site de reconnaissance de la biotine ; la reconnaissance a lieu normalement sous la LCST ; au-dessus de la LCST, le PNIPAM s'effondre et bloque la formation du lien streptavidine-biotine [181]. La même équipe a plus tard réussi à utiliser le PNIPAM pour contrôler thermiquement l'accrochage et le décrochage de biotine sur la streptavidine [182]. Par ailleurs, le PNIPAM peut être utilisé comme support d'adsorption de protéines, de la même manière que pour les cellules [119] ; cela permet d'envisager des applications en préparation d'échantillons ou en purification de protéines [183]. Plusieurs équipes ont étudié l'accrochage de protéines fluorescentes sur du PNIPAM [184, 185] ou des copolymères de NIPAM [186], y compris sur des surfaces mobiles [187].

**Autres usages.** Le PNIPAM est utilisé pour des travaux plus originaux, tel que dans le domaine de la neurochirurgie intravasculaire : le PNIPAM a ainsi été étudié *in vivo* pour obstruer des vaisseaux sanguins et générer une embolie [188]. MATSUBARA *et al.* ont utilisé ses propriétés thermiques pour préconcentrer du phosphate et le doser optiquement. La contraction d'un gel de PNIPAM au-dessus de la LCST permet de bloquer la diffusion d'espèces dans ce gel, comme le glucose ou l'insuline [189].

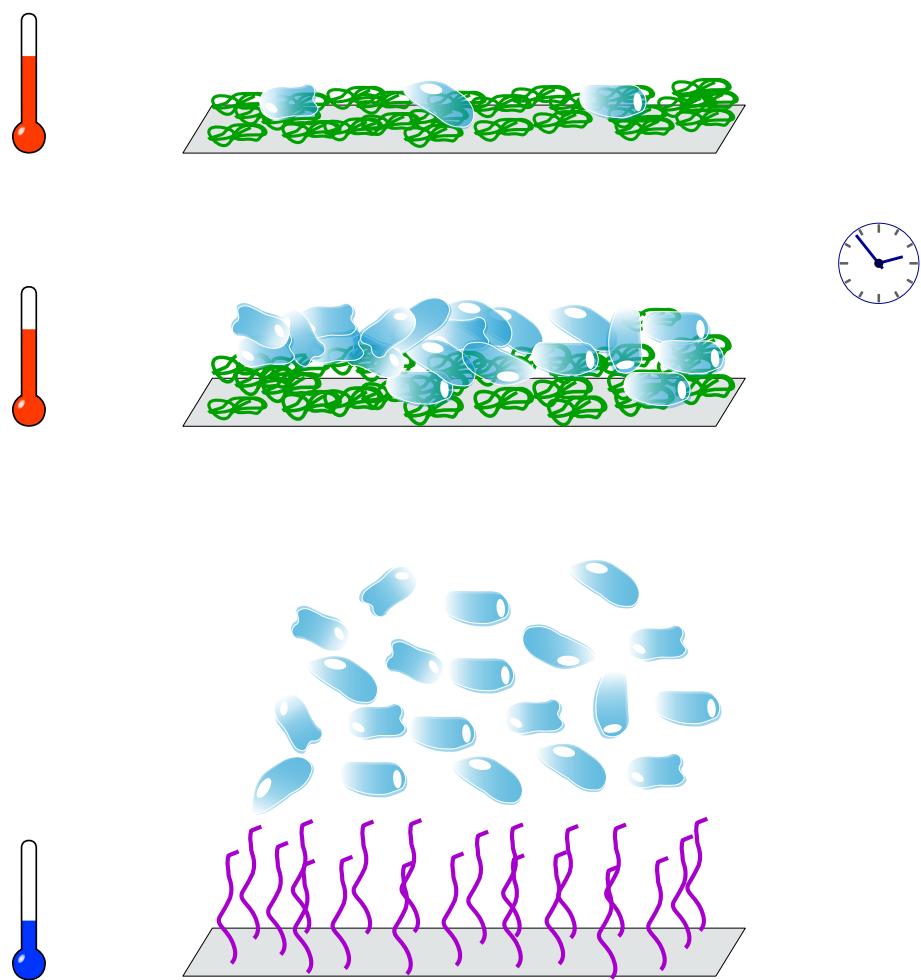


FIG. 1.9 – Culture et libération douce de cellules sur des couches de PNIPAM.

Par ailleurs, le PNIPAM a ouvert la voie de la séparation par chromatographie thermosensible, liquide [190, 191] ou par exclusion de taille [192].

### 1.3.3 Conclusions

**PNIPAM.** Le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est un polymère thermosensible ; il subit, entre 30 et 35 °C, une transition réversible. Sous sa température de transition (LCST), il est hydrophile et gonflé en solution aqueuse ; au-delà, il devient hydrophobe et se recroqueville sur lui-même. Il est possible d'ajuster la LCST en combinant le NIPAM à d'autres monomères, en réalisant une copolymérisation. Le comportement original du PNIPAM en fait un polymère étudié pour de nombreuses applications. En optique, on envisage des applications telles que le filtrage et le réglage de longueur d'onde. Le principal domaine d'application du PNIPAM reste cependant les sciences du vivant ; le polymère est souvent conjugué à des objets biologiques (anticorps, enzymes, etc.) pour les rendre thermosensibles ; il est ainsi possible de réaliser des immuno-tests utilisant la précipitation par affinité basée sur un bioconjugué de PNIPAM. Le PNIPAM est aussi utilisé comme coque autour de solutés, pour des applications en administration de médicaments. Enfin, les couches de PNIPAM, hydrophobes à la température du corps humain, servent de supports de culture de cellules et permettent une libération douce sans digestion enzymatique.

## 1.4 Conclusion

**Microsystèmes pour le vivant.** Les sciences du vivant sont demandeuses de technologies miniaturisées, intégrées et bas-coût permettant la manipulation d'échantillons biologiques et biochimiques. Des domaines tels que la protéomique nécessitent par exemple des outils de criblage fiables et haut débit. L'une des missions de la microfluidique est de répondre à ces attentes. La réduction des dimensions permet de réaliser des analyses plus rapides avec moins de réactifs. Elle entraîne néanmoins des effets secondaires inhabituels tels que la prédominance des forces de viscosité ; l'actionnement des liquides dans les microcanaux, par exemple leur mélange, reste un domaine de recherche dynamique. Le développement de briques technologiques est suivi de leur intégration cohérente sur des dispositifs miniaturisés, les laboratoires sur puce ; les microTAS sont des laboratoires sur puce intégrant l'ensemble des étapes de la chaîne d'analyse, de l'échantillon brut au résultat. La préparation des échantillons bruts est une étape critique de cette chaîne. Nos recherches visent à développer et intégrer certaines des briques technologiques des laboratoires sur puce.

**PNIPAM.** Le poly(*N*-isopropylacrylamide) est un polymère thermosensible subissant un changement conformationnel réversible, d'un état hydrophile et gonflé sous sa température de transition (LCST ~ 32 °C) à un état hydrophobe et replié au-delà. Cette capacité de bascule en fait un polymère très étudié, essentiellement dans le domaine du vivant. Le PNIPAM est régulièrement conjugué avec des objets biologiques afin de leur conférer une composante thermosensible ; il est également utilisé comme vecteur de solutés médicamenteux. Sa transition hydrophile – hydrophobe est par ailleurs particulièrement intéressante pour l'adsorption et le relargage d'objets biologiques, comme des cellules ou des protéines.

**Positionnement.** La réduction des dimensions dans les laboratoires sur puce augmente considérablement le rapport surface sur volume ; les effets de surface deviennent prépondérants. Il est donc nécessaire de mieux contrôler les effets physiques de surface. Les surfaces actuellement employées dans les systèmes microfluidiques sont généralement passives : elles peuvent par exemple être hydrophiles, hydrophobes, mais pas permutables d'un état à l'autre. Par ailleurs, l'emploi de ces

surfaces passives oblige parfois à utiliser des solvants qui peuvent dénaturer les objets biologiques durant leur traitement (par exemple, des protéines que l'on cherche à préconcentrer). Le PNIPAM promet des avancées significatives dans ces domaines.

**Problématiques.** Malgré l'abondance des travaux réalisés sur le PNIPAM dans le domaine du vivant, leur intégration dans des laboratoires sur puce est peu explorée ; les avantages sont pourtant multiples, et les applications prometteuses. Par exemple, un polymère proche du PNIPAM, le polyacrylamide, est bien connu pour bloquer le flux de liquides actionnés par électro-osmose ; que se passe-t-il dans le cas du PNIPAM ? Peut-on contrôler le flux en actionnant les couches de PNIPAM avec un stimulus thermique ? Les technologies de micro-électronique permettent de miniaturiser les sources de chaleur, de façon à contrôler très localement l'état du PNIPAM ; peut-on alors créer des motifs ou des alternances d'état du PNIPAM, créant ainsi des hétérogénéités sur la surface ? Par ailleurs, plusieurs équipes ont étudié l'adsorption et le relargage contrôlé de protéines sur des surfaces planes de PNIPAM. Comment évolue ce phénomène en microcanaux ? Peut-on le reproduire sur des phases mobiles ? Est-il envisageable d'intégrer ce processus dans un système de préparation d'échantillons pour l'analyse de protéines ?

**Objectifs.** Nos travaux sont la première étape du développement d'une nouvelle filière de microlaboratoires intelligents, basée sur des surfaces actives. Notre objectif est donc l'exploration des possibilités de développement et d'intégration de technologies à base de PNIPAM, répondant à certaines problématiques des laboratoires sur puce. Il s'agit notamment d'identifier les technologies maîtrisées, les verrous et les moyens de les contourner. S'agissant de travaux exploratoires, nous nous limitons volontairement à des technologies simples, facilement adaptables. Dans un premier volet, je détaille les travaux de développement d'une technologie PNIPAM, qui intègre des sources de chaleur visant à actionner, éventuellement localement, l'état du PNIPAM (chapitre 2). Je présente également de façon approfondie la fonctionnalisation chimique de surface permettant le greffage du polymère. Le second volet est consacré aux deux applications que nous avons explorées en détail : le contrôle de flux électrocinétiques et l'accrochage contrôlé de protéines en microcanaux (chapitre 3).



# Chapitre 2

## Développement et intégration de la technologie PNIPAM

« *Scribitur ad narrandum, non ad probandum.* »  
Quintilien, Institutio Oratoria, X, 1, XXI.

### 2.1 Introduction

**Contexte.** Le chapitre précédent a fait apparaître la richesse des développements produits dans le domaine des microsystèmes pour le vivant. J'ai également présenté le PNIPAM, un polymère thermosensible dont le comportement original a été abondamment commenté ; ce chapitre présente en détail les développements technologiques visant à son intégration en microsystèmes. Il apparaît que le PNIPAM présente un intérêt certain pour les laboratoires sur puce, notamment dans deux domaines que nous avons identifiés : l'accrochage réversible de protéines et le contrôle electrocinétique. La première application nécessite un chauffage uniforme dans tout le canal, afin d'optimiser l'efficacité d'adsorption ; nous nous dirigeons donc vers des lignes chauffantes longues. Au contraire, le contrôle electrocinétique, à travers l'implémentation de valves et mélangeurs, repose sur des hétérogénéités de charges de surface ; dans ce cas, il est nécessaire d'actionner l'état du PNIPAM de façon très locale. Cette application requiert donc des éléments chauffants individuels, adressables et surtout miniaturisés.

**Démarche.** La méthode choisie pour la conception du dispositif est la décomposition en éléments simples, à partir d'une analyse globale de l'objectif. Dans ce chapitre, je présente tout d'abord la démarche de conception, basée sur une réflexion sur les matériaux et caractéristiques du système. Je détaille ensuite la conception et la réalisation technologique des deux types d'éléments chauffants : les lignes chauffantes et les éléments adressables ; tous deux sont caractérisés thermiquement. Enfin, je rapporte la fonctionnalisation de surface pour le greffage du PNIPAM, via une couche d'accroche de silane ; ces couches sont caractérisées de façon approfondie par mesure d'angle de contact et différentes méthodes de spectroscopie.

## 2.2 Conception du dispositif

### 2.2.1 Fonctionnalités souhaitées

**Objectif.** L'objectif global de ce travail de recherche amont est le développement et l'intégration d'une technologie PNIPAM pour les laboratoires sur puces. Il s'agit à la fois de démontrer les possibilités de cette technologie, mais aussi d'identifier les verrous et les points bloquants. Le dispositif souhaité doit pour cela comprendre un ensemble de fonctionnalités et d'éléments listés ci-après.

**Canal.** Le contexte d'utilisation étant celui des laboratoires sur puces, il est nécessaire de valider le dispositif dans un microcanal ; exemples : canal en PDMS, capillaire en silice. Le canal va dépendre des matériaux choisis (section 2.2.2) et de l'assemblage (section 2.2.3).

**Dispositif chauffant.** La température est le stimulus permettant le changement de propriétés du PNIPAM. Il faut donc intégrer un actionneur thermique ; exemples : résistance chauffante, dispositif Peltier, étuve. Le développement du dispositif chauffant intégré est décrit dans la section 2.3.

**Surface fonctionnalisée.** Notre utilisation du PNIPAM nécessite son greffage sur une surface ; exemples : surfaces planes, parois de canaux, microparticules. Ce sera l'objet de la section 2.4.

### 2.2.2 Choix des matériaux

**Silicium et dérivés.** Historiquement, les premiers dispositifs microfluidiques d'analyse chimique ou biologique ne peuvent renier leur parenté avec les technologies « classiques » de la micro-électronique : ils sont réalisés sur silicium, avec des techniques d'usinage de volume telles que la gravure [193, 194]. L'essor de la micro-électronique a en effet conduit au développement de nombreuses méthodes de microfabrication, réutilisables pour la réalisation de dispositifs microfluidiques. Cependant, le silicium fait rapidement place aux matériaux isolants tels que le verre [65, 66] ; l'une des raisons est la nécessité d'appliquer de forts champs électriques pour les applications en électrophorèse. Le verre présente également l'avantage d'être transparent dans le domaine du visible et compatible avec des réactifs qui pourraient corroder le silicium [195]. Le verre et le silicium présentent l'intérêt d'être solides et robustes, donc de mieux résister à de fortes pressions appliquées dans les dispositifs. Ils sont disponibles sous forme de *wafers* et donc adaptés aux technologies micro-électroniques. Ces matériaux sont cependant peu adaptés à la réalisation du dispositif que nous souhaitons développer ; ils peuvent par contre servir de substrats ou d'excellents témoins de fonctionnalisation. Par ailleurs, les capillaires en silice fondu sont un bon choix pour des expériences préliminaires d'accrochage et de décrochage de protéines sur billes fonctionnalisées avec du PNIPAM.

**Polymères.** Le matériau idéal pour la microfluidique est souvent voulu peu coûteux, éventuellement jetable, biocompatible, transparent, pouvant être microfabriqué simplement et pouvant être fonctionnalisé chimiquement. Depuis environ une dizaine d'années, les polymères sont devenus les matériaux de choix pour la microfluidique [196], car ils cumulent plusieurs de ces caractéristiques [197, 198, 40].

**PDMS.** Le polydiméthylsiloxane (PDMS, CAS : 63148-62-9) est un polymère dont la technologie est intensivement développée depuis une dizaine d'années, notamment au sein du groupe de G.M. WHITESIDES [199, 200, 201]. Le premier dispositif intégré en PDMS pour l'électrophorèse capillaire est créé en 1997 [202]. Depuis, le PDMS est devenu l'un des polymères les plus utilisés en microfluidique, en particulier pour les microsystèmes d'analyse [203] et les laboratoires sur

puce [204]. La microfluidique est encore un domaine trop jeune pour savoir si le PDMS sera utilisé de façon industrielle à grande échelle ; cependant, ce polymère est un matériau de choix pour les travaux exploratoires et la réalisation flexible de prototypes [29]. Le PDMS est biocompatible [205], flexible [206] et transparent [207]. Les techniques de réplication par coulage assurent une bonne reproductibilité et un coût bien inférieur aux substrats de type *wafers*. Les inconvénients du PDMS sont sa faible résistance aux solvants [208] et sa naturelle hydrophobie [209], qui peut cependant être modifiée par fonctionnalisation chimique de surface [210]. Le PDMS est très utilisé pour les micro-systèmes fluidiques au LAAS. Sa faible résistance aux solvants organiques ne pose pas réellement de problème dans notre cas : le dispositif est principalement prévu pour accueillir des molécules biologiques, généralement manipulées en milieu aqueux ; les solvants organiques dénaturent rapidement les protéines, par exemple.

**Résine SU-8.** La SU-8 (CAS : 221273-01-4) est une résine photosensible négative. Son utilisation en microfluidique est plus récente que celle du PDMS, mais néanmoins répandue [211]. Ses principaux avantages sont son fort rapport d'aspect et sa haute résistance aux solvants organiques ; comme le PDMS, elle est biocompatible [212] et donc adaptée aux laboratoires sur puces. La technologie SU-8 est bien maîtrisée au LAAS, notamment les techniques de laminage [198, 41]. Sa mise en œuvre est cependant plus coûteuse et plus lourde que celle du PDMS ; elle nécessite des technologies de micro-électronique classique (par exemple, une machine d'alignement UV). La technologie PDMS est plus souple d'utilisation ; l'utilisation de la SU-8 n'est cependant pas à exclure si le besoin d'une technologie plus robuste émerge.

**Conclusion.** Si le PDMS apparaît comme un meilleur choix pour la réalisation des canaux, la SU-8 apparaît quant à elle comme un bon choix pour réaliser les motifs sur lesquels les canaux en PDMS seront moulés. Les deux voies PDMS et SU-8 ont été explorées au début de mes travaux ; l'assemblage SU-8 n'a finalement pas été retenu et est donné en annexe. Dans la section suivante, je présente les travaux concernant leur assemblage et le design global du dispositif.

## 2.2.3 Assemblage et intégration

### 2.2.3.1 Assemblage PDMS

**Collage réversible.** Le PDMS a l'avantage de pouvoir être assemblé très facilement avec la plupart des autres matériaux utilisés pour la fabrication de laboratoires sur puces [199]. Quel que soit le type de collage que l'on souhaite, il est préférable d'avoir des surfaces propres. Une simple mise en contact peut suffire pour obtenir un collage réversible entre le PDMS et un autre élément en PDMS, silicium, verre ou pyrex. L'élasticité du PDMS empêche généralement les fuites de liquides. Cette technique est adaptée lorsque la pression des fluides circulant n'est pas trop importante (sinon, il y a décollage). Elle peut par exemple être intéressante si un élément (jetable) en PDMS doit être assemblé avec un autre élément (réutilisable) plus coûteux ou complexe à réaliser.

**Collage irréversible.** Si l'on souhaite un collage plus robuste, une technique simple, éprouvée et très reproductible consiste à procéder à une activation chimique des surfaces à coller au plasma oxygène. Les paramètres utilisés au LAAS sont généralement : flux d'oxygène à 1000 mL/min, puissance 300 W pendant 30 s, avec cage de Faraday. Les deux faces à coller sont exposées au plasma, puis mises en contact aussitôt après.

### 2.2.3.2 Géométrie et assemblage choisis

**Assemblage du substrat.** La réalisation des dispositifs chauffants intégrés au dispositif nécessite l'utilisation de procédés de micro-électronique (voir la section 2.3) ; il est donc préférable d'utiliser un substrat solide de type *wafer* comme support, en particulier le pyrex, en raison de sa transparence et ses propriétés isolantes, électriques et thermiques. Les éléments chauffants sont réalisés par dépôt et structuration d'un couche d'or ; on ne considère ici que les éléments chauffants linéaires. Le dépôt d'une couche de SiO<sub>2</sub> en pleine plaque (sauf sur les contacts électriques) assure l'isolation électrique entre la résistance et le canal ; par ailleurs, la silice offre un excellent support de fonctionnalisation chimique par silanisation. Cette couche est déposée par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*, PECVD) ; transparente et mesurant seulement 500 nm d'épaisseur, elle ne doit pas entraîner de changements significatifs dans la dynamique de chauffage. Le substrat est prêt à recevoir les canaux.

**Assemblage des canaux.** Les canaux en PDMS sont coulés [199] sur des moules réutilisables en SU-8. Les réservoirs sont percés aux extrémités des canaux avec une aiguille calibrée en fonction de la connectique. L'ensemble des canaux en PDMS est assemblé avec le substrat selon la procédure détaillée précédemment (section 2.2.3.1). La connectique entre les microcanaux et le macromonde est souvent source de nombreux problèmes en microfluidique [51, 30, 50]. Notre dispositif n'est pas destiné à utiliser de fortes pressions, il est donc naturel de choisir une connectique extrêmement simplifiée, que FREDRICKSON *et al.* qualifient de « primitive », uniquement basée sur l'élasticité du PDMS : les réservoirs du PDMS sont percés selon la taille des tuyaux plastiques utilisés pour la circulation des fluides. L'élasticité du PDMS permet d'insérer les tuyaux dans les réservoirs et assure l'étanchéité du montage. Un dispositif plus complexe, éventuellement commercial (connectique Upchurch par exemple), peut être envisagé ensuite selon les besoins.

**Surface spécifique.** La surface spécifique désigne la zone sur laquelle le polymère est en interaction avec les molécules d'intérêt. Pour les applications d'accrochage et décrochage contrôlé de protéines (section 3.3, p. 82), il est nécessaire de maximiser la surface possible d'interaction. Plusieurs solutions sont envisageables : utiliser un matériau poreux [213], un réseau de piliers [214], des microbilles [215, 216] ou une combinaison de ces techniques [217]. La piste des piliers a été explorée et réalisée par gravure profonde (FIG. 2.1 (a)). Cette technologie est cependant longue, coûteuse et lourde en termes d'équipements ; elle est également soumise aux aléas des technologies de micro-électronique ; enfin, de tels piliers restent fragiles et cassent facilement (FIG. 2.1 (b)). Il est préférable d'opter pour la technique basée sur les microbilles ; en choisissant de plus des billes en silice, celles-ci sont facilement fonctionnalisables (voir la section 2.4). Il est par contre nécessaire d'adapter la géométrie du canal afin de pouvoir les piéger.

**Géométrie du canal.** L'un des principaux outils de manipulation de billes dans les microsystèmes fluidiques est le magnétisme [216] ; on l'utilise pour effectuer du triage [218] ou de l'auto-assemblage de billes [219]. Cette technologie est en cours de développement au LAAS mais n'est pas encore disponible. Par ailleurs, manipuler les billes paraît prématuré ; l'objectif principal est de s'en servir comme support d'adsorption et désorption contrôlée, puis de caractériser ce comportement par fluorescence. Piéger les billes est donc suffisant. Pour cela, une solution simple est de modifier la géométrie du canal de manière à créer un étranglement de taille inférieure au diamètre des billes (FIG. 2.2) ; ainsi, les billes sont bloquées avant l'étranglement, mais les liquides et les espèces biologiques peuvent toujours circuler. Cette géométrie de « gêne stérique », héritée des structures d'étirement de molécules d'ADN [220], a l'inconvénient de limiter les débits applicables dans le

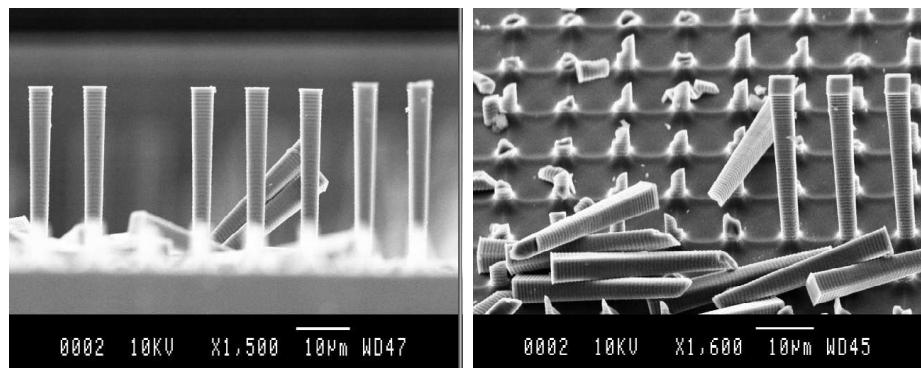


FIG. 2.1 – (a) Image MEB de piliers réalisés par gravure au fond d'un microcanal (microscopie électronique à balayage). (b) Image MEB de piliers cassés.

canal ; son avantage reste cependant sa simplicité d'implémentation. Des solutions alternatives, plus complexes, comme le piégeage par des plots magnétiques, peuvent être envisagées ultérieurement si nécessaire [221].

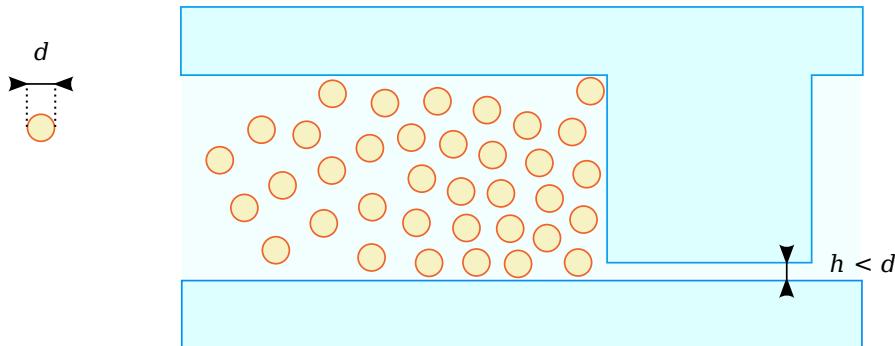


FIG. 2.2 – Schéma de la géométrie du canal servant à piéger les microbilles.

**Dispositif final.** Une vue 3D du dispositif final est présentée sur la FIG. 2.3. Elle comporte le substrat de pyrex, la résistance linéaire chauffante et le canal en PDMS avec son étranglement central<sup>1</sup>. La couche de  $\text{SiO}_2$  n'est pas visible car transparente. La FIG. 2.4 présente l'assemblage réel de la puce PDMS sur un substrat de verre.

## 2.3 Conception et réalisation des éléments chauffants

### 2.3.1 Lignes chauffantes simples

Les sections précédentes sont consacrées aux étapes de la conception globale du dispositif. Comme il s'agit de travaux exploratoires, aucun cahier des charges strict n'est disponible en ce

<sup>1</sup>La partie centrale du canal est non seulement abaissée afin de piéger les billes, mais également élargie, afin de compenser partiellement la perte de charge induite.

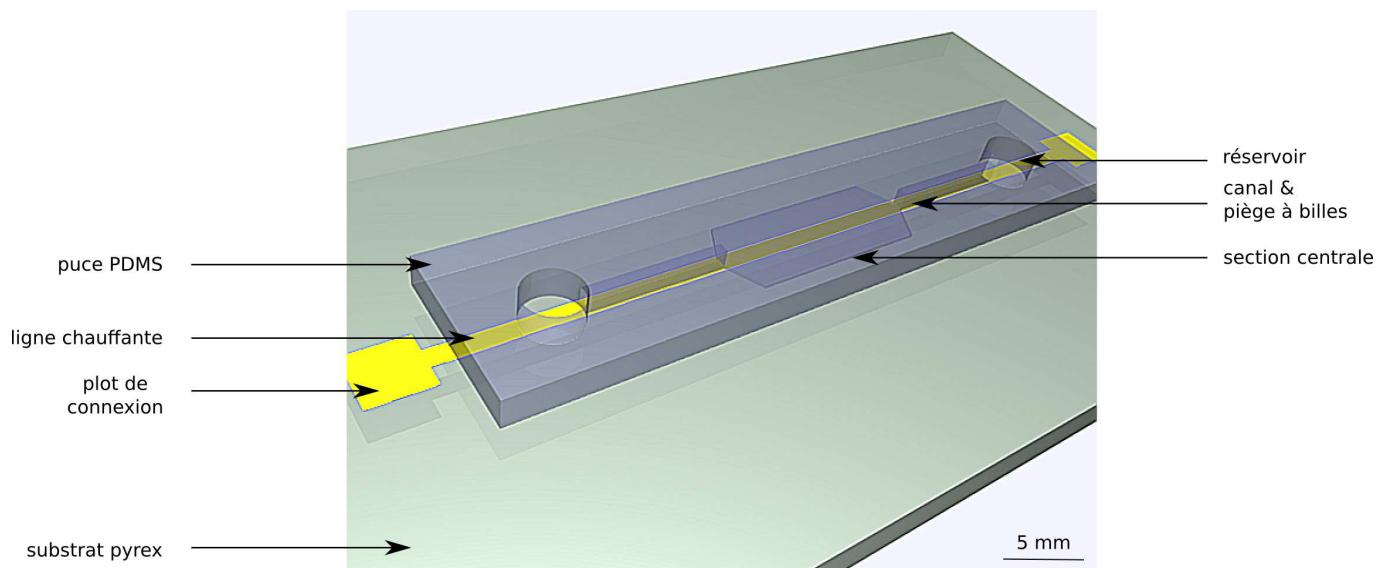


FIG. 2.3 – Vue d'ensemble 3D du dispositif, réalisée avec Blender.

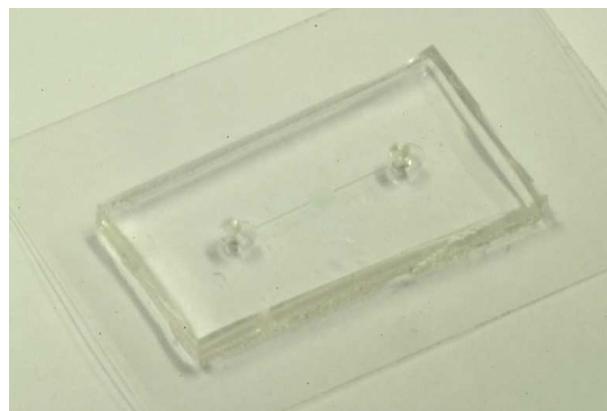


FIG. 2.4 – Vue d'ensemble du dispositif PDMS sur verre après fabrication, sans la ligne chauffante.

qui concerne le dispositif chauffant. Le premier objectif est donc la réalisation d'un dispositif chauffant simple, intégré à la puce microfluidique, destiné à actionner les couches de PNIPAM.

### 2.3.1.1 Réflexions préliminaires sur la simulation

**Flexibilité.** La simulation est un excellent outil d'aide à la conception de dispositifs électroniques : elle permet de prédire le comportement d'un composant, son intégration dans un système plus complexe et son interaction avec son environnement. Dans le cas d'un dispositif complexe, une simulation réalisée a priori permet de réduire le temps et le coût de réalisation : elle limite les erreurs et tests de technologie. Dans ce cas, le temps investi dans la modélisation complexe du dispositif est largement compensé par le gain de temps obtenu lors de la réalisation. Cependant, dans le cas de travaux exploratoires, il est difficile de savoir quelle sera la forme finale du dispositif. Il est peu avantageux d'attendre la finalisation d'un modèle complet avant de commencer la réalisation du dispositif. Il est préférable de conserver une certaine flexibilité ; modélisation et réalisation ont donc été menées en parallèle. La construction d'un modèle simple permet de déterminer les ordres de grandeur caractéristiques et de pouvoir modifier facilement le modèle selon l'évolution du dispositif. En parallèle, la réalisation d'un prototype simple permet d'obtenir rapidement un dispositif chauffant pouvant être caractérisé, étalonné et utilisé pour des tests préliminaires du système complet.

**Modélisation multiphysique par éléments finis.** Pour construire un modèle simple, une étude analytique paraît la plus appropriée. Cependant, ses résultats seront peu réutilisables lorsqu'il faudra passer à un modèle plus complexe. Idéalement, c'est l'ensemble du dispositif qu'il est intéressant de modéliser : non seulement le dispositif chauffant, mais également le transfert de chaleur dans le PDMS et le canal, le changement conformationnel du PNIPAM, l'adsorption et le relargage contrôlé de molécules biologiques ou la création de tourbillons pour le micromélange. Même si l'objectif des travaux n'est pas la réalisation de ce modèle exhaustif, il est important que les briques de base construites soient réutilisables par d'autres chercheurs. Par ailleurs, ce modèle complet comporte plusieurs phénomènes physiques interconnectés : chauffage par effet Joule (électro-thermique), transfert de chaleur (thermique), interaction biologique (couches sensibles et génie chimique), micromélange (fluidique). Considérant l'ensemble de ces éléments, nous avons choisi de travailler avec le logiciel COMSOL Multiphysics ; basé sur la modélisation en éléments finis, il est capable de supporter la montée en complexité du modèle. Par ailleurs, sa conception réellement multiphysique est très adaptée au problème à résoudre. Il autorise enfin le développement de briques de simulation séparées et multi-échelles, utiles pour un projet faisant simultanément intervenir des couches minces et des blocs de PDMS macrométriques.

**Objectifs.** Dans un premier temps, l'objectif est la construction d'un modèle simple visant à prédire le comportement électrique et thermique des éléments chauffants. Il s'agit de déterminer les dimensions caractéristiques et d'évaluer la portée et l'homogénéité du changement de température (notamment dans le liquide). Il s'agit également d'étudier l'inertie thermique de l'assemblage, la dynamique de chauffage et le temps de réponse de l'ensemble : en le comparant avec le temps de réponse du PNIPAM, on peut ainsi déterminer par quel élément est limité le dispositif.

### 2.3.1.2 Modélisation électro-thermique et transfert de chaleur

**Effet Joule et chauffage.** Notre première approche a été de modéliser l'effet Joule et la dynamique thermique ensemble, sur la même géométrie 3D. Le modèle est constitué d'une ligne chauffante en or de  $5.10^{-2} \times 500.10^{-6} \times 800.10^{-9}$  m sur un substrat de verre (TAB. 2.1) ; la longueur et la largeur sont de l'ordre de grandeur de celles du canal. Le sous-domaine correspondant à la résistance est

concerné par la conduction de courant (EQ. 2.1) et le transfert de chaleur par conduction (EQ. 2.2); le couplage Joule (EQ. 2.3) fait le lien entre les deux modèles. Le substrat en verre n'est concerné que par le modèle de transfert de chaleur. Le résultatat de la résolution stationnaire pour une tension de 7 V est présenté sur la FIG. 2.6; on obtient une température maximale de 318 K largement homogène sur les dimensions du canal à assembler ensuite.

$$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V) = 0 \quad (2.1)$$

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \nabla \cdot (-k \nabla T) = Q \quad (2.2)$$

$$Q = \sigma |\nabla V|^2 \quad (2.3)$$

Avec :

- $\sigma$  la conductivité ( $\text{S.m}^{-1}$ ).
- $V$  la tension électrique (V) ;
- $\rho$  la densité ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) ;
- $C_p$  la capacité calorifique à pression constante ( $\text{J.kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) ;
- $T$  la température (K) ;
- $k$  la conductivité thermique ( $\text{W.m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) ;
- $Q$  la source de chaleur ( $\text{W.m}^{-3}$ ).

TAB. 2.1 – Propriétés des différents matériaux utilisés pour la simulation (d'après [43] et bibliothèques de COMSOL).

	$k$	$\rho$	$C_p$
verre	1,38	2203	703
or	207	19300	128,7
unité	( $\text{W.m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )	( $\text{kg.m}^{-3}$ )	( $\text{J.kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ )

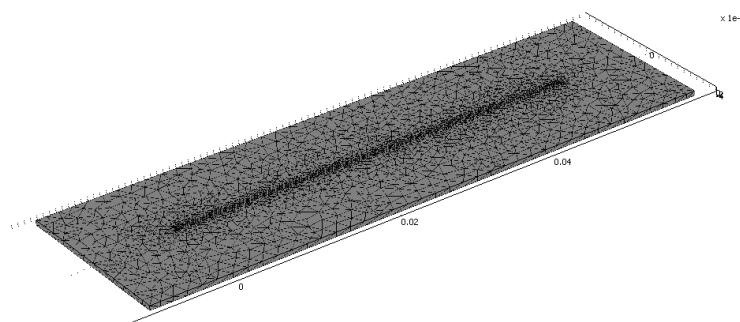


FIG. 2.5 – Maillage du modèle de simulation de la ligne chauffante sur verre.

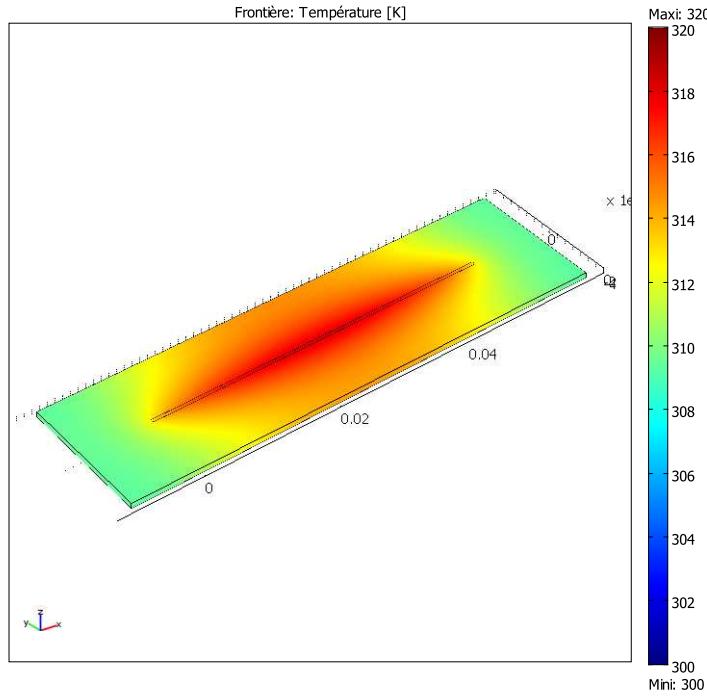


FIG. 2.6 – Résultat de la simulation de la ligne chauffante sur verre.

**Effet Joule – Ligne chauffante seule.** Le modèle précédent permet d’obtenir une première estimation du comportement du système. Il ne donne cependant pas d’information sur la dynamique thermique dans le canal PDMS ; par ailleurs, ce modèle en trois dimensions, avec de forts rapports d’aspect, demande un temps de calcul conséquent. La dynamique thermique est principalement limitée par l’échauffement de la veine fluidique ; le problème peut donc être scindé en deux parties : l’échauffement de la ligne chauffante seule, puis le transfert de chaleur dans la canalisation. La géométrie de la structure permet par ailleurs de se limiter à une simulation en deux dimensions, sans perdre en qualité de simulation. Les géométries 2D sont plus facilement modifiables et les calculs sont plus courts, tout en donnant des résultats comparables. Nous avons donc découpé géométriquement l’effet Joule dans la résistance et le transfert de chaleur dans la structure. La première géométrie (FIG. 2.7) reprend les dimensions réelles de la résistance ( $8.10^{-2} \times 500.10^{-6} \times 800.10^{-9}$  m) et les propriétés du matériau sont celles de l’or<sup>2</sup> :  $k = 207$  W.m<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>,  $\rho = 19300$  kg.m<sup>-3</sup> et  $C_p = 128,7$  J.kg<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. La physique en jeu ne change pas : les équations sont les mêmes que dans le cas précédent. Le résultat de la résolution pour une tension de 7 V est présenté sur la FIG. 2.8. La température est homogène dans la résistance (320 K). En se basant sur ces résultats, on peut ensuite modéliser le transfert de chaleur dans le reste de l’assemblage.

**Transfert de chaleur – Modèle.** Afin d’étudier la dynamique et l’extension du chauffage, nous utilisons le module de transfert de chaleur général de COMSOL. La géométrie à deux dimensions correspond à une coupe transversale du canal (FIG. 2.9). Le modèle est composé du substrat de verre (500 µm d’épaisseur), du canal rempli d’eau (50 × 100 µm) et du bloc de PDMS (1 mm d’épaisseur). Le flux de chaleur principal est dû à la conduction ; la contribution de la convection dans le liquide est

<sup>2</sup>Voir la section 2.3.1.3 sur le choix des matériaux pour la réalisation des lignes chauffantes.

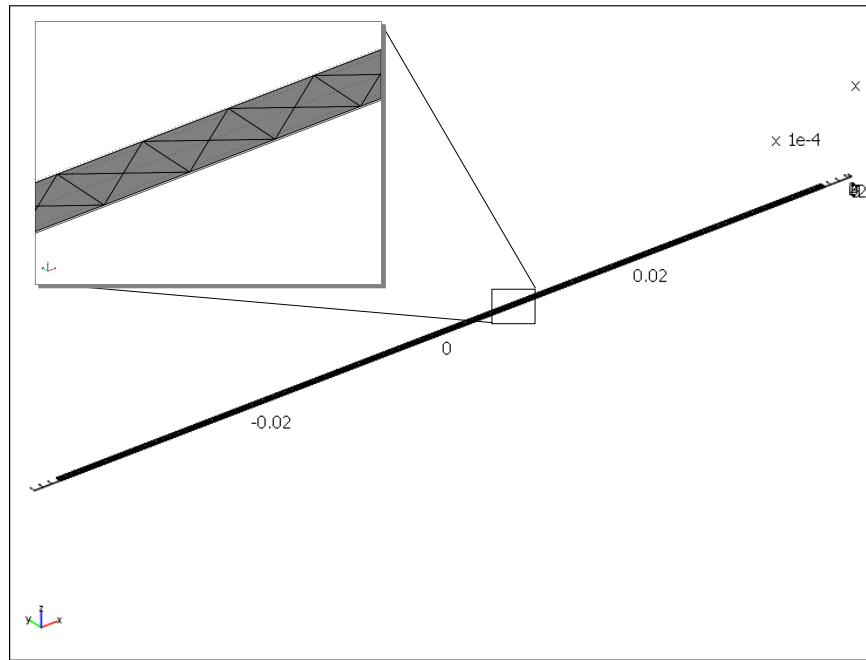


FIG. 2.7 – Maillage du modèle de simulation de l’effet Joule dans la ligne chauffante seule.

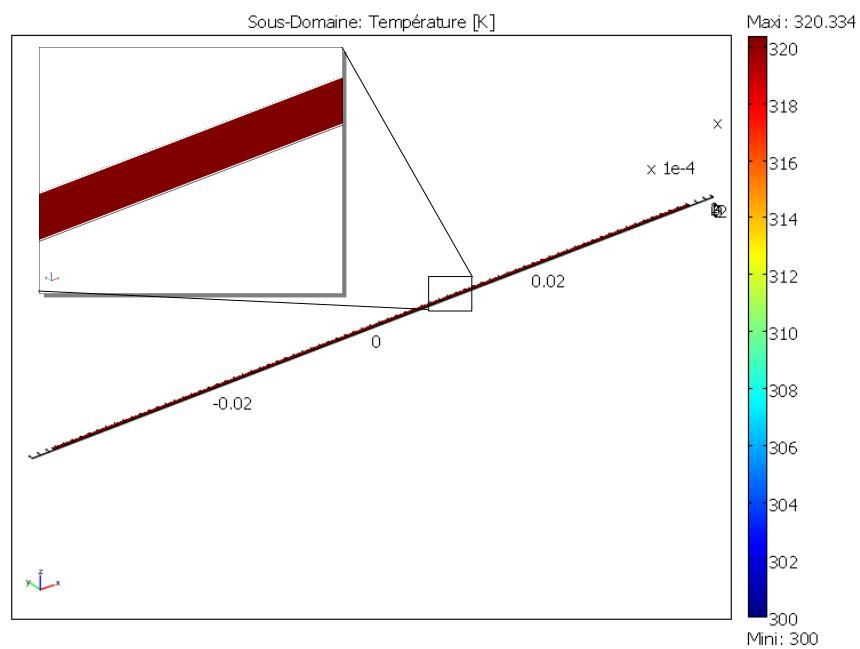


FIG. 2.8 – Résultat de la simulation de l’effet Joule dans la ligne chauffante seule sous COMSOL.

négligeable à cette échelle<sup>3</sup>. Les caractéristiques des différents matériaux sont données au TAB. 2.2<sup>4</sup>. La source de chaleur est placée sous le canal ; grâce aux variables de couplage, la modélisation de l'effet Joule détermine la température source. Les conditions aux limites assurent une continuité sur les bords latéraux, correspondant à l'extension du bloc de PDMS ; les limites supérieure et inférieure sont en interaction avec l'air ambiant. Le maillage est plus précis autour du canal, qui est la zone d'intérêt principale (FIG. 2.9).

TAB. 2.2 – Propriétés des différents matériaux utilisés pour la simulation (d'après [43] et bibliothèques de COMSOL).

	$k$	$\rho$	$C_p$
verre	1, 38	2203	703
$\text{SiO}_2$	1, 4	2270	1000
or	207	19300	128, 7
eau	$k(T)$	$\rho(T)$	$C_p(T)$
PDMS	0, 15	965	1200
unité	(W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	(kg.m <sup>-3</sup> )	(J.kg <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )

**Transfert de chaleur – Paramètres et résultats.** Les simulations sont effectuées pour différentes températures de source. La circulation de l'air ambiant sur les bords supérieur et inférieur se traduit par un coefficient de transfert de chaleur  $h = 50 \text{ W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$  ; la température ambiante est fixée à  $T_{amb} = 300 \text{ K}$ . La FIG. 2.10 montre la dynamique de chauffage lorsque la source de température est fixée à 320 K. La FIG. 2.11 montre l'évolution de la température en fonction du temps en deux points : l'un au centre du canal, l'autre au milieu de sa face supérieure. On observe que la température de transition du PNIPAM (LCST  $\sim 32^\circ\text{C} \sim 305 \text{ K}$ ) est atteinte dans l'intégralité du canal en moins de 10 ms. Il faut environ 100 ms pour obtenir une température de 310 K dans l'intégralité du canal. La température se stabilise après quelques secondes (FIG. 2.12).

<sup>3</sup>Cette approximation est pleinement validée par une comparaison quantitative des résultats donnés par ce modèle et un modèle identique prenant en compte la convection : les résultats obtenus sont identiques.

<sup>4</sup>La fine couche de  $\text{SiO}_2$ , qui ne mesure que 500 nm et a des propriétés très proches du verre, est négligée en première approximation.

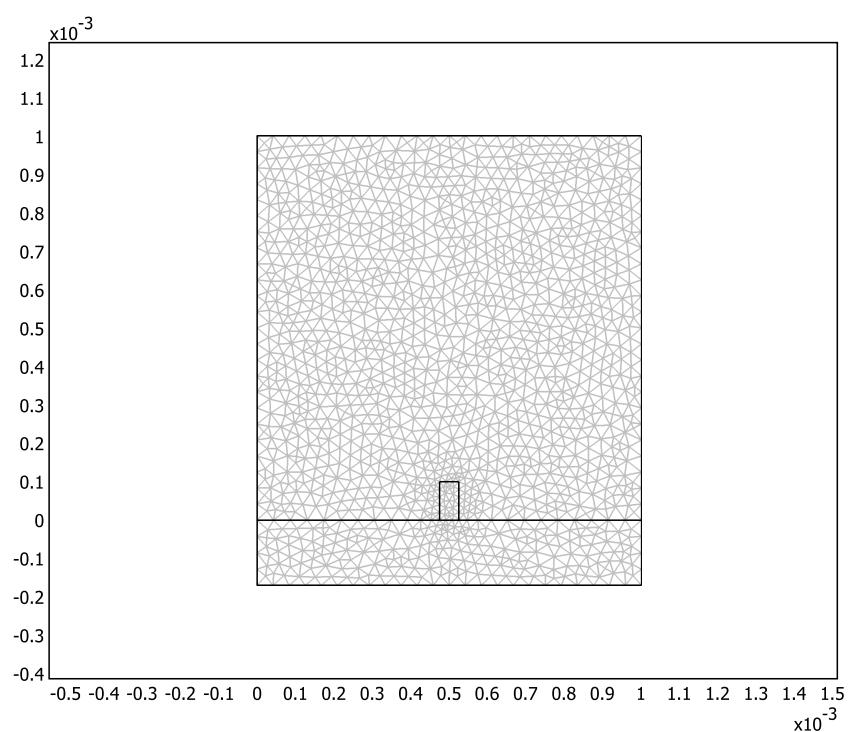


FIG. 2.9 – Maillage du modèle de simulation du transfert de chaleur dans l’assemblage sous COMSOL. La géométrie correspond à une coupe 2D dans le plan transversal au canal.

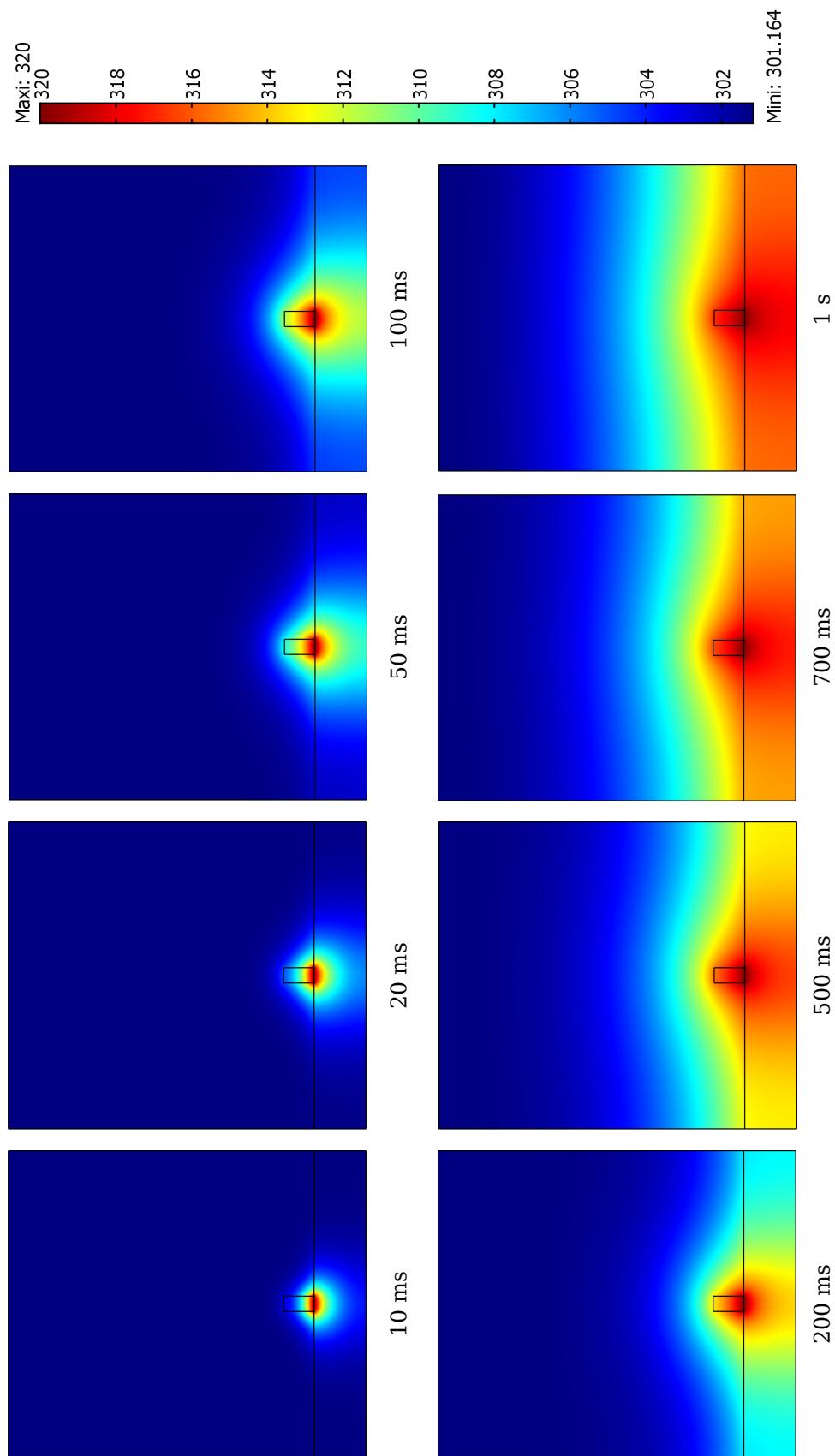


FIG. 2.10 – Dynamique thermique du transfert de chaleur dans l’assemblage entre 10 ms et 1 s.

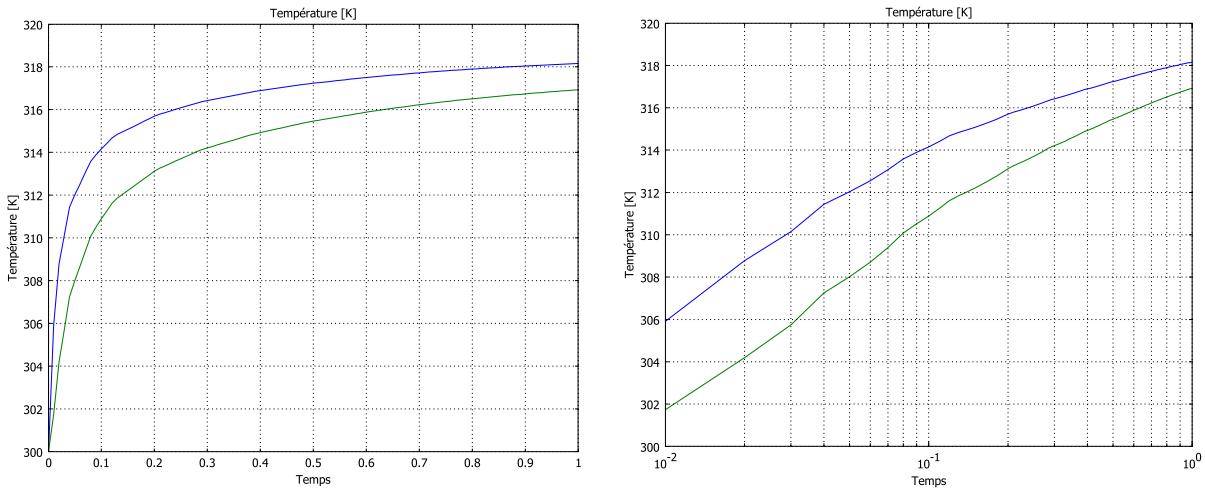


FIG. 2.11 – Simulation : évolution de la température en deux points du canal pendant la première seconde de chauffage. Courbe supérieure bleue : point au centre ; courbe inférieure verte : point en haut du canal. Le graphe de droite représente les mêmes données avec une échelle temporelle logarithmique.

**Conclusions.** Les simulations montrent qu'une ligne chauffante simple permet de stabiliser l'intégralité du canal à une température supérieure à la LCST du PNIPAM en environ 100 ms. La tension appliquée engendre un régime stationnaire et permet de contrôler la température. Les modèles sont suffisamment flexibles pour être adaptés en fonction des modifications de la technologie.

### 2.3.1.3 Réalisation technologique

**Dessin.** Le dessin du masque comporte deux lignes chauffantes parallèles : l'une de  $500\text{ }\mu\text{m}$  de large, l'autre de  $100\text{ }\mu\text{m}$ . La simulation a montré que des résistances de telles dimensions, du même ordre de grandeur que la largeur du canal ( $100\text{ }\mu\text{m}$ ), produisent un échauffement correspondant au stimulus thermique dont nous avons besoin. Les deux lignes, distantes de 2 cm, sont longues de 8 cm et dotées, à chacune de leurs extrémités, d'un plot de  $2 \times 2\text{ mm}$  visant à faciliter la connexion électrique. Une géométrie linéaire permet de chauffer l'intégralité du canal ou uniquement une partie, selon la disposition choisie à l'assemblage : si le canal est placé longitudinalement sur la résistance, il est chauffé dans son intégralité. Placé perpendiculairement, seule l'intersection entre le canal et la résistance est chauffée. Cette géométrie permet donc de conserver une certaine flexibilité dans les expériences.

**Matériaux et caractéristiques.** Nous réalisons les résistances selon un procédé standard « *lift-off* » de dépôt par métallisation. Elles sont composées d'une couche de  $8000\text{ \AA}$  d'or déposée sur une couche d'accroche de  $1000\text{ \AA}$  de titane. L'or n'est pas le matériau idéal pour réaliser une résistance chauffante ; on lui préfère souvent le silicium polycristallin (ou « polysilicium »), plus résistant. Cependant, la technique de dépôt par métallisation est plus légère qu'un dépôt de polysilicium à haute température (environ  $600^\circ\text{C}$  pour un dépôt en LPCVD, *low pressure chemical vapor deposition*). Il

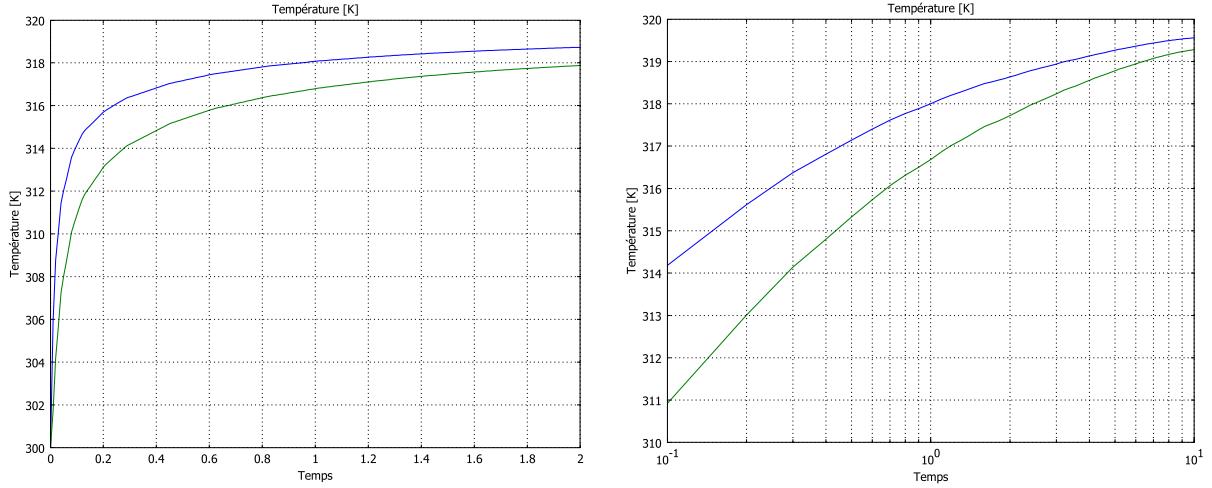


FIG. 2.12 – Simulation : évolution de la température en deux points du canal pendant le chauffage. Courbe supérieure bleue : point au centre ; courbe inférieure verte : point en haut du canal. (gauche) Évolution pendant deux secondes, échelle linéaire ; (droite) évolution pendant dix secondes, échelle logarithmique.

est toujours possible de modifier ce matériau par la suite ; le procédé technologique et le modèle de simulation sont facilement adaptables.

#### 2.3.1.4 Caractérisation

**Montage.** Nous effectuons la caractérisation électrique et thermique avec un générateur et une caméra infrarouge CEDIP *Infrared systems* (FIG. 2.13). La fenêtre maximale de visualisation correspond à une zone de  $320 \times 240$  pixels, couvrant une surface de  $5,7 \times 4,3$  mm. En raison de la faible émissivité de l'or et de son fort coefficient de réflexion, il est impossible de mesurer la température directement sur la résistance (voir la FIG. 2.14, où l'or apparaît noir). Nous mesurons donc la température du pyrex jouxtant la résistance (en régime stationnaire, l'approximation est pertinente), conjointement à une caractérisation électrique.

**Caractérisation thermique et électrique.** Les résultats pour la résistance de  $500\ \mu\text{m}$  sont présentés sur la FIG. 2.15. On observe que la caractéristique courant–tension est linéaire dans la gamme considérée ; la résistance mesurée est de  $8\ \Omega$ . La température atteint  $45^\circ\text{C}$  pour une puissance délivrée de  $8\ \text{W}$  ; ces résultats sont proches de la simulation, qui donne un résultat de  $47^\circ\text{C}$  pour  $7\ \text{W}$  ; la différence est attribuée aux simplifications du modèle. Le chauffage est peu efficace : c'est une conséquence du choix des matériaux utilisés pour fabriquer la résistance, ainsi que de son design très simplifié. Ce dispositif permet néanmoins d'obtenir facilement une température supérieure à la température de transition du PNIPAM. En régime stationnaire (après stabilisation), la température est homogène sur plus de  $1,5$  mm autour de la résistance.

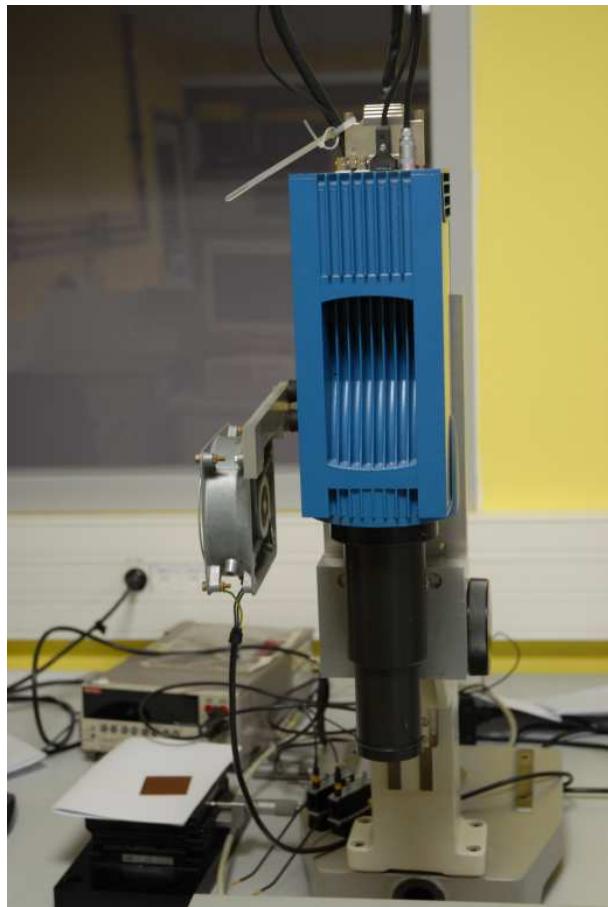


FIG. 2.13 – Montage de caractérisation par thermographie infrarouge

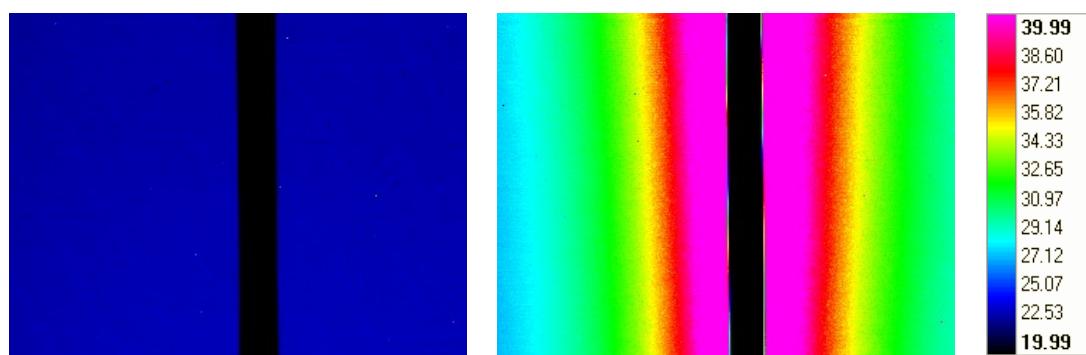


FIG. 2.14 – Visualisation du chauffage par thermographie infrarouge sur la résistance de 500  $\mu\text{m}$ . (gauche) 0 V, 23 °C; (droite) 7 V, 40 °C. La résistance apparaît noire en raison de la réflexion infrarouge sur l'or.

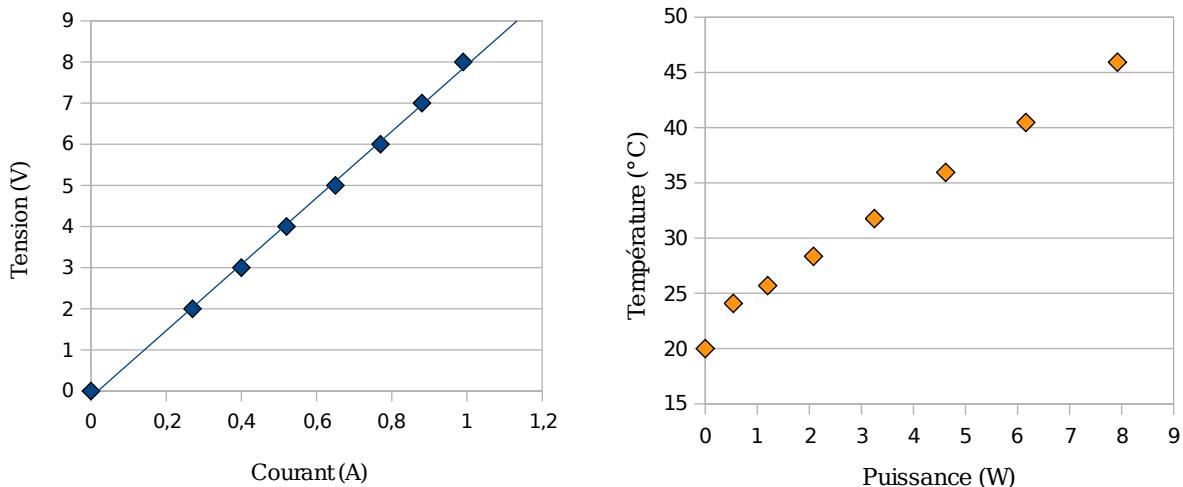


FIG. 2.15 – Caractérisation électrique et thermique des lignes chauffantes. (gauche) Caractéristique courant-tension dans la gamme de température du dispositif ; (droite) échauffement par effet Joule : évolution de la température en fonction du courant (thermographie infrarouge).

### 2.3.2 Éléments chauffants adressables

#### 2.3.2.1 Contexte et technologie

**Contexte.** La section précédente est dédiée au développement de lignes chauffantes simples, visant à chauffer l'intégralité du canal de façon non discriminée ; cet objectif correspond par exemple à une application biologique de la technologie PNIPAM : on souhaite que l'interaction avec les molécules biologiques soit homogène. À l'inverse, une application de type fluidique (par exemple, le micromélange) est basée sur l'hétérogénéité des charges de surface ; on souhaite dans ce cas contrôler l'état du PNIPAM précisément, à l'échelle micrométrique. Cela implique des zones de chauffage micrométriques, mais surtout indépendantes les unes des autres, autant au niveau de la commande que de l'influence mutuelle.

**Technologies.** Deux voies technologiques ont été mises en œuvre. La première, repose sur un savoir-faire développé depuis plusieurs années au LAAS, basé sur une technologie polysilicium. Plusieurs thèses de doctorat ont été dédiées à ce travail [222, 223, 224, 225] ; nous pouvons désormais réaliser des matrices de microactionneurs ou microcapteurs thermiques adressables indépendamment. La seconde voie, plus simple, utilise la technologie sur verre mise en place pour la réalisation des lignes chauffantes. Elle est moins performante que la voie silicium en terme de miniaturisation et de facilité d'adressage des éléments chauffants individuels ; elle présente toutefois l'avantage d'un assemblage final plus facile et surtout d'une technologie plus simple et moins onéreuse. Les travaux présentés ci-après ont été réalisés en collaboration avec Bertrand MARTY et Emmanuel COLLÉ.

**Technologie silicium.** Le dispositif d'adressage électrique est basé sur des éléments non linéaires en polysilicium à seuil symétrique (FIG. 2.16, FIG. 2.17). Les éléments non linéaires correspondent à des zones P et N<sup>5</sup> réalisées par implantation ionique dans une couche fine de polysilicium (0,5 µm). La caractéristique de seuil symétrique correspond à une structure NPN (ou PNP). Le seuil global

<sup>5</sup>La notion de zone P et N correspond au vocabulaire de la micro-électronique, en particulier au dopage de semi-conducteur. Voir *Physique de l'état solide*, C. KITTEL, chapitre 8, « Conductivité due aux impuretés », p.201 [226].

est modifié en ajustant le dopage ou en assemblant plusieurs structures élémentaires NPN en série. Pour une présentation plus détaillée de la technologie mise en jeu, le lecteur peut se rapporter aux publications associées [225, 227]. Bertrand MARTY a procédé à une caractérisation électrique approfondie de ces éléments [225] ; ces résultats ne relèvent pas directement de nos travaux et ne sont donc pas détaillés ici. La section suivante présente néanmoins, de façon résumée, la caractérisation thermique effectuée par Emmanuel COLLÉ.

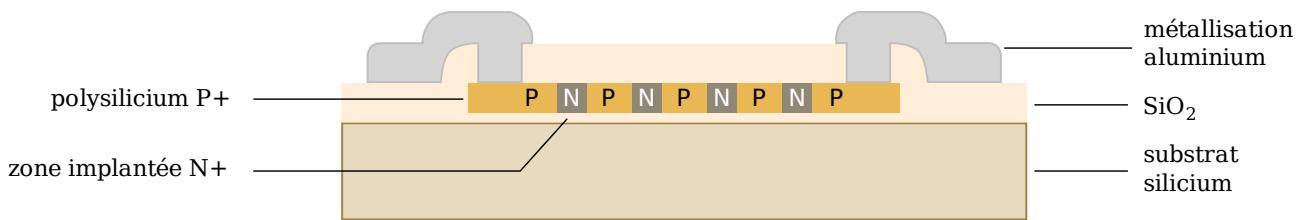


FIG. 2.16 – Schéma d'un élément individuel du dispositif chauffant adressable.

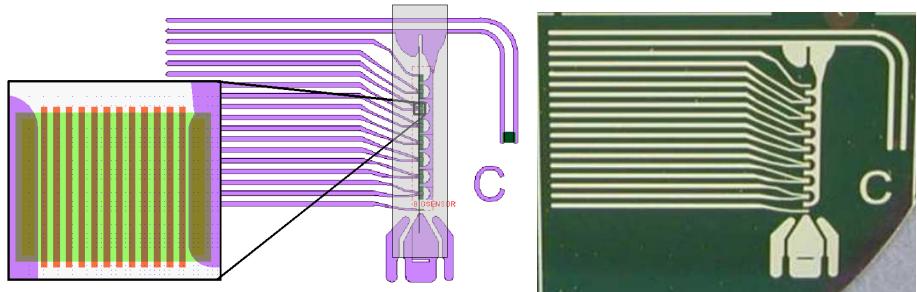


FIG. 2.17 – (gauche) Schéma de l'ensemble des éléments chauffants adressables. La zone griseée représente un canal en PDMS. (droite) Photo du dispositif réalisé.

### 2.3.2.2 Caractérisation thermique

**Thermographie infrarouge.** De la même manière que pour les lignes chauffantes, nous caractérisons les éléments adressables par thermographie infrarouge. L'un des éléments est mis sous tension de manière à dépasser le seuil et produire de la chaleur. La température est mesurée sur l'élément chauffé ainsi que sur ses voisins (non alimentés), en fonction de la tension appliquée. Les résultats sont présentés sur la FIG. 2.18. On observe tout d'abord qu'il est nécessaire d'appliquer de fortes tensions pour atteindre la température de transition du PNIPAM : 135 V pour 32 °C. Cela est dû au design du dispositif, conçu comme un détecteur très sensible aux variations de température. La caractérisation montre que les proches voisins chauffent également, en raison de la conduction thermique dans le substrat ; si l'élément sous tension est à 32 °C, ses plus proches voisins sont à environ 27 °C. On préfère généralement chauffer le PNIPAM au-delà de sa LCST, vers 40 à 50 °C ; or, dès 40 °C sur l'élément sous tension, ses premiers voisins atteignent 32 °C. Des efforts doivent donc être faits pour mieux isoler les éléments chauffants les uns des autres. On peut par exemple envisager de réaliser ces dispositifs sur substrats verre ou pyrex, moins conducteurs que le silicium ; la technologie mise en œuvre n'est en effet pas dépendante d'un substrat en silicium.

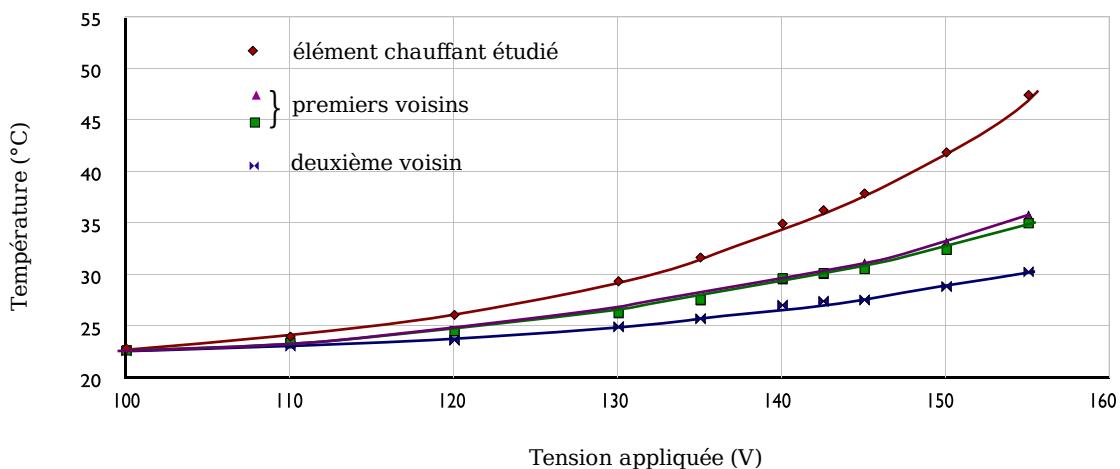


FIG. 2.18 – Caractérisation d'une série d'éléments chauffants adressables par thermographie infrarouge.

### 2.3.3 Conclusions

**Lignes chauffantes.** J'ai traité dans cette partie de deux types d'éléments chauffants ; chacun correspond à une application différente du PNIPAM. Le premier dispositif est une ligne chauffante simple, visant à chauffer l'intégralité du canal sans discrimination. Il fait appel à une technologie micro-électronique volontairement limitée. La caractérisation de ce système montre que, même non optimisé, ses performances sont acceptables. Le dispositif chauffant n'est donc pas un point bloquant dans le développement de la technologie intégrée PNIPAM : le LAAS, en particulier le groupe N2IS, dispose de la technologie et du savoir-faire pour optimiser ce système et pour l'adapter aux autres éléments du dispositif. De nombreuses améliorations sont envisageables :

**Polysilicium.** Nous avons utilisé une résistance en couche d'or sur titane en raison de la facilité de dépôt de ces couches. Le silicium polycristallin montre des propriétés électro-thermiques plus intéressantes, mais implique une technologie légèrement plus lourde. Il peut être intéressant de tester ce matériau.

**Transparence.** L'application visée du dispositif appartient au domaine des laboratoires sur puces. Le domaine de la biologie fait souvent appel à la microscopie ; l'expérience a montré qu'il est préférable de concevoir des dispositifs aussi transparents que possible, afin de faciliter leur utilisation en microscopie. Ainsi, un élément chauffant en métal placé sous le canal interdit toute utilisation d'un microscope inversé, dans lequel l'objectif est situé sous l'échantillon. Dans cette optique, il est intéressant d'explorer la piste de l'ITO (*indium tin oxyde*, oxyde d'indium-étain) ; ce composé, déjà très utilisé pour l'électromouillage, a la particularité d'être un conducteur électrique transparent.

**Design.** Enfin, le design proposé est volontairement très simple. Il faut probablement l'adapter en fonction des contraintes des autres éléments du dispositif. Par exemple, s'il s'avère impossible d'utiliser des résistances transparentes en ITO, on peut envisager de modifier le design pour dédoubler la résistance en deux résistances parallèles, le canal étant aligné entre elles. Ainsi, l'observation par le dessous devient possible, tout en conservant l'homogénéité de température dans le canal.

**Éléments adressables.** Le second dispositif chauffant n'a pas été développé particulièrement pour notre application ; il a été conçu avant tout comme un capteur de température. Son intérêt majeur est de comporter des éléments chauffants miniaturisés adressables individuellement : une telle fonctionnalité est exactement ce dont nous avons besoin pour réaliser des mélangeurs électrocinétiques. Cependant, les dispositifs que nous avons pu tester ne sont pas adaptés à notre application. D'autres dispositifs ont été réalisés mais ils n'ont pas encore été évalués.

## 2.4 Fonctionnalisation de surface et greffage du PNIPAM

### 2.4.1 Chimie de greffage du PNIPAM

#### 2.4.1.1 Couche d'accroche de silane

**TMSMPM.** Nous avons choisi le silane 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (TMSPM, CAS : 2530-85-0) en raison de son extrémité méthacrylate, capable de réagir avec le polymère [228] ; il est aussi appelé  $\gamma$ -méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPTMS). Sa formule est donnée sur la FIG. 2.19. Ce silane est neutre, il ne s'ionise pas en solution. Son extrémité Si—(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (triméthoxysilane) est destinée à s'accrocher sur la surface à fonctionnaliser.

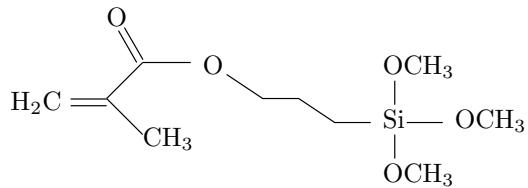


FIG. 2.19 – Molécule de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate

**Silanisation.** Le protocole établi s'inspire du protocole de fonctionnalisation « CEA-2 », développé au CEA-Leti pour immobiliser des sondes biologiques sur des biopuces [229, 230]. Le protocole établi pour le greffage du TMSPM comprend les étapes suivantes :

- Activation de la surface par un bain de NaOH ou par plasma O<sub>2</sub>, afin de créer des fonctions silanol Si—OH. Lavage à l'eau désionisée (EDI).
- Neutralisation HCl (si activation NaOH ou Brown) à 0,5 N pour neutraliser la basicité de la soude, puis lavage à l'EDI.
- Lavages à l'éthanol, afin de chasser au maximum les traces d'eau qui pourraient interagir avec les molécules de silane.
- Lavages au solvant de silanisation, s'il est différent de l'éthanol.
- Silanisation : le silane est dilué dans un solvant organique, de type éthanol, méthanol, trichloroéthylène ou hexadécane. Les concentrations habituellement utilisées pour la modification de surface sont de l'ordre de 10<sup>-4</sup> M. Dans le cas des capillaires et microcanaux, la forte augmentation du rapport surface sur volume oblige à utiliser des concentrations beaucoup plus élevées (de l'ordre de 10<sup>-1</sup> M). Dans le cas contraire, il pourrait y avoir une hétérogénéité de la silanisation dans le capillaire : la solution s'appauvrit en silane au fur et à mesure de sa progression dans le canal. La silanisation dure généralement une nuit, à température ambiante.
- Lavages au solvant de silanisation et l'éthanol, puis séchage.

- Réticulation (éventuelle) afin de stabiliser la couche organique : recuit en étuve pendant trois heures à 110 °C.

Des modifications mineures ont lieu selon le support de fonctionnalisation (voir la section 2.4.1.3) : type d'activation, nombre de lavages, nature du solvant, réticulation. Le protocole général reste toutefois le même ; il amène à une surface exposant des groupes acryliques prêts à réagir avec le polymère à greffer.

#### 2.4.1.2 Polymérisation de l'acrylamide et du NIPAM

**Contexte.** Les polymères à base d'acrylamide (FIG. 2.20, CAS : 79-06-1) sont très utilisés en biochimie, notamment pour l'électrophorèse. Ils sont depuis longtemps utilisés en tant que gel [231] ; plus récemment, ils ont été utilisés comme revêtements de canaux (capillaires ou puces), pour diminuer le phénomène d'électro-osmose et empêcher l'adsorption de protéines sur les parois [232, 233]. Les mécanismes de polymérisation radicalaire en chaîne de l'acrylamide sont maintenant bien connus [234]. L'acrylamide est particulièrement intéressant pour nous, car il est très proche du NIPAM. Le polyacrylamide (PAM) est l'équivalent d'un PNIPAM non thermosensible qui resterait toujours dans l'état hydrophile déplié ; il consiste par conséquent un excellent témoin pour nos expériences. On le substitue également parfois au PNIPAM dans certains tests préliminaires, afin de supprimer la variable thermosensible.

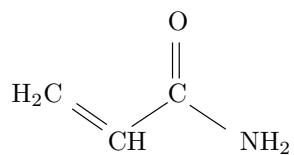
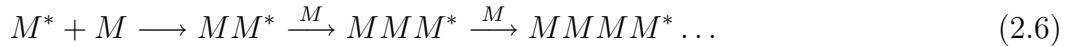


FIG. 2.20 – Molécule d'acrylamide.

**Polymérisation.** On distingue deux grandes catégories de réactions de polymérisation : la polymérisation en chaîne et la polymérisation par étapes. Une réaction de polymérisation en chaîne est une réaction conduisant à la formation de polymères par additions successives de monomères sur une extrémité active de la chaîne macromoléculaire. Si cette extrémité active est un radical, on parle de polymérisation radicalaire ; les polymérisations d'acrylamide et de NIPAM que nous réalisons sont des polymérisations en chaîne radicalaires. Elles se déroulent en trois phases : l'amorçage, la propagation et la terminaison. L'amorçage comprend deux sous-étapes. La première est la génération de radicaux primaires à l'aide d'un initiateur (Eq. 2.4). La seconde est l'addition du radical primaire sur une première unité monomère pour former le premier « maillon » de la chaîne polymère en croissance (Eq. 2.5). C'est, d'une manière générale, la première réaction qui constitue l'étape lente, et gouverne donc la vitesse globale du processus d'amorçage. La propagation est la principale étape de la polymérisation radicalaire (Eq. 2.6). C'est au cours de cette étape que la chaîne macromoléculaire se forme, par additions successives d'unités monomères sur le « macro-radical » en croissance. La terminaison correspond à la rencontre d'un polymère ayant un monomère activé en bout de chaîne et d'une espèce qui désactive ce monomère. Par exemple, deux macro-radicaux peuvent, lors d'une réaction de recombinaison, reformer une liaison covalente.

$$A_2 \longrightarrow 2 A^* \quad (2.4)$$



**Protocole.** Le protocole est adapté de celui proposé par S. HJERTÉN [228, 235]. On prépare une solution aqueuse d'acrylamide à 5% (w/v), dans lequel bulle de l'azote pendant 3 heures : il s'agit de chasser le dioxygène O<sub>2</sub>, susceptible d'inhiber la polymérisation en réduisant les radicaux libres. Puis, on ajoute l'initiateur (persulfate d'ammonium, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, CAS : 7727-54-0) et un catalyseur, le TEMED (*N,N,N',N'*-tetraméthyléthylénediamine, CAS : 110-18-9) ; leurs concentrations finales sont respectivement de 5 mg/mL et de 1 μL/mL. Aussitôt la solution prête, elle est introduite dans le canal à fonctionnaliser, dont les surfaces ont été préalablement greffées de silane TMSPM. Au bout d'une heure, le canal est abondamment rincé à l'eau désionisée, afin de ne laisser que les chaînes d'acrylamide chimisorbées sur la surface. Ce protocole amène à un greffage épars du polymère et des chaînes longues.

**Polymérisation du NIPAM.** J'ai présenté en détail le poly(*N*-isopropylacrylamide) à la section 1.3. Les mécanismes de polymérisation sont très proches de ceux mis en jeu pour l'acrylamide ; le protocole de greffage est identique.

#### 2.4.1.3 Supports de fonctionnalisation

**Substrats de silicium ou silice.** Avec notre protocole, le PNIPAM peut être greffé sur toute surface modifiable avec le TMSPM. Le TMSPM est un silane, donc facilement greffable sur toute surface de silicium ou de silice. Nous réalisons la fonctionnalisation selon ce protocole sur des wafers de silicium (avec oxyde SiO<sub>2</sub> natif ou oxydation thermique), des substrats de verre (par exemple, des lames de microscope), des couches d'oxyde SiO<sub>2</sub> PECVD<sup>6</sup> et des microbilles de silice. Sur ces supports, le greffage fonctionne de façon efficace et très reproductible. Quelques aménagements du protocole sont nécessaires selon les substrats : par exemple, pour fonctionnaliser les microbilles de silice (diamètre 5 à 10 μm), nous utilisons un mélangeur et une centrifugeuse, afin de manipuler les billes et les solutions. Cependant, ces modifications sont mineures et n'aboutissent pas à des résultats différents.

**Autres substrats.** L'application visée incite à augmenter autant que possible la surface fonctionnalisée, afin d'augmenter la surface d'interaction avec les molécules biologiques. Il est donc tentant de fonctionnaliser les surfaces de PDMS, qui constituent trois des quatre murs des canaux de notre dispositif (le quatrième étant une couche de SiO<sub>2</sub>). Je détaille ces travaux dans la section 2.4.3.1.

#### 2.4.2 Caractérisation chimique de la fonctionnalisation

**Techniques.** Nous avons mis en œuvre différentes techniques de caractérisation des couches chimiques greffées lors de la fonctionnalisation. La mesure d'angle de contact de goutte d'eau est une mesure de routine très répandue, mais qui ne fournit qu'une information limitée. Les spectroscopies Raman et infrarouge classiques se sont révélées incapables de détecter nos couches [236]. Il faut donc se tourner vers des techniques plus poussées : la spectroscopie infrarouge à réflexions internes multiples, et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en transmission. Toutes ces techniques servent à vérifier le bon déroulement des différentes étapes et la présence des fonctions chimiques greffées.

---

<sup>6</sup>Plasma-enhanced chemical vapor deposition : méthode de dépôt de couches minces utilisé en micro-électronique.

### 2.4.2.1 Angle de contact

**Théorie et principe.** Dans le domaine de la fonctionnalisation de surface, la mesure d'angle de contact est régulièrement employée pour vérifier le bon déroulement des différentes étapes. Les ordres de grandeur d'hydrophilie et d'hydrophobie peuvent, en effet, être associés aux fonctions chimiques que l'on s'attend à trouver sur la surface. Elle consiste à déposer, sur la surface à caractériser, une goutte d'un liquide choisi. Le mouillage entre les deux phases est défini par les interactions cohésives entre la surface et le liquide à l'échelle moléculaire. Selon l'affinité entre la surface et le liquide, la goutte s'étale plus ou moins (FIG. 2.21). Thomas YOUNG a établi en 1805 la relation entre l'angle de contact  $\theta_c$  de la goutte et les énergies interfaciales  $\gamma$  définissant l'équilibre mécanique de la ligne triple de contact liquide – solide – gaz (Eq. 2.7) [237]. Pour plus de détails sur la notion de mouillage, le lecteur peut se rapporter aux travaux de P.-G. DE GENNES [238, 239].

$$\cos \theta_c = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (2.7)$$

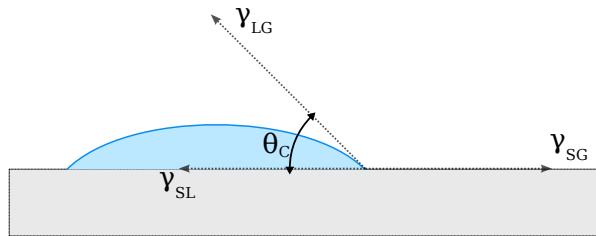


FIG. 2.21 – Représentation schématique d'une goutte de liquide en mouillage partiel sur une surface solide. S signifie solide, L liquide et G gaz.

**Utilisation en routine.** Nous utilisons la mesure d'angle de contact comme méthode de caractérisation de routine afin de vérifier le bon déroulement des étapes de fonctionnalisation. Ainsi, la première étape de la silanisation (activation à la soude ou au plasma) crée de nombreuses fonctions silanol (Si-OH), qui rendent la surface très hydrophile. Cela correspond à un étalement prononcé de la goutte, donc à un angle de contact faible ( $\sim 20^\circ$ ). Après silanisation, on obtient un angle compris entre  $70^\circ$  et  $80^\circ$ , selon l'état de stabilisation de la couche. L'acrylamide, quant à lui, est un polymère connu pour son hydrophilie.

**Mesures dynamiques.** La mesure d'angle de contact est encore plus intéressante pour le cas du PNIPAM, puisque la mouillabilité de la surface change dynamiquement avec la température. Une surface de PNIPAM « froid » ( $T < LCST$ ) montre les propriétés d'une surface hydrophile ; à l'inverse, une surface de PNIPAM « chaud » ( $T > LCST$ ) se comporte comme une surface hydrophobe. L'expérience a montré qu'il est délicat d'effectuer des mesures statiques, car cela implique la thermalisation de tous les éléments de la chaîne : le réservoir d'eau, le circuit d'eau amenant la goutte, la chambre de mesure, le substrat, etc. Une mesure statique porte sur l'état figé de la goutte après une durée déterminée. La technique dynamique consiste à faire varier, avec la seringue, le volume de la goutte en continu, en étudiant la variation de l'angle de contact [240]. Lorsqu'on augmente le volume de la goutte, sa base s'élargit et progresse sur la surface ; on obtient ainsi un angle de contact d'avancement (FIG. 2.22). Inversement, en diminuant le volume de la goutte, le liquide est aspiré, la base de la goutte rétrécit, donnant un angle de contact de recul. Nous avons donc opté pour des mesures dynamiques, plus riches en information.

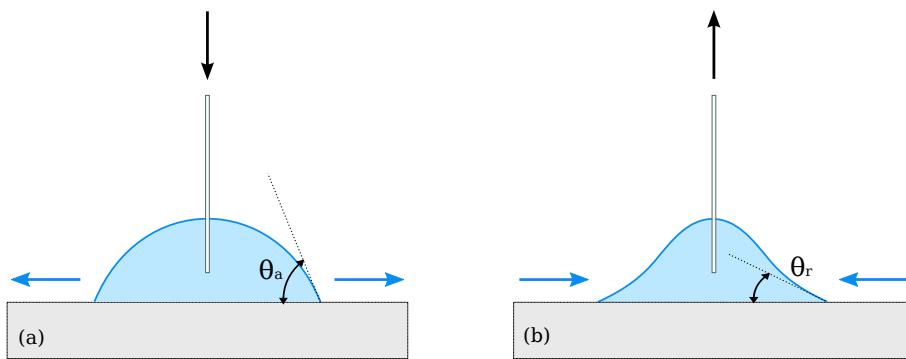


FIG. 2.22 – Schéma de mesures dynamiques d'angle de contact. (a) Augmentation du volume de la goutte et mesure de l'angle d'avancement  $\theta_a$ ; (b) diminution du volume de la goutte et mesure de l'angle de recul  $\theta_r$

**Mesures dynamiques sur PNIPAM.** La FIG. 2.23 montre l'évolution, en fonction de la température, de l'angle de contact d'avancement sur une surface fonctionnalisée avec du PNIPAM. L'angle de contact sur une surface de silane (TMSPM) est donné pour référence. On constate que l'angle d'avancement sur PNIPAM croît de façon significative ( $\sim 68^\circ$  à  $83^\circ$ ), en particulier autour de la température de transition ( $LCST \sim 32^\circ$ ); l'angle de contact d'avancement sur surface de TMSPM reste constant autour de  $74^\circ$  sur toute la gamme de température testée. Ces résultats sur PNIPAM sont à rapprocher de ceux de HUBER *et al.* [184], qui observent un comportement similaire sur des couches de PNIPAM d'environ 7,5 nm. PLUNKETT *et al.* [127] rapportent également ce phénomène sur des couches de PNIPAM de 19,5 nm. Nos protocoles de silanisation et de polymérisation sont différents; ils débouchent probablement sur des couches ayant une densité de greffage et une épaisseur différentes. Cependant, la ressemblance du comportement est un premier argument confirmant la présence de PNIPAM sur nos substrats.

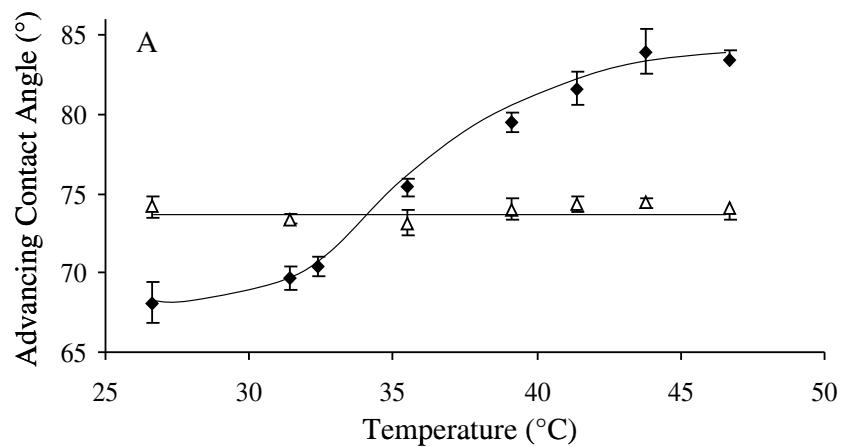


FIG. 2.23 – Évolution, en fonction de la température, de l'angle de contact d'avancement d'une goutte d'eau sur une surface de PNIPAM (◆) et sur une surface de silane TMSPM (△).

**Hystérésis sur PNIPAM.** La FIG. 2.24 montre l'évolution, en fonction de la température, de l'hystérésis entre l'angle de contact d'avancement et l'angle de contact de recul sur une surface fonctionnalisée avec du PNIPAM. On constate que la valeur de l'hystérésis augmente également avec la température, en particulier autour de la LCST ; l'hystérésis sur le silane reste constant. L'hystérésis sur PNIPAM suit le comportement de l'angle de contact d'avancement, ce qui signifie que l'angle de contact de recul est peu sensible à la température : une partie des molécules de PNIPAM présente à la solution aqueuse les mêmes groupes chimiques indépendamment de la température de transition. Un tel comportement a déjà été rapporté dans la littérature [241, 127]. Récemment, nos collègues spécialistes en modélisation à l'échelle atomique ont découvert que cet hystérésis pouvait être expliqué par la présence de monomères de NIPAM sous forme syndiotactique<sup>7</sup> dans les chaînes de PNIPAM [121]. Dans les monomères de NIPAM syndiotactique, les groupes polaires amide ne sont pas saturés par les interactions intramoléculaires dans l'état replié, comme c'est le cas pour la forme isotactique. Ces groupes sont alors libres d'interagir avec les molécules d'eau de la solution.

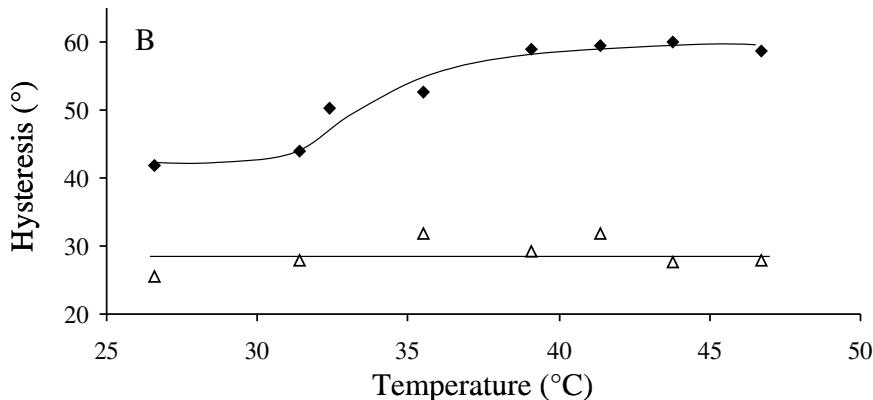


FIG. 2.24 – Évolution, en fonction de la température, de l'hystérésis entre l'angle de contact d'avancement et de recul d'une goutte d'eau sur une surface de PNIPAM (◆) et sur une surface de silane TMSPM (△).

**Conclusion.** La mesure d'angle de contact est une méthode rapide, simple et peu coûteuse. Elle permet d'obtenir des informations simples, mais toutefois limitées, sur la surface et les molécules chimiques qui y sont greffées. Nous l'avons utilisée comme méthode de routine pour vérifier les étapes de fonctionnalisation. Elle a également permis d'identifier des surfaces dont le comportement est cohérent avec la présence de PNIPAM. Cependant, il est nécessaire de mettre en œuvre des méthodes plus poussées pour réellement valider la présence de silane et de PNIPAM sur nos surfaces. Ces méthodes et leurs résultats font l'objet des deux sections suivantes.

#### 2.4.2.2 Spectroscopie infrarouge à réflexions internes multiples

**Principe.** La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique d'identification et de caractérisation chimique, basée sur l'absorption du rayonnement infrarouge par les liaisons chimiques de l'échantillon.

<sup>7</sup>Une macromolécule ou un polymère syndiotactique est principalement constitué d'unités élémentaires régulièrement alternées. Au contraire, dans une macromolécule isotactique, ces composants élémentaires sont tous organisés de la même façon.

La technique ATR (*attenuated total reflection*, réflexion totale atténuée), également appelée MIR (*multiple internal reflection*, réflexion multiple interne) utilise une propriété de la réflexion totale appelée onde évanescante. Cette méthode a l'avantage de permettre une analyse directe d'un échantillon solide ou liquide sans préparation particulière. Dans un montage ATR classique, un faisceau infrarouge est envoyé à travers un cristal positionné précisément en contact avec l'échantillon à analyser (voir la FIG. 2.25). L'ensemble est positionné de façon à ce que le faisceau se reflète au moins une fois sur la surface du cristal en contact avec l'échantillon à analyser. Cette réflexion crée une onde évanescante qui se propage sur l'échantillon sur quelques micromètres ; ce rayonnement infrarouge est absorbé de façon caractéristique par les liaisons chimiques de l'échantillon. Un détecteur placé à l'autre extrémité du cristal collecte le faisceau modifié. Pour une approche plus approfondie de cette technique, le lecteur peut se rapporter à l'ouvrage de référence *Internal Reflection Spectroscopy* de N.J. HARRICK [242].

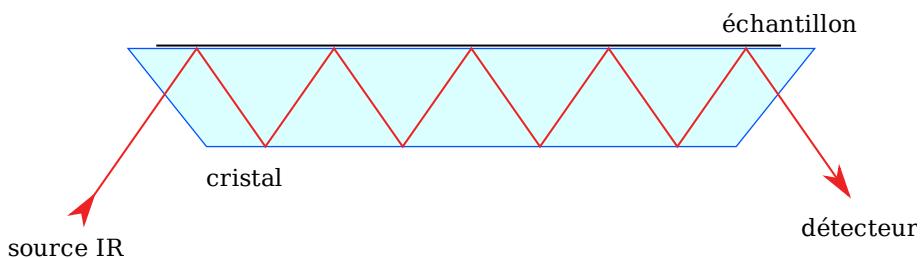


FIG. 2.25 – Schéma d'un montage de spectroscopie infrarouge ATR.

**Montage expérimental.** La technique ATR/MIR est particulièrement utile pour l'analyse de solides (tels que des poudres) et de liquides. Cependant, pour caractériser des échantillons fonctionnalisés, des adaptations sont nécessaires. Une solution coûteuse est de fonctionnaliser directement le cristal ATR : l'onde évanescente parcourt ainsi la zone fonctionnalisée. Une autre solution, développée au CEA-Léti, permet la caractérisation directe d'échantillons de silicium fonctionnalisés [243]. Elle fait appel à un montage comprenant deux prismes de silicium servant d'entrée et de sortie au faisceau infrarouge dans la plaque de silicium fonctionnalisée (voir la FIG. 2.26). Cette technique a déjà été appliquée à l'analyse de couches chimiques servant à l'accrochage d'espèce biologiques [244]. Les travaux présentés ci-après ont été réalisés en collaboration avec Névine ROCHAT et Guillaume DELAPIERRE, du CEA-Léti, Grenoble, France.

**Échantillons.** Nous découpons les échantillons à partir d'un wafer de silicium de 4 pouces, dopé P et doublement poli. L'épaisseur mesurée est de  $530 \mu\text{m}$  et la résistivité de  $20 \Omega\cdot\text{cm}$ . Après une activation de la surface plasma  $\text{O}_2$ <sup>8</sup>, les échantillons sont plongés dans une solution de silane à 10 % en méthanol aussitôt après, selon le protocole habituel décrit au paragraphe 2.4.1.1. L'un des échantillons est réservé, tandis que l'autre subit ensuite le greffage de PNIPAM tel que décrit au paragraphe 2.4.1.2.

**Résultats et discussion – Silane.** Le lecteur peut se rapporter aux formules du silane TMSPM (p. 54) et du NIPAM (p. 25) pour comparer les fonctions chimiques identifiées sur les spectres IR-ATR. Le spectre obtenu sur l'échantillon de silane est donné à la FIG. 2.27. Le groupe acrylate (ester) est bien identifié autour de  $1700 \text{ cm}^{-1}$ , notamment à  $1722 \text{ cm}^{-1}$ ; on observe aussi le *stretching*

<sup>8</sup>1000 mL/min  $\text{O}_2$  à 800 W sans cage pendant 5 min.

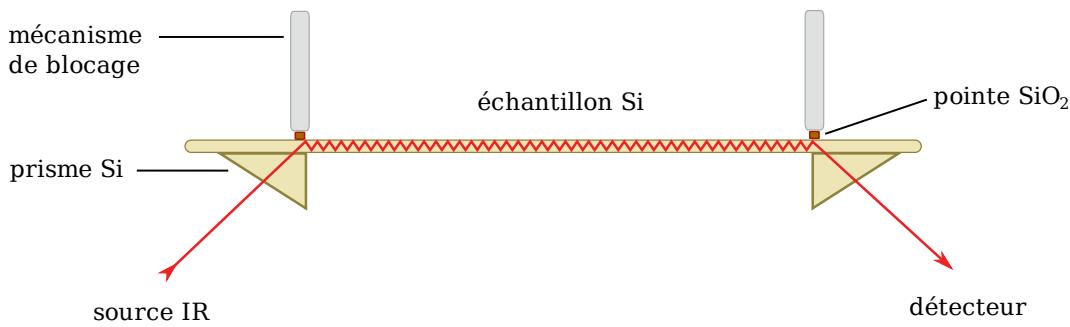


FIG. 2.26 – Schéma du montage de spectroscopie infrarouge MIR à deux prismes développé au CEA-Leti (d'après [243]).

(étirement) de  $-\text{C}=\text{CH}_2$  à  $1639 \text{ cm}^{-1}$ . Les contributions des groupes aliphatiques sont visibles autour de  $1900 \text{ cm}^{-1}$ . La contribution au-delà de  $3100 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée à l'eau résiduelle.

**Résultats et discussion – PNIPAM.** Le spectre obtenu sur l'échantillon de PNIPAM (greffé via une couche de silane) est donné à la FIG. 2.28. Le pic acrylate provenant du silane est toujours visible à  $1722 \text{ cm}^{-1}$ . Le pic à  $1646 \text{ cm}^{-1}$  correspond au mode *stretching* de  $\text{C}=\text{O}$  (amide I) ; le pic à  $1531 \text{ cm}^{-1}$  est affecté au mode *bending* (pliage) de  $\text{NH}$  (amide II), avec les modes *stretching* correspondants autour de  $3300 \text{ cm}^{-1}$ . La succession de pics autour de  $2900 \text{ cm}^{-1}$  correspond au mode *stretching* de  $\text{C}-\text{H}$  aliphatique.

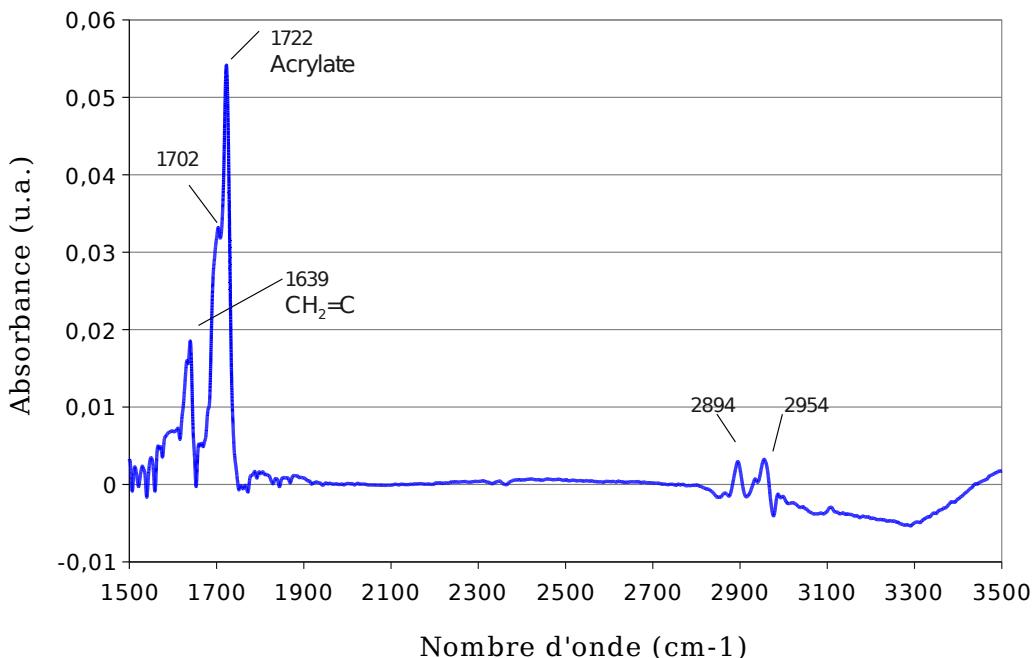


FIG. 2.27 – Spectre IR-ATR d'un échantillon de silicium doublement poli fonctionnalisé avec le silane TMSPM.

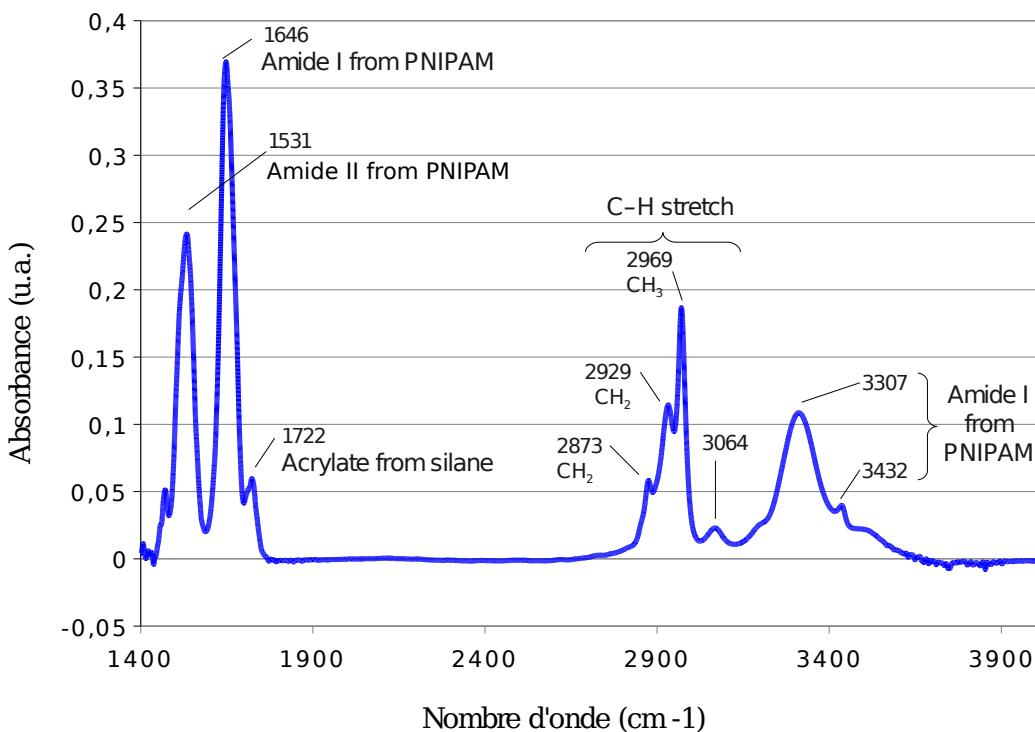


FIG. 2.28 – Spectre IR-ATR d'un échantillon de silicium doublement poli fonctionnalisé avec le PNIPAM via une couche d'accroche de silane.

**Conclusion.** Les bandes d'absorption caractéristiques acrylate, amide I et amide II confirment la présence de ces groupements, présents dans le TMSPM et le PNIPAM. Les spectres obtenus sont donc cohérents avec la présence de silane et de PNIPAM sur les échantillons analysés. Ces résultats sont encourageants, mais incomplets : d'une part, la présence d'eau résiduelle gêne une partie des mesures autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Par ailleurs, la limite inférieure de la gamme de mesure ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ) ne donne pas accès à une partie du proche infrarouge. Nous avons eu l'opportunité de collaborer avec une autre équipe spécialisée en spectroscopie infrarouge afin de consolider ces résultats ; ces travaux font l'objet de la section suivante.

#### 2.4.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en transmission

**Principe.** Le principe général est le même que dans la section précédente : l'échantillon à analyser est soumis à un rayonnement infrarouge dont l'absorption est caractéristique des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. En spectroscopie infrarouge classique (dispersive), on utilise un monochromateur pour faire varier la fréquence du faisceau infrarouge ; on mesure alors pour chaque fréquence l'énergie absorbée par les liaisons chimiques. En spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier transform infrared*, FTIR), on remplace le monochromateur par un interféromètre, afin de mesurer une gamme complète de fréquences simultanément ; la transformée de Fourier du signal mesuré donne accès à un spectre caractéristique du composé analysé. Pour plus de détails sur cette technique, le lecteur peut consulter l'ouvrage complet de Brian C. SMITH [245].

**Protocole expérimental.** Les travaux présentés dans cette section ont été réalisés en collaboration avec Meng LI et Yves J. CHABAL, du *Laboratory for Surface Modification, Rutgers University*,

*Piscataway, NJ, USA.* Les échantillons sont identiques à ceux décrits dans la section précédente. Les mesures sont effectuées en transmission, selon deux angles. La mesure selon l'angle d'incidence de Brewster est sensible à la fois aux composantes normales et tangentielle des modes de vibration des liaisons chimiques. La mesure selon l'incidence quasi-normale, en revanche, n'est sensible qu'à la composante tangentielle (parallèle à la surface). La combinaison des deux mesures permet, une fois l'affectation des pics effectuée, de déterminer l'orientation des molécules sur la surface.

**Résultats et discussion – Silane.** Le spectre obtenu sur l'échantillon de silane est donné à la FIG. 2.29. L'assignation des pics aux liaisons chimiques est effectuée par les spécialistes de la spectroscopie infrarouge. Le lecteur peut se rapporter à la représentation du silane TMSPM p. 54 pour comparer les fonctions chimiques identifiées sur le spectre FTIR. L'assignation des pics permet notamment d'identifier des bandes d'absorption caractéristiques des fonctions acrylate entre 1600 et  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Les pics à  $1720$  et  $1702\text{ cm}^{-1}$  sont assignés aux vibrations de *stretching* de la liaison C=O dans le groupe  $-\text{C}=\text{C}-\text{C}(=\text{O})$ . Les pics à  $1640$  et  $877\text{ cm}^{-1}$  sont assignés aux modes *stretching* de la liaison C=C et au *bending* C-H hors-plan du groupe  $-\text{C}=\text{CH}_2$  ([246] pp.163, 104, 106). La région  $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$  est plus complexe ; elle contient des modes provenant de différentes bandes. Elle inclut les modes *stretching* asymétrique ( $1250 - 1300\text{ cm}^{-1}$ ) et symétrique ( $1050 - 1200\text{ cm}^{-1}$ ) de C-O-C ([246] p.177). Elle contient également les modes de phonons<sup>9</sup> optiques longitudinaux (LO) et transverses (TO) de complexes Si–O–Si, formés soit entre molécules de silane réticulées, soit à partir de la chimisorption sur la surface de silicium oxydé (mode TO dans la gamme  $1040 - 1060\text{ cm}^{-1}$ , mode LO dans la gamme  $1150 - 1200\text{ cm}^{-1}$ ). Une particularité importante du mode de phonon LO est son absence sur le spectre obtenu en incidence quasi-normale (FIG. 2.29 (b)) ; cela signifie qu'il est polarisé normalement à la surface. Deux autres contributions possibles dans la région  $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$  sont le mode *stretching* de Si–O–C à  $1100\text{ cm}^{-1}$  et le mode *rocking* (balancement) de CH<sub>3</sub> à  $1190\text{ cm}^{-1}$  ; ces deux contributions peuvent être dues à une hydrolyse incomplète du silane (Si–O–CH<sub>3</sub>).

**Résultats et discussion – PNIPAM.** Le spectre obtenu sur l'échantillon comprenant la couche d'accroche de silane et le PNIPAM est donné à la FIG. 2.30. L'analyse FTIR révèle la présence de bandes d'absorption caractéristiques des groupes amide I et amide II entre  $1500$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$ . On observe également des bandes d'absorption autour de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , correspondant au groupe isopropyl (se rapporter à la représentation du PNIPAM p. 25). Plus précisément, les pics entre  $1500$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$  sont attribués à plusieurs modes *stretching* de CH ( $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2$ ) ; le pic à  $1656\text{ cm}^{-1}$  correspond au mode *stretching* de C=O (amide I) ; le pic à  $1535\text{ cm}^{-1}$  est affecté au mode *bending* de NH (amide II), avec les modes *stretching* correspondants autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Les bandes à  $1460\text{ cm}^{-1}$  et  $1377\text{ cm}^{-1}$  correspondent respectivement aux modes de *bending* asymétrique et symétrique de CH<sub>3</sub> ; la bande d'absorption à  $1460\text{ cm}^{-1}$  peut également contenir une contribution des modes *scissoring* (cisialement) de  $-\text{CH}_2$ , qui chevauchent le mode *bending* de  $-\text{CH}_3$ .

**Conclusion.** Les spectres et leur analyse confirment la présence de TMSPM et de chaînes de PNIPAM sur les substrats de silicium. Les mesures ont été effectuées sur des échantillons nettoyés de façon rigoureuse à l'eau et en bain ultrasons, pour décrocher les éventuelles chaînes de PNIPAM physisorbées sur la surface. On peut donc en conclure que ces chaînes sont chimisorbées sur la surface : notre chimie est efficace.

<sup>9</sup>Un phonon est un quantum de vibration dans un solide cristallin. Les branches optiques apparaissent à partir de plusieurs atomes par maille primitive. Charles KITTEL présente ces notions de façon approfondie dans *Physique de l'état solide* [226], chap. 4.

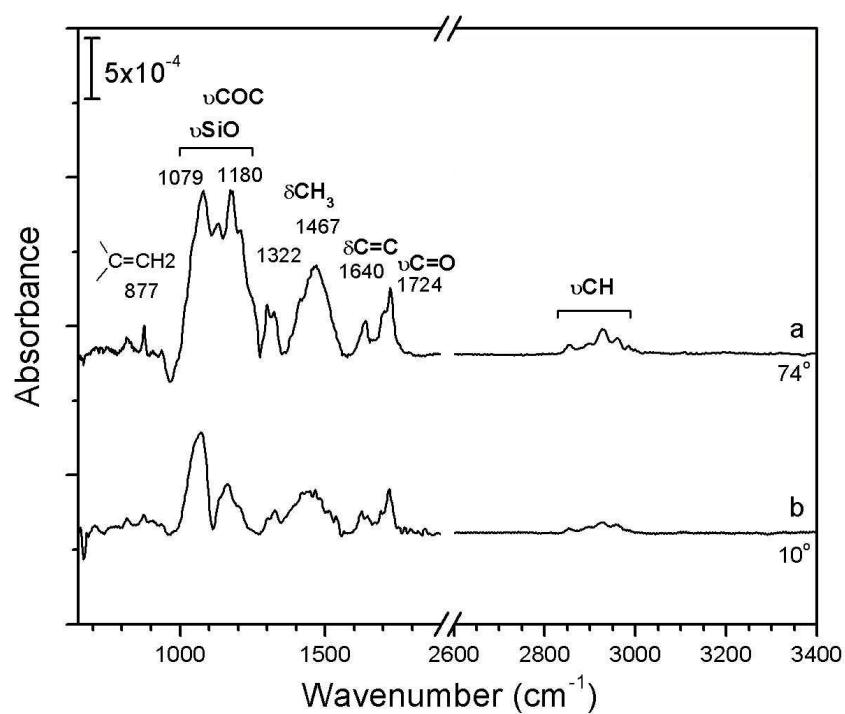


FIG. 2.29 – Spectre FTIR d'un échantillon de silicium doublement poli fonctionnalisé avec le silane TMSPM. (a) Angle de Brewster, (b) angle quasi-normal.

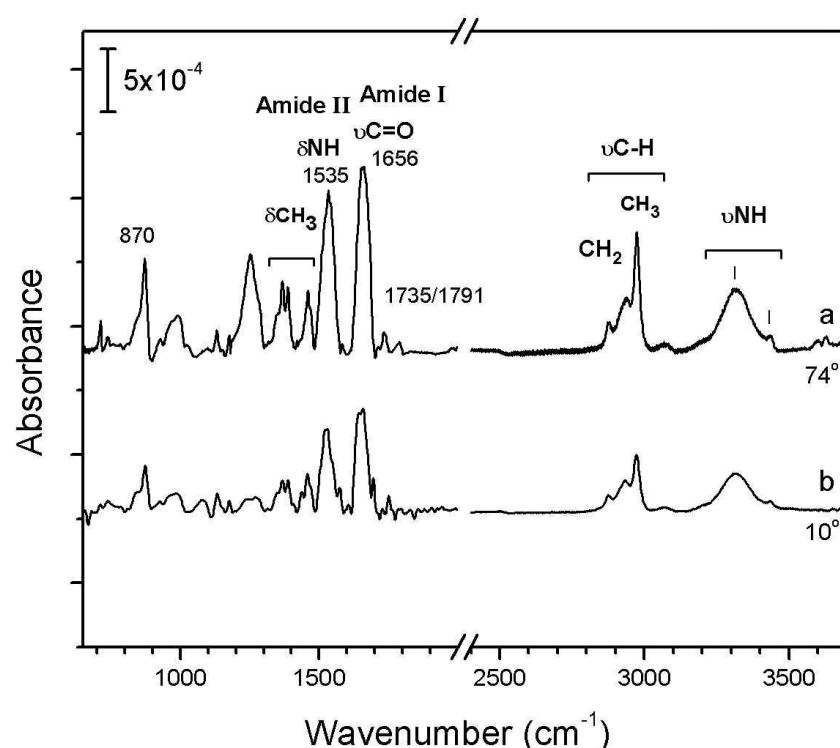


FIG. 2.30 – Spectre FTIR d'un échantillon de silicium doublement poli fonctionnalisé avec le PNIPAM via une couche d'accroche de silane. (a) Angle de Brewster, (b) angle quasi-normal.

## 2.4.3 Modifications du protocole

### 2.4.3.1 Fonctionnalisation du PDMS

**Motivation.** L’application biologique visée incite à augmenter la surface d’interaction entre le PNIPAM et les molécules biologiques. Il est tentant d’essayer de fonctionnaliser les surfaces de PDMS, qui constituent trois des quatre murs des canaux de notre prototype. Il s’agit dans cette section de déterminer si notre chimie est facilement transférable au support PDMS.

**Résistance du PDMS aux solvants organiques.** Le PDMS est généralement peu compatible avec la majorité des solvants organiques, qui le font gonfler [208]. Afin de préparer des tests de fonctionnalisation du PDMS, nous effectuons un test élémentaire de résistance de notre PDMS aux habituels solvants utilisés pour la silanisation : le trichloroéthylène, l’hexadécane, le méthanol et le toluène. Trois morceaux de PDMS séjournent pendant 24 heures dans ces solvants, puis nous comparons leur masse ; les résultats sont présentés dans le TAB. 2.3. On observe que le trichloroéthylène et le toluène imbibent complètement le PDMS et doivent donc être écartés. Dans ce test, le méthanol ne semble pas affecter le PDMS. L’hexadécane entraîne une hausse de masse qui n’est pas redhibitoire. Une observation supplémentaire, qui n’apparaît pas dans ce tableau, est que les échantillons ayant séjourné dans le méthanol ou l’hexadécane ont conservé une certaine élasticité, contrairement aux deux autres échantillons qui sont devenus cassants. Nous testons donc la fonctionnalisation du PDMS dans le méthanol et l’hexadécane.

TAB. 2.3 – Comparaison de l’augmentation de masse d’échantillons de PDMS ayant séjourné pendant 24 heures dans différents solvants organiques.

solvant	trichloroéthylène	hexadécane	méthanol	toluène
masse initiale	451 mg	570 mg	497 mg	507 mg
masse finale	1170 mg	774 mg	503 mg	954 mg
augmentation (%)	159 %	36 %	1,3 %	88 %

**Protocole.** Nous préparons des échantillons de PDMS, soumis à une activation au plasma O<sub>2</sub><sup>10</sup>, afin de procéder à différents tests de fonctionnalisation : dans l’hexadécane<sup>11</sup>, dans le méthanol (avec<sup>12</sup> et sans<sup>13</sup> catalyse par acide acétique) et dans le silane pur. Les témoins correspondent à des substrats subissant le même traitement, mais sans le silane. Une étape de greffage de polyacrylamide (5 % (m/v)) simule l’accrochage d’une couche de PNIPAM<sup>14</sup>. Des substrats de verre servent de référence pour la caractérisation par mesure d’angle de contact de goutte d’eau.

**Témoins.** Les résultats sont présentés sur la FIG. 2.31. Les résultats obtenus sur lame de verre indiquent le comportement recherché : l’angle de contact de goutte d’eau obtenu après silanisation sur lame de verre est entre 70 ° et 80 ° selon le solvant, ce qui est cohérent avec nos résultats

<sup>10</sup>1000 mL/min O<sub>2</sub> à 200 W avec cage pendant 30 s.

<sup>11</sup>90 % hexadécane, 10 % silane. Cette haute concentration en silane, non nécessaire ici, est héritée du protocole de silanisation en capillaires (voir le paragraphe 2.4.1.1).

<sup>12</sup>90 % méthanol, 8 % EDI, 2 % silane, quelques gouttes d’acide acétique.

<sup>13</sup>90 % méthanol, 8 % EDI, 2 % silane.

<sup>14</sup>Il arrive souvent que l’on remplace le PNIPAM par du polyacrylamide, un polymère non thermosensible très proche du PNIPAM. Voir la section 2.4.1.2

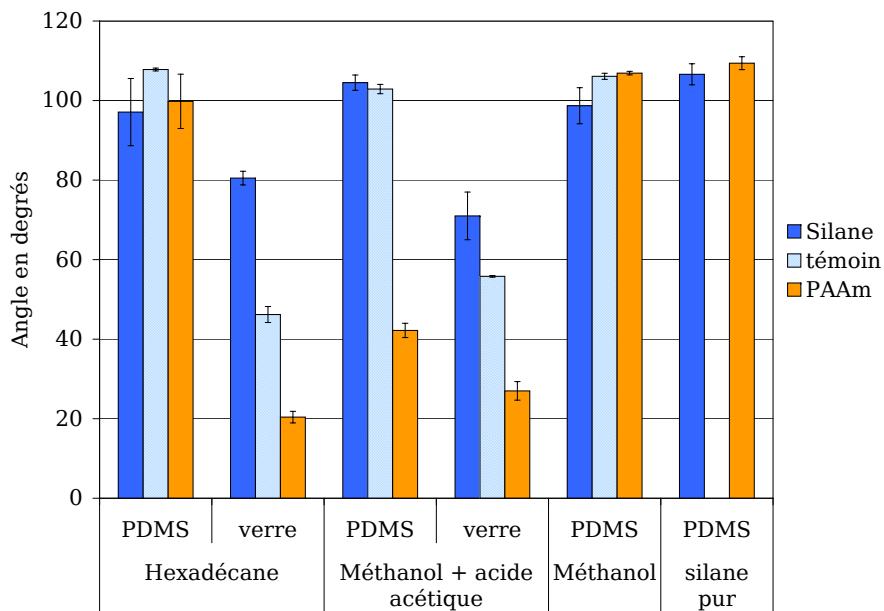


FIG. 2.31 – Caractérisation de la fonctionnalisation du PDMS (silane et acrylamide) par mesure de l’angle de contact d’une goutte d’eau. PAAm signifie polyacrylamide.

précédents [247]. Cet angle décroît ensuite entre  $20^{\circ}$  et  $30^{\circ}$  après greffage du polyacrylamide, bien connu pour être hydrophile [248].

**Résultats.** Les résultats obtenus sur PDMS pour le silane ne sont pas concluants. L’angle de contact après silanisation reste proche de l’angle de contact mesuré sur les témoins, autour de  $100^{\circ}$ . Ces valeurs sont à rapprocher du comportement natif du PDMS, qui est hydrophobe. C’est d’ailleurs également le comportement observé sur ces échantillons après l’étape de polymérisation de l’acrylamide, à l’exception d’un. L’échantillon de PDMS fonctionnalisé par le protocole « méthanol + acide acétique » montre une surface hydrophile ( $\sim 40^{\circ}$ ) après polymérisation d’acrylamide. Ce résultat encourageant n’a néanmoins pas pu être reproduit lors d’expériences complémentaires de vérification.

**Conclusion.** Notre protocole bien établi fonctionne de façon reproductible sur les supports de fonctionnalisation usuels à base de silice : capillaires,  $\text{SiO}_2$ , verre, pyrex. Les expériences menées sur le PDMS visent à établir si ce protocole est facilement transférable sur support PDMS. Les résultats montrent que la fonctionnalisation du PDMS se heurte à de sérieuses difficultés, qui nécessitent des compétences pointues en chimie des surfaces ; nous décidons donc de ne pas continuer sur cette voie et de choisir comme méthode alternative l’utilisation de microbilles de silice, qui augmentent la surface possible d’interaction.

#### 2.4.3.2 Modification du protocole

**Densité de greffage.** Lors des expériences d’accrochage et décrochage de protéines (voir le chapitre suivant), nous observons une désorption incomplète des molécules biologiques. Il est possible que ce problème vienne d’une adsorption non spécifique des protéines sur des zones non recouvertes de PNIPAM ; il est donc souhaitable d’augmenter la densité de greffage de silane et de PNIPAM sur

les substrats. Par ailleurs, BUNKER *et al.* ont également remarqué que l’adsorption réversible de protéines est meilleure avec des films de polymères sous forme de brosse, ayant une haute densité de greffage [249].

**Modifications du protocole.** La silanisation se déroule de façon identique, à la différence du silane ; on utilise le (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane (MPTMS, FIG. 2.32, CAS : 4420-74-0) au lieu du TMSPM. La polymérisation du NIPAM, en revanche, est effectuée selon un tout autre protocole. On prépare une solution contenant à 25% (m/v) de PNIPAM en dioxane. L’initiateur utilisé est l’azobisisobutyronitrile (AIBN, CAS : 78-67-1) à raison de 20 mg/mL. L’ensemble est chauffé à 80 °C pendant deux heures pour activer la polymérisation. Cette chimie modifiée n’a pas été caractérisée de façon aussi approfondie que la chimie initiale. Les résultats obtenus avec cette chimie sont détaillés au chapitre suivant.

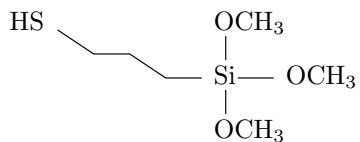


FIG. 2.32 – Molécule de (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane

#### 2.4.4 Conclusions

**Fonctionnalisation et caractérisation.** J’ai détaillé dans cette section nos travaux concernant la fonctionnalisation chimique de surface, en particulier la chimie de greffage du PNIPAM via une couche d’accroche de silane TMSPM. Le protocole de silanisation est dérivé du protocole CEA-2 sur lequel j’ai travaillé précédemment au Léti ; le protocole de polymérisation est adapté de la littérature. La caractérisation par mesure d’angle de contact de goutte d’eau sert de mesure de routine ; elle permet d’identifier un comportement cohérent avec la présence de PNIPAM sur les substrats analysés. De plus, deux techniques différentes de spectroscopie valident la présence de couches de silane et de PNIPAM sur nos échantillons. Ces expériences confirment donc que notre chimie de greffage fonctionne et est reproductible ; les résultats obtenus peuvent par ailleurs être réutilisés comme référence pour l’analyse infrarouge du TMSPM et du PNIPAM. En revanche, le protocole de fonctionnalisation ne peut pas être facilement appliqué au support PDMS ; la fonctionnalisation du PDMS est un sujet de recherche à part entière et nous préférons nous tourner vers l’utilisation de microbilles en silice afin d’augmenter la surface spécifique. Enfin, un protocole modifié a été testé afin d’augmenter la densité de greffage de PNIPAM et ainsi améliorer la réversibilité de l’adsorption. Pour des raisons de temps, nous ne pouvons pas caractériser cette chimie modifiée de façon aussi approfondie que le protocole initial ; les résultats obtenus en accrochage – décrochage avec ce protocole adapté sont présentés au chapitre suivant.

### 2.5 Conclusion

**Démarche et conception générale.** Dans ce chapitre, j’ai présenté de façon approfondie le développement des briques fonctionnelles du dispositif. Nous avons tout d’abord mené une réflexion sur les fonctionnalités souhaitées afin de déterminer les objectifs. Nous avons ensuite procédé au

choix des matériaux en comparant leurs caractéristiques et en nous aidant de la littérature ; nous avons finalement opté pour un canal réalisé en PDMS moulé à partir de motifs en SU-8. Par ailleurs, j'ai détaillé les procédés d'assemblage testés et validés au cours de nos travaux, en décrivant notamment la géométrie du canal et les moyens choisis pour augmenter la surface spécifique : des microbilles piégées par un étranglement du canal en PDMS.

**Dispositifs chauffants.** J'ai ensuite présenté les développements technologiques visant à activer la transition du PNIPAM. Après des réflexions préliminaires, nous avons orienté notre choix vers une technologie simplifiée utilisant une géométrie sous forme de ligne résistive chauffante. Nous avons réalisé un modèle utilisant la méthode des éléments finis pour simuler le chauffage par effet Joule et le transfert de chaleur dans l'assemblage verre – canal – PDMS. Les résultats de simulation ont montré un chauffage homogène dans le canal et une constante de temps acceptable au regard des dynamiques mises en jeu. Nous avons procédé à la réalisation technologique de ces lignes chauffantes par un procédé standard de *lift-off* et caractérisé électriquement et thermiquement ce dispositif. Même non optimisé, il permet de chauffer de façon homogène le canal ( $45^{\circ}\text{C}$  pour 8 W). Des éléments chauffants adressables, développés en collaboration avec d'autres chercheurs du groupe, permettent un contrôle de la température à plus petite échelle ; ils ont été caractérisés afin d'envisager une application au mélange microfluidique. Enfin, j'ai proposé un ensemble de pistes à suivre pour optimiser et améliorer le dispositif.

**Fonctionnalisation chimique.** J'ai détaillé le protocole de fonctionnalisation chimique visant à greffer le PNIPAM sur des surfaces à base de silice ou silicium. La caractérisation par angle de contact et spectroscopie infrarouge confirme la présence de ces couches et permet de conclure que la chimie est efficace et reproductible. La transposition du protocole de greffage sur substrat PDMS n'a pas abouti et demande des travaux plus poussés. Une modification du protocole a été effectuée pour obtenir des couches plus denses et ainsi améliorer les performances de désorption.

**Application et intégration.** J'ai présenté dans ce chapitre le développement de la technologie PNIPAM et la caractérisation individuelle de chaque élément de base. Dans le chapitre suivant, je me concentre sur les applications de cette technologie dans le domaine des laboratoires sur puce.



# Chapitre 3

## Contrôle electrocinétique et accrochage de protéines

*“If I’d asked my customers what they wanted, they would have told me ‘A faster horse’.”*

**Henry Ford**, (attribué)

### 3.1 Introduction

**Motivations.** L’objectif général des travaux présentés dans cette thèse est de mettre en place les premières bases d’une nouvelle filière technologique des laboratoires sur puce, basée sur les propriétés originales du PNIPAM. Au chapitre 1, j’ai tout d’abord présenté le contexte des systèmes miniaturisés d’analyse, afin d’identifier les enjeux actuels. Au chapitre 2, j’ai détaillé les travaux de développement de la technologie PNIPAM ; son intégration dans les laboratoires sur puce ne semble pas poser de problèmes majeurs. Dans ce chapitre, je présente deux applications particulières de la technologie PNIPAM dans le domaine des laboratoires sur puce. La première consiste à tirer avantage du changement de conformation du PNIPAM pour modifier à volonté les phénomènes électriques à l’interface liquide – solide dans les canaux ; il s’agit d’étudier les possibilités de contrôle du flux electrocinétique par le PNIPAM, avec pour objectif final le développement de mélangeurs. La seconde application repose sur la transition entre les états hydrophobe et hydrophile du PNIPAM : il s’agit de déterminer si des couches de PNIPAM peuvent être utilisées comme piège à objets biologiques ; un dispositif d’accrochage et décrochage contrôlé de protéines serait par exemple très utile dans le cadre de la préparation d’échantillons pour la protéomique.

### 3.2 Contrôle electrocinétique

#### 3.2.1 Contexte et principe

##### 3.2.1.1 Mélangeurs electrocinétiques

**Micromélange.** La fluidique à bas nombre de Reynolds, caractéristique des laboratoires sur puce, engendre nativement des flux laminaires et stables [250]. Par conséquent, le mélange de liquides, reposant uniquement sur la diffusion, est beaucoup plus long qu’aux échelles macrométriques

(FIG. 3.1). Le développement de mélangeurs plus performants fait donc l'objet de recherches intensives [251, 252, 253, 49]. On distingue généralement deux types de micromélangeurs ; les mélangeurs passifs ne requièrent pas de source d'énergie externe [254] ; c'est par exemple le cas de ceux basés sur la géométrie des canaux ou sur des microstructures [255, 256]. Les mélangeurs actifs, par exemple électrocinétiques, sont actionnés par une source d'énergie externe.

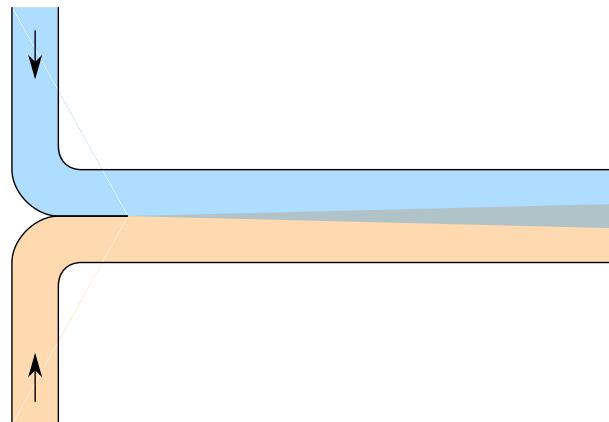


FIG. 3.1 – Schéma illustrant la lenteur du mélange reposant sur la seule diffusion de deux liquides.

**Mélange électrocinétique** L'application d'un champ électrique sur un liquide électrolytique, aux abords d'une surface chargée, entraîne le mouvement d'ensemble du liquide. Si la surface est chargée de façon hétérogène, ce phénomène d'« électro-osmose » est accompagné de recirculations de liquide pouvant créer des rouleaux convectifs [257] ; les mélangeurs électrocinétiques reposent sur ce principe. STROOCK *et al.* ont vérifié expérimentalement l'influence de motifs de charges de surface sur le flux électro-osmotique [258] : on observe effectivement des flux de recirculation sous l'action d'un champ électrique stationnaire [259]. Notre démarche consiste à utiliser le PNIPAM pour contrôler dynamiquement le flux à l'interface solide – liquide, au voisinage de la « double couche électrique ». L'objectif à terme est le développement de mélangeurs reposant sur le dessin dynamique de motifs de charge de surface, grâce au contrôle local de l'état du polymère. Je détaille ci-après les notions de double couche électrique et d'électro-osmose (FIG. 3.2).

### 3.2.1.2 Double couche électrique

**Définition.** La double couche électrique est un modèle décrivant la variation du potentiel électrique dans un électrolyte aux abords d'une surface. Ainsi, lorsqu'un liquide non acide est au contact d'une surface de silice, celle-ci se charge à cause de la dissociation des molécules de surface. Une surface de silice contenant des groupements silanol  $\text{SiOH}$  laisse place à des espèces  $\text{SiO}^-$  et libère des protons  $\text{H}^+$ . Les ions positifs présents dans la solution sont attirés vers la surface chargée négativement et forment une première couche en regard de la surface. Cette couche dense ( $\leq 1 \text{ nm}$ ) de contre-ions, appelée couche de Stern, écrante les charges négatives de surface. Une seconde couche, plus diffuse ( $\sim 10 \text{ nm}$ ), se forme ensuite : la couche de Gouy-Chapman. Les ions présents dans cette seconde couche sont libres de diffuser dans le liquide (FIG. 3.3). Au-delà de la couche diffuse, le liquide est neutre [260].

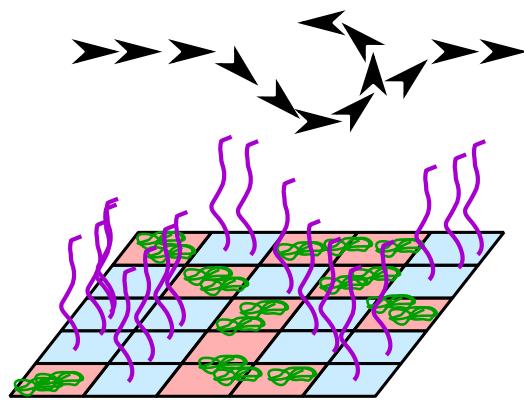


FIG. 3.2 – Principe d'un mélangeur électrocinétique à technologie PNIPAM. L'activation de motifs de surface de charges définis par la conformation du PNIPAM doit permettre de créer des recirculations de liquide. L'état du PNIPAM est contrôlé par des éléments chauffants adressables miniaturisés.

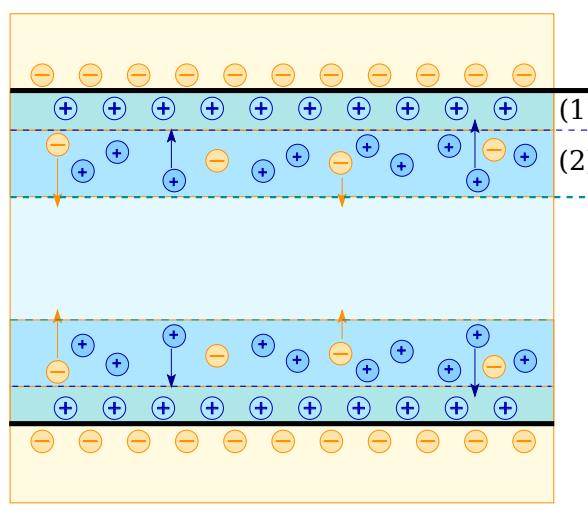


FIG. 3.3 – Schéma illustrant un modèle de la double couche électrique. La couche de Stern (1) est dense et localisée près de la surface. La couche de Gouy-Chapman (2) est plus diffuse. Les deux couches ont une épaisseur comprise entre 1 et 10 nm [261].

**Historique.** Plusieurs théories ont été développées concernant la répartition des charges électriques au voisinage des surfaces. En 1879, HELMHOLTZ ne considère dans la solution qu'une distribution de charge opposée [262]. GOUY et CHAPMAN approfondissent cette théorie en introduisant le principe de couche diffuse liée à l'agitation thermique ; ils proposent un modèle où le potentiel décroît exponentiellement à cause des contre-ions [263, 264]. Puis, STERN propose un modèle dans lequel la couche diffuse commence à une distance finie de la paroi [265]. D'autres théories plus complexes ont été développées (triple couche électrique, par exemple), ayant pour but une compréhension plus intime des phénomènes qui entrent en jeu [266].

**Potentiel  $\zeta$ .** Le potentiel  $\zeta$  (*zéta*) est la différence de potentiel entre la couche dense de Stern et le liquide. Il caractérise la répartition des charges électriques sur la surface. C'est un paramètre clef dans les laboratoires sur puce, en particulier ceux utilisant des effets électrocinétiques. KIRBY *et al.* ont récemment publié une étude complète sur le potentiel  $\zeta$  dans les microsystèmes fluidiques, avec une attention particulière pour les puces de séparation [267, 268].

### 3.2.1.3 Électro-osmose

**Définition.** L'électro-osmose est le mouvement d'ensemble d'un fluide provoqué par l'application d'un champ électrique tangentiel dans la couche diffuse de la double couche électrique. Le mouvement des ions de la couche diffuse entraîne d'un bloc le liquide tel une gaine (FIG. 3.4) [269].

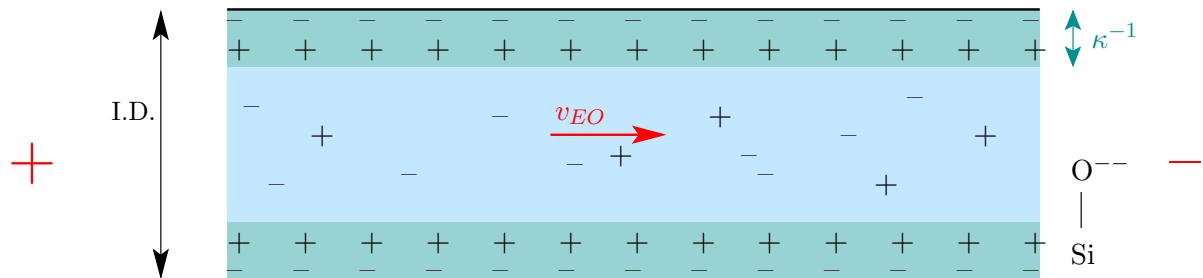


FIG. 3.4 – Illustration schématique d'un flux électro-osmotique dans un canal.  $\kappa^{-1}$  représente l'épaisseur de la double couche électrique,  $v_{EO}$  la vitesse électro-osmotique et I.D. le diamètre interne du capillaire.

**Grandeurs caractéristiques.** La vitesse électro-osmotique  $v_{EO}$  est proportionnelle à l'intensité  $i$  et au potentiel électrocinétique  $\zeta$  de la paroi ; elle est inversement proportionnelle à la conductivité  $\sigma$  et à la viscosité  $\eta$  de la solution (Eq. 3.1). La mobilité électro-osmotique  $\mu_{EO}$  de l'électrolyte dans le canal est donnée par la relation Eq. 3.2 où  $E$  est le champ électrique appliqué ( $V.cm^{-1}$ ),  $L$  la longueur du canal (cm) et  $t$  le temps que met le liquide pour parcourir la distance  $L$ . L'électro-osmose est un moyen d'actionnement très répandu en analyse, ce qui explique les recherches poussées visant à sa caractérisation [270] et explorant ses applications [271]. Plusieurs groupes travaillent également à sa simulation numérique [272] et à des techniques de visualisation [273].

$$v_{EO} = \frac{i \zeta}{4 \pi \sigma \eta} \propto \frac{\zeta}{\eta} \quad (3.1)$$

$$\mu_{EO} = \frac{v_{EO}}{E} = \frac{L}{t E} \quad (3.2)$$

**Paramètres.** Le pH de la solution est un paramètre important de l'électro-osmose ; en modifiant les constantes de dissociation des groupements chimiques, il fixe leur degré d'ionisation et donc le potentiel  $\zeta$  [274]. Le pH est en général fixé par le manipulateur, mais des variations non désirées peuvent avoir lieu par des phénomènes d'électrolyse [275]. D'autre part, la répartition des contre-ions dans la double couche électrique est fonction de la force ionique de la solution, donc de la concentration des différentes espèces [276]. Enfin, certains tampons contiennent des couples acide – base dont le  $pK_a$  est sensible à la température, modifiant ainsi le pH. La température influe également sur la viscosité dynamique de l'eau, qui varie de 1,79 cP à 0,28 cP entre 0 et 100 °C, provoquant ainsi une augmentation de la mobilité électro-osmotique.

**Masquage des charges de surface par un polymère.** Pour réduire de façon significative l'électro-osmose, il est courant d'utiliser un revêtement polymère greffé sur la surface des canaux. Les polymères à base d'acrylamide sont utilisés en électrophorèse capillaire pour supprimer le flux électro-osmotique, parfois gênant [277]. La capacité de bascule conformationnelle du PNIPAM est particulièrement intéressante dans cette situation : elle permet d'envisager de contrôler les phénomènes électrocinétiques à l'interface solide – liquide. Le phénomène d'électro-osmose est basé sur la répartition des charges de surface ; une altération de la répartition des charges électriques de surface modifie localement la viscosité du liquide sur la paroi. La FIG. 3.5 montre les deux états gonflé et replié du polymère selon la température. Dans l'état gonflé, le PNIPAM empêche le glissement du liquide ; en revanche, dans l'état replié, la force électrique générée par le potentiel de polarisation s'applique sur les charges de la double couche électrique, entraînant un glissement du liquide sur la surface.

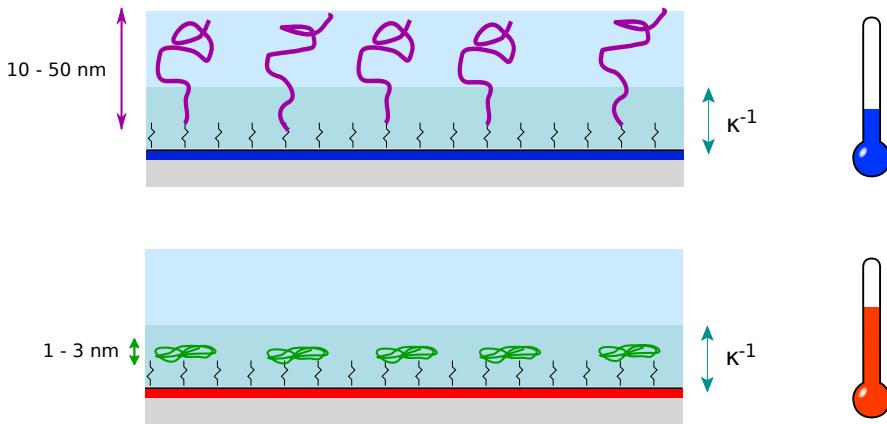


FIG. 3.5 – Masquage de la double couche électrique par le poly(NIPAM) selon sa conformation, dépendante de la température.  $\kappa^{-1}$  est l'épaisseur de la double couche électrique.

### 3.2.2 Mesure et modification du flux électro-osmotique

#### 3.2.2.1 Méthode de l'observation du courant

**Principe de la mesure.** HUANG *et al.* proposent en 1988 une méthode de mesure du flux électro-osmotique par observation du courant (*current monitoring*) [278]. Le capillaire dans lequel on souhaite mesurer la vitesse électro-osmotique est rempli d'un tampon de concentration  $C_1$ ; ses deux extrémités sont plongées dans des réservoirs (FIG. 3.6) contenant le même tampon, l'un

de concentration  $C_1$ , l'autre de concentration légèrement différente, par exemple  $C_2 = 0,9 \times C_1$ . L'application d'un champ électrique entre les réservoirs provoque le déplacement électro-osmotique du tampon  $C_1$  dans le capillaire et son remplacement progressif par le tampon  $C_2$ . Ce changement de concentration provoque une modification des espèces ioniques dans le capillaire qui se traduit par une diminution progressive du courant électrique. Lorsque tout le contenu du capillaire a été remplacé, le courant atteint un palier. La FIG. 3.7 montre une courbe type obtenue sur l'un de nos capillaires. Le flux électro-osmotique dépend de l'état des charges présentes sur la surface et de leur éventuel masquage par des couches chimiques ; le temps nécessaire au remplacement du contenu du capillaire donne donc une information directe sur la mobilité électro-osmotique (EQ. 3.2). Cette méthode simple est régulièrement utilisée pour caractériser le flux électro-osmotique dans les systèmes microfluidiques [279].

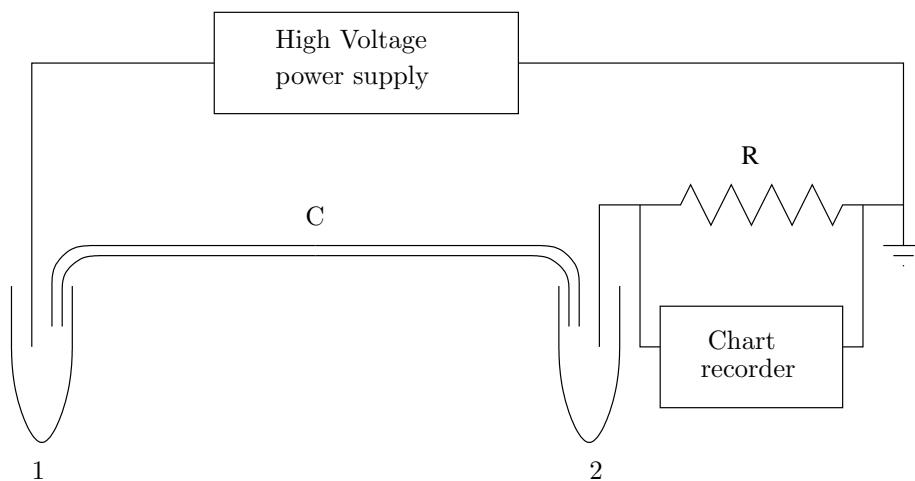


FIG. 3.6 – Diagramme schématique de la mesure de courant pour déterminer la vitesse électro-osmotique. 1 et 2 représentent les réservoirs d'électrolyte, reliés par le capillaire C [278].

**Paramètres.** Outre les paramètres de l'électro-osmose, cette expérience est sensible à la différence de concentration entre les deux tampons  $C_1$  et  $C_2$ . La différence minimale est de 5 % selon HUANG *et al.*; une différence de concentration trop faible nivèle les différences de résistivité du capillaire et rend la mesure difficile. Pour cette raison, il est tentant d'utiliser une différence importante (par exemple une différence de 50 %) pour faciliter la mesure. Cependant, une différence importante de concentration est couplée à une différence de force ionique qui modifie la répartition des contre-ions dans la double couche électrique, modifiant ainsi l'expérience.

**Montage expérimental.** Le montage expérimental<sup>1</sup> permet de mesurer le courant circulant dans le circuit (FIG. 3.8). Deux tubes eppendorf servant de réservoirs sont remplis avec des concentrations différentes (typiquement  $0,5\times$  et  $0,45\times$ )<sup>2</sup> d'un même tampon de pH basique (TBE), et placés dans une étuve (Memmert UNE 200), permettant de faire varier la température environnante. Le capillaire à étudier est rempli avec le tampon  $0,5\times$  et ses extrémités sont plongées dans les réservoirs.

<sup>1</sup>L'expérience de mesure de la vitesse électro-osmotique a été mise en place dans le cadre des travaux de doctorat de Patrick ABGRALL.

<sup>2</sup>TBE  $1\times$  : 0,45 M Tris Borate, 0,01 M EDTA. On peut noter que le TBE contient du Tris, dont le pKa change avec la température. Par ailleurs, nous avons utilisé des tampons de  $1\times$  et  $0,5\times$  quand la mesure était difficile.

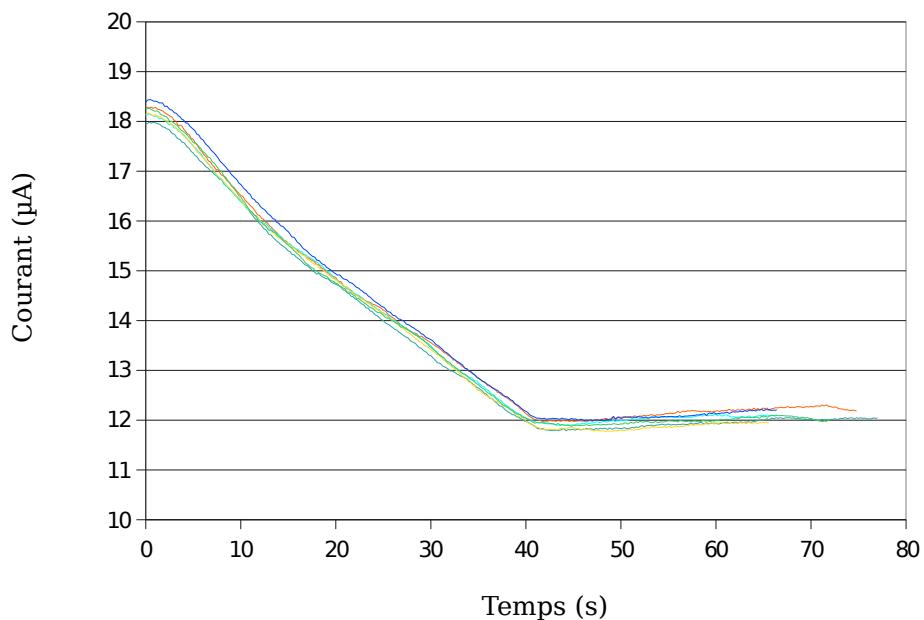


FIG. 3.7 – Courbe typique de mesure d'électro-osmose (6 courbes superposées). Courbes obtenues dans un capillaire nu. Champ positif de 400 V/cm, tampons de TBE de 1× et 0,5×.

Une alimentation haute-tension LabSmith HVS448 3000 V, reliée à deux électrodes, sert à appliquer le champ électrique ; elle est pilotée par une carte d'instrumentation National Instruments, également chargée de mesurer l'intensité du courant dans le circuit. L'ensemble est connecté à un ordinateur qui permet de piloter l'expérience.

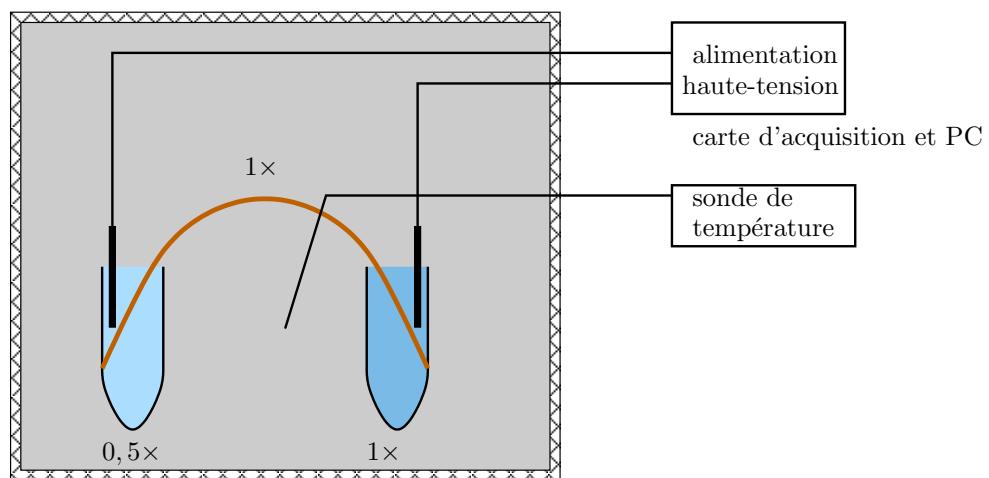


FIG. 3.8 – Expérience de mesure du flux électro-osmotique.

### 3.2.2.2 Modification du flux électro-osmotique

**Modification des charges de surface par le silane.** La présence de silane seul sur les parois du canal masque en partie les charges de surface de la même façon qu'un polymère ; l'électro-osmose

reste cependant non négligeable. À température ambiante ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), la mobilité électro-osmotique dans les capillaires non silanisés<sup>3</sup> est d'environ  $4,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ . Pour un capillaire silanisé, elle est de  $2,06 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ , soit moitié moindre.

### 3.2.3 Contrôle du flux électro-osmotique par le PNIPAM

#### 3.2.3.1 Expérience préliminaire

**Polyacrylamide.** En électrophorèse capillaire, l'acrylamide est régulièrement utilisé pour supprimer le phénomène indésirable d'électro-osmose. Nous caractérisons des capillaires revêtus d'acrylamide afin d'obtenir un modèle auquel comparer le comportement du PNIPAM sous la LCST. L'électro-osmose est considérablement réduite par la présence d'acrylamide, mais n'est pas complètement supprimée (FIG. 3.9) :  $\mu_{EO} = 0,25 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$  dans le capillaire avec acrylamide, soit une réduction de 94 % environ par rapport à la mobilité dans le capillaire nu :  $\mu_{EO} = 3,85 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ .

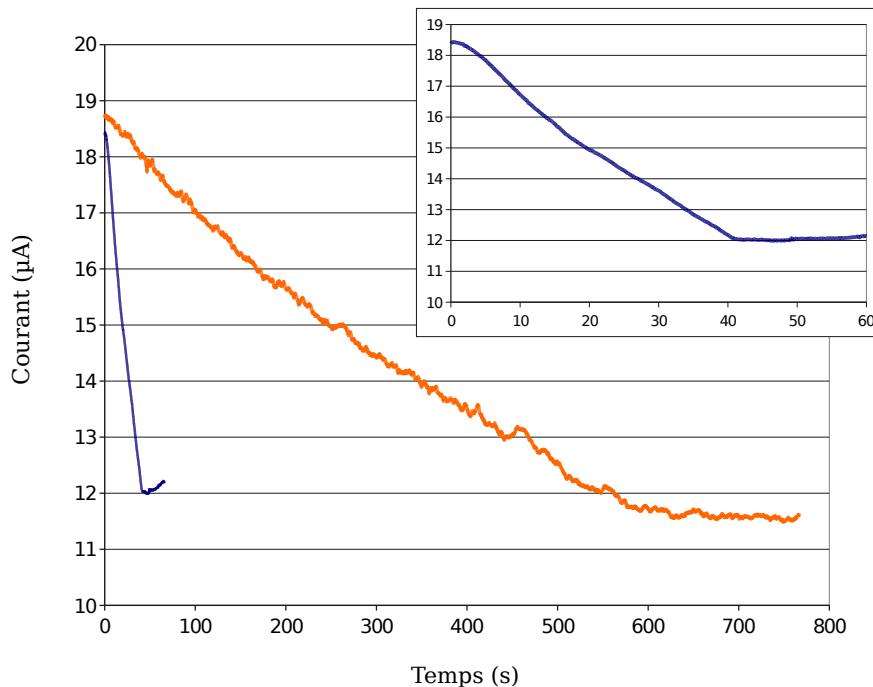


FIG. 3.9 – Comparaison du flux électro-osmotique dans un capillaire nu (témoin, courbe bleue, à gauche et dilatée en insert) et un capillaire avec un revêtement d'acrylamide (courbe principale, en orange). Champ positif de  $400 \text{ V/cm}$ , tampons TBE  $1\times$  et  $0,5\times$ .

#### 3.2.3.2 Influence du PNIPAM sur la mobilité électro-osmotique

**PNIPAM à température ambiante.** À température ambiante, sous la LCST, le polymère est dans l'état hydrophile et gonflé, équivalent à un revêtement d'acrylamide. Comme prévu, le flux électro-osmotique mesuré est extrêmement faible, à tel point qu'il est difficile d'extraire de la courbe

<sup>3</sup>Cette valeur et les suivantes ont été obtenues dans les mêmes conditions : champ positif de  $400 \text{ V/cm}$ , tampons TBE  $1\times$  et  $0,5\times$ .

la mobilité électro-osmotique (FIG. 3.10) ; on estime celle-ci à environ  $0,03 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ <sup>4</sup>. Il y a environ deux ordres de grandeur entre cette valeur et celle de la mobilité dans le capillaire silanisé ( $2,33 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ ).

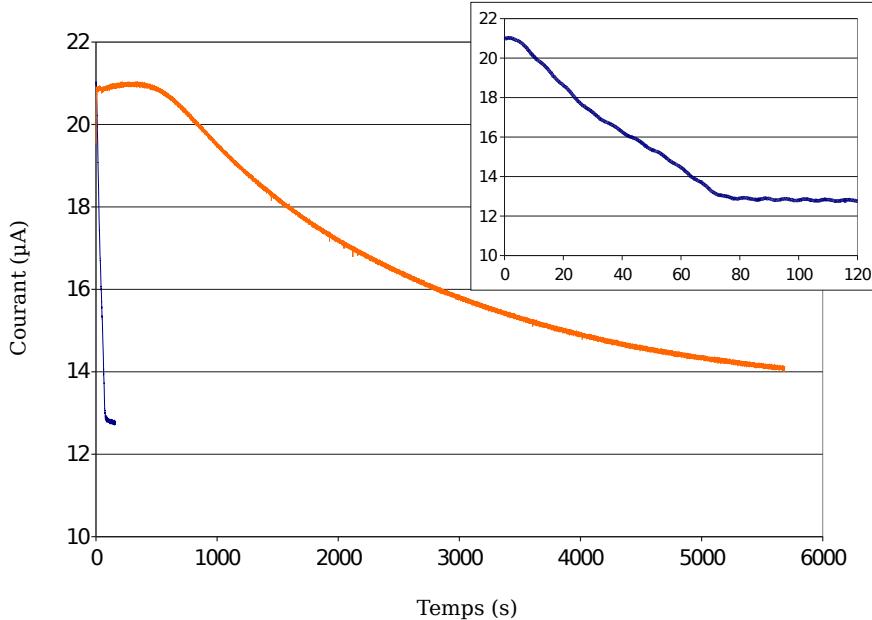


FIG. 3.10 – Comparaison du flux électro-osmotique dans un capillaire silanisé (témoin, courbe bleue à gauche et dilatée en insert) et un capillaire avec PNIPAM (courbe principale, en orange), à température ambiante inférieure à la LCST du polymère. Champ positif de 400 V/cm, tampons TBE 1× et 0,5×.

**Fonctionnement par cycles.** Les premières expériences d'étude en température (FIG. 3.11) font apparaître un changement d'état du polymère à partir de 32 °C. On observe une augmentation significative de la mobilité électro-osmotique au-dessus de cette température critique. Cependant, les nuages de points obtenus sont imprécis. Ces problèmes de reproductibilité sont en majeure partie attribuables à la nécessité de remplacer le tampon présent dans le capillaire entre chaque expérience : cette « remise à zéro » nécessite l'ouverture de l'enceinte thermostatée et par conséquent la stabilisation de la température. Pendant le retour à température du système, des phénomènes hydrodynamiques provoquent le déplacement du liquide dans le capillaire, faussant ainsi les résultats. Afin de contourner ce problème, nous avons procédé par cycles : une fois le capillaire mis en place et l'étuve fermée, on procède à l'expérience en appliquant le champ désiré ; on recommence ensuite la même expérience avec un champ électrique opposé : le remplacement du liquide a lieu dans l'autre sens. En enchaînant ainsi plusieurs cycles, on obtient des données plus fiables et des résultats reproductibles (3.12). L'inconvénient de cette technique est l'éventuel mélange des solutions stagnant près des extrémités du capillaire.

**PNIPAM selon la température.** La majorité des expériences précédentes a été réalisée avec des tampons de 1× et 0,5×, car le manque de reproductibilité empêchait d'obtenir des courbes

<sup>4</sup>Cette valeur est à considérer comme une limite supérieure de la valeur réelle de la mobilité, car le palier final n'est pas atteint.

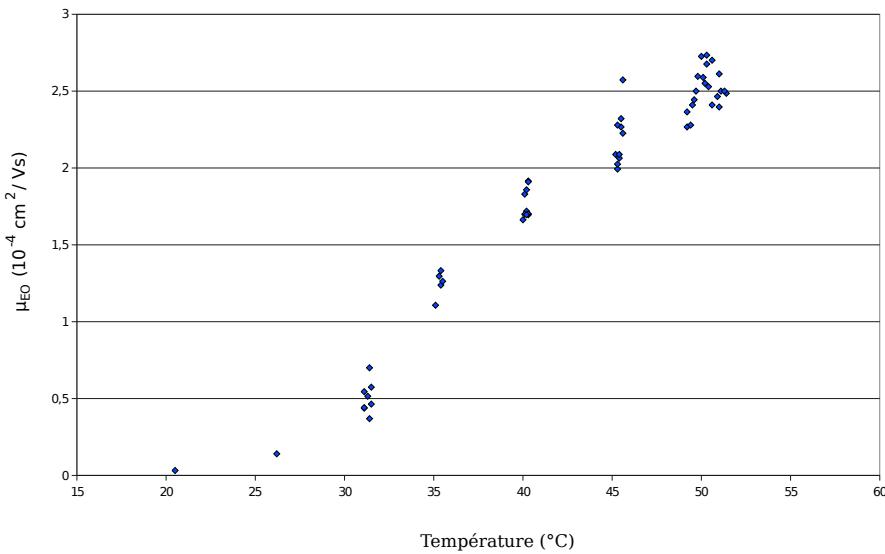


FIG. 3.11 – Évolution de la mobilité électro-osmotique  $\mu_{EO}$  avec la température  $T$  dans un capillaire avec PNIPAM (en bleu). 54 expériences, champ positif de 400 V/cm, tampons TBE 1× et 0,5×.

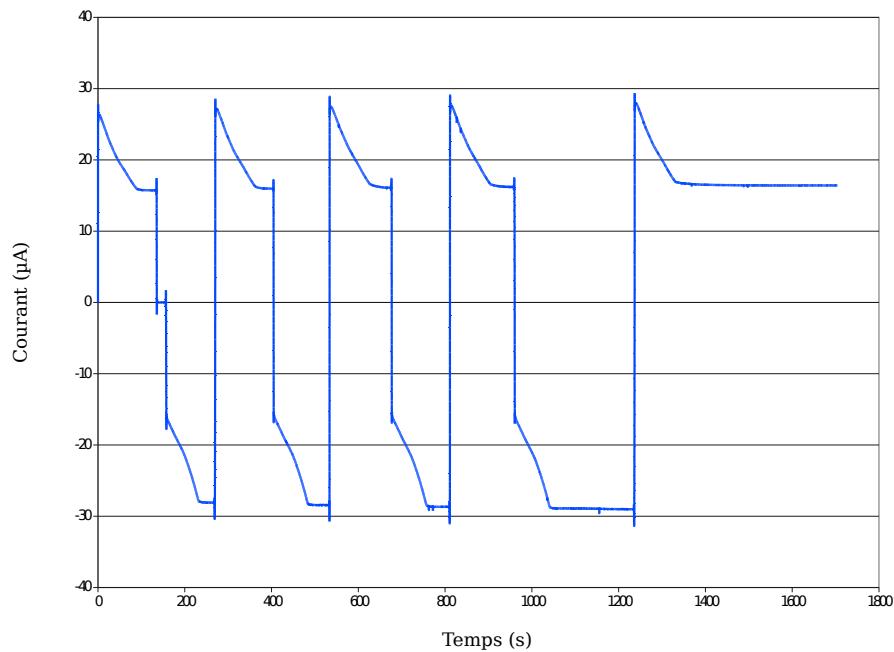


FIG. 3.12 – Évolution du courant électrique au cours de plusieurs cycles dans un capillaire silanisé. Champ positif et négatif de  $\pm 400$  V/cm, tampons TBE 1× et 0,5×.

correctes : en augmentant la différence de concentration entre les tampons, on réduit l'influence du bruit sur le signal obtenu. Une approche plus rigoureuse, limitant le changement de force ionique, est d'utiliser une différence de concentration de 10 % seulement. La FIG. 3.13 présente l'évolution de la mobilité électro-osmotique selon la température, dans un capillaire avec revêtement de PNIPAM, mesurée avec des solutions de  $0,5\times$  et  $0,45\times$ . Les résultats sont semblables à ceux obtenus précédemment avec des tampons de  $1\times$  et  $0,5\times$ . La transition a lieu entre  $30^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$  et un réel palier est atteint vers  $40^{\circ}\text{C}$ , avec une valeur comprise entre  $2.10^{-4}$  et  $2.5.10^{-4}\text{ cm}^2/\text{V.s}$ . Cette valeur est environ d'un ordre de grandeur supérieure à celle relevée à  $25^{\circ}\text{C}$  ( $0,13.10^{-4}\text{ cm}^2/\text{V.s}$ ).

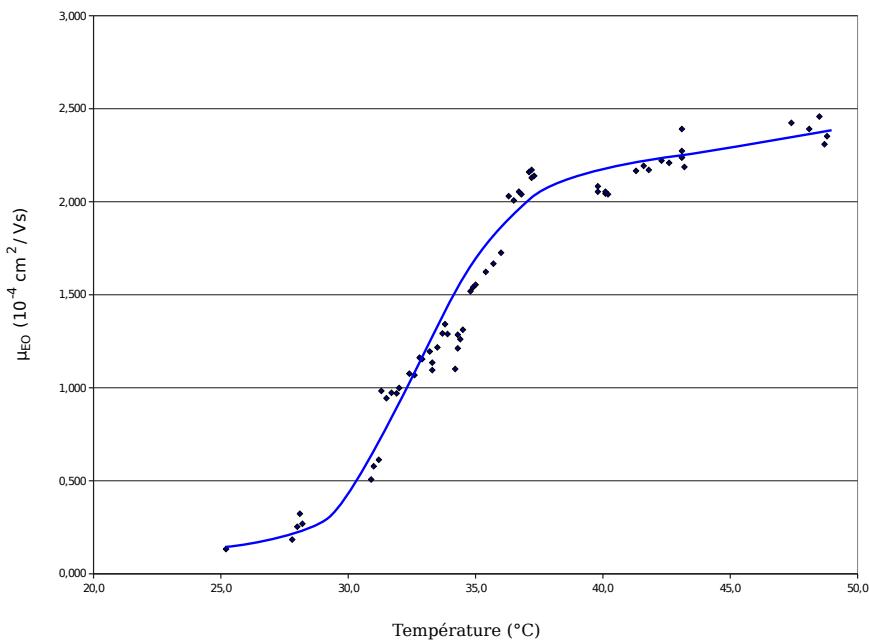


FIG. 3.13 – Évolution de la mobilité électro-osmotique dans un capillaire avec revêtement de poly(NIPAM). 146 expériences, champ positif de  $400\text{ V/cm}$ , tampons TBE  $0,5\times$  et  $0,45\times$ .

### 3.2.4 Conclusions

**Contrôle électrocinétique.** Nous avons mis en évidence l'influence du PNIPAM sur le flux électro-osmotique par son action sur la double couche électrique. Sous la température inférieure critique de solution (LCST,  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ ), le polymère est gonflé : à la manière du polyacrylamide, il masque les charges de surface et augmente la viscosité, diminuant ainsi considérablement le flux électro-osmotique. Au-delà de la LCST, le polymère se recroqueille et rend possible le phénomène d'électro-osmose. La mobilité électro-osmotique augmente d'un ordre de grandeur (de  $0,13.10^{-4}$  à  $2,05.10^{-4}\text{ cm}^2/\text{V.s}$  environ) entre  $25^{\circ}\text{C}$  et  $40^{\circ}\text{C}$ . Ces résultats permettent d'envisager le développement de mélangeurs électrocinétiques, basés sur des motifs de charges de surface, dessinés par du PNIPAM actionné localement ; cette tâche a été confiée à Emmanuel COLLÉ dans le cadre d'un contrat post-doctoral. Je me suis pour ma part intéressé à une autre application de la technologie PNIPAM pour les laboratoires sur puce : l'accrochage et le décrochage contrôlé de molécules biologiques.

### 3.3 Accrochage et décrochage contrôlé de protéines

#### 3.3.1 Contexte et expériences préliminaires

##### 3.3.1.1 Rappel du contexte et des objectifs

**Préparation d'échantillons.** J'ai rappelé au chapitre 1 les enjeux de la préparation d'échantillons pour les laboratoires sur puces [37]. La transition réversible hydrophile – hydrophobe du PNIPAM le rend particulièrement intéressant pour des applications d'accrochage et décrochage contrôlé de molécules biologiques, telles que des cellules. HUBER *et al.* rapportent en 2003 des résultats notables dans le domaine particulier de l'accrochage de protéines (FIG. 3.14) : ils observent le décrochage de protéines fluorescentes adsorbées sur du PNIPAM ; cette expérience a lieu sur un substrat plan, sur lequel sont intégrées des électrodes chauffantes en or [184]. Notre objectif est de déterminer dans quelle mesure ce type de manipulation peut être intégré dans un laboratoire sur puce, dans la vision plus générale de la préparation d'échantillons. Nous utilisons comme support des microbilles dont la surface est fonctionnalisée avec du PNIPAM [75] ; nous étudions les billes dans deux types de canaux : tout d'abord, dans des capillaires en silice fondu, qui sont des supports modèles de caractérisation microfluidique, puis dans les puces en PDMS présentées au chapitre 2. Une partie des travaux présentés dans cette section a été réalisée avec Deka MOUSSA RAGUEH dans le cadre de son stage de fin d'étude.

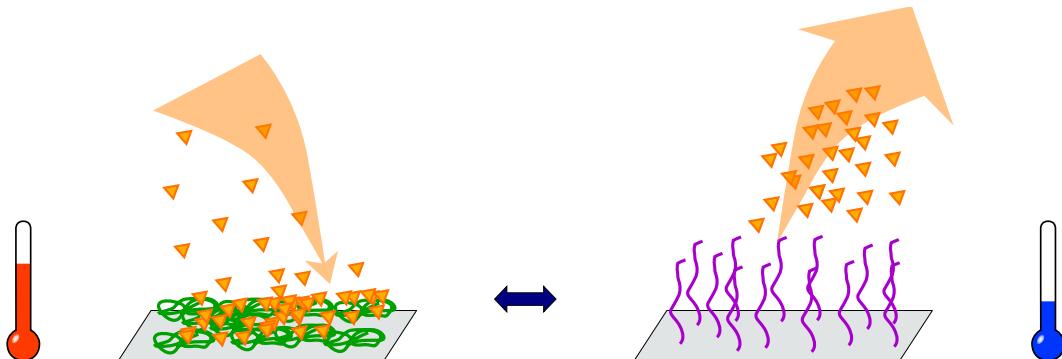


FIG. 3.14 – Schéma d'interaction entre le PNIPAM et des molécules biologiques telles que des protéines. Pour  $T > LCST$ , le PNIPAM est replié et hydrophobe (en vert) : les protéines s'y adsorbent (en orange). À  $T < LCST$ , le PNIPAM se déplie (en mauve), devient hydrophile et libère les protéines qu'il a piégées.

##### 3.3.1.2 Méthode de caractérisation

**Microscopie à fluorescence.** De nombreuses molécules biologiques peuvent être conjuguées avec un fluorophore, une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse à une certaine longueur d'onde et de la restituer rapidement ( $< 10$  ns) sous forme de lumière fluorescente, à une longueur d'onde plus grande. Cette conjugaison, dans notre cas protéine – fluorophore, permet de visualiser la présence et les dynamiques des protéines par fluorescence. Le déplacement de Stokes du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées permet d'utiliser la fluorescence comme moyen de détection ; un miroir dichroïque sépare l'excitation lumineuse et le signal spécifique émis par le fluorophore. Notre groupe est équipé d'un microscope optique à épifluorescence Olympus BX 51, pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorophores les plus utilisés. Une lampe à

vapeur de mercure produit le faisceau lumineux. Chaque jeu de filtres contient un filtre d'excitation, un miroir dichroïque et un filtre d'émission. Les images sont transmises à une caméra haute sensibilité Andor. Il est également possible d'observer des échantillons de façon classique en lumière blanche. Le montage complet est montré sur la FIG. 3.15.



FIG. 3.15 – Vue du montage complet de caractérisation par microscopie à fluorescence, incluant : (à gauche) le générateur de la lampe à vapeur de mercure, (en haut) la caméra haute sensibilité, (au centre) le microscope à fluorescence, sur la platine duquel est fixé le montage Peltier.

**Régulation de la température.** Les premières étapes de validation sont réalisées en capillaire de verre et sur dispositif PDMS simple ; l'objectif est de dissocier les éventuels problèmes thermiques, liés à un chauffage localisé, des caractéristiques d'adsorption – désorption intrinsèques au PNIPAM. Nous utilisons deux types de sources thermiques : l'un est un élément Peltier, capable de chauffer et refroidir dans la gamme 5 – 100 °C ; adapté pour les puces, il l'est moins pour les capillaires, en raison de la surface limitée d'échange de chaleur ; les transitions thermiques sont par ailleurs assez lentes. La seconde source thermique utilisée est un souffleur d'air chaud, qui permet de passer très rapidement de la température ambiante à plusieurs centaines de degrés ; il ne dispose pas de système de refroidissement. Quelle que soit la source thermique, le dispositif (capillaire ou puce) est généralement chauffé autour de 50 °C, un bon compromis entre la température de transition du PNIPAM ( $\sim 32$  °C) et une température modérée visant à éviter la dénaturation des protéines.

**Molécules et réactifs.** Trois espèces sont nécessaires aux expériences : des molécules biologiques capables de s'adsorber sur le PNIPAM, un fluorophore permettant la visualisation et des microbilles pouvant être fonctionnalisées avec du PNIPAM. L'albumine de sérum est la plus abondante des protéines sanguines chez les humains et les autres mammifères ; l'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumine*, BSA, CAS : 9048-46-8), en particulier, est souvent utilisée comme protéine modèle en biologie. Stable, de taille moyenne ( $\sim 66$  kDa), elle est produite à grande échelle, donc à bas coût, par purification de sang bovin dérivé de l'industrie animale. Nous avons donc choisi de travailler principalement avec des solutions de conjugués albumine – fluorescéine, disponible commercialement auprès de Sigma Aldrich (A 9771). La fluorescéine (CAS : 2321-07-5) est un fluorophore très répandu, excité autour de 495 nm et émettant vers 521 nm ; son dérivé isothiocyanate (*fluorescein isothiocyanate*, FITC, CAS : 27072-45-3), particulièrement réactif avec les groupes amine des protéines, est utilisé pour réaliser des conjugaisons de molécules biologiques. Les microbilles utilisées sont des billes de silice de  $5\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre, obtenues auprès de Restek. Les expériences sont généralement réalisées avec une concentration finale de 50 mg/mL en billes et en albumine – fluorescéine. Nous avons testé des variations de ce rapport selon les besoins de la visualisation, tout en restant dans les mêmes ordres de grandeur. Les protéines et les billes sont en solution de tampon phosphate dilué.

**Traitement des données.** Les dynamiques d'adsorption et désorption sont enregistrées par la caméra sous forme de vidéos ; les images sont ensuite ajustées et analysées avec l'outil ImageJ. Les opérations les plus courantes sont la correction de la luminosité, du contraste et de l'alignement des images ; la fonction de suivi des particules permet de mesurer l'intensité lumineuse sur un jeu de billes. Le bruit de fond de fluorescence est soustrait à l'intensité lumineuse de chaque bille ; celle-ci est ensuite normalisée par rapport à l'intensité lumineuse de tout le canal à chaque instant, afin de s'affranchir, par exemple, de l'effet d'épuisement de fluorescence (*photobleaching*). Enfin, l'évolution de la fluorescence au cours du temps est normalisée par rapport au maximum d'intensité de l'expérience, afin de faciliter la comparaison des différents cas.

**Manipulation.** Le dispositif expérimental rend difficile la connexion des capillaires avec un système fluidique à plusieurs circuits. Les expériences en capillaires sont donc réalisées en fluide statique : une solution mixte de protéines fluorescentes et de microbilles fonctionnalisées avec du PNIPAM est introduite dans le capillaire. Celui-ci est immobilisé sur le support du microscope et aligné sous l'objectif (FIG. 3.16). Nous procédons de façon identique pour les puces en PDMS sur verre, à cause de l'encombrement stérique de l'objectif du microscope (FIG. 3.17). Dans les deux cas, la visualisation du canal en lumière blanche permet de vérifier la présence des billes (FIG. 3.19 & FIG. 3.20). La fluorescence diffuse de la solution dans le canal assure la présence des protéines fluorescentes.

### 3.3.1.3 Comportement des billes dans les microcanaux

**Capillaires.** L'utilisation de capillaires en microfluidique est principalement héritée des techniques d'analyse telle que l'électrophorèse. Lors du développement de systèmes microfluidiques d'analyse, le capillaire reste souvent le support témoin auquel on compare le dispositif miniaturisé [107]. Les capillaires sont des canaux simples, réguliers, sans connectique complexe et facilement fonctionnalisables. Nous utilisons des capillaires en silice fondu, de  $75\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre interne. La gaine protectrice est ôtée par endroits afin d'obtenir des fenêtres de visualisation ; nous limitons le nombre de fenêtres, car elles fragilisent le capillaire. La FIG. 3.18 montre un exemple du principal problème de l'utilisation de billes dans les capillaires : leur tendance à s'adsorber sur la surface

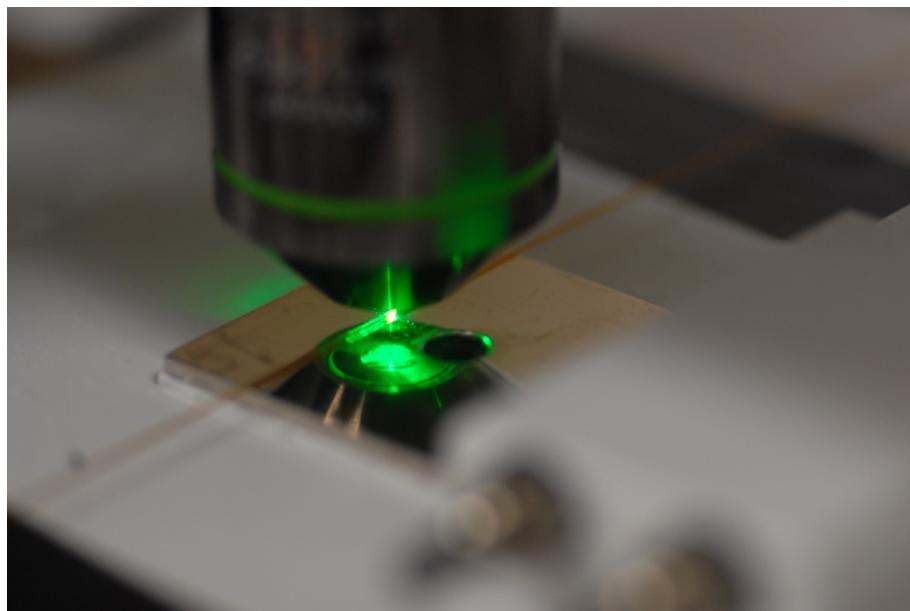


FIG. 3.16 – Vue d'un capillaire pendant une expérience, placé sur un dispositif Peltier et sous l'objectif du microscope à fluorescence.

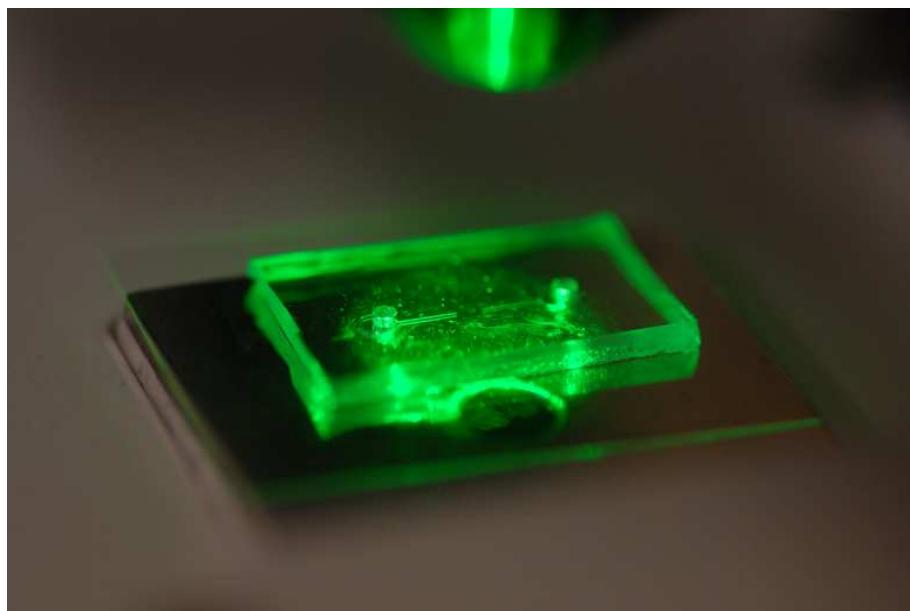


FIG. 3.17 – Vue d'une puce PDMS pendant une expérience, placée sur un dispositif Peltier et sous l'objectif du microscope à fluorescence. L'objectif est ici relevé pour faciliter la visualisation de la puce ; lors des expériences, il est beaucoup plus proche.

interne du canal. Ce comportement gêne la visualisation et diminue l'accessibilité de la surface des billes. Une façon simple de remédier à ce problème est de fonctionnaliser la paroi interne du capillaire avec un revêtement hydrophile. Comme le capillaire est en silice, nos protocoles classiques de silanisation fonctionnent bien ; nous greffons donc une couche de polyacrylamide sur la paroi interne. Ce revêtement inverse la tendance des billes à l'adsorption ; celles-ci restent majoritairement au centre du canal (FIG. 3.19).

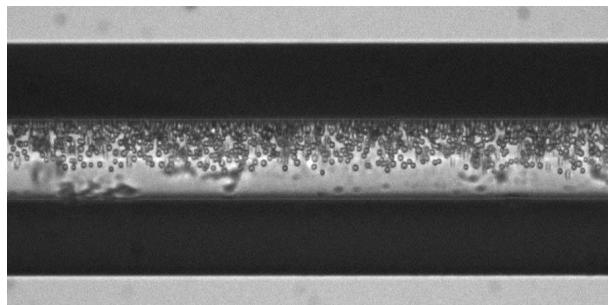


FIG. 3.18 – Accumulation de microbilles sur la paroi d'un capillaire non fonctionnalisé.

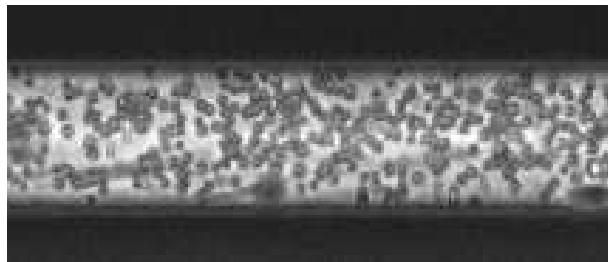


FIG. 3.19 – Microbilles dans un capillaire dont la paroi interne est fonctionnalisée avec du polyacrylamide empêchant leur adsorption.

**Puces PDMS.** L'objectif principal de nos travaux est l'intégration de la technologie PNIPAM dans les laboratoires sur puce ; par conséquent, il est indispensable d'étudier le comportement des billes et les phénomènes d'adsorption – désorption dans des systèmes de ce type. Nous utilisons pour cela les puces en PDMS décrites au chapitre 2, plus proches des laboratoires sur puces que les capillaires. La FIG. 3.20 montre le piège à billes dans la zone centrale du dispositif. Malgré le caractère hydrophobe du PDMS, l'adsorption des billes sur les murs du canal semble négligeable. L'expérience montre cependant que ces puces ont d'autres limitations. Par exemple, le dispositif en PDMS doit avoir une épaisseur suffisante pour assurer la solidité des canaux, éviter qu'ils ne se déforment et maintenir les tubes de connectique ; cependant, cette même épaisseur empêche, aux forts grossissements, la mise au point lors de l'observation au microscope. Par ailleurs, la faible longueur du canal réduit considérablement l'espace disponible pour déplacer l'objectif.

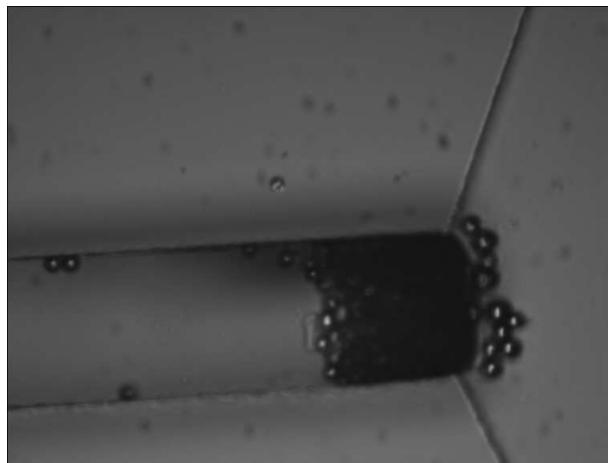


FIG. 3.20 – Accumulation de microbilles dans le piège central d'une puce. Image réalisée en lumière blanche.

### 3.3.2 Adsorption et désorption de protéines fluorescentes

#### 3.3.2.1 Expériences en capillaires

**Adsorption.** Le système est chauffé pendant quelques secondes ; la visualisation de la fluorescence en temps réel permet d'observer l'augmentation de la fluorescence des billes (FIG. 3.21). Le chauffage est ensuite arrêté et le système revient à température ambiante ; lorsque la température des billes devient inférieure à la LCST du PNIPAM, les protéines fluorescentes sont relarguées en solution. Le profil typique de fluorescence d'une bille durant une expérience est présenté à la FIG. 3.22. On observe toutefois que le niveau de fluorescence de la bille ne rejoint pas son niveau initial : la bille conserve environ 40 % de la fluorescence adsorbée.

**Analyse de la saturation.** Le protocole expérimental précédent consiste à chauffer le système de façon à dépasser la LCST du PNIPAM, puis à cesser le chauffage et laisser le système revenir à l'équilibre. Le chauffage est arrêté après quelques secondes, lorsque les billes sont devenues fluorescentes, pour observer la désorption. Il est néanmoins important de déterminer le temps qu'il faut aux billes pour être saturées en protéines fluorescentes ; c'est l'objectif de l'expérience suivante. Au lieu de cesser le chauffage, nous le maintenons et observons l'évolution de la fluorescence de deux billes. Les résultats sont donnés sur la FIG. 3.23. On observe qu'un palier de fluorescence est atteint après environ trois minutes de chauffage ; les fluctuations apparaissant ensuite restent minimes et sont probablement dues à des fluctuations globales de la chaîne de mesure : elles sont identiques sur les deux billes. On observe également une dérive de la source de chaleur (dans ce cas, le souffleur d'air chaud).

**Désorption.** Le profil de fluorescence montré sur la FIG. 3.22 indique clairement que la désorption de protéines fluorescentes est incomplète. Les billes conservent environ 40 % de la fluorescence totale qu'elles ont adsorbée. Cette fluorescence résiduelle est due à des protéines fluorescentes adsorbées qui ne sont pas relarguées : une expérience témoin a confirmé que, sans chauffage, nos protéines fluorescentes ne s'adsorbent pas sur le PNIPAM hydrophile des billes. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce piégeage irréversible est l'adsorption de complexes albumine – fluorescéine directement sur la surface des billes et non sur les couches de PNIPAM. Notre protocole de fonctionnalisation

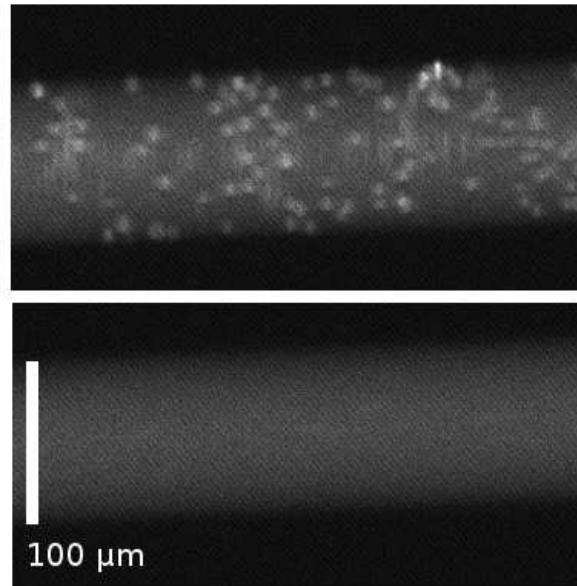


FIG. 3.21 – Visualisation de l’adsorption et désorption de protéines fluorescentes sur des microbilles fonctionnalisées avec du PNIPAM dans un capillaire.

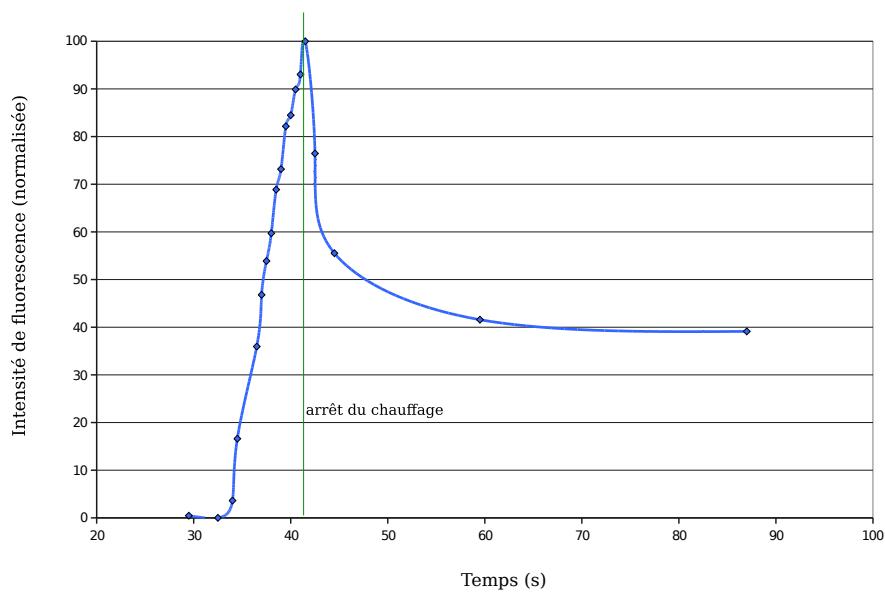


FIG. 3.22 – Profil typique de l’évolution de la fluorescence d’une microbille fonctionnalisée avec du PNIPAM, au cours de l’adsorption et de la désorption de protéines fluorescentes selon la température.

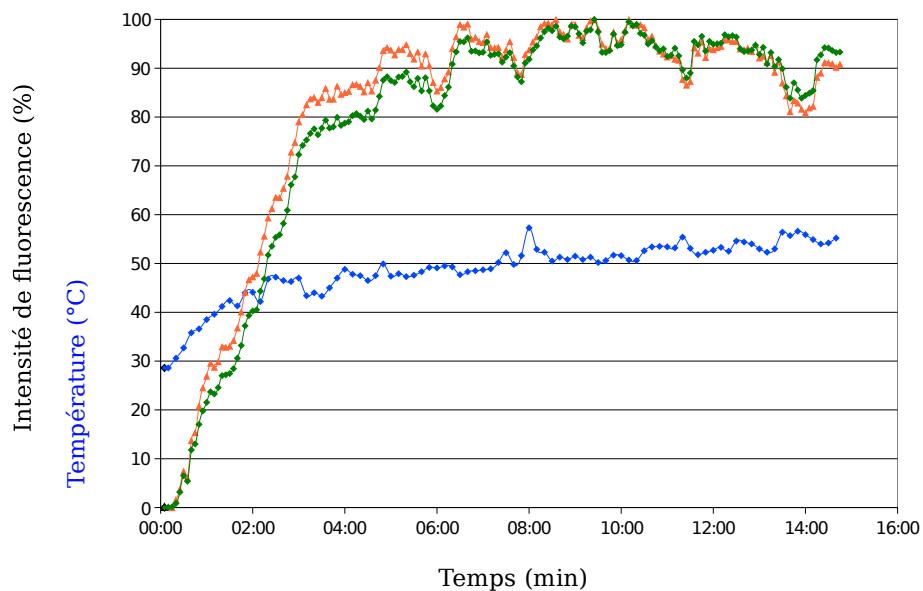


FIG. 3.23 – Évolution de la fluorescence de deux billes lors d'une analyse de saturation en protéines. Le chauffage est prolongé afin d'observer le comportement du système et de déterminer un palier de saturation.

chimique favorise en effet la synthèse de chaînes longues et dispersées de polymère ; le PNIPAM n'assure qu'un recouvrement incomplet de la surface et autorise une adsorption non spécifique des protéines fluorescentes sur la surface des billes. Ce problème, souvent rencontré en biologie, par exemple dans le domaine des biopuces, peut être résolu par plusieurs moyens. Il est possible de saturer la surface non couverte de PNIPAM en utilisant d'autres macromolécules biologiques auxquelles on ne s'intéresse pas dans l'expérience. Cependant, dans l'optique générale de la préparation d'échantillons, cette solution peut éventuellement entraîner des problèmes de contamination de l'analyte. Il est donc préférable de se tourner vers une autre solution, par exemple la modification du protocole de polymérisation pour synthétiser une couche de PNIPAM plus dense [249].

**Couches denses de PNIPAM.** Nous avons modifié le protocole de polymérisation de façon à obtenir des couches de PNIPAM de plus haute densité (§ 2.4.3.2, p. 67) ; la surface externe des billes est ainsi davantage couverte, ce qui doit réduire les sites d'adsorption non spécifique. Les premiers tests effectués avec ces billes ne montrent cependant pas de meilleurs résultats qu'avec le protocole précédent de fonctionnalisation (FIG. 3.24) ; une hypothèse avancée est que le protocole chimique n'a pas d'influence si l'on utilise de grosses protéines. L'amélioration des conditions de manipulation a cependant permis d'obtenir un taux de désorption de 80% pour les deux protocoles, au lieu de 60% précédemment.

### 3.3.2.2 Expériences en puces PDMS

**Adsorption.** Nous avons réalisé en puces PDMS les mêmes expériences d'adsorption – désorption qu'en capillaires. La caractérisation est plus difficile, car l'épaisseur de PDMS gêne la mise au point du microscope aux forts grossissements. Nous avons néanmoins pu observer l'adsorption de protéines fluorescentes sur des billes fonctionnalisées avec du PNIPAM, comme en capillaires ; la quantification n'a toutefois pas été possible. La FIG. 3.25 montre une concentration de fluorescence sur les billes.

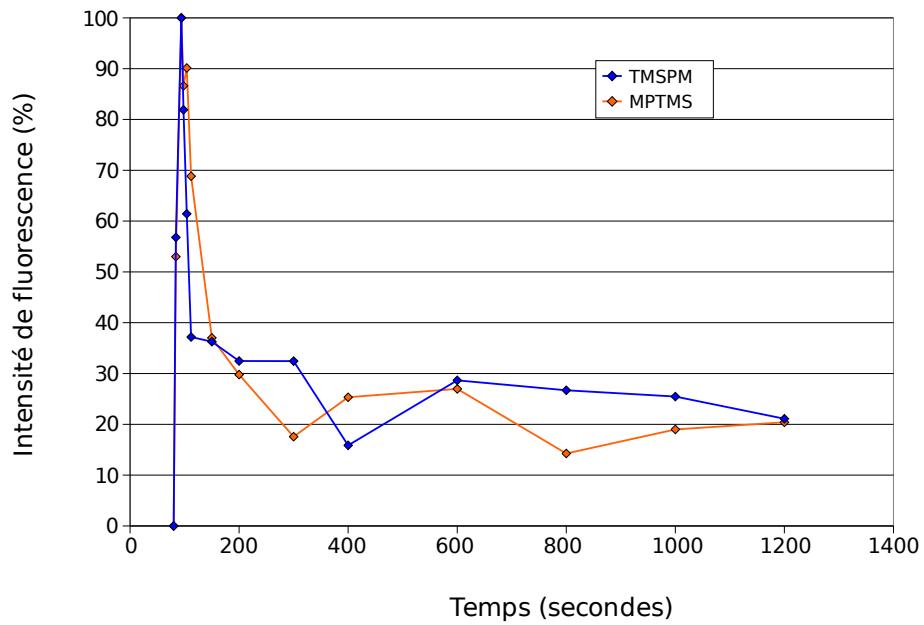


FIG. 3.24 – Évolution de la fluorescence d'une bille lors de l'adsorption et la désorption partielle de complexes albumine – fluorescéine sur des couches de TMSPM et de MPTMS.

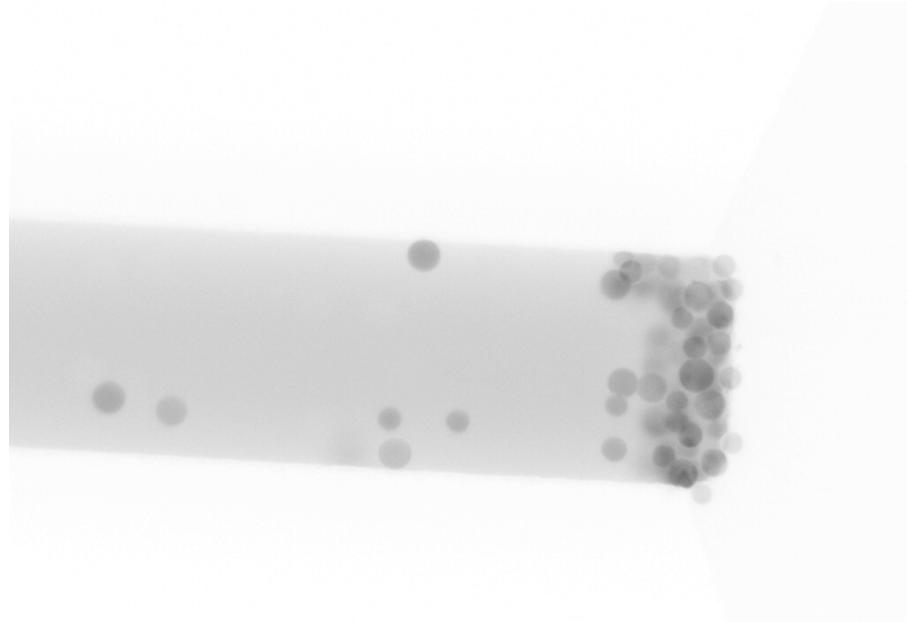


FIG. 3.25 – Adsorption de protéines fluorescentes sur des microbilles immobilisées dans la partie centrale d'une puce PDMS. La fluorescence est légèrement visible dans le canal ( $50 \mu\text{m}$  de large) à cause des protéines fluorescentes en solution ; elle se concentre sur les billes recouvertes de PNIPAM. Couleurs inversées pour faciliter la visualisation.

**Désorption.** Les expériences menées en puces PDMS ne montrent aucune désorption. La situation est plus défavorable qu'en capillaires, où les billes sont relativement libres en solution. Dans les canaux PDMS, les billes sont piégées et tassées au niveau de l'étranglement central ; l'hypothèse avancée est que les éventuelles protéines désorbées stagnent autour des billes. Un rinçage permettrait de faciliter la circulation des protéines désorbées, mais l'encombrement stérique dû à l'objectif du microscope empêche la connexion de tubes.

### 3.3.2.3 Accrochage de streptavidine

**Streptavidine.** L'utilisation du dispositif pour la préparation d'échantillons implique que le PNIPAM soit en interaction avec de nombreuses espèces différentes. Il est indispensable d'étudier son comportement vis à vis, par exemple, de protéines différentes de l'albumine testée jusqu'à présent. Le dispositif fonctionne-t-il aussi bien avec d'autres protéines ? Nous avons effectué des expériences préliminaires afin de nous en assurer. Nous avons pour cela utilisé une autre protéine très répandue, la streptavidine, légèrement plus petite que l'albumine ( $\sim 53$  KDa contre  $66$  KDa), conjuguée à un fluorophore de type Alexa. L'évolution de la fluorescence d'une bille est donnée sur la FIG. 3.26. On observe que le comportement est similaire à celui de l'albumine. Ce résultat doit être considéré comme préliminaire, car d'autres paramètres ont varié<sup>5</sup>, mais il est encourageant et incite à poursuivre des expériences plus poussées.

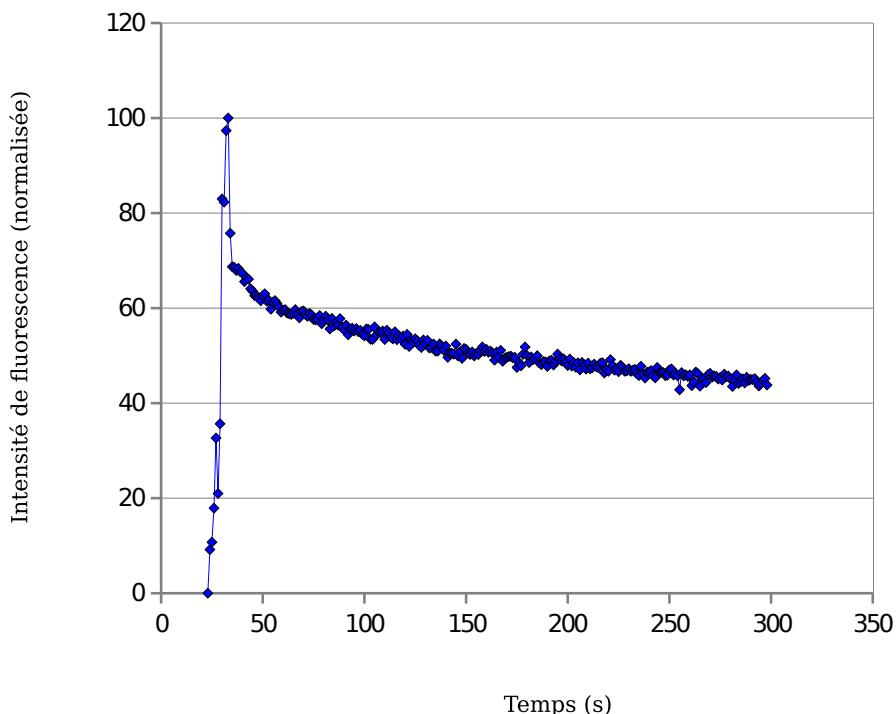


FIG. 3.26 – Évolution de la fluorescence d'une bille lors de l'adsorption et la désorption partielle de complexes streptavidine – Alexa.

<sup>5</sup>Les billes ont été fonctionnalisées avec le protocole modifié ; par ailleurs, les fluorophores ont des efficacités très différentes.

### 3.3.3 Conclusions

**Adsorption et désorption de protéines.** Nous avons exploré la possibilité d'utiliser des couches de PNIPAM pour accrocher réversiblement des protéines ; l'application visée est la préparation d'échantillons biologiques avant analyse. Nous avons accroché avec succès des complexes albumine – fluorescéine sur des microbilles de silice, fonctionnalisées avec du PNIPAM ; ces expériences ont été menées en capillaires, en puces PDMS – verre et caractérisées par fluorescence. Le relargage des protéines adsorbées est toutefois incomplet : en capillaires, environ 20 % des protéines sont adsorbées irréversiblement. Attribuant ce phénomène à de l'adsorption non spécifique sur des zones non recouvertes de PNIPAM, nous avons modifié le protocole de fonctionnalisation pour obtenir des couches plus denses. Les résultats de désorption obtenus avec le nouveau protocole sont inconclusifs. Dans les puces PDMS, l'absence de désorption est attribuée en partie au tassemement des billes dans la zone servant à les piéger. Dans ces deux types de canaux, des travaux plus poussés, incluant notamment une étape de rinçage doux, sont nécessaires. Enfin, nous avons également adsorbé des molécules de streptavidine sur le PNIPAM, démontrant ainsi que d'autres protéines que l'albumine peuvent être capturées.

**Améliorations.** L'un des problèmes majeurs que nous avons rencontrés a été la manipulation des billes ; en capillaires, nous n'avions aucun moyen de les bloquer afin d'observer l'évolution de la fluorescence ; en puces, la méthode choisie (piège stérique) s'est finalement révélée plus gênante qu'utile. Si des travaux complémentaires sont engagés, l'une des premières pistes à explorer est l'utilisation de billes magnétiques piégeables par actionnement magnétique. On peut par exemple envisager de les immobiliser grâce à des microbobines intégrées, telles que celles actuellement développées au LAAS. Par ailleurs, en puces, la faible longueur des canaux et l'épaisseur du PDMS ont géné la visualisation au microscope. Une solution est d'adapter les supports de caractérisation de telle manière qu'ils puissent être utilisés sur un microscope inversé. À moyen terme, il faudrait également intégrer des circuits fluidiques multiples, correspondant aux différents réactifs et étapes, afin de faciliter les étapes de rinçage. Enfin, afin de valider cette technique, il est indispensable de faire varier les conditions expérimentales. Des tests menés à pH acide ou avec la streptavidine, une protéine légèrement plus petite que l'albumine (53 KDa contre 65 KDa), sont en cours.

## 3.4 Conclusion

**Contrôle électrocinétique.** Dans ce chapitre, j'ai présenté deux applications possibles de la technologie PNIPAM pour les laboratoires sur puce. La première repose sur le contrôle du phénomène d'électro-osmose ; le greffage de PNIPAM sur les surfaces internes d'un canal permet de contrôler l'influence de la double couche électrique : il est possible de bloquer ou autoriser le déplacement électrocinétique d'un liquide. Sur des surfaces fonctionnalisées avec du PNIPAM, la mobilité électroosmotique augmente d'un ordre de grandeur entre 25 °C et 40 °C. En combinant ce comportement avec les éléments chauffants adressables présentés au chapitre 2, il est possible de permuter localement l'état du PNIPAM ; les hétérogénéités de charge ainsi créées permettent d'envisager le développement de mélangeurs électrocinétiques basés sur le PNIPAM.

**Accrochage de protéines.** La seconde application consiste en l'accrochage réversible d'espèces biologiques sur des couches de PNIPAM. Ce polymère est déjà utilisé comme substrat de culture de cellules : sa température de transition, proche de celle du corps humain, permet d'utiliser le PNIPAM replié comme support de culture, puis de relarguer les cellules en abaissant la température. De façon analogue, nous avons montré que des billes couvertes de PNIPAM peuvent accrocher et

décrocher des protéines ; la désorption est toutefois incomplète. Ces résultats encouragent néanmoins le développement de systèmes de préparation d'échantillon utilisant le PNIPAM comme piège à molécules biologiques.



# Conclusion générale

**Enjeux des laboratoires sur puce.** Les laboratoires sur puce sont des dispositifs intégrés rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions de laboratoire ; ils sont généralement dédiés à la manipulation d'échantillons chimiques ou biologiques. Ce sont souvent des systèmes microfluidiques, à faible nombre de Reynolds ; la réduction des dimensions entraîne des comportements particuliers des liquides, tels que la prédominance de flux laminaires ; pour cette raison, l'actionnement des liquides dans les microcanaux, notamment leur mélange, est un enjeu qui a retenu notre attention. Les microTAS sont un sous-ensemble des laboratoires sur puce ; ce terme rassemble les systèmes miniaturisés, possédant généralement une dimension micrométrique, qui intègrent la séquence complète d'analyse d'un échantillon brut jusqu'à la lecture du résultat. Par définition, les microTAS doivent manipuler des prélèvements non idéaux ; il est nécessaire de traiter de tels échantillons avant l'analyse, par exemple pour les concentrer ou les séparer d'espèces parasites. La préparation d'échantillon est le second enjeu qui a retenu notre attention.

**PNIPAM.** Le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est un polymère thermosensible subissant un changement conformationnel réversible, d'un état hydrophile et gonflé sous sa température de transition ( $\text{LCST} \sim 32^\circ\text{C}$ ) à un état hydrophobe et replié au-delà. Les caractéristiques du PNIPAM permettent d'envisager des applications intéressantes en ce qui concerne les deux enjeux que nous avons identifiés : hydrophobe, il est capable de piéger des objets biologiques tels que des cellules ou des protéines ; hydrophile, il peut les libérer sur demande, sur un simple stimulus thermique, une fois que la solution a été débarrassée d'espèces indésirables. Il est donc intéressant d'étudier dans quelle mesure le PNIPAM peut contribuer à la préparation d'échantillons biologiques dans les laboratoires sur puce. Par ailleurs, un contrôle local de l'état du PNIPAM permet de dessiner des motifs ou des alternances de PNIPAM gonflé – hydrophile et replié – hydrophobe ; il est ainsi possible de créer des hétérogénéités de charges de surface, dont il est prévu qu'elles entraînent des recirculations de flux électrocinétique. Le PNIPAM est donc susceptible d'être à la base de mélangeurs électrocinétiques. Il existe par conséquent au moins deux applications possibles du PNIPAM répondant à des demandes technologiques des laboratoires sur puce. L'objectif de nos travaux a été d'explorer les possibilités de développement et d'intégration de technologies à base de PNIPAM, répondant à ces deux problématiques.

**Technologie PNIPAM.** Nous avons développé une technologie d'intégration du PNIPAM dans les microsystèmes qui comprend deux volets : d'une part, l'intégration d'éléments chauffants, sources des stimuli thermiques permettant de contrôler l'état du polymère ; d'autre part, un protocole de fonctionnalisation chimique pour greffer le PNIPAM sur des surfaces. Nous avons réalisé deux types d'éléments chauffants : le premier consiste en des lignes chauffantes simples, longues, permettant un chauffage homogène de microcanaux, adapté à l'accrochage de molécules biologiques. Le second, plus complexe, est constitué d'un ensemble d'éléments chauffants miniaturisés, individuels et adressables ; ils sont destinés au contrôle local de l'état du PNIPAM, dans l'objectif de mélangeurs électrocinétiques. Nos résultats indiquent que l'intégration de ces sources thermiques n'est pas un

point bloquant : ces technologies sont bien maîtrisées au LAAS. Par ailleurs, notre protocole de greffage chimique a été caractérisé de façon approfondie ; plusieurs techniques confirment la présence de groupes chimiques spécifiques du PNIPAM. Nous avons greffé le PNIPAM avec succès, via une couche de silane, sur plusieurs types de surfaces : substrats plans de silicium et de verre, capillaires en silice fondu et microbilles en silicium. L'intégration de technologies PNIPAM dans les microsystèmes semble donc possible sans nécessiter de lourds développements spécifiques.

**Applications.** Les deux applications visées sont le mélange électrocinétique et l'accrochage réversible d'objets biologiques. Afin de déterminer l'influence du PNIPAM sur le flux électrocinétique, nous avons réalisé une étude complète en température. Nous avons ainsi montré que le contrôle thermique du PNIPAM permet de moduler le flux électro-osmotique ; la mobilité électro-osmotique sur PNIPAM augmente d'un ordre de grandeur entre 25 °C et 40 °C. Ces résultats encouragent la poursuite de travaux plus poussés dans cette voie. Par ailleurs, nous avons piégé avec succès des protéines sur des billes fonctionnalisées avec du PNIPAM. Leur libération n'est toutefois que partielle, à hauteur de 60 % ; ce décrochage incomplet est attribué à une adsorption non spécifique qui peut probablement être limitée.

**Perspectives.** Les briques de base de cette nouvelle approche sont en place ; de nombreux travaux restent cependant à réaliser pour la rendre totalement opérationnelle. Il est notamment nécessaire de définir les caractéristiques optimales et les protocoles d'utilisation des dispositifs. L'étape suivante est le test en fonctionnement de ces microlaboratoires de prétraitement d'échantillons, par exemple sur des protéines d'intérêt pharmaceutique. Une comparaison quantitative avec les protocoles utilisés actuellement, faite sur des échantillons réels, permettra finalement de jauger l'efficacité et l'avenir de cette nouvelle filière.

# Annexe A

## Publications

### Revues internationales

G. Paumier, J. Sudor, A.M. Gué, F. Vinet, M. Li, Y.J. Chabal, A. Estève, M. Djafari Rouhani, Nanoscale actuation of electrokinetic flows on thermoreversible surfaces, *Electrophoresis*, 2008, 29 (6), pp.1245-1252.

### Conférences internationales

G. Paumier, S. Siv, A. Bancaud, J. Sudor, A.M. Gué, Thermoresponsive polymer-based microdevice for nano-liquid chromatography, International Conference on Biomedical Electronics and Devices (Biodevices), Funchal (Portugal), 28-31 janvier 2008, pp.178-181.

G. Paumier, J. Sudor, E. Collé, B. Marty, A. Bancaud, T. Camps, A.M. Gué, Electrokinetic mixers based on stimuli-responding surfaces, 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS'07), Paris (France), 7-11 octobre 2007, pp.910-912.

J. Sudor, G. Paumier, A.M. Gué, F. Vinet, A. Estève, M. Djafari Rouhani, Spatio-temporal tuning of stimuli-responding surfaces for dynamic control of electroosmotic flows, 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS'06), Tokyo (Japon), 5-11 novembre 2006, pp.74-76.

### Conférences nationales

J. Sudor, G. Paumier, A.M. Gué, F. Vinet, Z. Li, Y.J. Chabal, A. Estève, M. Djafari Rouhani, Surfaces decorated with active polymers for spatio-temporal control of electrokinetic flows, 3<sup>e</sup> Congrès Français de Microfluidique, Toulouse (France), 12-14 décembre 2006.

### Conférences locales

G. Paumier, Intégration de polymères actifs dans les laboratoires-sur-puces, Journée annuelle de l'école doctorale GEET, Toulouse (France), 20 mars 2008, pp. 172-174.



## Annexe B

### Assemblage SU-8

Il existe différentes techniques d'assemblage de la résine SU-8, à choisir selon les caractéristiques voulues du dispositif final. Ainsi, pour un dispositif souple et multiniveaux, on préférera la technologie de laminage couche-à-couche, développée au LAAS dans le cadre des travaux de doctorat de Patrick ABGRALL [198], éventuellement suivie d'une libération totale du dispositif. Dans d'autres cas, on souhaite un dispositif robuste comprenant des éléments en SU-8 et d'autres en matériaux solides tels que du silicium ou pyrex. Cette piste a été explorée mais non retenue. Les résultats sont néanmoins rapportés ci-après pour mémoire.

**Bonding Silicium/SU-8//SU-8/Pyrex.** Dans le cadre de travaux annexes nécessitant l'application de pressions importantes dans les canaux, l'objectif est l'assemblage de deux wafers de silicium et pyrex par leurs faces comprenant chacune une épaisseur de SU-8 (FIG. B.1). Le wafer inférieur en silicium possède une couche de SU-8 de quelques dizaines de microns avec des motifs dessinant des canaux de 7 cm de long et 100  $\mu\text{m}$  de large. Le wafer supérieur en pyrex 7740 est percé de trous correspondant aux extrémités des canaux ; il est recouvert d'une fine couche de SU-8 ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) servant à effectuer le collage. L'assemblage est effectué sur une machine de type *wafer-bonder* permettant l'alignement des wafers, le chauffage et le contrôle de la force appliquée.

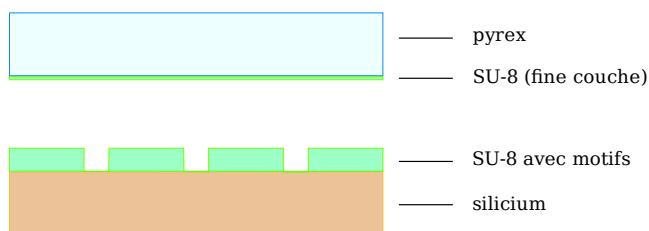


FIG. B.1 – Schéma de l'assemblage Silicium/SU-8//SU-8/Pyrex.

**Conclusions.** Différents tests ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Si les deux couches sont complètement réticulées, le collage n'a pas lieu. Il est préférable de n'effectuer que le *soft bake* sur l'une des deux couches, qui dans notre cas est la couche fine. La couche épaisse contient en effet des motifs et doit donc subir le PEB (*post-exposure bake*)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>conditions expérimentales : activation au plasma O<sub>2</sub> 1000 mL/min à 600 W sans cage pendant 2 min ; force appliquée : 1 kN ; sous vide (pression :  $\sim 1,18 \cdot 10^{-4}$  mbar) ; Température : 75 °C (plaqué supérieure), 85 °C (plaqué inférieure) ; durée : 20 min.

- Le plasma d'activation effectué sur les couches avant l'assemblage peut entraîner une réticulation partielle d'une couche non réticulée<sup>2</sup>.
- Le chauffage des substrats, qui facilite le collage, est fait par lampe halogène. Par défaut, le chauffage est effectué avant la mise en contact des couches de SU-8, ce qui risque de réticuler partiellement ou totalement la fine couche. Il est préférable de d'abord mettre en contact les couches, puis de chauffer progressivement<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup>conditions expérimentales : idem cas précédent ; la couche fine (supérieure) n'a subi auparavant qu'un *soft bake* et n'est pas réticulée.

<sup>3</sup>conditions expérimentales : couche fine non réticulée ; pas de plasma ; force appliquée : 1 kN ; sous vide (pression :  $\sim 1,78 \cdot 10^{-4}$  mbar) ; Température : 75 ° C (plaqué supérieure), 85 ° C (plaqué inférieure) ; durée : 20 min.

# Annexe C

## Notes de droit d'auteur

### C.1 Droits régissant ce document

L'auteur, Guillaume PAUMIER, place l'ensemble du texte de ce document sous les termes de la licence de documentation libre GNU (GNU free documentation license – GFDL) version 1.2 ou toute version ultérieure publiée par la Free Software Foundation (<http://www.gnu.org/licenses/fdl.html>). Les termes complets de la licence GFDL sont donnés p. 103.

L'ensemble des documents multimedia (schémas, images, graphiques) est placé sous double licence GFDL (version 1.2 ou ultérieure) et Creative Commons Attribution ShareAlike 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>). Afin de faciliter leur réutilisation, tous les schémas sont disponibles sous forme d'images vectorielles au format SVG (*scalable vector graphics*) ; elles sont librement modifiables et agrandissables sans perte de qualité. Leur liste, comprenant leur emplacement immuable sur Internet, sera donnée dans la version finale de ce document.

### C.2 Crédits

Certaines images utilisées dans ce document n'ont pas été réalisées par l'auteur ; elles ont néanmoins toutes été préalablement placées sous une licence autorisant explicitement leur réutilisation libre. Le TAB. C.1 liste les auteurs respectifs et les conditions de réutilisation de ces images. Ces conditions font parfois référence à des textes légaux disponibles aux adresses suivantes :

- Creative Commons Attribution ShareAlike 2.0 France :  
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/fr/>
- Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5 :  
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/>
- GNU free documentation license (GFDL) 1.2 or later :  
<http://www.gnu.org/licenses/fdl.html>

TAB. C.1 – Crédits et conditions de réutilisation des images.

page	Image	Informations
9	Tests de grossesse	Auteur : Ceridwen Sources : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Test_de_grossesse_ouvert.jpg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Test_de_grossesse_ouvert.jpg</a> <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Test_de_grossesse_ferm%C3%A9.jpg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Test_de_grossesse_ferm%C3%A9.jpg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.0 France
9	OneTouch Ultra2	Auteur : David-i98 Source : <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Blood_Glucose_Testing.JPG">http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Blood_Glucose_Testing.JPG</a> Termes : GFDL 1.2 or later
15	Molécule d'eau	Auteur : Philip Ronan Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Water_molecule.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Water_molecule.svg</a> Termes : Domaine public
15	Chromosome	Auteur : NIH Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Chromosom.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Chromosom.svg</a> Termes : Domaine public
15	Anticorps	Auteur : Artur Jan Fijałkowski Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Antibody_scheme.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Antibody_scheme.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
15	Ribosome	Auteur : Jerome Walker Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Ribosome_symbol.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Ribosome_symbol.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
15	Phage	Auteur : Michael David Jones Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:T-even-phage.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:T-even-phage.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
15	Virus	Auteur : Tyler Heal Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Virus_RePLICATION.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Virus_RePLICATION.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
15	Bactérie	Auteur : Mariana Ruiz Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Average_prokaryote_cell--en.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Average_prokaryote_cell--en.svg</a> Termes : Domaine public
15	Globule rouge	Auteur : Mariana Ruiz Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Osmotic_pressure_on_blood_cells_diagram.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Osmotic_pressure_on_blood_cells_diagram.svg</a> Termes : Domaine public
15	Cellule animale	Auteur : Science Primer (National Center for Biotechnology Information) Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Celltypes.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Celltypes.svg</a> Termes : Domaine public
15	MOSFET	Auteur : Arne Nordmann Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Scheme_of_metal_oxide_semiconductor_field-effect_transistor.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Scheme_of_metal_oxide_semiconductor_field-effect_transistor.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
15	Roue dentée	Auteur : The Tango! Desktop Project Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Applications-system.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Applications-system.svg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5
16	Feuille d'érable	Auteur : Steve Jurvetson Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Maple_leaf_structure.jpg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Maple_leaf_structure.jpg</a> Termes : Creative Commons Attribution ShareAlike 2.0
57	Angle de contact	Auteur : Joris Gillis Source : <a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/Image&gt;Contact_angle.svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/Image&gt;Contact_angle.svg</a> Termes : Domaine public

## C.3 GNU Free Documentation License

Version 1.2, November 2002

Copyright © 2000,2001,2002 Free Software Foundation, Inc.

51 Franklin St, Fifth Floor, Boston, MA 02110-1301 USA

Everyone is permitted to copy and distribute verbatim copies of this license document, but changing it is not allowed.

### Preamble

The purpose of this License is to make a manual, textbook, or other functional and useful document “free” in the sense of freedom : to assure everyone the effective freedom to copy and redistribute it, with or without modifying it, either commercially or noncommercially. Secondarily, this License preserves for the author and publisher a way to get credit for their work, while not being considered responsible for modifications made by others.

This License is a kind of “copyleft”, which means that derivative works of the document must themselves be free in the same sense. It complements the GNU General Public License, which is a copyleft license designed for free software.

We have designed this License in order to use it for manuals for free software, because free software needs free documentation : a free program should come with manuals providing the same freedoms that the software does. But this License is not limited to software manuals ; it can be used for any textual work, regardless of subject matter or whether it is published as a printed book. We recommend this License principally for works whose purpose is instruction or reference.

### 1. Applicability and definitions

This License applies to any manual or other work, in any medium, that contains a notice placed by the copyright holder saying it can be distributed under the terms of this License. Such a notice grants a world-wide, royalty-free license, unlimited in duration, to use that work under the conditions stated herein. The “**Document**”, below, refers to any such manual or work. Any member of the public is a licensee, and is addressed as “**you**”. You accept the license if you copy, modify or distribute the work in a way requiring permission under copyright law.

A “**Modified Version**” of the Document means any work containing the Document or a portion of it, either copied verbatim, or with modifications and/or translated into another language.

A “**Secondary Section**” is a named appendix or a front-matter section of the Document that deals exclusively with the relationship of the publishers or authors of the Document to the Document’s overall subject (or to related matters) and contains nothing that could fall directly within that overall subject. (Thus, if the Document is in part a textbook of mathematics, a Secondary Section may not explain any mathematics.) The relationship could be a matter of historical connection with the subject or with related matters, or of legal, commercial, philosophical, ethical or political position regarding them.

The “**Invariant Sections**” are certain Secondary Sections whose titles are designated, as being those of Invariant Sections, in the notice that says that the Document is released under this License. If a section does not fit the above definition of Secondary then it is not allowed to be designated as Invariant. The Document may contain zero Invariant Sections. If the Document does not identify any Invariant Sections then there are none.

The “**Cover Texts**” are certain short passages of text that are listed, as Front-Cover Texts or Back-Cover Texts, in the notice that says that the Document is released under this License. A Front-Cover Text may be at most 5 words, and a Back-Cover Text may be at most 25 words.

A “**Transparent**” copy of the Document means a machine-readable copy, represented in a format whose specification is available to the general public, that is suitable for revising the document straightforwardly with generic text editors or (for images composed of pixels) generic paint programs or (for drawings) some widely available drawing editor, and that is suitable for input to text formatters or for automatic translation to a variety of formats suitable for input to text formatters. A copy made in an otherwise Transparent file format whose markup, or absence of markup, has been arranged to thwart or discourage subsequent modification by readers is not Transparent. An image format is not Transparent if used for any substantial amount of text. A copy that is not “Transparent” is called “**Opaque**”.

Examples of suitable formats for Transparent copies include plain ASCII without markup, Texinfo input format, LaTeX input format, SGML or XML using a publicly available DTD, and standard-conforming simple HTML, PostScript or PDF designed for human modification. Examples of transparent image formats include PNG, XCF and JPG. Opaque formats include proprietary formats that can be read and edited only by proprietary word processors, SGML or XML for which the DTD and/or processing tools are not generally available, and the machine-generated HTML, PostScript or PDF produced by some word processors for output purposes only.

The “**Title Page**” means, for a printed book, the title page itself, plus such following pages as are needed to hold, legibly, the material this License requires to appear in the title page. For works in formats which do not have any title page as such, “Title Page” means the text near the most prominent appearance of the work’s title, preceding the beginning of the body of the text.

A section “**Entitled XYZ**” means a named subunit of the Document whose title either is precisely XYZ or contains XYZ in parentheses following text that translates XYZ in another language. (Here XYZ stands for a specific section name mentioned below, such as “**Acknowledgements**”, “**Dedications**”, “**Endorsements**”, or “**History**”.) To “**Preserve the Title**” of such a section when you modify the Document means that it remains a section “Entitled XYZ” according to this definition.

The Document may include Warranty Disclaimers next to the notice which states that this License applies to the Document. These Warranty Disclaimers are considered to be included by reference in this License, but only as regards disclaiming warranties : any other implication that these Warranty Disclaimers may have is void and has no effect on the meaning of this License.

## 2. Verbatim copying

You may copy and distribute the Document in any medium, either commercially or noncommercially, provided that this License, the copyright notices, and the license notice saying this License applies to the Document are reproduced in all copies, and that you add no other conditions whatsoever to those of this License. You may not use technical measures to obstruct or control the reading or further copying of the copies you make or distribute. However, you may accept compensation in exchange for copies. If you distribute a large enough number of copies you must also follow the conditions in section 3.

You may also lend copies, under the same conditions stated above, and you may publicly display copies.

### 3. Copying in quantity

If you publish printed copies (or copies in media that commonly have printed covers) of the Document, numbering more than 100, and the Document's license notice requires Cover Texts, you must enclose the copies in covers that carry, clearly and legibly, all these Cover Texts : Front-Cover Texts on the front cover, and Back-Cover Texts on the back cover. Both covers must also clearly and legibly identify you as the publisher of these copies. The front cover must present the full title with all words of the title equally prominent and visible. You may add other material on the covers in addition. Copying with changes limited to the covers, as long as they preserve the title of the Document and satisfy these conditions, can be treated as verbatim copying in other respects.

If the required texts for either cover are too voluminous to fit legibly, you should put the first ones listed (as many as fit reasonably) on the actual cover, and continue the rest onto adjacent pages.

If you publish or distribute Opaque copies of the Document numbering more than 100, you must either include a machine-readable Transparent copy along with each Opaque copy, or state in or with each Opaque copy a computer-network location from which the general network-using public has access to download using public-standard network protocols a complete Transparent copy of the Document, free of added material. If you use the latter option, you must take reasonably prudent steps, when you begin distribution of Opaque copies in quantity, to ensure that this Transparent copy will remain thus accessible at the stated location until at least one year after the last time you distribute an Opaque copy (directly or through your agents or retailers) of that edition to the public.

It is requested, but not required, that you contact the authors of the Document well before redistributing any large number of copies, to give them a chance to provide you with an updated version of the Document.

### 4. Modifications

You may copy and distribute a Modified Version of the Document under the conditions of sections 2 and 3 above, provided that you release the Modified Version under precisely this License, with the Modified Version filling the role of the Document, thus licensing distribution and modification of the Modified Version to whoever possesses a copy of it. In addition, you must do these things in the Modified Version :

- A. Use in the Title Page (and on the covers, if any) a title distinct from that of the Document, and from those of previous versions (which should, if there were any, be listed in the History section of the Document). You may use the same title as a previous version if the original publisher of that version gives permission.
- B. List on the Title Page, as authors, one or more persons or entities responsible for authorship of the modifications in the Modified Version, together with at least five of the principal authors of the Document (all of its principal authors, if it has fewer than five), unless they release you from this requirement.
- C. State on the Title page the name of the publisher of the Modified Version, as the publisher.
- D. Preserve all the copyright notices of the Document.
- E. Add an appropriate copyright notice for your modifications adjacent to the other copyright notices.
- F. Include, immediately after the copyright notices, a license notice giving the public permission to use the Modified Version under the terms of this License, in the form shown in the Addendum below.

- G. Preserve in that license notice the full lists of Invariant Sections and required Cover Texts given in the Document's license notice.
- H. Include an unaltered copy of this License.
- I. Preserve the section Entitled "History", Preserve its Title, and add to it an item stating at least the title, year, new authors, and publisher of the Modified Version as given on the Title Page. If there is no section Entitled "History" in the Document, create one stating the title, year, authors, and publisher of the Document as given on its Title Page, then add an item describing the Modified Version as stated in the previous sentence.
- J. Preserve the network location, if any, given in the Document for public access to a Transparent copy of the Document, and likewise the network locations given in the Document for previous versions it was based on. These may be placed in the "History" section. You may omit a network location for a work that was published at least four years before the Document itself, or if the original publisher of the version it refers to gives permission.
- K. For any section Entitled "Acknowledgements" or "Dedications", Preserve the Title of the section, and preserve in the section all the substance and tone of each of the contributor acknowledgements and/or dedications given therein.
- L. Preserve all the Invariant Sections of the Document, unaltered in their text and in their titles. Section numbers or the equivalent are not considered part of the section titles.
- M. Delete any section Entitled "Endorsements". Such a section may not be included in the Modified Version.
- N. Do not retitle any existing section to be Entitled "Endorsements" or to conflict in title with any Invariant Section.
- O. Preserve any Warranty Disclaimers.

If the Modified Version includes new front-matter sections or appendices that qualify as Secondary Sections and contain no material copied from the Document, you may at your option designate some or all of these sections as invariant. To do this, add their titles to the list of Invariant Sections in the Modified Version's license notice. These titles must be distinct from any other section titles.

You may add a section Entitled "Endorsements", provided it contains nothing but endorsements of your Modified Version by various parties—for example, statements of peer review or that the text has been approved by an organization as the authoritative definition of a standard.

You may add a passage of up to five words as a Front-Cover Text, and a passage of up to 25 words as a Back-Cover Text, to the end of the list of Cover Texts in the Modified Version. Only one passage of Front-Cover Text and one of Back-Cover Text may be added by (or through arrangements made by) any one entity. If the Document already includes a cover text for the same cover, previously added by you or by arrangement made by the same entity you are acting on behalf of, you may not add another; but you may replace the old one, on explicit permission from the previous publisher that added the old one.

The author(s) and publisher(s) of the Document do not by this License give permission to use their names for publicity for or to assert or imply endorsement of any Modified Version.

## 5. Combining documents

You may combine the Document with other documents released under this License, under the terms defined in section 4 above for modified versions, provided that you include in the combination all of the Invariant Sections of all of the original documents, unmodified, and list them all as Invariant Sections of your combined work in its license notice, and that you preserve all their Warranty Disclaimers.

The combined work need only contain one copy of this License, and multiple identical Invariant Sections may be replaced with a single copy. If there are multiple Invariant Sections with the same name but different contents, make the title of each such section unique by adding at the end of it, in parentheses, the name of the original author or publisher of that section if known, or else a unique number. Make the same adjustment to the section titles in the list of Invariant Sections in the license notice of the combined work.

In the combination, you must combine any sections Entitled “History” in the various original documents, forming one section Entitled “History”; likewise combine any sections Entitled “Acknowledgements”, and any sections Entitled “Dedications”. You must delete all sections Entitled “Endorsements”.

## 6. Collections of documents

You may make a collection consisting of the Document and other documents released under this License, and replace the individual copies of this License in the various documents with a single copy that is included in the collection, provided that you follow the rules of this License for verbatim copying of each of the documents in all other respects.

You may extract a single document from such a collection, and distribute it individually under this License, provided you insert a copy of this License into the extracted document, and follow this License in all other respects regarding verbatim copying of that document.

## 7. Aggregation with independent works

A compilation of the Document or its derivatives with other separate and independent documents or works, in or on a volume of a storage or distribution medium, is called an “aggregate” if the copyright resulting from the compilation is not used to limit the legal rights of the compilation’s users beyond what the individual works permit. When the Document is included in an aggregate, this License does not apply to the other works in the aggregate which are not themselves derivative works of the Document.

If the Cover Text requirement of section 3 is applicable to these copies of the Document, then if the Document is less than one half of the entire aggregate, the Document’s Cover Texts may be placed on covers that bracket the Document within the aggregate, or the electronic equivalent of covers if the Document is in electronic form. Otherwise they must appear on printed covers that bracket the whole aggregate.

## 8. Translation

Translation is considered a kind of modification, so you may distribute translations of the Document under the terms of section 4. Replacing Invariant Sections with translations requires special permission from their copyright holders, but you may include translations of some or all Invariant Sections in addition to the original versions of these Invariant Sections. You may include a translation of this License, and all the license notices in the Document, and any Warranty Disclaimers, provided that you also include the original English version of this License and the original versions of those notices and disclaimers. In case of a disagreement between the translation and the original version of this License or a notice or disclaimer, the original version will prevail.

If a section in the Document is Entitled “Acknowledgements”, “Dedications”, or “History”, the requirement (section 4) to Preserve its Title (section 1) will typically require changing the actual title.

## **9. Termination**

You may not copy, modify, sublicense, or distribute the Document except as expressly provided for under this License. Any other attempt to copy, modify, sublicense or distribute the Document is void, and will automatically terminate your rights under this License. However, parties who have received copies, or rights, from you under this License will not have their licenses terminated so long as such parties remain in full compliance.

## **10. Future revisions of this license**

The Free Software Foundation may publish new, revised versions of the GNU Free Documentation License from time to time. Such new versions will be similar in spirit to the present version, but may differ in detail to address new problems or concerns. See <http://www.gnu.org/copyleft/>.

Each version of the License is given a distinguishing version number. If the Document specifies that a particular numbered version of this License “or any later version” applies to it, you have the option of following the terms and conditions either of that specified version or of any later version that has been published (not as a draft) by the Free Software Foundation. If the Document does not specify a version number of this License, you may choose any version ever published (not as a draft) by the Free Software Foundation.

# Références

- [1] M.R. WILKINS, J.C. SANCHEZ, A.A. GOOLEY, R.D. APPEL, I. HUMPHERY-SMITH, D.F. HOCHSTRASSER et K.L. WILLIAMS : Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 13:19–50, 1996.
- [2] H. ANDERSSON et A. van den BERG : Microfluidic devices for cellomics: A review. *Sens. Actuators B Chem.*, 92(3):315–325, Jul. 2003, doi:10.1016/S0925-4005(03)00266-1.
- [3] J. EL-ALI, P.K. SORGER et K.F. JENSEN : Cells on chips. *Nature*, 442(7101):403–411, Jul. 2006, doi:10.1038/nature05063. Revue.
- [4] I. MEYVANTSSON, J.W. WARRICK, S. HAYES, A. SKOIEN et D.J. BEEBE : Automated cell culture in high density tubeless microfluidic device arrays. *Lab. Chip.*, 8(5):717–724, May 2008, doi:10.1039/b715375a.
- [5] P.G. RIGHETTI : Bioanalysis: Its past, present and some future. *Electrophoresis*, 25(14):2111–2127, 2004, doi:10.1002/elps.200305808.
- [6] P. YAGER, T. EDWARDS, E. FU, K. HELTON, K. NELSON, M.R. TAM et B.H. WEIGL : Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442(7101):412–418, Jul. 2006, doi:10.1038/nature05064.
- [7] S. FIELDS : The interplay of biology and technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18):10051–10054, Aug 2001, doi:10.1073/pnas.191380098.
- [8] G.M. WHITESIDES : The ‘right’ size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.*, 21(10):1161–1165, Oct. 2003, doi:10.1038/nbt872.
- [9] V. GEWIN : Nanobiotechnology: small talk. *Nature*, 444(7118):514–515, Nov. 2006, doi:10.1038/nj7118-514a.
- [10] A. MANZ, N. GRABER et H.M. WIDMER : Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B*, 1(1-6):244–248, Jan. 1990, doi:10.1016/0925-4005(90)80209-I.
- [11] A. MANZ, D.J. HARRISON, E.M.J. VERPOORTE, J.C. FETTINGER, A. PAULUS, H. LÜDI et H.M. WIDMER : Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems – capillary electrophoresis on a chip. *J. Chromatogr. A*, 593(1-2):253–258, Feb. 1992, doi:10.1016/0021-9673(92)80293-4.
- [12] D.R. REYES, D. IOSSIFIDIS, P.-A. AUROUX et A. MANZ : Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal. Chem.*, 74(12):2623–2636, 2002, doi:10.1021/ac0202435.

- [13] D. JANASEK, J. FRANZKE et A. MANZ : Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 442(7101):374–380, Jul. 2006, doi:10.1038/nature05059.
- [14] L.A. LEGENDRE, J.M. BIENVENUE, M.G. ROPER, J.P. FERRANCE et J.P. LANDERS : A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples. *Anal. Chem.*, 78(5):1444–1451, Mar. 2006, doi:10.1021/ac0516988.
- [15] N. LION, F. REYMOND, H.H. GIRAULT et J.S. ROSSIER : Why the move to microfluidics for protein analysis? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15(1):31–37, Feb. 2004, doi:10.1016/j.copbio.2004.01.001.
- [16] M. U. KOPP, H. J. CRABTREE et A. MANZ : Developments in technology and applications of microsystems. *Curr Opin Chem Biol*, 1(3):410–419, Oct 1997, doi:10.1016/S1367-5931(97)80081-6.
- [17] P. HORVATOVICH, N.I. GOVORUKHINA, T.H. REIJMERS, A.G.J. van der ZEE, F. SUITS et R. BISCHOFF : Chip-LC-MS for label-free profiling of human serum. *Electrophoresis*, 28(23):4493–4505, Dec. 2007, doi:10.1002/elps.200600719.
- [18] D.A. DUNN et I. FEYGIN : Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization: submicroliter fluid handling. *Drug Discovery Today*, 5(12, suppl. 1):84–91, Dec. 2000, doi:10.1016/S1359-6446(00)00064-7. Revue
- [19] M.J. MADOU et R. CUBICCIOTTI : Scaling issues in chemical and biological sensors. *Proc. IEEE*, 91(6):830–838, 2003, doi:10.1109/JPROC.2003.813577.
- [20] S. NILSSON et T. LAURELL : Miniaturization in analytical and bioanalytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(7):1676–1677, Apr 2004, doi:10.1007/s00216-004-2543-z.
- [21] Comité de Pilotage du RÉSEAU MICROFLUIDIQUE : Argumentaire en faveur du lancement d'une action incitative ambitieuse et structurée en nano-microfluidique et microsystèmes fluidiques. Livre blanc, Jan. 2005. URI : [http://www.laas.fr/Microfluidique/LIVRE%20BLANC\\_Microfluidique\\_VF.pdf](http://www.laas.fr/Microfluidique/LIVRE%20BLANC_Microfluidique_VF.pdf).
- [22] A. RÍOS, A. ESCARPA, M.C. GONZÁLEZA et A.G. CREVILLÉN : Challenges of analytical microsystems. *Tr. Anal. Chem.*, 25(5):467–479, May 2006, doi:10.1016/j.trac.2005.11.012.
- [23] A.W. MOORE : *The Infinite*, chapitre 2: Aristotle, page 296. Routledge, 2001. p. 34.
- [24] B.C. K. CHOI et A.W.P. PAK : Multidisciplinarity, interdisciplinarity and transdisciplinarity in health research, services, education and policy: 1. Definitions, objectives, and evidence of effectiveness. *Clin. Invest. Med.*, 29(6):351–364, Dec. 2006. URI : <http://csci-scrc.medical.org/english/cim.html>.
- [25] S.W. ABOELELA, E. LARSON, S. BAKKEN, O. CARRASQUILLO, A. FORMICOLA, S.A. GLIED, J. HAAS et K.M. GEBBIE : Defining interdisciplinary research: conclusions from a critical review of the literature. *Health Serv. Res.*, 42(1 Pt 1):329–346, Feb. 2007, doi:10.1111/j.1475-6773.2006.00621.x.
- [26] R.W. BARBER et D.R. EMERSON : Optimal design of microfluidic networks using biologically inspired principles. *Microfluid. Nanofluid.*, 4(3):179–191, Mar 2008, doi:10.1007/s10404-007-0163-6.

- [27] M. GROSS : *Travels to the Nanoworld: Miniature Machinery in Nature and Technology.* Perseus Publishing, 1999.
- [28] EDITORIAL : Spring-cleaning in France. *Nature*, 453(7192):133, May 2008, doi:10.1038/453133a.
- [29] G.M. WHITESIDES : The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, Jul. 2006, doi:10.1038/nature05058.
- [30] P. TABELING : *Introduction à la microfluidique.* Échelles. Belin, 2003.
- [31] A.R. WHEELER, H. MOON, C.A. BIRD, R.R. Ogorzalek Loo, C.-C. J. KIM, J.A. LOO et R.L. GARRELL : Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS. *Anal. Chem.*, 77(2):534–540, Jan. 2005, doi:10.1021/ac048754+.
- [32] Y. FOUILLET, D. JARY, C. CHABROL, P. CLAUSTRE et C. PEPPONNET : Digital microfluidic design and optimization of classic and new fluidic functions for lab on a chip systems. *Microfluid. Nanofluid.*, 4(3):159–165, Mar. 2008, doi:10.1007/s10404-007-0164-5.
- [33] S. COLIN : *Microfluidique.* Traité EGEM. Lavoisier, 2004.
- [34] T.M. SQUIRES et S.R. QUAKE : Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.*, 77(3):977–1026, 2005, doi:10.1103/RevModPhys.77.977.
- [35] O. REYNOLDS : An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 174:935–982, 1883. URI : <http://www.jstor.org/stable/109431>.
- [36] A. van den BERG et P. BERGVLD : Labs-on-a-chip: origin, highlights and future perspectives. on the occasion of the 10th microTAS conference. *Lab. Chip.*, 6(10):1266–1273, Oct. 2006, doi:10.1039/b612120a.
- [37] R. MARIELLA : Sample preparation: the weak link in microfluidics-based biodetection. *Biomed. Microdevices*, May 2008, doi:10.1007/s10544-008-9190-7.
- [38] EDITORS : Ten emerging technologies that will change the world. M.I.T.’s Technology Review, Jan 2001. URI : <http://www.technologyreview.com/Infotech/12265/>.
- [39] G.M. WHITESIDES et A.D. STROOCK : Flexible methods for microfluidics. *Physics Today*, 54(6):42–48, Jun. 2001, doi:10.1063/1.1387591.
- [40] H. BECKER et C. GÄRTNER : Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(1):89–111, Jan. 2008, doi:10.1007/s00216-007-1692-2.
- [41] P. ABGRALL, V. CONEDERA, H. CAMON, A.-M. GUÉ et N.-T. NGUYEN : SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems. *Electrophoresis*, 28(24):4539–4551, Dec. 2007, doi:10.1002/elps.200700333.
- [42] A. HATCH, A. E. KAMHOLZ, K. R. HAWKINS, M. S. MUNSON, E. A. SCHILLING, B. H. WEIGL et P. YAGER : A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. *Nature Biotechnology*, 19(5):461–465, May 2001, doi:10.1038/88135.

- [43] G.A. ARDILA RODRIGUEZ : *Conception, simulation et réalisation d'un micro-actionneur à base de matériau énergétique pour l'actionnement microfluidique.* Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, Jan. 2008.
- [44] D.J. LASER et J.G. SANTIAGO : A review of micropumps. *J. Micromech. Microeng.*, 14(6):R35–R64, Jun 2004, doi:10.1088/0960-1317/14/6/R01.
- [45] P. WOIAS : Micropumps – past, progress and future prospects. *Sens. Actuators B Chem.*, 105(1):28–38, Feb. 2005, doi:10.1016/j.snb.2004.02.033.
- [46] L. CHEN, S. LEE, J. CHOO et E.K. LEE : Continuous dynamic flow micropumps for microfluid manipulation. *J. Micromech. Microeng.*, 18(1):013001–0130022, Jan. 2008, doi:10.1088/0960-1317/18/1/013001.
- [47] T. THORSEN, S.J. MAERKL et S.R. QUAKE : Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298(5593):580–584, Oct. 2002, doi:10.1126/science.1076996.
- [48] J. MELIN et S.R. QUAKE : Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36:213–231, 2007, doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132646.
- [49] C. ZHANG, D. XING et Y. LI : Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. *Biotechnol. Adv.*, 25(5):483–514, Sep.-Oct. 2007, doi:10.1016/j.biotechadv.2007.05.003. Revue.
- [50] C.K. FREDRICKSON et Z.H. FAN : Macro-to-micro interfaces for microfluidic devices. *Lab. Chip.*, 4(6):526–533, Dec. 2004, doi:10.1039/b410720a.
- [51] C. GAERTNER, H. BECKER, B. ANTON, A.P. O'NEILL et O. ROETTING : Polymer based microfluidic devices: examples for fluidic interfaces and standardization concepts. In *Proceedings of SPIE - Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems*, volume 4982, pages 99–104, 2003.
- [52] D. NIARCHOS : Magnetic MEMS: key issues and some applications. *Sens. Actuators A Phys.*, 109(1-2):166–173, Dec 2003, doi:10.1016/j.sna.2003.09.010.
- [53] N. PAMME : Magnetism and microfluidics. *Lab Chip*, 6(1):24–38, Jan 2006, doi:10.1039/b513005k.
- [54] S. BRONZEAU et N. PAMME : Simultaneous bioassays in a microfluidic channel on plugs of different magnetic particles. *Anal Chim Acta*, 609(1):105–112, Feb 2008, doi:10.1016/j.aca.2007.11.035.
- [55] J.D. TRUMBULL, I.K. GLASGOW, D.J. BEEBE et R.L. MAGIN : Integrating microfabricated fluidic systems and NMR spectroscopy. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 47(1):3–7, 2000, doi:10.1109/10.817611.
- [56] K.B. MOGENSEN, H. KLANK et J.P. CUTTER : Recent developments in detection for microfluidic systems. *Electrophoresis*, 25(21-22):3498–3512, 2004, doi:10.1002/elps.200406108. Revue.
- [57] J.R. KROGMEIER, I. SCHAEFER, G. SEWARD, G.R. YANTZ et J.W. LARSON : An integrated optics microfluidic device for detecting single DNA molecules. *Lab Chip*, 7(12):1767–1774, Dec 2007, doi:10.1039/b710504e.

- [58] B. KUSWANDI, NURIMAN, J. HUSKENS et W. VERBOOM : Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. *Anal Chim Acta*, 601(2):141–155, Oct 2007, doi:10.1016/j.aca.2007.08.046. [Revue].
- [59] M. BOWDEN, L. SONG et D.R. WALT : Development of a microfluidic platform with an optical imaging microarray capable of attomolar target DNA detection. *Anal Chem*, 77(17):5583–5588, Sep 2005, doi:10.1021/ac050503t.
- [60] L. RINDORF, P.E. HØIBY, J.B. JENSEN, L.H. PEDERSEN, O. BANG et O. GESCHKE : Towards biochips using microstructured optical fiber sensors. *Anal Bioanal Chem*, 385(8):1370–1375, Aug 2006, doi:10.1007/s00216-006-0480-8.
- [61] D. PSALTIS, S.R. QUAKE et C. YANG : Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, 442(7101):381–386, Jul 2006, doi:10.1038/nature05060.
- [62] EDITORS : 10 emerging technologies that will change your world. M.I.T.’s Technology Review, Feb 2004. URI : <http://www.technologyreview.com/Infotech/13438/?a=f>.
- [63] S.C. TERRY, J.H. JERMAN et J.B. ANGELL : A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans. Electron. Devices*, 26(12):1880–1886, Dec. 1979. URI : <http://ieeexplore.ieee.org/search/wrapper.jsp?arnumber=1480369>.
- [64] A.J. DEMELLO : Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442(7101):394–402, Jul. 2006, doi:10.1038/nature05062. [Revue].
- [65] D.J. HARRISON, A. MANZ, Z. FAN, H. LÜDI et H.M. WIDMER : Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal. Chem.*, 64(17):1926–1932, 1992, doi:10.1021/ac00041a030.
- [66] D.J. HARRISON, K. FLURI, K. SEILER, Z. FAN, C.S. EFFENHAUSER et A. MANZ : Micro-machining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261(5123):895–897, Aug. 1993, doi:10.1126/science.261.5123.895.
- [67] P.S. DITTRICH, K. TACHIKAWA et A. MANZ : Micro total analysis systems. latest advancements and trends. *Anal. Chem.*, 78(12):3887–3908, Jun. 2006, doi:10.1021/ac0605602.
- [68] J. WEST, M. BECKER, S. TOMBRINK et A. MANZ : Micro total analysis systems: Latest achievements. *Anal. Chem.*, 80(12):4403 – 4419, May 2008, doi:10.1021/ac800680j.
- [69] P.-A. AUROUX, D. IOSSIFIDIS, D.R. REYES et A. MANZ : Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal. Chem.*, 74(12):2637–2652, Jun. 2002, doi:10.1021/ac020239t. [Revue].
- [70] Y. SUN et Y.C. KWOK : Polymeric microfluidic system for DNA analysis. *Anal. Chim. Acta*, 556(1):80–96, Jan. 2006, doi:10.1016/j.aca.2005.09.035.
- [71] J.O. TEGENFELDT, C. PRINZ, H. CAO, R.L. HUANG, R.H. AUSTIN, S.Y. CHOU, E.C. COX et J.C. STURM : Micro- and nanofluidics for DNA analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(7):1678–1692, Apr. 2004, doi:10.1007/s00216-004-2526-0.
- [72] D. FIGEYS et D. PINTO : Proteomics on a chip: Promising developments. *Electrophoresis*, 22(2):208–216, Jan. 2001, doi:10.1002/1522-2683(200101)22:2<208::AID-ELPS208>3.0.CO;2-O.

- [73] N. LION, T.C. ROHNER, L. DAYON, I.L. ARNAUD, E. DAMOC, N. YOUEHOVSKI, Z.-Y. WU, Ch. ROUSSEL, J. JOSSERAND, H. JENSEN, J.S. ROSSIER, M. PRZYBYLSKI et H.H. GIRAUT : Microfluidic systems in proteomics. *Electrophoresis*, 24(21):3533–3562, 2003, doi:10.1002/elps.200305629. Revue.
- [74] Y. TANAKA, K. SATO, T. SHIMIZU, M. YAMATO, T. OKANO et T. KITAMORI : Biological cells on microchips: new technologies and applications. *Biosens. Bioelectron.*, 23(4):449–458, Nov. 2007, doi:10.1016/j.bios.2007.08.006.
- [75] C.T. LIM et Y. ZHANG : Bead-based microfluidic immunoassays: the next generation. *Biosens. Bioelectron.*, 22(7):1197–1204, Feb. 2007, doi:10.1016/j.bios.2006.06.005.
- [76] S. SUZUKI et S. HONDA : Miniaturization in carbohydrate analysis. *Electrophoresis*, 24(21):3577–3582, Nov. 2003, doi:10.1002/elps.200305662. Revue.
- [77] A.D. ZAMFIR, L. BINDILA, N. LION, M. ALLEN, H.H. GIRAUT et J. PETER-KATALINIĆ : Chip electrospray mass spectrometry for carbohydrate analysis. *Electrophoresis*, 26(19):3650–3673, Oct. 2005, doi:10.1002/elps.200500101. Revue.
- [78] B. CHARLTON, B. CROSSLEY et S. HIETALA : Conventional and future diagnostics for avian influenza. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Apr. 2008, doi:10.1016/j.cimid.2008.01.009.
- [79] B.L. ZIOBER, M.G. MAUK, E.M. FALLS, Z. CHEN, A.F. ZIOBER et H.H. BAU : Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head Neck*, 30(1):111–121, Jan. 2008, doi:10.1002/hed.20680. Revue.
- [80] B.H. WEIGL, R.L. BARDELL et C.R. CABRERA : Lab-on-a-chip for drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55(3):349–377, 2003, doi:10.1016/S0169-409X(02)00223-5. Revue.
- [81] J.G.E. GARDENIERS et A. van den BERG : Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(7):1700–1703, Apr. 2004, doi:10.1007/s00216-003-2435-7.
- [82] H.Y. TAN, W.K. LOKE, Y.T. TAN et N.-T. NGUYEN : A lab-on-a-chip for detection of nerve agent sarin in blood. *Lab. Chip.*, 8(6):885–891, Jun. 2008, doi:10.1039/b800438b.
- [83] S.J. HASWELL : Chemical technology: all together now. *Nature*, 441(7094):705, Jun. 2006, doi:10.1038/441705a.
- [84] J. ASTORGA-WELLS, H. JÖRNVAL et T. BERGMAN : A microfluidic electrocapture device in sample preparation for protein analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 75(19):5213–5219, Oct. 2003, doi:10.1021/ac0300901.
- [85] J. ASTORGA-WELLS, S. VOLLMER, S. TRYGGVASON, T. BERGMAN et H. JÖRNVAL : Microfluidic electrocapture for separation of peptides. *Anal. Chem.*, 77(22):7131–7136, 2005, doi:10.1021/ac050931z.
- [86] A. DODGE, E. BRUNET, S. CHEN, J. GOULPEAU, V. LABAS, J. VINH et P. TABELING : Pdms-based microfluidics for proteomic analysis. *Analyst*, 131(10):1122–1128, Oct. 2006, doi:10.1039/b606394b.

- [87] S.L.S. FREIRE et A.R. WHEELER : Proteome-on-a-chip: mirage, or on the horizon? *Lab. Chip.*, 6(11):1415–1423, Nov. 2006, doi:10.1039/b609871a. Revue.
- [88] J.D. RAMSEY, S.C. JACOBSON, C.T. CULBERTSON et J.M. RAMSEY : High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 75(15):3758–3764, June 2003, doi:10.1021/ac0264574.
- [89] J. LI, T. LERICHE, T.-L. TREMBLAY, C. WANG, E. BONNEIL, D.J. HARRISON et P. THIBAULT : Application of microfluidic devices to proteomics research: Identification of trace-level protein digests and affinity capture of target peptides. *Mol. Cell. Proteomics*, 1(2):157–168, Jan. 2002, doi:10.1074/mcp.M100022-MCP200.
- [90] S.C. JACOBSON, C.T. CULBERTSON, J.E. DALER et J.M. RAMSEY : Microchip structures for submillisecond electrophoresis. *Anal. Chem.*, 70(16):3476–3480, July 1998, doi:10.1021/ac980349t.
- [91] W.R. VANDAVEER, S.A. PASAS-FARMER, D.J. FISCHER, C.N. FRANKENFELD et S.M. LUNTE : Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(21-22):3528–3549, Nov 2004, doi:10.1002/elps.200406115.
- [92] E. THRUSH, Of. LEVI, W. HA, K. WANG, S.J. SMITH et J.S. HARRIS : Integrated bio-fluorescence sensor. *J. Chromatogr. A*, 1013(1-2):103–110, Sep 2003, doi:10.1016/S0021-9673(03)01361-X.
- [93] N. MINC et J.-L. VIOVY : Microfluidique et applications biologiques : enjeux et tendances. *C. R. Physique*, 5(5):565–575, juin 2004, doi:10.1016/j.crhy.2004.04.003.
- [94] R.H. LIU, J. YANG, R. LENIGK, J. BONANNO et P. GRODZINSKI : Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal. Chem.*, 76(7):1824–1831, Apr. 2004, doi:10.1021/ac0353029.
- [95] H. MOON, A.R. WHEELER, R.L. GARRELL, J.A. LOO et C.-J.C. KIM : An integrated digital microfluidic chip for multiplexed proteomic sample preparation and analysis by MALDI-MS. *Lab. Chip.*, 6(9):1213–1219, Sep. 2006, doi:10.1039/b601954d.
- [96] J.M. RAMSEY : The burgeoning power of the shrinking laboratory. *Nat. Biotechnol.*, 17(11):1061–1062, Nov. 1999, doi:10.1038/15044.
- [97] J.V. ZOVAL et M.J. MADOU : Centrifuge-based fluidic platforms. *Proc. IEEE*, 92(1):140–153, 2004, doi:10.1109/JPROC.2003.820541. Revue.
- [98] C. ERIKSSON, C. AGATON, R. KÅNGE, M. SUNDBERG, P. NILSSON, B. EK, M. UHLÉN, M. GUSTAFSSON et S. HOBER : Microfluidic analysis of antibody specificity in a compact disk format. *J. Proteome Res.*, 5(7):1568–1574, Jul. 2006, doi:10.1021/pr050447c.
- [99] M. MADOU, J. ZOVAL, G. JIA, H. KIDO, J. KIM et N. KIM : Lab on a CD. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8:601–628, 2006, doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095758.
- [100] J. LICHTENBERG, N.F. de ROOIJ et E. VERPOORTE : Sample pretreatment on micro-fabricated devices. *Talanta*, 56(11):233–266, Feb. 2002, doi:10.1016/S0039-9140(01)00593-8. Revue.

- [101] M.TONER et D. IRIMIA : Blood-on-a-chip. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 7:77–103, 2005, doi:10.1146/annurev.bioeng.7.011205.135108.
- [102] J.L. LUQUE-GARCIA et T.A. NEUBERT : Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1153(1-2):259–276, Jun. 2007, doi:10.1016/j.chroma.2006.11.054. Revue.
- [103] R. LIMA, S. WADA, S. TANAKA, M. TAKEDA, T. ISHIKAWA, K.-I. TSUBOTA, Y. IMAI et T. YAMAGUCHI : In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomed. Microdevices*, 10(2):153–167, Apr. 2008, doi:10.1007/s10544-007-9121-z.
- [104] A.G. CREVILLÉN, M. HERVÁS, M.A. LÓPEZ, M.C. GONZÁLEZ et A. ESCARPA : Real sample analysis on microfluidic devices. *Talanta*, 74(3):342–357, Dec. 2007, doi:10.1016/j.talanta.2007.10.019. Revue.
- [105] K. S. DRESE, F. von GERMAR et M. RITZI : Sample preparation in lab-on-a-chip systems. *Med Device Technol*, 18(1):42, 44, 46, 2007. URI : <http://www.devicelink.com/mdt/archive/07/01/004.html>.
- [106] Y. HUANG, E.L. MATHER, J.L. BELL et M. MADOU : MEMS-based sample preparation for molecular diagnostics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372(1):49–65, Jan. 2002, doi:10.1007/s00216-001-1191-9. Revue.
- [107] S. Le GAC, J. CARLIER, J.-C. CAMART, C. CRENN-OLIVÉ et C. ROLANDO : Monoliths for microfluidic devices in proteomics. *J. Chromatogr. B*, 808(1):3–14, Aug. 2004, doi:10.1016/j.jchromb.2004.03.067.
- [108] N. LION, V. GOBRY, H. JENSEN, J.S. ROSSIER et H. GIRAULT : Integration of a membrane-based desalting step in a microfabricated disposable polymer injector for mass spectrometric protein analysis. *Electrophoresis*, 23(20):3583–3588, Oct. 2002, doi:10.1002/1522-2683(200210)23:20<3583::AID-ELPS3583>3.0.CO;2-N.
- [109] N. LION, J.-O. GELLON, H. JENSEN et H.H. GIRAULT : On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1003(1-2):11–19, Jun. 2003, doi:10.1016/S0021-9673(03)00771-4.
- [110] M. GUSTAFSSON, D. HIRSCHBERG, C. PALMBERG, H. JÖRNVALL et T. BERGMAN : Integrated sample preparation and maldi mass spectrometry on a microfluidic compact disk. *Anal. Chem.*, 76(2):345–350, Jan. 2004, doi:10.1021/ac030194b.
- [111] J.N. ADKINS, S.M. VARNUM, K.J. AUBERRY, R.J. MOORE, N.H. ANGELL, R.D. SMITH, D.L. SPRINGER et J.G. POUNDS : Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, 1(12):947–955, Dec. 2002, doi:10.1074/mcp.M200066-MCP200.
- [112] M. HESKINS et J.E. GUILLET : Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, 2(8):1441–1455, Dec. 1968, doi:10.1080/10601326808051910.
- [113] X.-Z. ZHANG, F.-J. WANG et C.-C. CHU : Thermoresponsive hydrogel with rapid response dynamics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 14(5):451–455, May 2003, doi:10.1023/A:1023219019500.

- [114] H. YIM, M.S. KENT, S. MENDEZ, S.S. BALAMURUGAN, S. BALAMURUGAN, G.P. LOPEZ et S. SATIJA : Temperature-dependent conformational change of PNIPAM grafted chains at high surface density in water. *Macromol.*, 37(5):1994–1997, 2004, doi:10.1021/ma0354290.
- [115] H.G. SCHILD : Poly(*N*-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.*, 17(2):163–249, 1992, doi:10.1016/0079-6700(92)90023-R.
- [116] R. PELTON : Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 85(1):1–33, Feb. 2000, doi:10.1016/S0001-8686(99)00023-8. Revue.
- [117] Y.V. PAN, R.A. WESLEY, R. LUGINBUHL, D.D. DENTON et B.D. RATNER : Plasma polymerized *N*-isopropylacrylamide: Synthesis and characterization of a smart thermally responsive coating. *Biomacromol.*, 2(1):32–36, 2001, doi:10.1021/bm0000642.
- [118] P.S. CURTI, M.R. De MOURA, E. RADOVANOVIC, A.F. RUBIRA, E.C. MUNIZ et R.A. MOLITERNO : Surface modification of polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(*N*-isopropylacrylamide). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 13(12):1175–1180, Dec 2002, doi:10.1023/A:1021154424189.
- [119] P. HEINZ, F. BRETAGNOL, I. MANNELLI, L. SIRGHI, A. VALSESIA, G. CECCONE, D. GILLILAND, K. LANDFESTER, H. RAUSCHER et F. ROSSI : Poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted on plasma-activated poly(ethylene oxide): Thermal response and interaction with proteins. *Langmuir*, 24(12):6166–6175, May 2008, doi:10.1021/la800575f.
- [120] G. GRAZIANO : On the temperature-induced coil to globule transition of poly-*N*-isopropylacrylamide in dilute aqueous solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27(1):89–97, Mar. 2000, doi:10.1016/S0141-8130(99)00122-1.
- [121] A. ESTÈVE, A. BAIL, G. LANDA, A. DKHISSI, M. BRUT, M. DJAFARI ROUHANI, J. SUDOR et A.-M. GUÉ : A new insight into the understanding of the collapsed form of poly(*N*-isopropylacrylamide) molecules. *Chem. Phys.*, Volume 340(1-3):12–16, Nov. 2007, doi:10.1016/j.chemphys.2007.06.054.
- [122] G. ZHANG : Study on conformation change of thermally sensitive linear grafted poly(*N*-isopropylacrylamide) chains by quartz crystal microbalance. *Macromol.*, 37(17):6553–6557, 2004, doi:10.1021/ma035937+.
- [123] G. LIU et G. ZHANG : Collapse and swelling of thermally sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) brushes monitored with a quartz crystal microbalance. *J. Phys. Chem. B*, 109(2):743–747, 2005, doi:10.1021/jp046903m.
- [124] N. ISHIDA et S. BIGGS : Direct observation of the phase transition for a poly(*n*-isopropylacryamide) layer grafted onto a solid surface by AFM and QCM-D. *Langmuir*, 23(22):11083–11088, Oct. 2007, doi:10.1021/la701461b.
- [125] M. ANNAKA, C. YAHIRO, K. NAGASE, A. KIKUCHI et T. OKANO : Real-time observation of coil-to-globule transition in thermosensitive poly(*n*-isopropylacrylamide) brushes by quartz crystal microbalance. *Polymer*, 48(19):5713–5720, Sept. 2007, doi:10.1016/j.polymer.2007.06.067.
- [126] C. RAMKISsoon-GANORKAR, A. GUTOWSKA, F. LIU, M. BAUDYS et S. W. KIM : Polymer molecular weight alters properties of pH-/temperature-sensitive polymeric beads. *Pharm Res*, 16(6):819–827, Jun 1999, doi:10.1023/A:1018813700535.

- [127] K.N. PLUNKETT, X. ZHU, J.S. MOORE et D.E. LECKBAND : PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density. *Langmuir*, 22(9):4259–4266, Apr. 2006, doi:10.1021/la0531502.
- [128] Y. PEI, J. CHEN, L. YANG, L. SHI, Q. TAO, B. HUI et J. LI : The effect of pH on the LCST of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 15(5):585–594, 2004, doi:10.1163/156856204323046852.
- [129] G. ZHANG et C. WU : Reentrant coil-to-globule-to-coil transition of a single linear homopolymer chain in a water/methanol mixture. *Phys Rev Lett*, 86(5):822–825, Jan 2001, doi:10.1103/PhysRevLett.86.822.
- [130] Howard G. SCHILD et David A. TIRRELL : Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *J. Phys. Chem.*, 94(10):4352–4356, 1990, doi:10.1021/j100373a088.
- [131] F. EECKMAN, K. AMIGHI et A. J. MOËS : Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery. *Int J Pharm*, 222(2):259–270, Jul 2001, doi:10.1016/S0378-5173(01)00716-5.
- [132] T. G. PARK et A. S. HOFFMAN : Estimation of temperature-dependent pore size in poly(*n*-isopropylacrylamide) hydrogel beads. *Biotechnol Prog*, 10(1):82–86, 1994, doi:10.1021/bp00025a010.
- [133] G. ROLLASON, J. E. DAVIES et M. V. SEFTON : Preliminary report on cell culture on a thermally reversible copolymer. *Biomaterials*, 14(2):153–155, 1993, doi:10.1016/0142-9612(93)90230-Y.
- [134] K. AUDITORE-HARGREAVES, R.L. HOUGHTON, N. MONJI, J.H. PRIEST, A.S. HOFFMAN et R.C. NOWINSKI : Phase-separation immunoassays. *Clin. Chem.*, 33(9):1509–1516, Sep. 1987. URI : <http://www.clinchem.org/cgi/content/abstract/33/9/1509>.
- [135] I.C. BARKER, J.M.G. COWIE, T.N. HUCKERBY, D.A. SHAW, I. SOUTAR et L. SWANSON : Studies of the "smart" thermoresponsive behavior of copolymers of *N*-isopropylacrylamide and *N,N*-dimethylacrylamide in dilute aqueous solution. *Macromol.*, 36(20):7765–7770, 2003, doi:10.1021/ma034250m.
- [136] G. BOKIAS et Y. MYLONAS : Association of positively charged copolymers based on *N*-isopropylacrylamide with hydrophobically modified poly(sodium acrylate) in water. *Macromol.*, 34(4):885–889, 2001, doi:10.1021/ma001423o.
- [137] J. MOSELHY, X. Y. WU, R. NICHOLOV et K. KODARIA : In vitro studies of the interaction of poly(nipam/maa) nanoparticles with proteins and cells. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11(2):123–147, 2000, doi:10.1163/156856200743616.
- [138] J.M. WEISSMAN, H.B. SUNKARA, A.S. TSE et S.A. ASHER : Thermally switchable periodicities and diffraction from mesoscopically ordered materials. *Science*, 274(5289):959–960, Nov. 1996, doi:10.1126/science.274.5289.959.
- [139] S. MIAS, J. SUDOR et H. CAMON : PNIPAM: a thermo-activated nano-material for use in optical devices. *Microsystem Technologies*, 14(4-5):691–695, Apr. 2008, doi:10.1007/s00542-007-0454-6.

- [140] L. KLOUDA et A.G. MIKOS : Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68(1):34–45, Jan. 2008, doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.025.
- [141] N. MONJI et A. S. HOFFMAN : A novel immunoassay system and bioseparation process based on thermal phase separating polymers. *Appl Biochem Biotechnol*, 14(2):107–120, Mar 1987, doi:10.1007/BF02798429.
- [142] N. MONJI, C. A. COLE, M. TAM, L. GOLDSTEIN et R. C. NOWINSKI : Application of a thermally-reversible polymer-antibody conjugate in a novel membrane-based immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(2):652–660, Oct 1990, doi:10.1016/0006-291X(90)90724-2.
- [143] N. MONJI, C. A. COLE et A. S. HOFFMAN : Activated, n-substituted acrylamide polymers for antibody coupling: application to a novel membrane-based immunoassay. *J Biomater Sci Polym Ed*, 5(5):407–420, 1994, doi:10.1163/156856294X00112.
- [144] I.Y. GALAEV et B. MATTIASSON : Thermoactive water-soluble polymers, nonionic surfactants, and hydrogels as reagents in biotechnology. *Enzyme Microb Technol*, 15(5):354–366, May 1993, doi:10.1016/0141-0229(93)90122-I.
- [145] Y. G. TAKEI, M. MATSUKATA, T. AOKI, K. SANUI, N. OGATA, A. KIKUCHI, Y. SAKURAI et T. OKANO : Temperature-responsive bioconjugates. 3. antibody-poly (n-isopropylacrylamide) conjugates for temperature-modulated precipitations and affinity bioseparations. *Bioconjug. Chem.*, 5(6):577–582, 1994, doi:10.1021/bc00030a013.
- [146] A. KUMAR, P.-O. WAHLUND, C. KEPKA, I.Y. GALAEV et B. MATTIASSON : Purification of histidine-tagged single-chain Fv-antibody fragments by metal chelate affinity precipitation using thermoresponsive copolymers. *Biotechnol. Bioeng.*, 84(4):494–503, Nov. 2003, doi:10.1002/bit.10810.
- [147] A. KUMAR, I.Y. GALAEV et B. MATTIASSON : *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, volume 421 de *Methods in Molecular Biology*, chapitre Affinity precipitation of proteins using metal chelates, pages 37–52. Humana Press, second edition édition, 2008.
- [148] J. P. CHEN et A. S. HOFFMAN : Polymer-protein conjugates. ii. affinity precipitation separation of human immunogammaglobulin by a poly(n-isopropylacrylamide)-protein a conjugate. *Biomaterials*, 11(9):631–634, Nov 1990, doi:10.1016/0142-9612(90)90020-Q.
- [149] B. MATTIASSON, A. KUMAR et Galaev IYU : Affinity precipitation of proteins: design criteria for an efficient polymer. *J Mol Recognit*, 11(1-6):211–216, 1998, doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<211::AID-JMR425>3.0.CO;2-Y.
- [150] D. C. ROEPKE, S. M. GOYAL, C. J. KELLEHER, D. A. HALVORSON, A. J. ABRAHAM, R. F. FREITAS et E. L. CUSSLER : Use of temperature-sensitive gel for concentration of influenza virus from infected allantoic fluids. *J Virol Methods*, 15(1):25–31, Jan 1987, doi:10.1016/0166-0934(87)90045-0.
- [151] S. ANASTASE-RAVION, Z. DING, A. PELLÉ, A. S. HOFFMAN et D. LETOURNEUR : New antibody purification procedure using a thermally responsive poly(n-isopropylacrylamide)-dextran derivative conjugate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 761(2):247–254, Sep 2001, doi:10.1016/S0378-4347(01)00336-X.

- [152] Y. H. BAE, T. OKANO et S. W. KIM : "on-off" thermocontrol of solute transport. ii. solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharm Res*, 8(5):624–628, May 1991, doi:10.1023/A:1015860824953.
- [153] R. YOSHIDA, K. SAKAI, T. OKANO et Y. SAKURAI : Surface-modulated skin layers of thermal responsive hydrogels as on-off switches: II. drug permeation. *J Biomater Sci Polym Ed*, 3(3):243–252, 1992, doi:10.1163/156856292X00150.
- [154] H. ICHIKAWA et Y. FUKUMORI : A novel positively thermosensitive controlled-release micro-capsule with membrane of nano-sized poly(n-isopropylacrylamide) gel dispersed in ethylcellulose matrix. *J Control Release*, 63(1-2):107–119, Jan 2000, doi:10.1016/S0168-3659(99)00181-9.
- [155] A. CHILKOTI, M.R. DREHER, D.E. MEYER et D. RAUCHER : Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 54(5):613–630, Sep. 2002, doi:10.1016/S0169-409X(02)00041-8. Revue.
- [156] A. GUTOWSKA, Y. H. BAE, H. JACOBS, F. MOHAMMAD, D. MIX, J. FEIJEN et S. W. KIM : Heparin release from thermosensitive polymer coatings: in vivo studies. *J Biomed Mater Res*, 29(7):811–821, Jul 1995, doi:10.1002/jbm.820290705.
- [157] S. Y. LIN, K. S. CHEN et L. RUN-CHU : Design and evaluation of drug-loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling properties. *Biomaterials*, 22(22):2999–3004, Nov 2001, doi:10.1016/S0142-9612(01)00046-1.
- [158] F. EECKMAN, A.J. MOËS et K. AMIGHI : Evaluation of a new controlled-drug delivery concept based on the use of thermoresponsive polymers. *Int. J. Pharm.*, 241(1):113–125, Jul. 2002, doi:10.1016/S0378-5173(02)00198-9.
- [159] A. MIZUTANI, A. KIKUCHI, M. YAMATO, H. KANAZAWA et T. OKANO : Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials*, 29(13):2073–2081, May 2008, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.004.
- [160] Y. HOU, A.R. MATTHEWS, A.M. SMITHERMAN, A.S. BULICK, M.S. HAHN, H. HOU, A. HAN et M.A. GRUNLAN : Thermoresponsive nanocomposite hydrogels with cell-releasing behavior. *Biomaterials*, 29(22):3175–3184, Aug. 2008, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.024.
- [161] T. TAKEZAWA, Y. MORI et K. YOSHIZATO : Cell culture on a thermo-responsive polymer surface. *Biotechnology (N Y)*, 8(9):854–856, Sep 1990, doi:10.1038/nbt0990-854.
- [162] A. KUSHIDA, M. YAMATO, C. KONNO, A. KIKUCHI, Y. SAKURAI et T. OKANO : Temperature-responsive culture dishes allow nonenzymatic harvest of differentiated madin-darby canine kidney (mdck) cell sheets. *J Biomed Mater Res*, 51(2):216–223, Aug 2000, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2<216::AID-JBM10>3.0.CO;2-K.
- [163] Y. H. AN, D. WEBB, A. GUTOWSKA, V. A. MIRONOV et R. J. FRIEDMAN : Regaining chondrocyte phenotype in thermosensitive gel culture. *Anat. Rec. A*, 263(4):336–341, Aug 2001, doi:10.1002/ar.1114.
- [164] T. OKANO, N. YAMADA, H. SAKAI et Y. SAKURAI : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(n-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*, 27(10):1243–1251, Oct 1993, doi:10.1002/jbm.820271005.

- [165] H. A. von RECUM, T. OKANO, S. W. KIM et P. S. BERNSTEIN : Maintenance of retinoid metabolism in human retinal pigment epithelium cell culture. *Exp Eye Res*, 69(1):97–107, Jul 1999, doi:10.1006/exer.1999.0682.
- [166] M. YAMATO, O. H. KWON, M. HIROSE, A. KIKUCHI et T. OKANO : Novel patterned cell coculture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces. *J Biomed Mater Res*, 55(1):137–140, Apr 2001, doi:10.1002/1097-4636(200104)55:1<137::AID-JBM180>3.0.CO;2-L.
- [167] T. AOKI, Y. NAGAO, E. TERADA, K. SANUI, N. OGATA, N. YAMADA, Y. SAKURAI, K. KATAOKA et T. OKANO : Endothelial cell differentiation into capillary structures by copolymer surfaces with phenylboronic acid groups. *J Biomater Sci Polym Ed*, 7(7):539–550, 1995, doi:10.1163/156856295X00463.
- [168] H. A. von RECUM, S. W. KIM, A. KIKUCHI, M. OKUHARA, Y. SAKURAI et T. OKANO : Novel thermally reversible hydrogel as detachable cell culture substrate. *J Biomed Mater Res*, 40(4):631–639, Jun 1998, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980615)40:4<631::AID-JBM15>3.0.CO;2-I.
- [169] M.T. MORAN, W.M. CARROLL, A. GORELOV et Y. ROCHEV : Intact endothelial cell sheet harvesting from thermoresponsive surfaces coated with cell adhesion promoters. *J. R. Soc. Interface*, 4(17):1151–1157, Dec. 2007, doi:10.1098/rsif.2007.1023.
- [170] T. OKANO, N. YAMADA, M. OKUHARA, H. SAKAI et Y. SAKURAI : Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, 16(4):297–303, Mar 1995, doi:10.1016/0142-9612(95)93257-E.
- [171] M. MAEDA, C. NISHIMURA, D. UMENO et M. TAKAGI : Psoralen-containing vinyl monomer for conjugation of double-helical dna with vinyl polymers. *Bioconjug Chem*, 5(6):527–531, 1994, doi:10.1021/bc00030a007.
- [172] D. UMENO, M. KAWASAKI et M. MAEDA : Water-soluble conjugate of double-stranded dna and poly(n-isopropylacrylamide) for one-pot affinity precipitation separation of dna-binding proteins. *Bioconjug Chem*, 9(6):719–724, 1998, doi:10.1021/bc980019f.
- [173] W. L. HINRICHSEN, N. M. SCHUURMANS-NIEUWENBROEK, P. van de WETERING et W. E. HENNINK : Thermosensitive polymers as carriers for dna delivery. *J Control Release*, 60(2-3):249–259, Aug 1999, doi:10.1016/S0168-3659(99)00075-9.
- [174] M. KURISAWA, M. YOKOYAMA et T. OKANO : Gene expression control by temperature with thermo-responsive polymeric gene carriers. *J Control Release*, 69(1):127–137, Oct 2000, doi:10.1016/S0168-3659(00)00297-2.
- [175] T. G. PARK et A. S. HOFFMAN : Synthesis and characterization of a soluble, temperature-sensitive polymer-conjugated enzyme. *J Biomater Sci Polym Ed*, 4(5):493–504, 1993, doi:10.1163/156856293X00159.
- [176] Z. DING, G. CHEN et A. S. HOFFMAN : Synthesis and purification of thermally sensitive oligomer-enzyme conjugates of poly(n-isopropylacrylamide)-trypsin. *Bioconjug Chem*, 7(1): 121–126, 1996, doi:10.1021/bc950087r.

- [177] Z. DING, G. CHEN et A. S. HOFFMAN : Unusual properties of thermally sensitive oligomer-enzyme conjugates of poly(n-isopropylacrylamide)-trypsin. *J Biomed Mater Res A*, 39(3):498–505, Mar 1998, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980305)39:3<498::AID-JBM22>3.0.CO;2-5.
- [178] G. CHEN et A. S. HOFFMAN : Synthesis of carboxylated poly(nipaam) oligomers and their application to form thermo-reversible polymer-enzyme conjugates. *J Biomater Sci Polym Ed*, 5(4):371–382, 1994, doi:10.1163/156856294X00086.
- [179] L. V. SIGOLAEVA, N. L. EREMEEV et N. F. KAZANSKAIA : Anomalous temperature dependence of the activity of immobilized alpha-chymotrypsin preparations. *Bioorg Khim*, 20(3):268–273, Mar 1994.
- [180] J. P. CHEN, H. J. YANG et A. S. HOFFMAN : Polymer-protein conjugates. i. effect of protein conjugation on the cloud point of poly (n-isopropylacrylamide). *Biomaterials*, 11(9):625–630, Nov 1990, doi:10.1016/0142-9612(90)90019-M.
- [181] P. S. STAYTON, T. SHIMOBORI, C. LONG, A. CHILKOTI, G. CHEN, J. M. HARRIS et A. S. HOFFMAN : Control of protein-ligand recognition using a stimuli-responsive polymer. *Nature*, 378(6556):472–474, Nov 1995, doi:10.1038/378472a0.
- [182] Z. DING, C. J. LONG, Y. HAYASHI, E. V. BULMUS, A. S. HOFFMAN et P. S. STAYTON : Temperature control of biotin binding and release with a streptavidin-poly(n-isopropylacrylamide) site-specific conjugate. *Bioconjug Chem*, 10(3):395–400, 1999, doi:10.1021/bc980108s.
- [183] S. CARTER, S. RIMMER, R. RUTKAITE, L. SWANSON, J.P.A. FAIRCLOUGH, A. STURDY et M. WEBB : Highly branched poly(n-isopropylacrylamide) for use in protein purification. *Biomacromolecules*, 7(4):1124–1130, Apr. 2006, doi:10.1021/bm050929h.
- [184] D.L. HUBER, R.P. MARGINELL, M.A. SAMARA, B.-I. KIM et B.C. BUNKER : Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device. *Science*, 301(5631):352–354, July 2003, doi:10.1126/science.1080759.
- [185] D. O H TEARE, D. C. BARWICK, W. C E SCHOFIELD, R. P. GARROD, A. BEEBY et J. P S BADYAL : Functionalization of solid surfaces with thermoresponsive protein-resistant films. *J. Phys. Chem. B*, 109(47):22407–22412, Dec. 2005, doi:10.1021/jp052869f.
- [186] M.D. KURKURI, M.R. NUSSIO, A. DESLANDES et N.H. VOELCKER : Thermosensitive copolymer coatings with enhanced wettability switching. *Langmuir*, 24(8):4238–4244, Apr. 2008, doi:10.1021/la703668s.
- [187] A.E. IVANOV, J. EKEROTH, L. NILSSON, B. MATTIASSEN, B. BERGENSTÅHL et I.Y. GALAEV : Variations of wettability and protein adsorption on solid siliceous carriers grafted with poly(n-isopropylacrylamide). *J. Colloid. Interface Sci.*, 296(2):538–544, Apr. 2006, doi:10.1016/j.jcis.2005.09.064.
- [188] Y. MATSUMARU, A. HYODO, T. NOSE, S. ITO, T. HIRANO et S. OHASHI : Application of thermosensitive polymers as a new embolic material for intravascular neurosurgery. *J Biomater Sci Polym Ed*, 7(9):795–804, 1996, doi:10.1163/156856296X00138.
- [189] M. ANDERSSON, A. AXELSSON et G. ZACCHI : Diffusion of glucose and insulin in a swelling n-isopropylacrylamide gel. *Int. J. Pharm.*, 157(2):199–208, Nov 1997, doi:10.1016/S0378-5173(97)00243-3.

- [190] H. KANAZAWA, K. YAMAMOTO, Y. KASHIWASE, Y. MATSUSHIMA, N. TAKAI, A. KIKUCHI, Y. SAKURAI et T. OKANO : Analysis of peptides and proteins by temperature-responsive chromatographic system using n-isopropylacrylamide polymer-modified columns. *J Pharm Biomed Anal*, 15(9-10):1545–1550, Jun 1997, doi:10.1016/S0731-7085(96)02004-3.
- [191] H. KANAZAWA, T. SUNAMOTO, Y. MATSUSHIMA, A. KIKUCHI et T. OKANO : Temperature-responsive chromatographic separation of amino acid phenylthiohydantions using aqueous media as the mobile phase. *Anal Chem*, 72(24):5961–5966, Dec 2000, doi:10.1021/ac0004658.
- [192] H. LAKHIARI, T. OKANO, N. NURDIN, C. LUTHI, P. DESCOUTS, D. MULLER et J. JOZEFONVICZ : Temperature-responsive size-exclusion chromatography using poly(n-isopropylacrylamide) grafted silica. *Biochim Biophys Acta*, 1379(3):303–313, Mar 1998, doi:10.1016/S0304-4165(97)00110-4.
- [193] D.J. HARRISON, P.G. GLAVINA et A. MANZ : Towards miniaturized electrophoresis and chemical analysis systems on silicon: an alternative to chemical sensors. *Sens. Actuators B Chem.*, 10(2):107–116, Jan. 1993, doi:10.1016/0925-4005(93)80033-8.
- [194] G. OCVIRK, E. VERPOORTE, A. MANZ et H.M. WIDMER : Integration of a micro liquid chromatograph onto a silicon chip. In *Proc. of The 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers'95) and Eurosensors IX*, volume 1, pages 756–759, Stockholm, Sweden, 25–29 June 1995. URI : [http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs\\_all.jsp?tp=&arnumber=717342](http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?tp=&arnumber=717342).
- [195] A. DARIDON, V. FASCIO, J. LICHTENBERG, R. WÜTRICH, H. LANGEN, E. VERPOORTE et N. F. de ROOIJ : Multi-layer microfluidic glass chips for microanalytical applications. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371(2):261–269, Sep. 2001, doi:10.1007/s002160101004.
- [196] S.R. QUAKE et A. SCHERER : From micro- to nanofabrication with soft materials. *Science*, 290(5496):1536–1540, Nov. 2000, doi:10.1126/science.290.5496.1536.
- [197] H. BECKER et C. GÄRTNER : Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, 21(1):12–26, 2000, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7.
- [198] P. ABGRALL : *Microtechnologies polymères pour les laboratoires sur puces*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2006.
- [199] D.C. DUFFY, J.C. McDONALD, O.J.A. SCHUELLER et G.M. WHITESIDES : Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 70(23):4974–4984, 1998, doi:10.1021/ac980656z.
- [200] J.C. McDONALD, D.C. DUFFY, J.R. ANDERSON, D.T. CHIU, H. WU, O.J.A. SHUELLER et G.M. WHITESIDES : Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21(1):27–40, 2000, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C.
- [201] J.M.K. NG, I. GITLIN, A.D. STROOCK et G.M. WHITESIDES : Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis*, 23(20):3461–3473, Oct 2002, doi:10.1002/1522-2683(200210)23:20<3461::AID-ELPS3461>3.0.CO;2-8.

- [202] C.S. EFFENHAUSER, G.J.M. BRUIN, A. PAULUS et M. EHRAT : Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Anal. Chem.*, 69(17):3451–3457, 1997, doi:10.1021/ac9703919.
- [203] J. KUNCOVA-KALLIO et P.J. KALLIO : PDMS and its suitability for analytical microfluidic devices. In *Proc. 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS '06)*, pages 2486–2489, Aug. 2006.
- [204] S.K. SIA et G.M. WHITESIDES : Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24(21):3563–3576, 2003, doi:10.1002/elps.200305584.
- [205] M.C. BÉLANGER et Y. MAROIS : Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 58(5):467–477, 2001, doi:10.1002/jbm.1043.
- [206] J.C. LOTTERS, W. OLTHUIS, P.H. VELTINK et P. BERGVELD : The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications. *J. Micromech. Microeng.*, 7(3):145–147, Sept. 1997, doi:10.1088/0960-1317/7/3/017.
- [207] A.C.M. KUO : *Polymer Data Handbook*, chapitre Poly(dimethylsiloxane), pages 411–435. Oxford University Press, Inc., 1999.
- [208] J.N. LEE, C. PARK et G.M. WHITESIDES : Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 75(23):6544–6554, Dec. 2003, doi:10.1021/ac0346712.
- [209] M. HUNTER, M. GORDON, A. BARRY, J. HYDE et R. HEIDENREICH : Properties of polyorganosilox surfaces on glass. *Ind. Eng. Chem.*, 39(11):1389–1395, 1947, doi:10.1021/ie50455a605.
- [210] S. THORSLUND : *Microfluidics in surface-modified PDMS: Towards miniaturized diagnostic tools*. Thèse de doctorat, Uppsala University, 2006. URI : <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-7270>.
- [211] P. ABGRALL et A.-M. GUÉ : Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem — a review. *J. Micromech. Microeng.*, 17:R15–R49, 2007, doi:10.1088/0960-1317/17/5/R01.
- [212] B.A. WEISENBERG et D.L. MOORADIAN : Hemocompatibility of materials used in microelectromechanical systems: platelet adhesion and morphology in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 60(2):283–291, May 2002, doi:10.1002/jbm.10076.
- [213] C. YU, M.H. DAVEY, F. SVEC et J.M. FRÉCHET : Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.*, 73(21):5088–5096, Nov. 2001, doi:10.1021/ac0106288.
- [214] W.C. CHANG, L.P. LEE et D. LIEPMANN : Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel. *Lab Chip*, 5:64–73, 2005, doi:10.1039/b400455h.

- [215] R.D. OLESCHUK, L.L. SHULTZ-LOCKYEAR, Y. NING et D. J. HARRISON : Trapping of bead-based reagents within microfluidic systems: on-chip solid-phase extraction and electrochromatography. *Anal. Chem.*, 72(3):585–590, Feb. 2000, doi:10.1021/ac990751n.
- [216] M.A.M. GIJS : *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems*, chapitre Magnetic Beads in Microfluidic Systems – Towards New Analytical Applications, pages 241–274. Springer US, 2007.
- [217] G.T.T. GIBSON, T.B. KOERNER, R. XIE, K. SHAH, N. de KOROMPAY et R.D. OLESCHUK : Entrapment of functionalized silica microspheres with photo-initiated acrylate-based polymers. *J. Colloid Interface Sci.*, 320(1):82–90, Apr. 2008, doi:10.1016/j.jcis.2008.01.027.
- [218] M. TONDRA, M. GRANGER, R. FUERST, M. PORTER, C. NORDMAN, J. TAYLOR et S. AKOU : Design of integrated microfluidic device for sorting magnetic beads in biological assays. *IEEE Trans. Mag.*, 37(4:1):2621–2623, Jul. 2001, doi:10.1109/20.951254.
- [219] H. ANDERSSON, C. JÖNSSON, C. MOBERG et G. STEMME : Patterned self-assembled beads in silicon channels. *Electrophoresis*, 22(18):3876–3882, Oct. 2001, doi:10.1002/1522-2683(200110)22:18<3876::AID-ELPS3876>3.0.CO;2-P.
- [220] J. HAN et H.G. CRAIGHEAD : Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array. *Science*, 288(5468):1026–1029, May 2000, doi:10.1126/science.288.5468.1026.
- [221] A.-E. SALIBA, E. PSICHARI, L. SAIAS, N. MINC, V. STUDER et J.-L. VIOVY : Ferrofluid pattern for guiding magnetic beads self-organisation: Application to affinity cell separation and on-chip cell culture. In *Proceedings of the 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS'07)*, volume 1, pages 575–577, Paris, France, 7–11 Oct. 2007.
- [222] David JUGIEU : *Conception et réalisation d'une matrice de microéjecteurs thermiques adressables individuellement pour la fonctionnalisation de biopuce*. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, 2005. URI : <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000072/>.
- [223] M. DUMONTEUIL et T. CAMPS : Polysilicon microheaters 2D addressed array using symmetrical thresholds elements. In *Proceedings of the 7th International workshop on electronics, control, modelling and signals (ECMS'2005)*, Toulouse (France), 17–20 May 2005.
- [224] M. DUMONTEUIL : *Solution générique pour l'adressage matriciel de micro-actionneurs thermiques et optimisation de micro-sources thermiques*. Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2006.
- [225] T. CAMPS, B. MARTY, J. TASSELLI, A. MARTY, L. BOUSCAYROL et J.C. MARROT : A generic technological approach for thermal sensors and actuators development. In *Proceedings of the 18th workshop on micromechanics Europe (MME 2007)*, pages 47–50, Guimarães (Portugal), 16–18 Sept. 2007.
- [226] C. KITTEL : *Physique de l'état solide*. Sciences Sup. Dunod, 7e édition, juin 1998.
- [227] G. PAUMIER, J. SUDOR, E. COLLÉ, B. MARTY, A. BANCAUD, T. CAMPS et A.-M. GUÉ : Electrokinetic mixers based on stimuli-responding surfaces. In *Proceedings of the 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS'07)*, volume 1, pages 910–912, Paris, France, 7–11 Oct. 2007.

- [228] S. HJERTÉN : High-performance electrophoresis : Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chromatogr. A*, 347:191–198, 1985, doi:10.1016/S0021-9673(01)95485-8.
- [229] A. HOANG et F. VINET : Brevet EN0016940. Publication 2818662, 2002.
- [230] G. PAUMIER : Immuno-test sur chimie CEA-2 – Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur. Rapport de stage, Institut national des sciences appliquées de Toulouse, 2004.
- [231] S. RAYMOND et L. WEINTRAUB : Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130(3377):711, Sept. 1959, doi:10.1126/science.130.3377.711.
- [232] J. HORVATH et V. DOLNÍK : Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22(4):644–655, 2001, doi:10.1002/1522-2683(200102)22:4.
- [233] E.A.S. DOHERTY, R.J. MEAGHER, M.N. ALBARGHOUDHI et A.E. BARRON : Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *Electrophoresis*, 24(1-2):34–54, Jan. 2003, doi:10.1002/elps.200390029.
- [234] A. GIZ, H. Çatalgil GIZ, A. ALB, J.-L. BROUSSEAU et W.S. REED : Kinetics and mechanics of acrylamide polymerization from absolute, online monitoring of polymerization reaction. *Macromol.*, 34:1180–1191, 2001, doi:10.1021/ma000815s.
- [235] S. HJERTÉN : Coating for electrophoresis tube. US patent 4,680,201, Oct. 1985. URI : <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PT01&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPT0%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=4,680,201.PN.&OS=PN/4,680,201&RS=PN/4,680,201>.
- [236] G. PAUMIER : Contrôle nano-hydrodynamique de l'interface solide-liquide par des polymères actifs : Effets sur le flux électrocinétique dans les microcanaux. Mémoire de D.E.A., Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2005.
- [237] T. YOUNG : An essay on the cohesion of fluids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 95:65–87, 1805, doi:10.1098/rstl.1805.0005.
- [238] P.-G. DE GENNES : Wetting: Statics and dynamics. *Rev. Mod. Phys.*, 57(3):827–863, 1985, doi:10.1103/RevModPhys.57.827.
- [239] P.-G. DE GENNES, F. BROCHARD-WYART et D. QUÉRÉ : *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Belin, 2005.
- [240] S.-Y. LIN, H.-C. CHANG, L.-W. LIN et P.-Y. HUANG : Measurement of dynamic/advancing/receding contact angle by video-enhanced sessile drop tensiometry. *Rev. Sci. Instrum.*, 67(8):2852–2858, Aug. 1996, doi:10.1063/1.1147117.
- [241] S. BALAMURUGAN, S. MENDEZ, S.S. BALAMURUGAN, M.J. II O'BRIEN et G.P. LÓPEZ : Thermal response of poly(*N*-isopropylacrylamide) brushes probed by surface plasmon resonance. *Langmuir*, 19(7):2545–2549, 2003, doi:10.1021/la026787j.
- [242] N.J. HARRICK : *Internal reflection spectroscopy*. John Wiley & Sons Inc, 1967.
- [243] N. ROCHAT, M. OLIVIER, A. CHABLI, F. CONNE, G. LEFEUVRE et C. BOLL-BURDET : Multiple internal reflection infrared spectroscopy using two-prism coupling geometry: A convenient way for quantitative study of organic contamination on silicon wafers. *Appl. Phys. Lett.*, 77(14):2249–2251, Oct. 2000, doi:10.1063/1.1314885.

- [244] N. ROCHAT, A. TROUSSIER, A. HOANG et F. VINET : Multiple internal reflection spectroscopy for quantitative infrared analysis of thin-film surface coating for biological environment. *Mater. Sci. Eng. C Biomim. Mater. Sens. Syst.*, 23(1-2):99–103, 2003, doi:10.1016/S0928-4931(02)00239-4.
- [245] B.C. SMITH : *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC, Dec. 1995.
- [246] R.T. CONLEY : *Infrared spectroscopy*. Allyn and Bacon, Boston, 2nd edition édition, 1972.
- [247] G. PAUMIER, J. SUDOR, A.-M. GUÉ, F. VINET, M. LI, Y.J. CHABAL, A. ESTÈVE et M. DJAFARI-ROUHANI : Nanoscale actuation of electrokinetic flows on thermoreversible surfaces. *Electrophoresis*, 29(6):1245–1252, Mar. 2008, doi:10.1002/elps.200700396.
- [248] C. LI, Y. YANG, H.G. CRAIGHEAD et K.H. LEE : Isoelectric focusing in cyclic olefin copolymer microfluidic channels coated by polyacrylamide using a UV photografting method. *Electrophoresis*, 26(9):1800–1806, May 2005, doi:10.1002/elps.200410309.
- [249] B.C. BUNKER, D.L. HUBER, R.P. MANGINELL, B.-I. KIM, A.K. BOAL, G.D. BACHAND, S.B. RIVERA, J.M. BAUER et C. MATZKE : Incorporation of bioactive materials into integrated systems. In *Proceedings of SPIE*, volume 5220 de *Nanofabrication Technologies*, 2003. URI : <http://supercon.snu.ac.kr/~kbyung/paperpdf/spie.pdf>.
- [250] A.E. KAMHOLZ, B.H. WEIGL, B.A. FINLAYSON et P. YAGER : Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: the t-sensor. *Anal. Chem.*, 71(23):5340–5347, Dec 1999, doi:10.1021/ac990504j.
- [251] M. KAKUTA, F. G. BESSOTH et A. MANZ : Microfabricated devices for fluid mixing and their application for chemical synthesis. *Chem. Rec.*, 1(5):395–405, 2001, doi:10.1002/tcr.1023.
- [252] J.M. OTTINO et S. WIGGINS : Introduction: mixing in microfluidics. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 362(1818):923–935, May 2004, doi:10.1098/rsta.2003.1355.
- [253] N.-T. NGUYEN et Z. WU : Micromixers – a review. *J. Micromech. Microeng.*, 15(2):R1–R16, 2005, doi:10.1088/0960-1317/15/2/R01.
- [254] C.-C. HONG, J.-W. CHOI et C.H. AHN : A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures. *Lab. Chip.*, 4(2):109–113, Apr. 2004, doi:10.1039/b305892a.
- [255] F.G. BESSOTH, A.J. DEMELLO et A. MANZ : Microstructure for efficient continuous flow mixing. *Anal. Commun.*, 36(6):213–215, 1999, doi:10.1039/a902237f.
- [256] A.D. STROOCK, S.K.W. DERTINGER, A. AJDARI, I. MEZIC, H.A. STONE et G.M. WHITESIDES : Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 295(5555):647–651, Jan 2002, doi:10.1126/science.1066238.
- [257] A. ADJARI : Electro-osmosis on inhomogeneously charged surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 75(4):755–758, July 1995, doi:10.1103/PhysRevLett.75.755.
- [258] A.D. STROOCK, M. WECK, D.T. CHIU, W.T. HUCK, P.J. KENIS, R.F. ISMAGILOV et G.M. WHITESIDES : Patterning electro-osmotic flow with patterned surface charge. *Phys. Rev. Lett.*, 84(15):3314–3317, Apr. 2000, doi:10.1103/PhysRevLett.84.3314.

- [259] A.D. STROOCK et G.M. WHITESIDES : Controlling flows in microchannels with patterned surface charge and topography. *Acc. Chem. Res.*, 36(8):597–604, Aug. 2003, doi:10.1021/ar0202870.
- [260] F. ROUESSAC, A. ROUESSAC et D. CRUCHÉ : *Analyse chimique*. Dunod, 6th édition, 2004.
- [261] E. BRUNET : *Études de systèmes microfluidiques : agrégation de particules, électrocinétique linéaire, analyse de protéines*. Thèse de doctorat, Université Paris 6, 2004. URI : [http://pastel.paristech.org/archive/00000986/01/E\\_Brunet\\_These.pdf](http://pastel.paristech.org/archive/00000986/01/E_Brunet_These.pdf).
- [262] H. HELMHOLTZ : Studien über electrische Grenzschichten. *Wiedemann's Annalen der Physik und Chemie*, 243(7):337–382, 1879. URI : <http://www.weltderphysik.de/de/3001.php?bd=243>.
- [263] L.G. GOUY : Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *Journal de Physique Théorique et Appliquée*, 9(1):457–468, 1910. URI : <http://jphystap.journaldephysique.org/index.php?option=toc&url=/articles/jphystap/abs/1910/01/contents/contents.html>.
- [264] D.L. CHAPMAN : A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philosophical Magazine*, 25:475–481, 1913.
- [265] O. STERN : The theory of the electrolytic double shift. *Zeitschrift für Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie*, 30:508–516, 1924.
- [266] A.T. CONLISK : The Debye-Hückel approximation: Its use in describing electroosmotic flow in micro-and nanochannels. *Electrophoresis*, 26(10):1896–1912, 2005, doi:10.1002/elps.200410238.
- [267] B.J. KIRBY et E.F. Jr. HASSELBRINK : Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, 25(2):187–202, 2004, doi:10.1002/elps.200305754.
- [268] B.J. KIRBY et E.F. Jr. HASSELBRINK : Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis*, 25(2):203–213, 2004, doi:10.1002/elps.200305755.
- [269] F.F. REUSS : Sur un nouvel effet de l'électricité galvanique. *Mémoires de la Société Impériale des naturalistes de Moscou*, 2:327–337, 1809. 553 957.
- [270] S. GHOSAL : Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effects on band broadening in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(2):214–228, 2004, doi:10.1002/elps.200305745.
- [271] P. MELA, N.R. TAS, E.J.W. BERENSCHOT, J. v. NIEUWKASTEELE et A. v.d. BERG : Electrokinetic pumping and detection of low-volume flows in nanochannels. *Electrophoresis*, 25(21–22):3687–3693, 2004, doi:10.1002/elps.200406083.
- [272] N.A. PATANKAR et H.H. HU : Numerical simulation of electroosmotic flow. *Anal. Chem.*, 70(9):1870–1881, 1998, doi:10.1021/ac970846u.
- [273] D. ROSS, T.J. JOHNSON et L. LOCASCIO : Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels. *Anal. Chem.*, 73(11):2509–2515, 2001, doi:10.1021/ac001509f.

- [274] C. CHAIYASUT, Y. TAKATSU, S. KITAGAWA et T. TSUDA : Estimation of the dissociation constants for functional groups on modified and unmodified silica gel supports from the relationship between electroosmotic flow velocity and ph. *Electrophoresis*, 22(7):1267–1272, 2001, doi:10.1002/1522-2683(200105)22:7<1267::AID-ELPS1267>3.0.CO;2-8.
- [275] L. SZEKELY et R. FREITAG : Study of the electroosmotic flow as a means to propel the mobile phase in capillary electrochromatography in view of further miniaturization of electrochromatography systems. *Electrophoresis*, 26(10):1928–1939, 2005, doi:10.1002/elps.200410194.
- [276] P. SANTI et R.H. GUY : Reverse iontophoresis – Parameters determining electroosmotic flow: I. pH and ionic strength. *Electrophoresis*, 38(2-3):159–165, 1996, doi:10.1016/0168-3659(95)00115-8.
- [277] M. CRETICH, M. CHIARI, G. PIRRI et A. CRIPPA : Electroosmotic flow suppression in capillary electrophoresis: Chemisorption of trimethoxysilane-modified polydimethylacrylamide. *Electrophoresis*, 26(10):1913–1919, 2005, doi:10.1002/elps.200410368.
- [278] X. HUANG, M.J. GORDON et R.N. ZARE : Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, 60(17):1837–1838, 1988, doi:10.1021/ac00168a040.
- [279] I. RODRIGUEZ et N. CHANDRASEKHAR : Experimental study and numerical estimation of current changes in electroosmotically pumped microfluidic devices. *Electrophoresis*, 26(6):1114–1121, 2005, doi:10.1002/elps.200410155.



# Résumé

Les laboratoires sur puce sont des dispositifs intégrés rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions de laboratoire, généralement dédiées à la manipulation d'échantillons chimiques ou biologiques. L'objectif de ces travaux est l'intégration dans les microsystèmes d'un polymère intelligent, le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM), afin de développer une nouvelle filière technologique pour les laboratoires sur puce.

Le PNIPAM est un polymère thermosensible subissant un changement réversible, d'un état hydrophile et gonflé sous sa température de transition ( $LCST \sim 32^\circ C$ ) à un état hydrophobe et replié au-delà. La technologie développée repose sur des éléments chauffants et un protocole de greffage du PNIPAM sur des surfaces.

Nos travaux montrent que le contrôle thermique du PNIPAM permet de moduler le flux électro-osmotique, ouvrant ainsi la voie au développement de mélangeurs électrocinétiques. Ce contrôle permet également l'accrochage, partiellement réversible, de protéines sur des billes fonctionnalisées, pour des applications dans le domaine de la préparation d'échantillon.

*Mots-clés :* Microfluidique, polymère thermosensible, NIPAM, laboratoire sur puce.