

Sommaire

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre 1 Introduction.....	5
-------------------------------------	----------

1 Vannes en microfluidique.....	8
--	----------

1.1 Micro-vannes à membranes (ou à activation mécanique)	8
---	----------

1.1.1 Vannes à activation magnétique	8
--	---

1.1.2 Vannes à activation électrique	9
--	---

1.1.3 Vannes à activation piézoélectrique	11
---	----

1.1.4 Vannes à activation thermique	11
---	----

1.2 Micro-vannes à activation pneumatique	13
--	-----------

2 Micro-vannes à transition de phases	16
--	-----------

2.1 Vannes à transition solide/liquide.....	16
--	-----------

2.2 Micro-vannes à mémoire de formes	17
---	-----------

2.3 Micro-vannes basées sur les hydrogels.....	18
---	-----------

2.4 Comparaison des micro-vannes	22
---	-----------

3 Une nouvelle approche pour les vannes à hydrogel	24
---	-----------

3.1 Principe	24
---------------------------	-----------

3.2 Quels polymères stimulables pour des micro-vannes ?	26
--	-----------

3.2.1 Cahier des charges microfluidique	27
---	----

3.2.2 Polymères thermo-stimulables	28
--	----

3.2.3 Polyélectrolytes sensibles au pH et au champ électrique	39
---	----

3.3 Etat de l'art sur la synthèse de films minces de polymère.....	31
---	-----------

Références	35
-------------------------	-----------

Chapitre 2 Films minces d'hydrogels greffés stimulables.....	41
---	-----------

1 Synthèse de films minces d'hydrogels stimulables	44
---	-----------

1.1 Stratégie de synthèse.....	44
---------------------------------------	-----------

1.2 Synthèse des polymères stimulables fonctionnalisés.....	45
--	-----------

1.3 Traitement de surfaces pour obtenir les fonctionnalisations thiols.....	49
--	-----------

1.3.1 Préparation des surfaces de verre et de silicium	49
--	----

1.3.2 Préparation des surfaces d'or	50
---	----

1.4 Dépôt du film de polymère par spin-coating	52
---	-----------

1.4.1 Conditions de spin-coating	52
1.4.2 Fixation de la durée de spin-coating	53
1.5 Epaisseur des films.....	54
1.5.1 Epaisseurs des films secs	54
1.5.2 Effet de la viscosité sur le spin-coating	54
2 Propriétés stimulables des films d'hydrogels	58
2.1 Propriétés thermo-stimulables des gels de pNIPAM.....	58
2.2 Variation du taux de réticulation	60
2.2.1 Influence du temps de réaction	61
2.2.2 Influence du taux de modification des polymères	62
2.3 Propriétés pH-sensibles des gels de pAA	64
2.4 Bilan	66
3 Synthèse de films d'hydrogel par irradiation UV	67
3.1 Mise au point du procédé	67
3.2 Temps d'irradiation.....	70
3.3 Réaction thiol-ène : irradiation UV et chauffage thermique ?	73
3.4 Le cas des polyélectrolytes.....	76
3.5 Dépôts localisés : réalisation des masques	78
3.6 Lithographie laser : une alternative à la réalisation des masques.....	80
3.6.1 Principe	80
3.6.2 Paramètres d'irradiation.....	81
Conclusion	86
Références.....	87
 Chapitre 3 Actionneurs microfluidiques.....	 89
1 Gonflement de gel dans un canal microfluidique	94
1.1 Hydrodynamique à l'échelle microfluidique.....	94
1.2 Fabrication de puces microfluidiques en NOA	97
1.3 Dispositif expérimental.....	99
1.4 Intensité de fluorescence.....	101
1.4.1 Dépendance de l'intensité avec l'épaisseur libre dans le canal	101
1.4.2 Calibration.....	102
1.5 Gonflement d'un gel	104
2 Vannes thermo-stimulables	107
2.1 Fabrication et fonctionnement.....	107

2.1.1 Activation de vannes thermosensibles	108
2.1.2 Durabilité	110
2.2 Piégeage.....	112
2.2.1 Piégeage de fluide dans une micro-chambre	112
2.2.2 Intégration de 100 vannes sur une micro-puce	114
2.3 Intégration de vannes à hydrogel dans des puces en PDMS.....	116
2.3.1 Fabrication de puces microfluidiques en PDMS	117
2.3.2 Problèmes de fuites liés à la présence de l'hydrogel	119
2.3.3 Tenue en pression des systèmes en PDMS	121
2.3.4 Caractérisation des vannes dans des canaux en PDMS	122
2.4 Conclusion	124
3 Chambre microfluidique reconfigurable.....	125
3.1 Réalisation d'un enclos dans un canal microfluidique.....	125
3.2 Intégration à haute densité.....	127
3.3 Etude de la diffusion de la fluorescéine dans les hydrogels de pNIPAM.....	130
3.3.1 Expérience de diffusion	130
3.3.2 Estimations du coefficient de diffusion	133
4 Activation thermique localisée.....	137
4.1 Micro-résistance en or	137
4.2 Temps de réponse des vannes à activation localisée	139
4.3 Localisation de l'actionnement	141
Conclusion	145
Références.....	147
 Conclusion et perspectives	 149
 Annexes	 157
I - Ellipsométrie.....	159
II – Spectroscopie infrarouge en ATR	165
III – Variations de l'épaisseur d'un film de pNIPAM avec l'humidité	168
IV – Micro-fabrication des moules en su8 et des timbres en pdms	170
V – Vanne a activation localisée : Effet Joule avec une résistance en chrome	173
VI – Vanne a activation localisée : la vanne électro-sensible	177

Introduction générale

La microfluidique est la science de la manipulation des fluides à l'échelle micrométrique. A cette échelle, les effets inertiels deviennent généralement négligeables, tandis que les effets de la viscosité et de la tension de surface deviennent importants. Les forces inertielles étant négligeables, il n'y a plus d'instabilités hydrodynamiques, ni de turbulence. Il devient possible d'exercer un contrôle très fin sur les écoulements.

La microfluidique trouve de nombreuses applications dans des domaines comme la biologie et les analyses médicales [1, 2]. Le principal avantage de la microfluidique est la réduction des volumes d'analytes et de réactifs, avec pour conséquences une diminution des coûts et une amélioration des performances par rapport aux méthodes classiques. En outre, les tests peuvent être parallélisés et automatisés, et plusieurs processus peuvent être intégrés sur une même puce microfluidique.

Ces « Laboratoires sur Puces » ou Lab-on-a-Chip (LOC) sont, aujourd'hui, des dispositifs qui comprennent plusieurs fonctionnalités intégrées [3] : des systèmes d'injection des analytes ou de solutions tampons, des systèmes de triage de particules ou d'espèces chimiques, des systèmes d'analyses... Pour accomplir toutes ces fonctions un LOC nécessite de nombreux éléments tels que des actionneurs (pompes et micro-vannes, mélangeurs) ou des capteurs divers (pH-mètre, thermomètre, conductimètre, spectromètre...).

Afin de rendre la microfluidique plus accessible, tous ces éléments doivent être miniaturisés tout en gardant des performances suffisantes et un coût de fabrication et de fonctionnement faible. Dans ce contexte, disposer d'actionneurs performants et peu coûteux représente un atout. Réaliser de tels actionneurs est l'objectif essentiel de cette thèse.

A l'heure actuelle, les vannes à actuation pneumatique sont très largement utilisées dans les laboratoires-sur-puces. Par exemple, la société Fluidigm (500 M\$) commercialise des plateformes microfluidiques, exploitant cette technologie, pour réaliser des analyses

génomiques ou des manipulations sur des cellules uniques. Grâce à la bonne fiabilité des vannes à activation pneumatique ces plateformes sont très performantes.

Les vannes à activation pneumatique ont, été largement exploitées pour développer des laboratoires sur puces pour la recherche. Il existe cependant une vraie demande pour des laboratoires sur puces à très faibles coûts et dont le contrôle serait simplifié (voire même utilisables partout). Ces LOC pourraient avoir un impact très bénéfique dans des domaines comme l'analyse médicale. L'objectif de ce travail de thèse est donc de développer une technologie de micro-vanne facile à intégrer dans un LOC, économique, mais aussi facilement activable.

L'approche que nous avons privilégiée est une technologie de micro-vanne dont l'activation repose sur la transition de gonflement d'hydrogels stimulables. Cette transition peut être déclenchée par de petites modifications de certains paramètres expérimentaux et l'énergie d'activation peut donc être très faible.

Dans notre approche, une synthèse des hydrogels avant la micro-fabrication de la puce (synthèse *ex situ*), a été préférée aux synthèses *in situ* présentes dans la littérature. Il nous a donc été nécessaire de développer une stratégie de fabrication de films minces de polymères qui soit simple et versatile. Dans notre approche, les films sont obtenus par réticulation et greffage simultanés de chaînes de polymères préformées. La réticulation et le greffage sur le substrat sont réalisés grâce à une même réaction click : la réaction thiol-ène. Les films synthétisés *ex situ* sont ensuite intégrés dans la puce lors de la micro-fabrication par collage des micro-canaux sur le substrat.

Ce choix permet un meilleur contrôle des propriétés des hydrogels ainsi qu'une intégration plus facile dans les micro-canaux. Nous allons montrer dans ce manuscrit comment cela nous a permis d'obtenir des vannes basées sur les hydrogels très fiables, durables et activables avec de faibles énergies.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous présentons un état de l'art sur les vannes microfluidiques. Sur la base de cette revue, nous dégageons les critères importants que doit satisfaire une micro-vanne et nous établissons une nouvelle approche de vannes basées sur des films minces d'hydrogels stimulables. Nous verrons enfin qu'une nouvelle stratégie de synthèse pour ces films est souhaitable.

Ce projet, initié par Patrick Tabeling et Yvette Tran, s'inscrit donc dans un cadre pluridisciplinaire, qui se traduit par la collaboration de deux laboratoires à l'ESPCI. La synthèse de films d'hydrogels et des polymères indispensable à l'élaboration des vannes est développée au laboratoire Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM). Le laboratoire Gulliver apporte, lui, son expertise dans la conception, la réalisation et le test de micro-puce.

La synthèse de films minces de polymères est exposée dans le chapitre 2 du manuscrit. La première partie de ce chapitre détaille la stratégie de synthèse des films minces par réticulation/greffage de polymères fonctionnalisés. Les propriétés des films d'hydrogel, comme le ratio de gonflement et l'épaisseur, sont ensuite étudiées. Enfin l'activation par irradiation UV de la réaction de réticulation/greffage est présentée, et les performances du procédé photo-lithographique qui en découle sont discutées.

Dans le chapitre 3 nous développons notre nouvelle approche de vannes microfluidiques. En premier lieu nous traitons de la micro-fabrication et des performances de vannes thermo-stimulables. Ensuite, nous montrons comment notre nouvelle approche des actionneurs à hydrogels permet de développer des puces microfluidiques reconfigurables. Enfin, nous concluons et présenterons quelques perspectives de développement de ces actionneurs.

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1 Vannes en microfluidique	8
1.1 Micro-vannes à membranes (ou à activation mécanique)	8
1.1.1 Vannes à activation magnétique.....	8
1.1.2 Vannes à activation électrique.....	9
1.1.3 Vannes à activation piézoélectrique	11
1.1.4 Vannes à activation thermique	11
1.2 Micro-vannes à activation pneumatique	13
2 Micro-vannes à transition de phases	16
2.1 Vannes à transition solide/liquide.....	16
2.2 Micro-vannes à mémoire de formes	17
2.3 Micro-vannes basées sur les hydrogels.....	18
2.4 Comparaison des micro-vannes	22
3 Une nouvelle approche pour les vannes à hydrogel.....	24
3.1 Principe	24
3.2 Quels polymères stimulables pour les micro-vannes ?	26
3.2.1 Cahier des charges microfluidique	27
3.2.2 Polymères thermo-stimulables	28
3.2.3 Polyélectrolytes sensibles au pH et au champ électrique	29
3.3 Etat de l'art sur la synthèse de films minces de polymère.....	31
Références	35

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses technologies de micro-vannes ont été mises au point. L'évolution de ces micro-vannes au cours des dernières décennies met en valeur l'importance croissante des applications des Lab-On-a-Chip (LOC) aux niveaux académique et industriel. La recherche de techniques de fabrication toujours moins coûteuses, de vannes plus facilement activables et donc de LOC plus transportables et économiques démontre aussi la volonté de la communauté scientifique d'apporter à la société les avantages de la miniaturisation des laboratoires sur puces [4].

En 1998, l'équipe de Whitesides, publie une méthode de fabrication de micro-puces en poly(diméthylsiloxane) (PDMS) [5]. Comme illustré sur la figure 1, le PDMS est utilisé pour répliquer un moule puis est collé sur un substrat plat. De nombreux systèmes peuvent être produits ainsi à partir du moule original, ce qui évite d'avoir à graver du verre ou du silicium pour obtenir les micro-canaux. La simplicité de fabrication et le coût faible de production de ces micro-puces ont grandement encouragé le développement de la microfluidique et des laboratoires sur puces. De plus, le PDMS a eu un impact important sur l'intégration de vannes dans les LOC car sa déformabilité a été exploitée par de nombreux groupes pour réaliser des micro-vannes par pincement du micro-canal.

Il convient de présenter les différentes technologies de vannes avec leurs avantages et leurs inconvénients. Elles se partagent en deux grandes catégories : les vannes à membranes et les vannes à transition de phases. Cela nous permettra de positionner les actionneurs à hydrogels stimulables que nous mettons au point dans cette thèse.

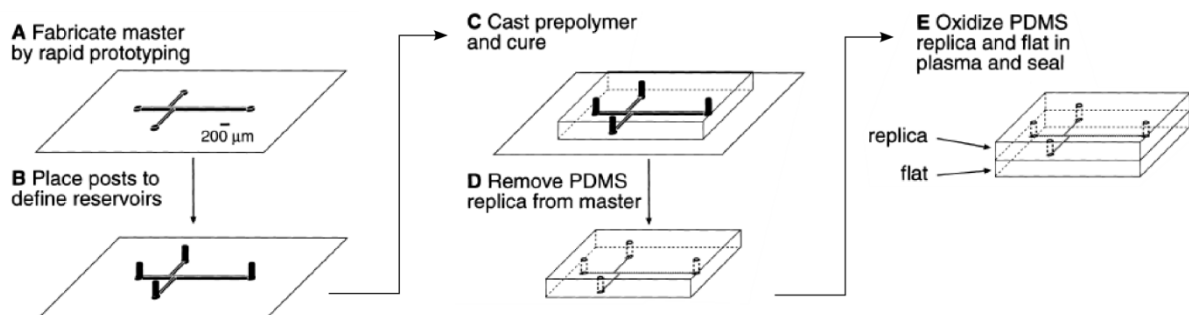


Figure 1 Principe de fabrication d'une micro-puce en PDMS (d'après [5]).

1 Vannes en microfluidique

Le développement des LOC et des systèmes d'analyses miniature (Micro Total Analysis system, μ TAS) est un domaine de recherche actif depuis quelques décennies. Un certain nombre de technologies de contrôle des flux dans des micro-canaux a donc déjà été mis au point. Ces technologies peuvent être classées en deux grandes catégories :

- les micro-vannes à membranes ou à activation mécanique ;
- les micro-vannes à changement de phase.

1.1 Micro-vannes à membranes (ou à activation mécanique)

Il existe un grand nombre de types d'actionnements pour les vannes à membranes. Pour toutes ces vannes le principe de fonctionnement est de déformer une des parois du micro-canal, formée par une membrane flexible, afin de pincer le canal pour le fermer. La figure 2 ci-après illustre les principaux types d'actionnement des vannes à membranes [6].

L'origine de la force de déplacement de la membrane peut être magnétique (figure 2a), électrique (figure 2b), piézoélectrique (figure 2c), ou thermique (figure 2d-e-f). Chacun de ces types d'actionnement fait l'objet d'une description détaillée, avec leurs avantages et leurs inconvénients, dans les sous-sections 1.1.1 à 1.1.4.

1.1.1 Vannes à activation magnétique

La première micro-vanne, réalisée par Terry et al. en 1979, est composée d'une membrane en silicone connectée à un solénoïde [7]. Pour diminuer la consommation énergétique de ce type de vannes, elles sont souvent réalisées avec des aimants permanents. Soit ceux-ci sont intégrés à la membrane et le mouvement est contrôlé par des bobines [8]. Soit ils sont fixes et une micro-bobine est intégrée à la membrane. C'est par exemple les vannes réalisées par Meckes et al. [9] à l'aide de micro-bobines en or.

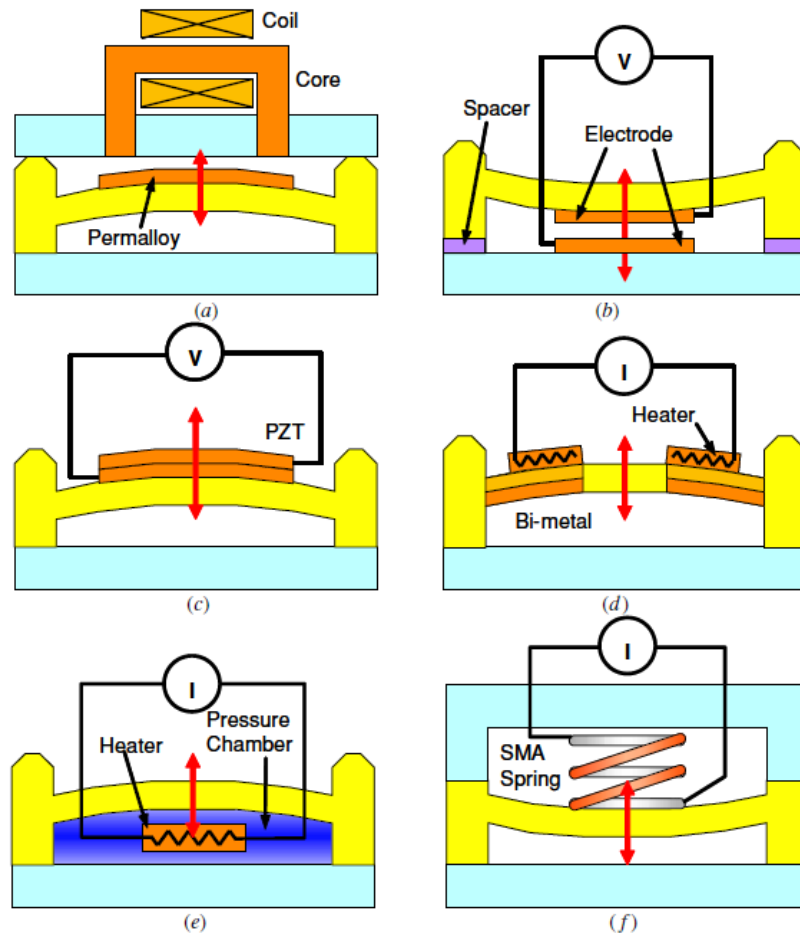


Figure 2 Illustration des principales actuations des vannes à membranes : (a) magnétique ; (b) électrostatique ; (c) électrostatique ; (d) bimétallique ; (e) thermo-pneumatique ; (f) à mémoire de forme (d'après [6]).

1.1.2 Vannes à activation électrique

Les vannes à activation électrique sont généralement composées comme suit :

- la membrane flexible constitue la paroi supérieure du micro-canal. Une électrode est intégrée à cette membrane ;
- une seconde électrode faisant face à la première est intégrée sur la face inférieure du canal, c'est-à-dire sur le substrat sur lequel est fabriquée la puce microfluidique.

En appliquant une différence de potentiel entre ces deux électrodes les forces électrostatiques permettent de déformer la membrane et de fermer le canal.

Un exemple de réalisation par Chang et Maharbiz est présenté en figure 3 [10]. Les micro-puces sont fabriquées sur un substrat en verre sur lequel une électrode d'ITO est déposée. Les parois du canal sont moulées dans du PDMS et une électrode métallique flexible est intégrée à la paroi supérieure. L'activation de la vanne est obtenue par l'application d'une tension de 15-20V à 5Mhz entre les deux électrodes (figure 3a). Sur la figure 3c, une vue de dessus d'une telle vanne est présentée. Le canal est rempli d'eau colorée. On constate que lors de l'activation l'espace sous l'électrode mobile est totalement effondré et que l'eau a été chassée.

Les auteurs ont aussi réalisé des matrices de 7 ou 9 de ces éléments (figure 3b) ce qui permet de reconfigurer les connections entre les différents canaux arrivant sur la matrice ou de réaliser des micro-pompes.

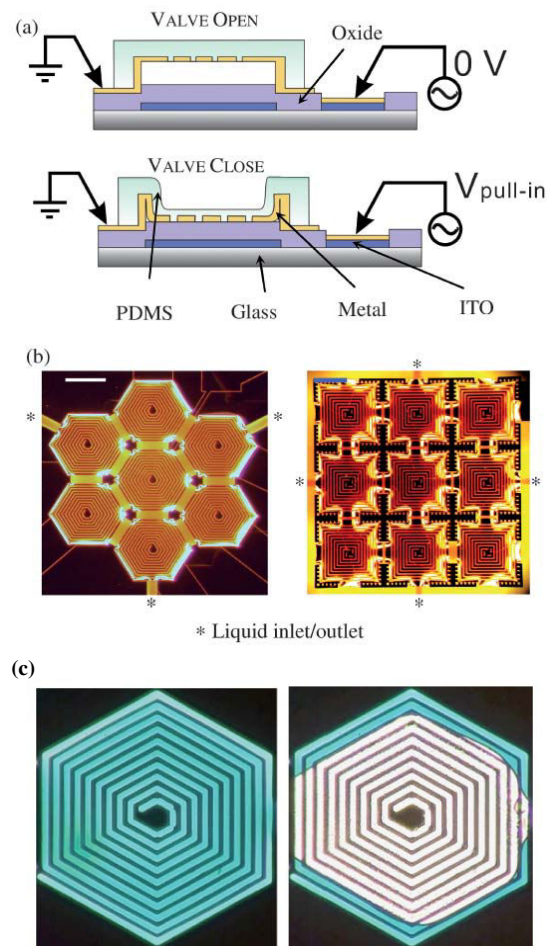


Figure 3 (a) Vanne à activation électrostatique. L'électrode du bas est isolée du micro-canal par une couche d'oxyde, une électrode métallique est intégrée à la paroi flexible supérieure. La vanne est normalement ouverte (haut), sa fermeture est obtenue par application d'une tension (bas). (b) Photographies de deux configurations possibles pour des matrices de vannes (barre d'échelle : 200 μm). (c) Photographies d'une vanne ouverte (gauche) et fermée (droite) (d'après [10]).

Les vannes que l'on vient de présenter montrent des performances intéressantes. Cependant, l'intégration d'un élément électronique à la membrane flexible implique une micro-fabrication complexe. De plus, elles sont difficilement miniaturisables à une taille inférieure à quelques centaines de microns.

1.1.3 Vannes à activation piézoélectrique

Sous l'effet d'un champ électrique certains cristaux peuvent se déformer ou produire un effort mécanique. Cet effet piézoélectrique génère un faible déplacement mais une force de flexion importante. Les matériaux piézoélectriques peuvent donc être exploités pour réaliser des micro-pompes. Le groupe de Peirs a utilisé cette technologie pour réaliser une micro-vanne intégrée à un endoscope [11]. Le groupe de Waibel a réalisé un stylo dont le réservoir était scellé par une vanne piézoélectrique [12]. L'utilisation en microfluidique de ces vannes reste tout de même faible, car leurs dimensions sont de l'ordre du millimètre et les tensions d'activations élevées (de l'ordre de 100 V pour les deux exemples ci-dessus).

1.1.4 Vannes à activation thermique

Il existe plusieurs types d'activation thermique :

- bimétallique ;
- thermo-pneumatique ;
- alliages à mémoires de forme.

La vanne à activation dite bimétallique (figure 2d), est faite d'éléments constitués de deux lames de métaux différents. Les métaux sont choisis avec des coefficients de dilatation thermique très différents. Un changement de température va donc mettre les éléments bimétalliques sous contrainte et les déformer.

Pour la vanne à activation thermo-pneumatique (figure 2e), la membrane flexible de la vanne est déformée grâce à l'expansion thermique d'un volume de matière enfermé dans une chambre piston. Naito et al. ont utilisé ce type de vannes pour effectuer de

l'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans des microréacteurs clos (figure 4) [13]. La PCR nécessite d'élever la température à 90°C. Comme schématisé sur la figure 4, à cette température, le volume d'air enfermé dans la chambre piston est suffisamment dilaté pour déformer la membrane la séparant du canal principal et ainsi isoler la chambre de réaction.

La montée en température, obligatoire pour réaliser la PCR, est astucieusement exploitée pour fournir l'énergie nécessaire à l'actuation des vannes. De plus, la micro-fabrication est simplifiée car aucun élément électrique intégré n'est à produire.

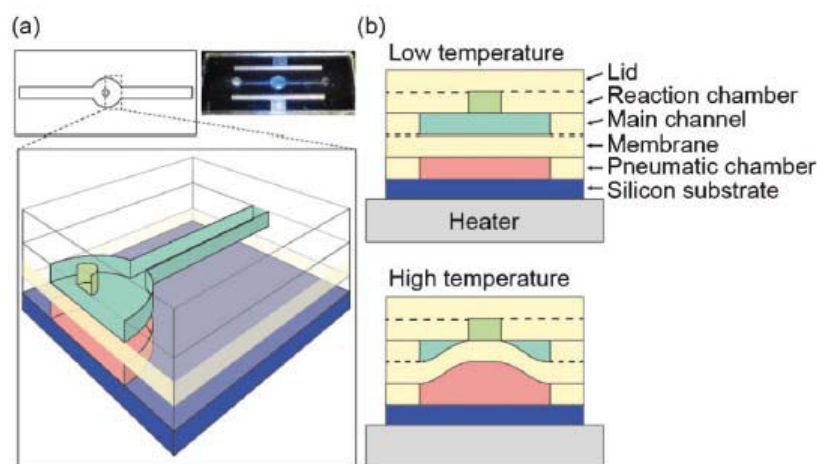


Figure 4 (a) Structure de la micro-vanne thermo-pneumatique réalisée par Naito et al. La micro-fabrication est réalisée en 6 couches pour former un couvercle, la chambre de réaction, le canal principal, la membrane, la chambre piston et le substrat. (b) Vues en coupe décrivant le principe d'activation. La vanne est normalement ouverte (haut, basse température), la membrane fléchit dans le canal principal et ferme la chambre de réaction quand la température augmente (bas) (d'après [13]).

Pour les vannes à activation avec des alliages à mémoire de forme (figure 2f), ces derniers gardent en mémoire leur forme initiale et y retournent après une déformation. La déformation peut être induite par un changement de température. Il est ainsi possible d'alterner entre une forme contrainte et une forme mémorisée lorsque la température varie autour d'une température critique.

Les procédés d'activation thermique apportent une augmentation de la force que peut délivrer la micro-vanne. Simultanément, les courses de déplacement de la membrane sont aussi plus longues. Un autre avantage de la thermo-activation est la simplicité des microstructures nécessaires par rapport aux autres technologies. La fabrication des micro-puces est donc plus aisée et moins coûteuse. Les inconvénients de cette technologie sont

des temps d'actuation relativement longs et une consommation énergétique importante due aux élévations de température importantes.

1.2 Micro-vannes à activation pneumatique

La vanne à actuation pneumatique développée par l'équipe de Quake est aussi une vanne à membrane [14]. Cependant, elle se distingue des vannes présentées précédemment par l'extériorisation du système d'activation des vannes. Cela conduit à des micro-puces plus faciles à produire. En effet, il n'est plus nécessaire d'intégrer des éléments métalliques, électriques ou piézoélectriques.

La micro-vanne de Quake est obtenue en fabriquant un canal de contrôle au dessus du canal principal comme illustré sur la figure 5A. Les vannes de Quake sont donc habituellement utilisées sur des puces en PDMS afin d'avoir une membrane flexible entre le canal principal et le canal de contrôle. Dans le canal principal circulent les fluides et échantillons sur lesquels on désire réaliser des expériences. Le canal de contrôle est, lui, rempli d'air et est relié à une source de pression externe. En augmentant la pression dans ce canal, on peut déformer la membrane comme illustré sur la figure 5B. On obtient alors un pincement du canal principal et donc la fermeture de la vanne.

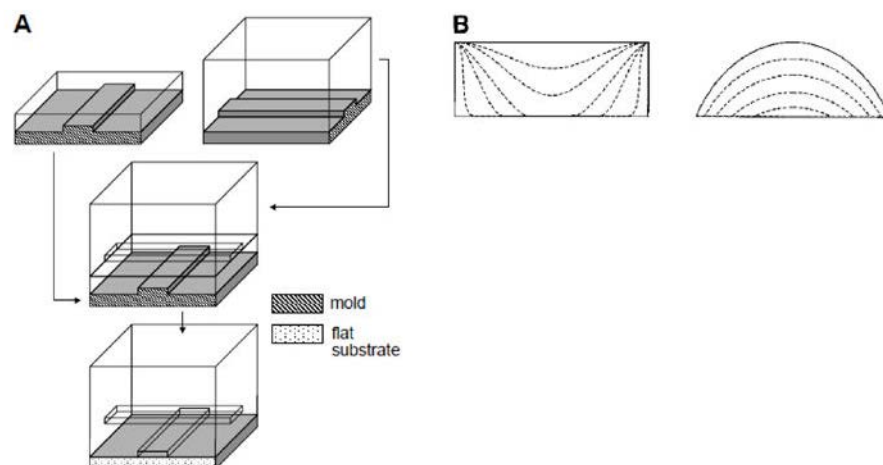


Figure 5 (A) Structure de la micro-vanne à activation pneumatique. La micro-fabrication est réalisée en deux couches pour obtenir le canal principal collé sur le substrat et le canal de contrôle au dessus du canal principal. (B) Représentation de la fermeture de la vanne pour des canaux à profil rectangulaire (gauche) ou arrondi (droite). Les lignes en pointillés indiquent la déformation de la membrane lorsque la pression augmente dans le canal de contrôle (d'après [14]).

Ces vannes sont d'une grande facilité d'utilisation et de fabrication. Elles possèdent un temps de réponse faible qui permet une utilisation à des fréquences d'ouverture/fermeture de l'ordre de la centaine de Hertz. Il est donc possible de développer des LOC très complexes avec ces micro-vannes, comme le comparateur présenté figure 6 [15].

Ce comparateur contient plusieurs milliers de vannes intégrées sur une seule puce et permet d'obtenir 254 chambres de réactions indépendantes. Les derniers développements sur ces types de vannes font état de la possibilité d'intégrer sur un LOC 100000 vannes/cm² activées à une fréquence de 5 Hz [16].

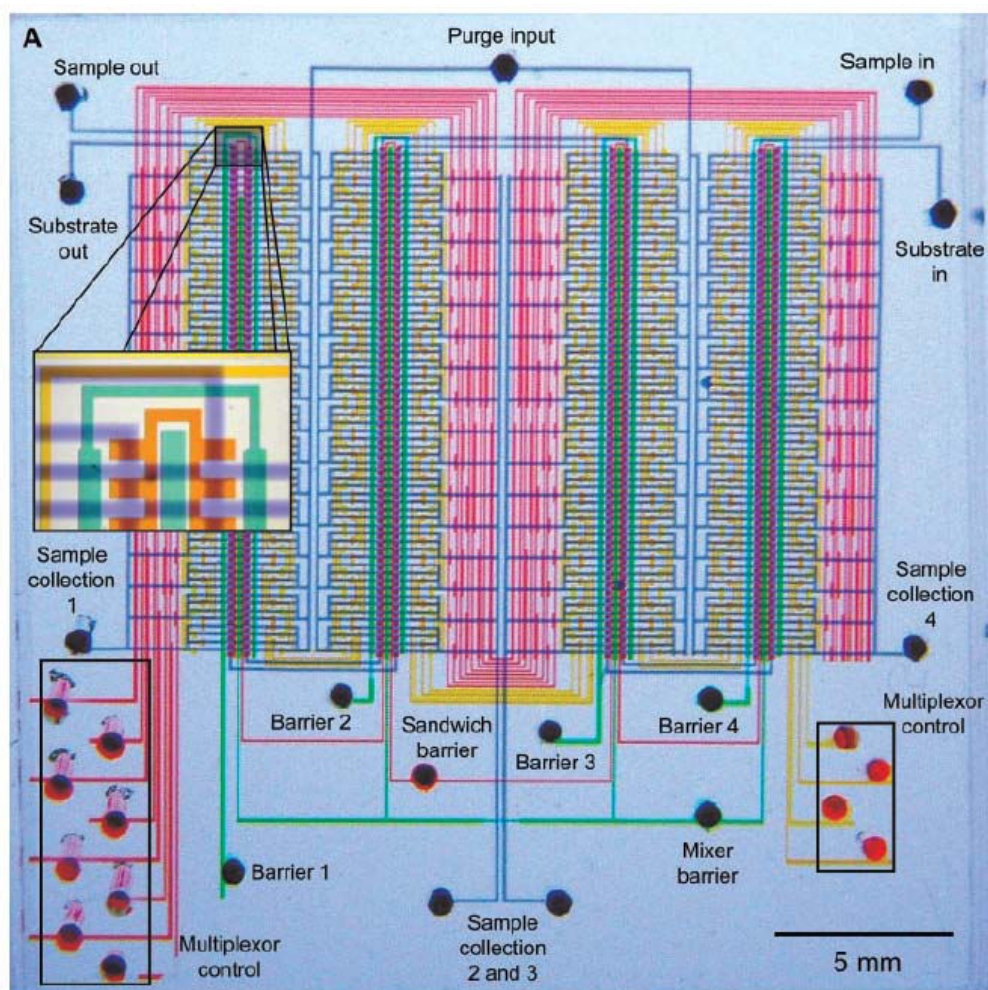


Figure 6 Photographie d'un comparateur microfluidique. Les différents canaux (de travail et de contrôle) ont été remplis par des colorants alimentaires pour faciliter la visualisation des différents éléments. En rouge et jaune : les canaux de contrôle des multiplexeurs permettant d'activer indépendamment une des 64 lignes du comparateur. En vert et rose : les canaux de contrôle permettant d'activer simultanément les barrières de séparation des chambres de réactions sur les 64 lignes d'une des 4 colonnes du comparateur. En bleu : les canaux de travail dans lesquels circulent les échantillons (d'après [15]).

Si les micro-puces sont faciles à produire, et les vannes très performantes, la technologie des vannes à actuation pneumatique, dans sa globalité, reste coûteuse et encombrante. En effet, le contrôle de milliers de vannes nécessite un nombre très important de sources de pression externes. Par exemple, l'utilisation du comparateur (figure 6) nécessite 18 sources de pression indépendantes pour activer les vannes. Le nombre de sources de pression est tout de même bien inférieur au nombre de vannes grâce à l'utilisation d'un multiplexeur et à l'activation de vannes de façon simultanée (par exemple les canaux de contrôle verts « Barrier » actionnent chacun un ensemble de 128 vannes).

Cette face cachée de la microfluidique est une des principales raisons pour lesquelles l'utilisation de LOC reste l'apanage des laboratoires académiques. L'apparition de LOC complexes à l'usage des consommateurs (on peut imaginer par exemple des bilans sanguins réalisés quotidiennement par une station domestique) nécessite des vannes dont l'activation pourrait être réalisée par des systèmes embarqués sur la puce.

2 Micro-vannes à transition de phases

La deuxième grande catégorie de micro-vannes regroupe les vannes à transition de phases. Le premier avantage de ces vannes réside dans la facilité de la construction car aucune structure complexe intégrée n'est nécessaire. Le deuxième avantage est la faible énergie d'activation des vannes. En effet, certaines transitions de phases sont très abruptes autour d'une valeur critique, une petite modification d'un paramètre expérimental permettant alors l'activation de la vanne.

2.1 Vannes à transition solide/liquide

La première approche pour obtenir des vannes à transition de phases est de travailler autour de la transition solide/liquide du fluide circulant dans le micro-canal. Neumann et al. ont proposé des vannes obtenues par la transition solide/liquide du tétradécane autour de 6°C (figure 7) [17].

Le substrat de la puce est posé sur un module Peltier qui fixe la température sous la température de fusion du fluide circulant. Le canal principal a une forme en « U » pour être éloigné du module Peltier. Malheureusement, la micro-fabrication doit être effectuée en plusieurs couches pour obtenir cette forme. En outre, on ne peut pas se permettre de geler le contenu du canal dans certaines applications (par exemple quand on travaille avec des micro-organismes vivants dans le fluide circulant). En revanche, les auteurs démontrent la faisabilité d'une puce électronique comprenant plusieurs centaines de micro-résistances qui sont activées de manière autonome. L'approche des micro-vannes à transition de phase est donc prometteuse pour des LOC contrôlables sans un équipement de laboratoire imposant.

Afin d'éviter de geler le fluide expérimental, une autre approche consiste à geler un second fluide non miscible ayant une température de fusion plus haute, par exemple, avec l'utilisation de la paraffine [18].

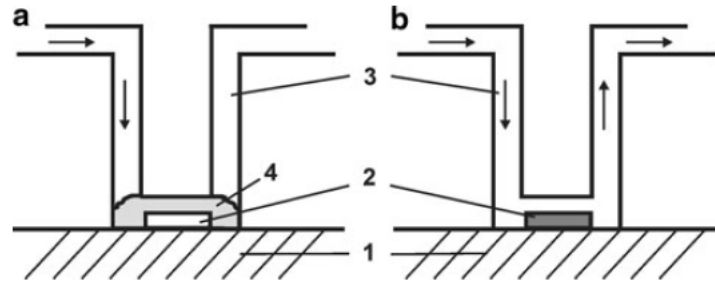


Figure 7 Vue schématique du fonctionnement de la vanne de Neumann et al. Les éléments constituant la vanne sont : (1) un module Peltier, (2) une micro-résistance chauffante, (3) le canal microfluidique, (4) un bouchon de fluide gelé. (a) Aucune tension n'est appliquée aux bornes de la résistance, le canal est gelé et la vanne fermée. (b) Le canal est ouvert quand une tension est appliquée à la résistance. La chaleur dégagée fait fondre le bouchon (d'après [17]).

Ces vannes à transition de phases sont intéressantes pour leurs faibles énergies d'actuation, la géométrie simple des micro-canaux et la réversibilité de l'actuation. Malheureusement, les temps d'actuations sont longs, de l'ordre de plusieurs secondes, aussi bien pour les vannes à paraffine que les vannes présentées par Neumann et al. De plus, il serait préférable d'avoir une technologie de vanne ayant un impact plus faible sur le fluide circulant. Pour cela deux classes de matériaux semblent prometteurs : les matériaux à mémoire de formes et les hydrogels stimulables.

2.2 Micro-vannes à mémoire de formes

Nous avons déjà évoqué les alliages à mémoire de forme pour l'activation de vannes à membranes. Très récemment, ces matériaux ont été réutilisés dans une approche simplifiée. Dans cette approche, c'est directement un polymère à mémoire de forme qui fait office de vanne, sans passer par l'intermédiaire d'une membrane. A cet effet, Takehara et al. ont utilisé du poly(ϵ -caprolactone), pour réaliser des vannes normalement ouverte et normalement fermée (figure 8) [19].

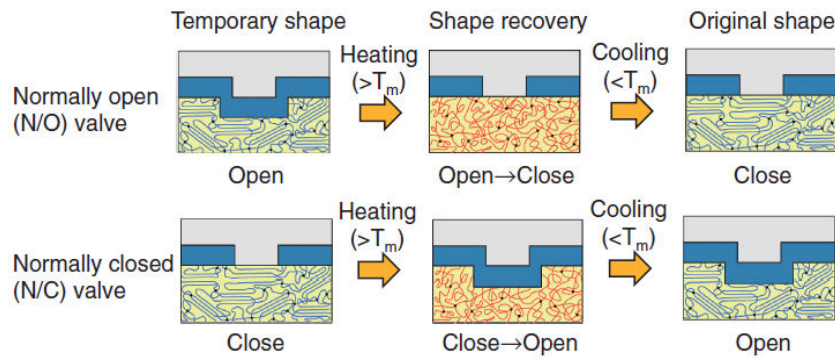


Figure 8 Principe de fonctionnement des vannes à polymère à mémoire de forme. (haut) Vanne normalement ouverte. (bas) Vanne normalement fermée (d'après [19]).

La transition du poly(ϵ -caprolactone) se fait autour de 52°C . Pour activer la transition des micro-résistances en or sont préalablement déposées sur le substrat. La taille des vannes obtenues par les auteurs est de l'ordre de la centaine de microns. L'activation est rapide, avec un temps de réponse de 0.1 seconde. La puissance électrique dissipée par les micro-résistances pour activer la vanne est inférieure à 100 mW. La micro-fabrication de la vanne ne comporte plus d'étapes complexes. En effet, la fabrication des micro-résistances est réalisée par une simple lithographie, et la géométrie simple du canal peut s'obtenir en une seule étape de fabrication.

Le faible coût et la simplicité de cette technologie sont intéressants pour des micro-puces jetables à usage unique car le fonctionnement de ces vannes n'est pas réversible.

2.3 Micro-vannes basées sur les hydrogels

Les hydrogels stimulables ont la propriété de changer de volume de manière réversible avec une grande amplitude de déformation pour seulement de faibles modulations de certains paramètres environnementaux. Le changement de volume peut être induit par différents stimuli tels que le pH [20], la température [21], le champ électrique [22], ou la lumière [23].

Ces matériaux sont donc de bons candidats pour réaliser des vannes à transition de phases facilement activables. La première démonstration du potentiel des hydrogels a été réalisée

en 1997 par l'équipe de Fréchet qui a obtenu des vannes thermo-stimulables avec des gels de poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM) [24].

Le temps de réponse de ces micro-vannes est fixé par la vitesse de gonflement/dégonflement des hydrogels. Le facteur limitant la cinétique est la diffusion du solvant dans le gel. L étant la plus petite dimension de l'hydrogel dans le micro-canal et D le coefficient de diffusion du solvant dans l'hydrogel, le temps de réponse τ de la micro-vanne est donné par :

$$\tau \sim \frac{L^2}{D} \quad (\text{éq. 1})$$

Pour diminuer le temps de réponse des vannes à hydrogel il faut donc diminuer la distance sur laquelle doit diffuser le solvant.

Le groupe de Beebe est le premier à avoir obtenu une vanne à hydrogel activable en moins de 10 secondes [25]. Pour cela, au lieu d'utiliser une unique structure d'hydrogel pour réaliser la vanne, plusieurs manchons d'hydrogel ont été synthétisés autour de piliers repartis au travers du canal (figure 9). L'épaisseur des manchons de polymère est de 100 μm . Cela permet d'obtenir un temps de réponse de 8 secondes. Comme le montre l'éq.1, multiplier par 4 l'épaisseur des manchons revient à ralentir d'un facteur 16 la dynamique de gonflement. Un unique cylindre d'hydrogel permettant d'obstruer le même canal aurait ainsi un temps de réponse de 130 secondes

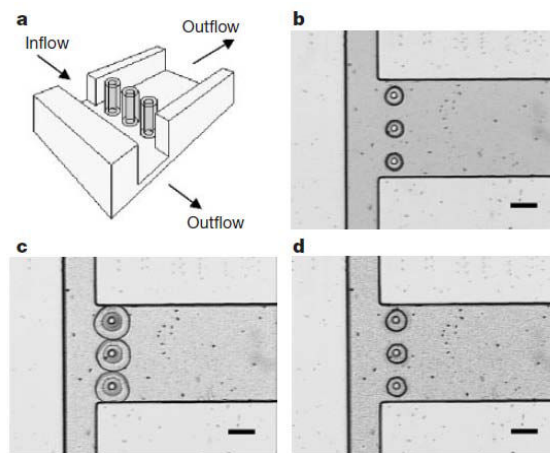


Figure 9 Structure de la vanne de Beebe. (a) Des plots préfabriqués dans le micro-canal servent de support à l'hydrogel. (b) La vanne microfluidique après photo-polymérisation de l'hydrogel. (c) Les manchons d'hydrogel sont dans leur état gonflé et obstruent la branche latérale du micro-canal. (d) L'hydrogel dans l'état effondré laisse le fluide circuler dans le canal latéral (d'après [25]).

Cette vanne est activée par le pH. Les manchons d'hydrogel sensibles au pH sont synthétisés *in situ*. Le micro-canal, contenant les piliers préfabriqués, est rempli d'une solution photo-polymérisable. L'utilisation d'un photo-masque aligné sur les piliers permet d'initier la polymérisation de l'hydrogel par irradiation UV de façon localisée. Le canal est ensuite rincé de l'excès de la solution de monomères. En plus du gain de temps sur l'actionnement, cette structure renforce la vanne en fixant l'hydrogel par contrainte géométrique. Cependant, lors du gonflement, des contraintes importantes apparaissent dans les manchons [26, 27] et ceux-ci ont tendance à céder après quelques cycles.

La base prometteuse établie par les travaux pionniers de Fréchet et Beebe [28, 29] a conduit à l'élaboration de vannes répondant à d'autres stimuli comme la force ionique [30] ou des radiations lumineuses [31, 32].

Comme évoqué précédemment, la principale faiblesse des vannes basées sur des hydrogels est leur longévité réduite due à la fissuration des monolithes d'hydrogels. Pour y remédier, un changement de géométrie est nécessaire. Récemment, Bäcker et al. ont réalisé des vannes sensibles à la température et au pH grâce à des films minces de pNIPAM et de poly(sodium acrylate) (pSA) [33]. Le micro-canal comprend un élargissement au niveau duquel l'hydrogel est synthétisé par polymérisation *in situ* initiée par UV (figure 10).

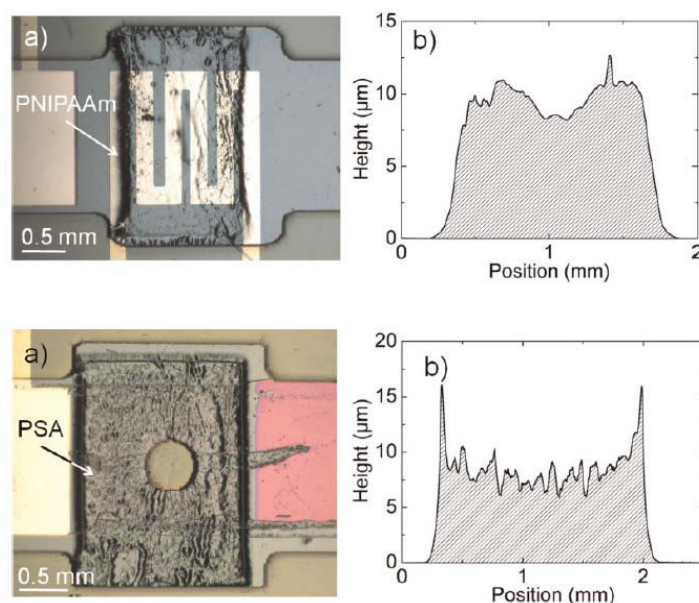


Figure 10 Structure des vannes à films minces d'hydrogel de pNIPAM (haut) et de pSA (bas). (a) Photographies. (b) Profils des films de gel obtenus par un profilomètre mécanique à balayage (d'après [33]).

Dans cette géométrie, le film ne développe pas de contrainte interne liée à un corps dur lors du gonflement. Le risque de rupture de l'hydrogel est donc diminué. Malheureusement, le maintien de l'hydrogel dans le canal par la constriction n'est pas suffisant pour assurer une bonne immobilisation et une reproductibilité de l'actionnement de la vanne. Les auteurs n'ont pas mesuré le temps de réponse, mais pour les films ayant une épaisseur sèche de 10 μm un temps d'actionnement de la vanne de l'ordre 0.1 seconde est attendu si on ne tient compte que de la diffusion de l'eau et non de l'équilibre thermique [34].

L'utilisation de films minces permet de diminuer fortement les temps de réponses qui se rapprochent des standards obtenus avec des vannes à membranes. L'utilisation de films à la place de manchons limite les contraintes qui peuvent se développer dans le gel lors du gonflement, ce qui diminue les risques de rupture. Néanmoins, la polymérisation *in situ* des motifs d'hydrogel rend compliquée la miniaturisation des vannes à des tailles inférieurs à 100 μm . Le maintien des hydrogels dans le micro-canal est aussi un problème non résolu.

Un grand avantage des vannes basées sur des hydrogels stimulables par rapport aux autres technologies de vanne est qu'elles permettent de mettre au point des LOC dont certaines fonctions et vannes sont actionnées de façon autonome [25]. Les hydrogels étant sensibles à des paramètres dépendant de la composition du fluide circulant ou des réactions chimiques en cours dans le canal (pH, force ionique, dégagement de chaleur), l'actionnement des vannes peut être déclenché sans application d'un stimulus extérieur. Les vannes à hydrogels stimulables sont donc particulièrement intéressantes pour développer des puces microfluidiques complexes contrôlables avec un équipement réduit.

2.4 Comparaison des micro-vannes

Ce tour d'horizon des différents types de vannes a permis de mettre en évidence les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles. De façon synthétique, chacune des technologies de vannes peut être évaluée selon trois critères :

- la **fabrication** juge la facilité de production des puces et le coût des matériaux. Les vannes pneumatiques ne nécessitant qu'une simple fabrication en double couche de PDMS sont excellentes à ce point vu.
- la **performance** renvoi à la vitesse d'actuation, la réversibilité de la vanne et sa durabilité. Dans ce domaine, les vannes à transitions de phase ne sont pas satisfaisantes du fait de leurs longs temps d'activation ou de l'absence de réversibilité pour les vannes à mémoire de forme.
- le **contrôle** note la possibilité d'utiliser les vannes avec un appareillage limité ainsi que l'énergie d'activation. Selon ce critère, les vannes à hydrogel sont les plus intéressantes de part leur capacité à fonctionner de façon autonome. En revanche les vannes pneumatiques sont les moins accordées à ce critère car elles demandent un équipement important pour leur contrôle.

Le tableau 1 dresse un comparatif des quatre catégories de vannes que nous venons de présenter sur ces trois critères. Un quatrième critère moins déterminant pourrait être ajouté, il s'agit de la dimension des vannes et de leur potentiel de miniaturisation.

	Fabrication	Performance	Contrôle
Membrane	Complexe	Bonne	Aisé
Pneumatique	Facile	Très bonne	Exigeant
Transition de Phase	Délicate	Correcte/Lenteur	Simple
Hydrogel	Délicate	Correcte/Fragilité	Simple

Tableau 1 : comparatif des quatre grandes catégories de micro-vannes selon les trois critères suivants : fabrication, performance et contrôlabilité.

On constate qu'aucune vanne ne satisfait les trois critères. Bien que le contrôle des vannes à activation pneumatique nécessite un équipement important et soit peu économe, on comprend l'impact qu'elles ont eu par leurs performances et la facilité de leur mise en œuvre.

L'utilisation des vannes à actuation pneumatique et du PDMS ont, il y a une quinzaine d'années, permis l'essor de l'utilisation des laboratoires sur puces pour la recherche. La prochaine étape attendue est l'avènement de puces à très faibles coûts et utilisables partout. Une nouvelle technologie allant résolument dans cette direction est l'invention de puces microfluidiques sur papier pour réaliser des diagnostics sanguins à très faibles coûts dans les pays en voie de développement [35-37].

A la vue du tableau 1, il apparaît clairement que les vannes à transition de phases et à hydrogel sont les plus prometteuses pour répondre à cette demande. Il faut cependant améliorer grandement leurs performances de fonctionnement et faciliter leur fabrication. Dans la section suivante, nous présentons une nouvelle approche des vannes à hydrogel qui devraient permettre de résoudre les faiblesses de ces vannes présentes dans la littérature.

3 Une nouvelle approche pour les vannes à hydrogel

Pour rendre la technologie de vannes à hydrogel compétitive il faut donc une nouvelle approche qui les rende plus fiables et durables et assure un temps d'activation aussi faible que possible. Dans cette section nous allons décrire une nouvelle approche de vannes à hydrogel permettant d'exploiter le plein potentiel de cette technologie en simplifiant la fabrication et en améliorant les performances.

3.1 Principe

Nous voulons élaborer des vannes à hydrogels durables et utilisables sur un grand nombre d'activation. Il faut donc garantir une meilleure résistance de l'hydrogel et une meilleure tenue dans le canal. En outre, il faut obtenir des temps d'actuation faibles. L'utilisation de films minces greffés d'hydrogels activables semble être la meilleure solution. Le principe de fonctionnement d'une vanne à films minces d'hydrogels est présenté sur la figure 11. Selon la valeur d'un paramètre de contrôle (la température par exemple avec des hydrogels de pNIPAM), l'hydrogel peut être effondré et la vanne est ouverte ou l'hydrogel peut être gonflé de solvant et la vanne est alors fermée.

Le temps d'ouverture et de fermeture des vannes à hydrogel est déterminé par deux phénomènes :

- le temps de gonflement/dégonflement limité par la diffusion du solvant dans l'hydrogel ;
- le temps nécessaire à l'établissement du stimulus déclenchant la transition.

S'il ne s'agit que de phénomène de diffusion, avec une épaisseur sèche de film allant de 1 à 10 micromètres, le temps de gonflement du gel prévu serait inférieur à 0,1 seconde [34].

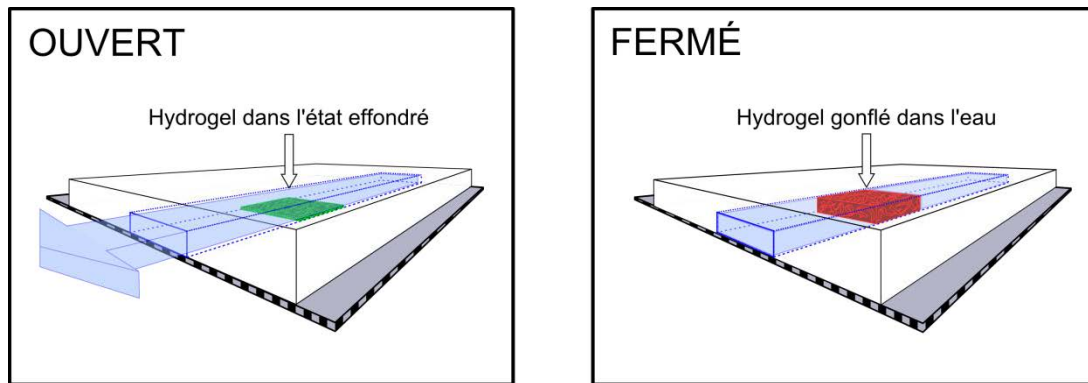


Figure 11 Vue schématique de la structure et du fonctionnement d'une vanne à base de films minces d'hydrogel.

S'il est question de paramètre de stimulation, le temps de réponse est fortement dépendant du stimulus choisi. Par exemple, pour des vannes activées par l'application d'un champ électrique, le stimulus pourrait être appliqué instantanément. Pour des vannes thermosensibles, à l'échelle micrométrique, des variations de température de quelques degrés peuvent être obtenues en moins de 0,1 seconde.

Pour remédier au problème de tenue mécanique des hydrogels comme micro-vannes, la solution est de greffer le gel chimiquement aux parois du canal. Préalablement à la synthèse du gel *in situ*, les parois du canal peuvent être fonctionnalisées en passant une première solution dans la micro-puce. Cependant, en faisant ainsi, toutes les parois sont fonctionnalisées et lors de la polymérisation de l'hydrogel, celui-ci se greffe à chacune d'entre elles. Il n'est donc pas possible d'obtenir ainsi un film mince greffé sur une seule paroi.

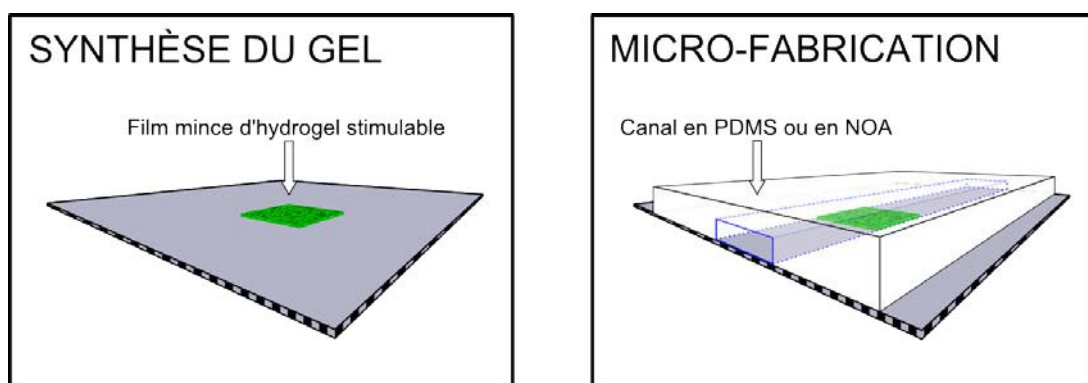


Figure 12 Vue schématique du procédé de fabrication d'une micro-vanne à base de films minces d'hydrogel synthétisé *ex situ*. La première étape est la préparation du substrat et la synthèse du motif d'hydrogel greffé. Le micro-canal est fabriqué par la suite et associé au substrat pour obtenir une micro-vanne.

Il apparaît que la synthèse *in situ* utilisée dans les approches précédentes constitue une limitation au développement de vannes à hydrogel tout à fait robustes. Les films minces n'ont besoin d'être greffés qu'à une seule paroi du micro-canal, par exemple le substrat. L'idée que nous avons mise en œuvre est de réaliser la synthèse du film mince greffé sur le substrat avant la fabrication de la puce (figure 12). Ce projet a débuté avec la thèse de Clémence Vergne [38].

Les avantages de cette synthèse du film d'hydrogel en dehors du canal sont nombreux :

- tous les traitements chimiques nécessaires à un bon greffage et la synthèse du gel peuvent être réalisés plus simplement et avec un meilleur contrôle ;
- on a la possibilité de caractériser les propriétés du gel, comme la tenue mécanique, l'épaisseur du film, le ratio de gonflement ;
- il est aussi possible après création des premiers motifs avec un hydrogel stimuable donné d'en produire de nouveaux avec un hydrogel différent. Cela est bien plus compliqué *in situ* car souvent l'injection d'une deuxième solution polymérisable n'est pas compatible avec la présence d'une première vanne ;
- enfin, la micro-fabrication est plus simple et on a une plus grande liberté dans le dessin du canal car il n'est plus nécessaire de fournir un renfort mécanique à l'hydrogel.

Cette stratégie de micro-fabrication des vannes résout donc de nombreux problèmes posés par les approches précédentes. Cependant, un petit nombre de contraintes inhérentes à la réalisation de vannes à hydrogel persiste. Nous allons les expliciter ci-dessous afin de choisir des polymères et des synthèses de films minces en conformité avec la réalisation de notre projet.

3.2 Quels polymères stimulables pour des micro-vannes ?

Pour réaliser une micro-vanne à hydrogel, il faut des hydrogels sensibles à un stimulus contrôlable depuis l'extérieur du système (comme la température, un champ électrique ou une onde lumineuse) ou bien caractéristique du milieu en écoulement dans la puce (comme le pH).

D'autres contraintes, fixées par la microfluidique, doivent être respectées par les hydrogels et donc par les polymères. Nous allons décrire ces contraintes, puis nous présenterons une sélection de polymères qui répondent à ces contraintes et qui sont de bons candidats pour notre projet.

3.2.1 Cahier des charges microfluidique

Pour réaliser une micro-vanne à base de films minces d'hydrogel selon notre nouvelle approche, il faut que l'épaisseur du gel à l'état gonflé soit suffisamment grande pour obstruer totalement le micro-canal. Parallèlement, l'épaisseur du gel effondré doit permettre un écoulement satisfaisant (voir figure 11). En d'autres termes, l'amplitude du changement de volume doit être importante. Un rapport 3 semble être le minimum (voir chapitre 3).

Pour réaliser plusieurs vannes sur une même puce, il est impératif de pouvoir réaliser des dépôts localisés d'hydrogels. Cette contrainte limite le nombre de voies de synthèse utilisables pour la micro-fabrication de micro-puces.

En résumé, les hydrogels que l'on recherche doivent satisfaire les 3 conditions suivantes :

- l'hydrogel doit être stimuable ;
- la variation d'épaisseur du film d'hydrogel avec le stimulus doit être au moins du simple au triple entre l'état gonflé et l'état collapsé ;
- l'hydrogel doit pouvoir être greffé de façon localisée (en motifs).

Ces trois conditions contraignent les choix possibles sur la nature chimique des polymères employés ainsi que sur les méthodes de synthèses des films minces utilisées. Dans un premier temps nous allons présenter une sélection de polymères qui peuvent répondre à ces contraintes, puis nous discuterons du choix de la méthode de synthèse de films minces.

3.2.2 Polymères thermo-stimulables

Pour obtenir des hydrogels thermo-stimulables, le pNIPAM est couramment employé. Ce polymère est connu pour avoir une température critique inférieure de solubilité (LCST, Lower Critical Solution Temperature) autour de 32°C en milieu aqueux [21]. Quand la température est inférieure à la LCST le polymère est gonflé par des molécules d'eau qui forment des liaisons hydrogène avec le pNIPAM. Lorsque la température est au-dessus de la LCST, le polymère devient hydrophobe et se recroqueville du fait de la rupture des liaisons hydrogène eau-polymère. Les films d'hydrogels obtenus avec ce polymère présentent donc une transition de phase gonflement/dégonflement autour de la LCST par absorption/éjection d'eau.

D'autres polymères peuvent être envisagés, pour changer la température d'ouverture/fermeture des vannes. Par exemple, des polymères à LCST plus élevées, comme le poly(*N*-isopropylmethacrylamide) et le poly(*N,N*-méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (pNIPMAM et pMADAME), sont intéressants pour développer des applications où les vannes doivent être fermées à une température supérieure à 32°C. Les LCST de ces polymères sont, d'après la littérature, d'environ 40°C [39, 40] et 50°C [41] respectivement.

Ces différents polymères à LCST utilisés dans notre approche permettront la réalisation de vannes normalement fermées : quand la puce sera à température ambiante, l'hydrogel sera gonflé et la vanne fermée. Pour obtenir l'ouverture de la vanne, il faudra fournir de l'énergie thermique pour dépasser la température critique.

Les polymères à température critique supérieure de solubilité (UCST, Upper Critical Solution Temperature) ont un comportement opposé : à basse température ils sont effondrés, ils gonflent lorsque la température devient supérieure à la UCST [42]. Des vannes normalement fermées, mais dont l'ouverture serait cette fois déclenchée en refroidissant la puce, peuvent être réalisées avec des polymères à UCST inférieures à la température ambiante. Des polymères avec une UCST supérieure à la température ambiante peuvent être employés pour réaliser des vannes thermosensibles normalement ouvertes.

Seuring et Agarwal ont récemment montré que le poly(méthacrylamide) (pMA) présentait une transition de solubilité dans l'eau à une UCST de 6°C [43]. De façon très intéressante, l'UCST peut être modifié par copolymérisation avec de l'acrylonitrile (pCN). Selon la composition du p(MA-co-CN) l'UCST peut varier entre 6 et 60°C. Une approche similaire développée par Woodfield et al. permet d'obtenir des copolymères à base de sulfobetaine avec des UCST comprises entre 6 et 82°C [44]. De nombreux polyzwitterions (comme la sulfobetaine) présentent une UCST, mais contrairement au p(MA-co-CN), la UCST est affectée par la force ionique de la solution [42].

Le tableau 2 dresse un récapitulatif des polymères envisageables (et de leurs propriétés thermiques) pour réaliser des vannes à hydrogel thermosensibles. La grande variété des réponses thermiques permet d'adapter l'actionnement des vannes aux applications auxquelles une micro-puce est destinée.

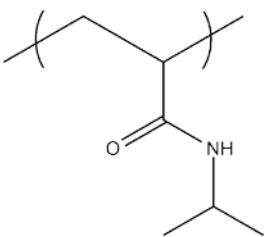
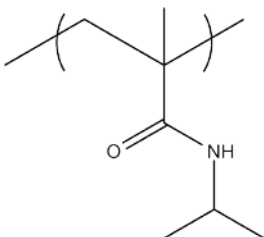
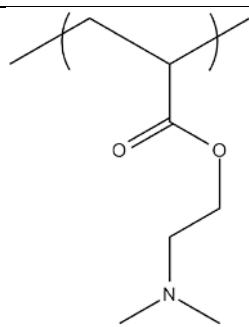
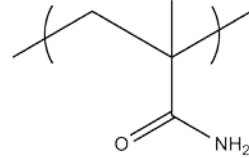
pNIPAM	pNIPMAM	pMADAME	p(MA-co-CN)
			
LCST ~ 32°C	LCST ~ 40°C	LCST ~ 50°C	UCST ~ 6-60°C

Tableau 2 Tableau récapitulatif des polymères thermosensibles envisagés dans cette étude, et de leurs températures critiques.

3.2.3 Polyélectrolytes sensibles au pH et au champ électrique

Les vannes à hydrogels développées par l'équipe de Beebe utilisaient le poly(acide acrylique) (pAA) comme polymère sensible au pH [25].

Les gels de polyélectrolytes sont gonflés par la pression osmotique exercée par les contre-ions dissociés et confinés dans la couche de gel pour assurer l'électroneutralité. Le pAA

est un polyélectrolyte portant un nombre de charges électriques dépendant du pH sous la forme de groupes anioniques carboxylates ($pK_a \sim 5,1$ [45]). Le gonflement du pAA est ainsi dépendant du pH.

L'utilisation de polyélectrolytes dans notre géométrie devrait aussi permettre l'élaboration de vannes activables par un champ électrique, en plaçant le film entre deux électrodes. L'application d'un champ électrique pourrait avoir pour effet de déplacer les contre-ions hors du gel ce qui diminue la pression osmotique et donc le gonflement. Pour réaliser de telles vannes, il est préférable d'avoir un polyélectrolyte fort, ionisé sur une plus large gamme de pH et quelle que soit la force ionique du milieu [46, 47]. Par exemple, le poly(sodium 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonate) (pAMPS, $pK_a \sim 0,4$) est un bon candidat. Des polyélectrolytes cationiques forts peuvent aussi être envisagés comme le poly(2-(méthacryloyloxy)éthyl-triméthyl-ammonium chloride) (pMAETAC, $pK_a \sim 9,4$ [48]).

Le tableau 3 dresse un récapitulatif des polymères envisageables pour réaliser des vannes à hydrogel électro-activables.

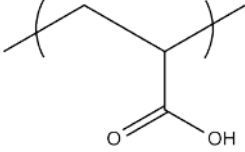
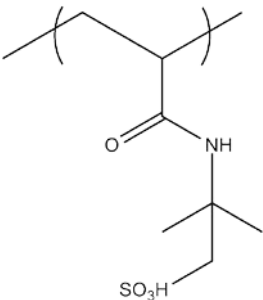
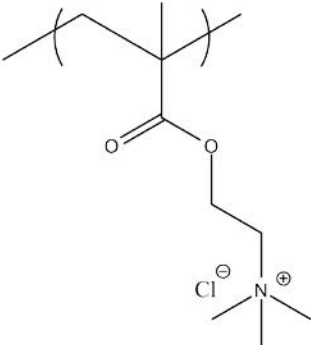
pAA	pAMPS	pMAETAC
		
$pK_a \sim 5,1$	$pK_a \sim 0,4$	$pK_a \sim 9,4$

Tableau 3 Tableau récapitulatif des polyélectrolytes envisagés dans cette étude et de leurs pK_a .

L'étape préalable à la micro-fabrication de la puce est la synthèse de films minces de ces polymères stimulables. Les différentes synthèses envisageables sont présentées ci-dessous.

3.3 Etat de l'art sur la synthèse de films minces de polymère

La recherche sur la synthèse et les applications des films minces de polymères, et notamment des hydrogels est un domaine actif. Cela est dû à leurs nombreuses propriétés comme la réponse à des stimuli extérieurs, la biocompatibilité, la capacité à stocker des principes actifs ou à immobiliser des cellules... [49-52].

Comme c'est le cas dans notre étude, l'optimisation de l'intégration des hydrogels est un point critique pour la fabrication et le développement de dispositifs qui exploitent au mieux les propriétés des hydrogels stimulables. Les méthodes de synthèse de réseaux chimiques de polymères utilisant une initiation UV sont les plus populaires, car elles permettent d'obtenir les hydrogels en motifs par irradiation au travers d'un photo-masque.

Deux stratégies possibles sont utilisées pour réaliser ces synthèses :

- la copolymérisation du monomère avec un co-monomère multifonctionnel ;
- la réticulation d'un film de chaînes de polymères préformées et fonctionnalisées avec des groupes réactifs.

Dans la première approche, une polymérisation radicalaire est initiée dans une solution de monomère et de réticulant. La solution réactive, contenant aussi des photo-initiateurs, est confinée entre deux substrats plans séparés par des cales d'espacement (figure 13a) [53, 54]. Un des substrats est fonctionnalisé pour que le film s'y greffe, l'autre est traité pour que le film de polymère n'adhère pas dessus. Le dépôt de l'hydrogel en motifs peut être réalisé par activation UV via un photo-masque, ou en utilisant un deuxième substrat texturé plutôt que plan. Toomey et al. ont ainsi fabriqué des surfaces recouvertes de textures de pNIPAM de 40 μm d'épaisseur [55].

L'introduction de la solution polymérisable, visqueuse, dans l'interstice est réalisée par exploitation de la capillarité (figure 13b). Cependant, une épaisseur de film inférieure à quelques dizaines de microns est difficile à obtenir du fait de l'utilisation des cales et du ralentissement de la montée capillaire avec l'épaisseur. En outre, le retrait du deuxième substrat peut entraîner des dégradations du gel. Cette méthode ne présente donc pas d'amélioration par rapport à une synthèse *in situ* pour la réalisation de micro-vannes.

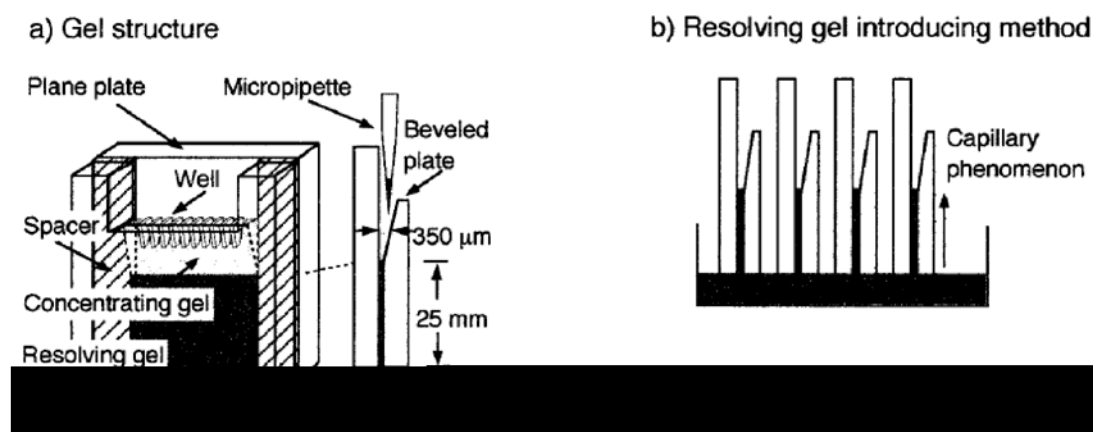


Figure 13 (a) Moule permettant l'obtention de films de polymères à partir d'une solution photo-polymérisable. (b) La solution est introduite par capillarité entre les deux substrats plans (d'après [54]).

La solution peut aussi être déposée par spin-coating sur un substrat fonctionnalisé pour le greffage, puis la réaction de polymérisation/réticulation est activée [56]. Dans ces conditions il est difficile de maintenir une atmosphère contrôlée pour éviter la présence catastrophique d'oxygène près du film qui inhibe la polymérisation radicalaire.

Dans la seconde approche, des polymères préformés et fonctionnalisés sont déposés en film sec sur le substrat. La réticulation et le greffage du réseau polymère est, en suite, activée par irradiation UV [57-59]. Cette approche offre l'avantage d'éviter la forte contrainte de la synthèse en atmosphère contrôlée. Contrainte particulièrement importante pour les synthèses de films minces où le rapport surface/volume est élevé. Les polymères sont obtenus par copolymérisation du monomère responsable des propriétés stimulables avec un monomère contenant un groupe chromophore réactif permettant la réticulation (figure 14).

Plusieurs méthodes de dépôt du film de polymère peuvent être adoptées, comme le dip-coating ou le spin-coating. Selon les conditions de dépôt, une large gamme d'épaisseurs de film peut être obtenue (de la centaine de nanomètres à plusieurs microns).

Ekkachai Martwongau cours de leuthèse de doctorat au laboratoire BMM sous la direction d'Yvette Tran[64]. Nous décrivons cette synthèse et discutons ses possibilités dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

L'étude de l'état de l'art sur les vannes microfluidiques nous a amené à définir une nouvelle approche de vannes hydrogels stimulables. La fabrication de ces vannes et leurs performances sont décrites dans le chapitre 3.

Références

1. Tokeshi, M., Y. Kikutani, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, and T. Kitamori, Chemical processing on microchips for analysis, synthesis, and bioassay. *Electrophoresis*, 2003. 24(1): p. 3583-3594.
2. Trietsch, S., T. Hankemeier, and H. Van der Linden, Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2010. 108(1): p. 64-75.
3. Mark, D., S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle, Microfluidic lab on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, 2010. 39: p. 1153-1182.
4. Whitesides, G., Solving problems. *Lab on a Chip*, 2010. 10(18): p. 2317-2318.
5. Duffy, D.C., J.C. McDonald, O.J. Schueller, and G.M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 1998. 70(23): p. 4974-4984.
6. Oh, K.W. and C.H. Ahn, A review of microvalves. *Journal of micromechanics and microengineering*, 2006. 16(5): p. R13.
7. Terry, S.C., J.H. Jerman, and J.B. Angell, A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *Electron Devices, IEEE Transactions on*, 1979. 26(12): p. 1880-1886.
8. Bae, B., H. Kee, S. Kim, Y. Lee, T. Sim, Y. Kim, and K. Park, In vitro experiment of the pressure regulating valve for a glaucoma implant. *Journal of micromechanics and microengineering*, 2003. 13: p. 613.
9. Meckes, A., J. Behrens, O. Kayser, W. Benecke, T. Becker, and G. Mäüller, Microfluidic system for the integration and cyclic operation of gas sensors. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1999. 76(1): p. 478-483.
10. Chang, M.-P. and M.M. Maharbiz, Electrostatically-driven elastomer components for user-reconfigurable high density microfluidics. *Lab on a Chip*, 2009. 9(9): p. 1274-1281.

11. Peirs, J., D. Reynaerts, and H. Van Brussel, Design of miniature parallel manipulators for integration in a self-propelling endoscope. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2000. 85(1): p. 409-417.
12. Waibel, G., J. Kohnle, R. Cernosa, M. Storz, M. Schmitt, H. Ernst, H. Sandmaier, R. Zengerle, and T. Strobel, Highly integrated autonomous microdosage system. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2003. 103(1): p. 225-230.
13. Naito, T., R. Arayanarakool, S. Le Gac, T. Yasui, N. Kaji, M. Tokeshi, A. van den Berg, and Y. Baba, Temperature-driven self-actuated microchamber sealing system for highly integrated microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2013. 13(3): p. 452-458.
14. Unger, M.A., H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S.R. Quake, Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 2000. 288(5463): p. 113-116.
15. Thorsen, T., S.J. Maerkl, and S.R. Quake, Microfluidic large scale integration. *Science*, 2002. 298(5593): p. 580-584.
16. Araci, I.E. and S.R. Quake, Microfluidic very large scale integration (mVLSI) with integrated micromechanical valves. *Lab on a Chip*, 2012. 12(16): p. 2803-2806.
17. Neumann, C., A. Voigt, L. Pires, and B. Rapp, Design and characterization of a platform for thermal actuation of up to 588 microfluidic valves. *Microfluidics and nanofluidics*, 2013. 14(2): p. 177-186.
18. Ogden, S., L. Klintberg, G. Thornell, K. Hjort, and R. Bode, Review on miniaturized paraffin phase change actuators, valves, and pumps. *Microfluidics and nanofluidics*, 2014. 17: p. 53-71.
19. Takehara, H., C. Jiang, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, and T. Ichiki, Novel microfluidic valve technology based on RQVKDSHPHPRU\ -HIIHFWRI caprolactone). *Applied Physics Express*, 2013. 6(3): p. 037201.
20. Philippova, O.E., D. Hourdet, R. Audebert, and A.R. Khokhlov, responsive gels of hydrophobically modified poly (acrylic acid). *Macromolecules*, 1997. 30(26): p. 8278-8285.
21. Afroze, F., E. Nies, and H. Berghmans, Phase transitions in the system poly (N-isopropylacrylamide)/water and swelling behaviour of the corresponding networks. *Journal of Molecular Structure*, 2000. 554(1): p. 55-68.

22. Tanaka, T., I. Nishio, S.-T. Sun, and S. Ueno-Nishi, Collapse of gels in an electric field. *Science*, 1982. 218(4571): p. 467-469.
23. Sumaru, K., K. Ohi, T. Takagi, T. Kanamori, and T. Shinbo, Photoresponsive properties of poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel partly modified with spirobenzopyran. *Langmuir*, 2006. 22(9): p. 4353-4356.
24. Peters, E.C., F. Svec, and J.M. Fréchet, Thermally responsive rigid polymer monoliths. *Advanced Materials*, 1997. 9(8): p. 630-633.
25. Beebe, D.J., J.S. Moore, J.M. Bauer, Q. Yu, R.H. Liu, C. Devadoss, and B.-H. Jo, Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, 2000. 404(6778): p. 588-590.
26. Marcombe, R., S. Cai, W. Hong, X. Zhao, Y. Lapusta, and Z. Suo, A theory of constrained swelling of a pH-sensitive hydrogel. *Soft matter*, 2010. 6(4): p. 784-793.
27. Zhao, X., W. Hong, and Z. Suo, Inhomogeneous and anisotropic equilibrium state of a swollen hydrogel containing a hard core. *Applied Physics Letters*, 2008. 92(5): p. 051904.
28. Yu, C., S. Mutlu, P. Selvaganapathy, C.H. Mastrangelo, F. Svec, and J.M. Fréchet, Flow control valves for analytical microfluidic chips without mechanical parts based on thermally responsive monolithic polymers. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(8): p. 1958-1961.
29. Yu, Q., J.M. Bauer, J.S. Moore, and D.J. Beebe, Thermally responsive biomimetic hydrogel valve for microfluidics. *Applied Physics Letters*, 2001. 78(17): p. 2589-2591.
30. Zhao, B. and J.S. Moore, Fast pH-and ionic strength-responsive hydrogels in microchannels. *Langmuir*, 2001. 17(16): p. 4758-4763.
31. Chen, G., F. Svec, and D.R. Knapp, Light-actuated high pressure-resistant microvalve for on-chip flow control based on thermo-responsive nanostructured polymer. *Lab on a Chip*, 2008. 8(7): p. 1198-1204.
32. Serksen, S.R., G.A. Mensing, M. Ng, N.J. Halas, D.J. Beebe, and J.L. West, Independent optical control of microfluidic valves formed from optomechanically responsive nanocomposite hydrogels. *Advanced Materials*, 2005. 17(11): p. 1366-1368.
33. Bäcker, M., M. Raue, S. Schusser, C. Jeitner, L. Breuer, P. Wagner, A. Poghossian, A. Förster, T. Mang, and M.J. Schöning, Microfluidic chip with

- integrated microvalves based on temperature-responsive hydrogels. *Physica Status Solidi (a)*, 2012. 209(5): p. 839-845.
34. Yoon, J., S. Cai, Z. Suo, and R.C. Hayward, Poroelastic swelling kinetics of thin hydrogel layers: comparison of theory and experiment. *Soft matter*, 2010. 6(23): p. 6004-6012.
 35. Ballerini, D.R., X. Li, and W. Shen, Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. *Microfluidics and nanofluidics*, 2012. 13(5): p. 769-787.
 36. Martinez, A.W., S.T. Phillips, G.M. Whitesides, and E. Carrilho, Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 2009. 82(1): p. 3-10.
 37. Yetisen, A.K., M.S. Akram, and C.R. Lowe, Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 2013. 13(12): p. 2210-2251.
 38. Vergne, C., Etude d'objets biomimétiques et de vannes polymères en microfluidique 2013, Université Pierre et Marie Curie: Paris.
 39. Duracher, D., A. Ellassari, and C. Pichot, Preparation of poly (N-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1999. 37(12): p. 1823-1837.
 40. Fujishige, S., K. Kubota, and I. Ando, Phase transition of aqueous solutions of poly (N-isopropylacrylamide) and poly (N-isopropylmethacrylamide). *The Journal of Physical Chemistry*, 1989. 93(8): p. 3311-3313.
 41. Cho, S.H., M.S. Jhon, S.H. Yuk, and H.B. Lee, Temperature-induced phase transition of poly (N, N-dimethylmethacrylate-co-acrylamide). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 1997. 35(4): p. 595-598.
 42. Seuring, J. and S. Agarwal, Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution. *Macromolecular rapid communications*, 2012. 33(22): p. 1898-1920.
 43. Seuring, J. and S. Agarwal, First example of a universal and effective approach: polymers with tunable upper critical solution temperature in water and electrolyte solution. *Macromolecules*, 2012. 45(9): p. 3910-3918.
 44. Woodfield, P.A., Y. Zhu, Y. Pei, and P.J. Roth, Hydrophobically modified sulfobetaine copolymers with tunable aqueous UCST through postpolymerization modification of poly (pentafluorophenyl acrylate). *Macromolecules*, 2014. 47(2): p. 750-762.

45. Schmidt, S., T. Hellweg, and R. von Klitzing, Packing density control in P (NIPAM-co-AAc) microgel monolayers: effect of surface charge, pH, and preparation technique. *Langmuir*, 2008. 24(1): p. 12595-12602.
46. Kabiri, K., S. Faraji-Dana, and M.J. Zohuriaan-Mehr, Novel sulfobetaine-sulfonic acid-contained superswelling hydrogel. *Polymers for advanced technologies*, 2005. 16(9): p. 659-666.
47. Kabiri, K., M. Zohuriaan-Mehr, H. Mirzadeh, and M. Kheirabadi, Solvent-, ion- and pH-specific swelling of poly (2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) superabsorbing gels. *Journal of polymer research*, 2010. 17(2): p. 203-212.
48. Tan, F., X. Xu, T. Deng, M. Yin, X. Zhang, and J. Wang, Fabrication of positively charged poly (ethylene glycol) acrylate hydrogel as a bone tissue engineering scaffold. *Biomedical Materials*, 2012. 7(5): p. 055009.
49. Kuckling, D., Responsive hydrogel layers: from synthesis to applications. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(8): p. 881-891.
50. Stuart, M.A.C., W.T. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G.B. Sukhorukov, I. Szleifer, V.V. Tsukruk, and M. Urban, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature materials*, 2010. 9(2): p. 101-113.
51. Tokarev, I. and S. Minko, Stimuli-responsive hydrogel thin films. *Soft matter*, 2009. 5(3): p. 511-524.
52. White, E.M., J. Yatvin, J.B. Grubbs, J.A. Bilbrey, and J. Locklin, Advances in smart materials: Stimuli-responsive hydrogel thin films. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2013. 51(14): p. 1084-1099.
53. Kobel, S., M. Limacher, S. Gobaa, T. Laroche, and M.P. Lutolf, Micropatterning of Hydrogels by Soft Embossing. *Langmuir*, 2009. 25(15): p. 8774-8779.
54. Zheng, J., T. Otake, T. Kitamori, and T. Sawada, Miniaturized ultrathin slab gel electrophoresis with thermal lens microscope detection and its application to fast genetic diagnosis. *Analytical Chemistry*, 1999. 71(21): p. 5003-5008.
55. Castellanos, A., S.J. DuPont, A.J. Heim, G. Matthews, P.G. Stroot, W. Moreno, and R.G. Toomey, Size-exclusion "capture and release" separations using surface-patterned poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Langmuir*, 2007. 23(11): p. 6391-6395.
56. Bashir, R., J. Hilt, O. Elibol, A. Gupta, and N. Peppas, Micromechanical cantilever as an ultrasensitive pH microsensor. *Applied Physics Letters*, 2002. 81(16): p. 3091-3093.

57. Toomey, R., D. Freidank, and J. Rühe, Swelling behavior of thin, ~~surface~~ ~~cross-linked~~ polymer networks. *Macromolecules*, 2004. 37(3): p. 882-887.
58. Kuckling, D., M.E. Harmon, and C.W. Frank, Photo-crosslinkable PNIPAAm copolymers. 1. Synthesis and characterization of constrained temperature-responsive hydrogel layers. *Macromolecules*, 2002. 35(16): p. 6377-6383.
59. Revzin, A., R.J. Russell, V.K. Yadavalli, W.-G. Koh, C. Deister, D.D. Hile, M.B. Mellott, and M.V. Pishko, Fabrication of poly (ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography. *Langmuir*, 2001. 17(18): p. 5440-5447.
60. Kuckling, D., J. Hoffmann, M. P    er, D. Ferse, K. Kretschmer, H.P. Adler, K.-F. Arndt, and R. Reichelt, Photo cross-linkable poly(isopropylacrylamide) copolymers III: microfabricated temperature responsive hydrogels. *Polymer*, 2003. 44(16): p. 4455-4462.
61. Harmon, M.E., D. Kuckling, and C.W. Frank, Photo-crosslinkable PNIPAAm copolymers. 2. Effects of constraint on temperature and pH-responsive hydrogel layers. *Macromolecules*, 2003. 36(1): p. 162-172.
62. Harmon, M.E., D. Kuckling, P. Pareek, and C.W. Frank, Photo-cross-linkable PNIPAAm copolymers. 4. Effects of copolymerization and cross-linking on the volume phase transition in constrained hydrogel layers. *Langmuir*, 2003. 19(26): p. 10947-10956.
63. Flory, P.J. and J. Rehner Jr, Statistical mechanics of ~~cross-linked~~ polymer networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics*, 1943. 11(11): p. 521-526.
64. Li, M., Films minces d'hydrogels stimulables, 2014, Université Pierre et Marie Curie: Paris.

Chapitre 2

Films minces d'hydrogels greffés stimulables

Sommaire

1 Synthèse de films minces d'hydrogels greffés stimulables.....	44
1.1 Stratégie de synthèse	44
1.2 Synthèse des polymères stimulables fonctionnalisés.....	45
1.3 Traitement de surfaces par des fonctions biols	49
1.3.1 Préparation des surfaces de verre et de silicium.....	49
1.3.2 Préparation des surfaces d'or	50
1.4 Dépôt du film de polymère par spin-coating	52
1.4.1 Conditions de spin-coating	52
1.4.2 Fixation de la durée de spin-coating	53
1.5 Epaisseur des films	54
1.5.1 Epaisseurs des films secs	54
1.5.2 Effet de la viscosité sur le spin-coating	54
2 Propriétés stimulables des films d'hydrogels.....	58
2.1 Propriétés thermostimulables des gels de pNIPAM.....	58
2.2 Variation du taux de réticulation.....	60
2.2.1 Influence du temps de réaction.....	61
2.2.2 Influence du taux de modification des polymères.....	62
2.3 Propriétés pHsensibles des gels de pAA.....	63
2.4 Bilan	66
3 Synthèse de films d'hydrogel par irradiation UV.....	67
3.1 Mise au point du procédé.....	67
3.2 Temps d'irradiation	70
3.3 Réaction thiolène : irradiation UV et chauffage thermique?.....	73
3.4 Le cas des polyélectrolytes.....	76
3.5 Dépôts localisés : réalisation des masques	78
3.6 Lithographie laser : une alternative à la réalisation des masques.....	80
3.6.1 Principe	80
3.6.2 Paramètres d'irradiation	81
Conclusion	86
Références.....	87

Malgré l'énorme potentiel des films d'hydrogels greffés, ceux-ci sont encore assez peu étudiés, sauf dans des applications très spécifiques. Cela est attribuable à l'absence d'une stratégie simple et reproductible de synthèse des films de polymères. Pour y remédier, nous proposons dans ce chapitre une nouvelle stratégie versatile pour fabriquer ces films sur une large gamme d'épaisseurs et avec une épaisseur contrôlée. Cette synthèse permet un ajustement simple des propriétés chimiques (par exemple les propriétés stimulables) et physiques (comme l'épaisseur et la structure) des hydrogels greffés.

Plus précisément, nous exposons cette voie de synthèse pour la fabrication de films sur mesure (épaisseurs et motifs) d'hydrogels stimulables. Evidemment, cette stratégie peut être généralisée à la synthèse de réseaux polymères greffés de tous types. Dans notre cas, les films de polymères forment des hydrogels stimulables. Les polymères utilisés sont stimulables. Par exemple, des films aux propriétés thermosensibles sont obtenus avec du pNIPAM, et des films pH-sensibles sont réalisés avec du pAA.

Nous présentons dans la section 1 la synthèse des polymères stimulables fonctionnalisés ainsi que les conditions qui permettent la fabrication de films minces. Nous verrons comment il est possible de choisir l'épaisseur du film sur une gamme allant de la centaine de nanomètres à plusieurs microns. Dans la section 2 les propriétés de gonflements stimulables des films minces seront discutées. Enfin, les réalisations de motifs d'hydrogel par un procédé de lithographie classique ou par un procédé de lithographie sélective seront présentées en section 3.

1 Synthèse de films minces d'hydrogels stimulables

La stratégie que nous avons choisie pour synthétiser des films d'hydrogels greffés au substrat consiste à réticuler, par la réaction click thiol-ène (figure 1) [1, 2], des chaînes de polymères préformées et fonctionnalisées. Nous avons préféré cette approche à une synthèse à partir de monomères qui sont simultanément polymérisés, réticulés et greffés par polymérisation radicalaire. L'avantage de l'élaboration de films à partir de polymères plutôt qu'à partir de monomères est la possibilité de travailler dans l'air sans la contrainte de l'atmosphère contrôlée (sous azote pour éviter l'oxygène qui inhibe la polymérisation). La présence d'oxygène, catastrophique pour l'élaboration d'hydrogels macroscopiques, l'est d'autant plus pour l'élaboration de films minces à cause du rapport surface/volume élevé. Un autre avantage de la chimie click thiol-ène est que la réaction est obtenue sans l'ajout d'initiateur ou de catalyseur. Enfin, la réaction thiol-ène peut être activée soit par chauffage thermique soit par irradiation UV ce qui permet d'obtenir des motifs d'hydrogels.

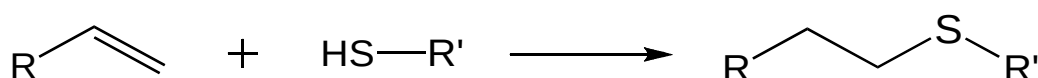


Figure 1 La réaction thiolène

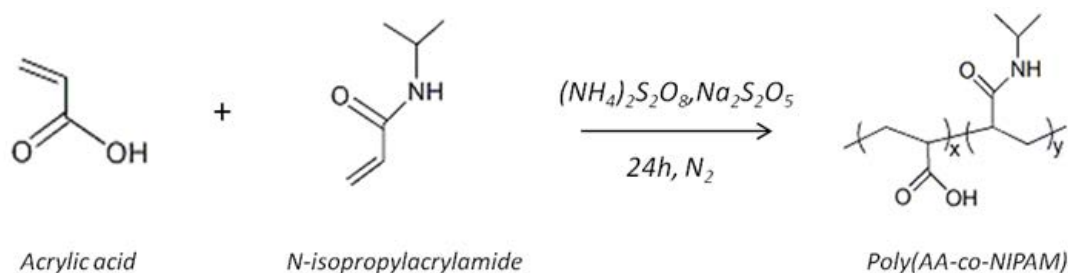
1.1 Stratégie de synthèse

La méthode de synthèse est résumée sur la figure 2. On commence par préparer une solution contenant le polymère stimulant fonctionnalisé par des groupements ène et le réticulant dithiol. La solution est ensuite déposée sur une surface fonctionnée avec une monocouche de thiols. On active ensuite la réaction thiol-ène pour créer et greffer le gel.

conventionnelle (figure 3A). La polymérisation est initiée dans l'eau par le couple redox persulfate d'ammonium/métabisulfite de sodium. La masse molaire du polymère obtenue peut être ajustée par la concentration en agent réducteur métabisulfite de sodium et par la concentration en monomères [6].

La fonctionnalisation du polymère dans l'eau est réalisée dans un second temps en modifiant les monomères d'acide acrylique par réaction avec une allylamine en présence du couple 1-(3-diméthyl-aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride / N-hydroxy-sulfo-succinimide (EDC/NHS) (figure 3B). Le couple EDC/NHS est utilisé pour favoriser la réaction de couplage, son efficacité est maximum pour des pH compris entre 4 et 7. Le pH pour réaliser cette étape est donc toujours ajusté à 5 avant l'introduction de l'EDC. En outre, l'agent de couplage EDC est introduit à 1,2 équivalent molaire par rapport à l'allylamine et le NHS est introduit à 2 équivalents molaires.

A



B

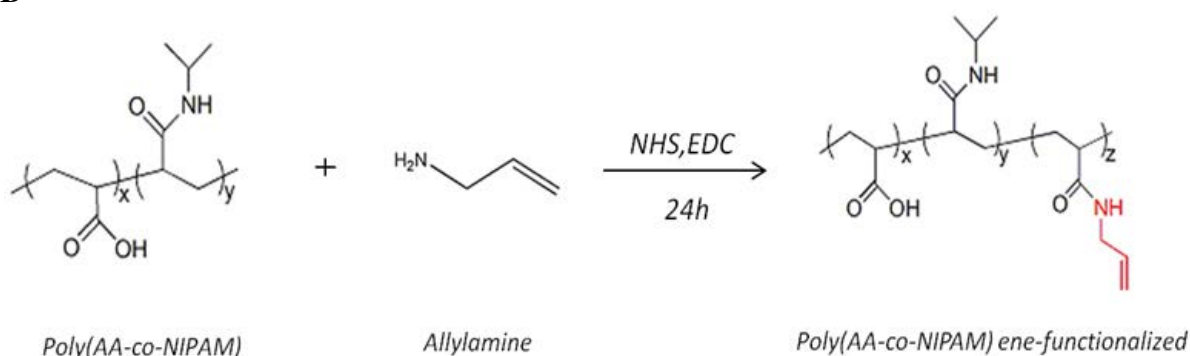


Figure 3 (A) Synthèse du copolymère poly(NIPAM-co-AA). (B) Réaction de modification de l'acide acrylique avec l'allylamine par liaison peptidique.

Le rapport entre les quantités de monomères de NIPAM et d'AA est typiquement de 95/5. Le taux de modification -proportion de monomères modifiés avec l'allylamine- est de l'ordre de quelques pourcents. Le polymère stimuable fonctionnalisé obtenu est présenté sur la figure 4A, il est composé de 95% de NIPAM, 2 à 3% de AA et 2 à 3% de monomères modifiés [7].

Le polyélectrolyte que nous avons utilisé en premier lieu est le pAA (figure 4B). Celui-ci est fonctionnalisé par l'allylamine exactement de la même façon que le pNIPAM (voir figure 3B). Le pAA peut être synthétisé par polymérisation radicalaire conventionnelle ou bien tout simplement obtenu dans le commerce.

Cette voie de synthèse est désormais bien caractérisée, et on peut aisément obtenir du pNIPAM et du pAA avec une masse molaire et un taux de fonctionnalisation choisis.

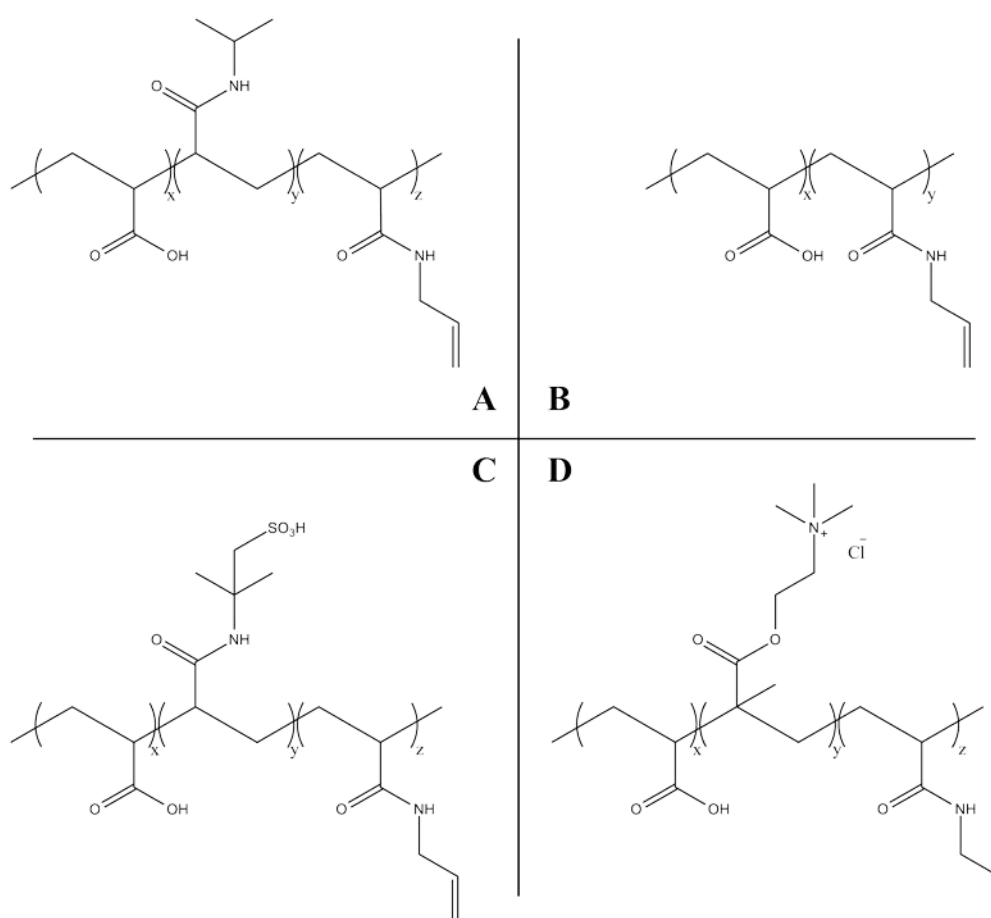


Figure 4 Polymères stimulables fonctionnalisés obtenus par copolymérisation radicalaire avec l'acide acrylique suivi d'une modification par l'allylamine. A – pNIPAM. B – pAA. C – pAMPS. D – pMAETAC.

Les polyélectrolytes forts poly(2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonic acid) (pAMPS) et poly(2-(methacryloyloxy)ethyl-triméthyl-ammonium chloride) (pMAETAC) sont synthétisés -comme le pNIPAM et le pAA- par copolymérisation avec l'acide acrylique puis modification avec l'allylamine (figure 4C et D). Toutefois, les conditions de synthèses sont différentes (utilisation de solvants organiques notamment).

Pour l'obtention de nouveaux polymères thermosensibles fonctionnalisés comme le poly(*N*-isopropylmethacrylamide) et le poly(*N,N*-méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (pNIPMAM et pMADAME), nous explorons une toute autre voie de synthèse : la fonctionnalisation avec des groupes ène est réalisée en une seule étape par copolymérisation du NIPMAM ou du MADAME avec du méthacrylate d'allyle (AMA) (figure 5). La composition de ces copolymères est typiquement comprise entre 98/2 et 95/5, c'est-à-dire que le taux de modification est compris entre 2 et 5%.

La synthèse de ces polymères thermosensibles et des polyélectrolytes forts est l'objet de la thèse d'Ekkachai Martwong au laboratoire SIMM.

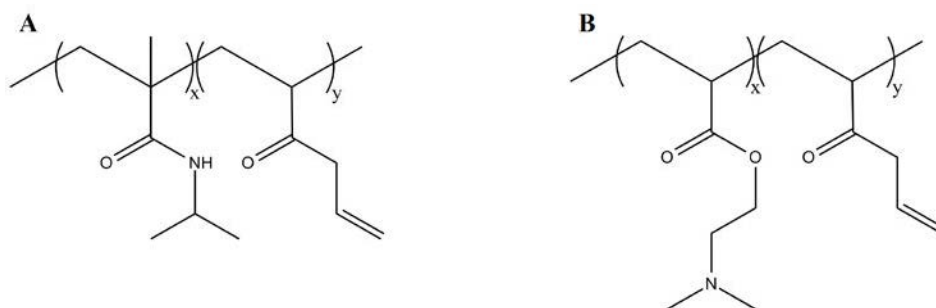


Figure 5 (A) Le copolymère poly (NIPMAM-co-AMA). (B) Le copolymère poly (MADAME-co-AMA)

Une fois les polymères fonctionnalisés obtenus, nous pouvons réaliser la synthèse des films minces d'hydrogels. La synthèse comporte trois grandes étapes :

- la fonctionnalisation des surfaces par une monocouche de thiols;
- l'élaboration et le dépôt de la solution contenant le polymère et le réticulant;
- l'activation de la réaction thiol-ène pour réticuler/greffer le film.

1.3 Traitement de surfaces pour obtenir les fonctionnalisations thiols

Afin d'obtenir des films greffés il est important d'avoir des surfaces propres et fonctionnalisées par des monocouches de thiols. Le traitement diffère en fonction des trois types des surfaces que l'on souhaite utiliser. La possibilité de greffer des films minces sur des substrats variés est un grand avantage de notre stratégie de synthèse. En effet, chaque surface a une utilité spécifique :

- les surfaces de silicium sont utilisées comme surfaces modèles de par leur très faible rugosité et leurs propriétés optiques bien définies. Ce sont notamment ces surfaces qui permettent une caractérisation par ellipsométrie des films obtenus ;
- les surfaces de verres ont un grand intérêt pour l'application microfluidique car leur transparence permet une observation du fonctionnement des puces par microscopie optique. De plus, leur faible coût par rapport au silicium et aux surfaces d'or est un avantage pour la production d'un grand nombre de micro-puces ;
- les surfaces d'or sont utilisées comme électrodes. Nous verrons au chapitre 3 comment elles permettent d'obtenir des vannes activées séparément par chauffage local de la puce microfluidique par effet Joule.

1.3.1 Préparation des surfaces de verre et de silicium

On peut considérer que les substrats de verre et de silicium ont la même chimie de surface. La même méthode est donc utilisée pour fonctionnaliser ces surfaces (figure 6). Le protocole suivant a été adopté :

- les surfaces sont nettoyées, et les groupements silanols de surface activés par un nettoyage piranha. Les plaques sont immergées dans un mélange 70/30 v/v d'acide sulfurique (>95%) et d'eau oxygénée (35%). Le mélange est porté à ébullition par chauffage à 200°C jusqu'à ce que le dégazage de la solution s'estompe (15 à 30 minutes). Les plaques sont ensuite abondamment rincées et mises sous ultra-sons une minute dans l'eau MilliQ. Enfin elles sont séchées sous flux d'azote ;

- les substrats sont immédiatement placés dans un réacteur hermétique. Celui-ci est purgé sous azote pour éviter la présence d'eau. Une autre étape pour éviter la pollution très rapide de la couche d'oxyde et pour activer les silanols de manière efficace est le nettoyage sous UV/ozone pendant 15 minutes ;
- une solution de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane à 3 vol% dans le toluène anhydre est transférée dans le réacteur sous azote. Les plaques sont conservées immergées dans la solution pendant 3 heures. Les surfaces sont alors rincées et mises sous ultra-sons dans du toluène et séchées sous flux d'azote. Les surfaces fonctionnalisées sont stables et peuvent être stockées sans condition particulière.

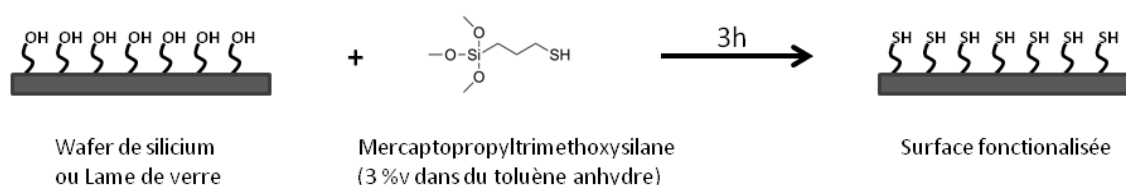


Figure 6 Schéma de fonctionnalisation des surfaces de verre et de silicium. Les surfaces activées sont immergées dans la solution de silane pendant 3 heures, dans un réacteur sous atmosphère d'azote.

1.3.2 Préparation des surfaces d'or

La préparation des substrats d'or est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, les dépôts d'or sont réalisés à l'aide d'un bâti de dépôt métallique par évaporation à très basse pression. Le principe de ces dépôts est de chauffer le métal pour l'évaporer. Le gaz métallique se trouve ainsi projeté sur les substrats à recouvrir. Le dépôt en basse pression permet d'éviter les risques d'oxydation et de collision entre les molécules du gaz métallique, ce qui assure une grande régularité du dépôt. De plus, les couches métalliques sont déposées à un rythme très lent afin d'avoir une faible rugosité de surface. Les dépôts ont été réalisés de la façon suivante :

- les plaques de verres sont d'abord nettoyées par une solution piranha comme décrit précédemment ;

- les plaques de verres sont placées directement dans le bâti de dépôt métallique. Le vide est effectué dans le bâti jusqu'à obtenir une pression inférieure à 10^{-5} mbar ;
- une couche d'accroche de chrome de l'ordre de 3 nm d'épaisseur est déposée en maintenant la pression interne du bâti inférieure à 10^{-5} mbar ;
- une couche de 100 nm d'or est enfin déposée avec une vitesse de dépôt inférieure à 0.2 nm/s.

Nous avons aussi utilisé des substrats d'or commerciaux commandés chez ACM dont la couche d'accroche en chrome et la couche d'or ont des épaisseurs de 15 nm et 120 nm respectivement.

Dans un second temps, les surfaces sont fonctionnalisées. On utilise l'auto-assemblage en monocouche sur des surfaces d'or des alcanethiols en phase liquide [8]. Cet assemblage spontané est réalisé avec des dithiols (figure 7). Cette réaction de greffage simple est effectuée sans précaution particulière (pas d'exigence d'atmosphère contrôlée sans oxygène ou eau) :

- les surfaces d'or sont immergées pendant 2 heures dans une solution de dithioerythritol à 1 mM dans le chloroforme. La réaction est réalisée dans un réacteur fermé afin d'éviter l'évaporation du chloroforme ;
- les substrats sont rincés sous-ultrasons dans le chloroforme avant d'être séchés sous flux d'azote.

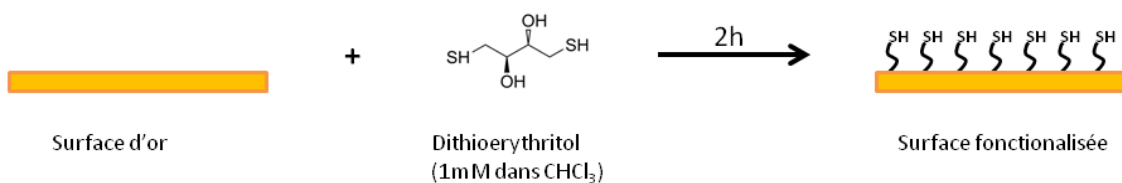


Figure 7 Schéma de fonctionnalisation des surfaces d'or

1.4 Dépôt du film de polymère par spin-coating

L'étape suivante pour obtenir des couches minces d'hydrogel est le dépôt par spin-coating de la solution contenant le polymère fonctionnalisé et le réticulant.

Le spin-coating a été retenue comme méthode de dépôt car elle offre la possibilité d'obtenir des épaisseurs de films de polymères du nanomètre à quelques microns. Cette méthode est largement employée pour obtenir des films uniformes. Elle offre un meilleur contrôle et une meilleure homogénéité de l'épaisseur et une distribution du polymère plus homogène que le spray-coating, et est plus économe en solution de dépôt que le dip-coating.

1.4.1 Conditions de spin-coating

Nous avons utilisé comme réticulant dithiol du dithioerythritol pour sa solubilité dans la solution de polymère pour le spin-coating. Il est utilisé en excès de trente fois par rapport au nombre de fonctions « ène » portées par les chaînes de polymère en solution. Le solvant de la solution doit donc respecter les trois critères suivants :

- solubiliser le polymère ;
- solubiliser le réticulant ;
- avoir une tension superficielle et une volatilité adaptées au spin-coating.

Pour la réalisation d'hydrogels de pNIPAM le co-solvant choisi est un mélange méthanol/butanol 1/1 v/v.

Pour la réalisation de couches de pAA nous avons préféré un mélange méthanol/acide formique 7/3 v/v.

Il est préférable de préparer la solution de polymère plusieurs heures avant le dépôt (notamment pour les polymères de grandes masses molaires), afin que celle-ci soit bien homogène et que le polymère soit totalement dissout. La réaction thiol-ène n'est pas activée dans cette solution à température ambiante. Cependant, par précaution, le réticulant n'est introduit dans la solution que quelques minutes avant le spin-coating. Une

fois la solution homogénéisée, après l'ajout de réticulant, elle est déposée sur la surface par spin-coating pendant 30 secondes à 3000 tours/min.

1.4.2 Fixation de la durée de spin-coating

Pendant la durée de rotation de l'échantillon, l'épaisseur du film décroît puis atteint un plateau. Afin de limiter les écarts d'épaisseur entre des films réalisés dans les mêmes conditions il faut choisir une durée de spin-coating telle que l'épaisseur ne varie plus et a atteint le plateau. Le tableau 1 donne les épaisseurs obtenues pour trois films synthétisés à partir de la même solution de dépôt pour différents temps de rotation. Le choix d'une durée de 30 secondes permet de s'assurer d'une très bonne précision et reproductibilité sur l'épaisseur des films.

Temps de spin-coating (secondes)	25	30	35
Epaisseur sèche du film de polymère (nm)	295	297	294

Tableau 1 Epaisseur sèche de films obtenus avec une solution à 3% en masse pour des chaînes de pNIPAM de masse molaire 230 kg/mol

Après dépôt par spin-coating du mélange réticulant/polymère, la réticulation du réseau et le greffage sont obtenus en plaçant les films pendant 16 heures dans une étuve sous vide à 120°C (voir 2.2.1). En sortie d'étuve les films sont rincés à l'eau MilliQ pour éliminer l'excès de réticulant et les chaînes libres qui n'ont pas réagi et s'assurer que les polymères en surface sont tous accrochés par liaison chimique. Enfin les films sont séchés sous flux d'azote. Après la synthèse des films, les propriétés comme l'épaisseur sèche à l'air et le ratio de gonflement dans l'eau sont mesurées par ellipsométrie (voir annexe I). Pour pouvoir utiliser cette technique de mesure, les films sont réalisés sur des surfaces de silicium.

1.5 Epaisseur des films

L'épaisseur d'un film déposé par spin-coating dépend de facteurs aussi variés que la viscosité de la solution, la vitesse de rotation ou encore le temps de spin-coating. Nous avons décidé de garder la vitesse de rotation constante pour toutes nos synthèses à la valeur de 3000 tours/min, et de fixer le temps de rotation à 30 secondes. La viscosité de la solution permet alors de contrôler l'épaisseur sèche des films d'hydrogel (mesurée à l'air).

1.5.1 Epaisseurs des films secs

Les conditions de spin-coating étant fixées, l'épaisseur des films synthétisés peut être choisie en jouant sur la viscosité de la solution, c'est-à-dire en ajustant la concentration en polymère ou sa masse molaire.

La figure 8A présente l'épaisseur des films en fonction de la concentration massique de polymère dans la solution de dépôt à partir de solutions de pNIPAM de trois masses molaires différentes. On observe que l'épaisseur de film peut être choisie sur une large gamme allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres.

On obtient exactement la même variation d'épaisseur en fonction de la concentration pour des films de pAA et de pNIPAM de même masse molaire (figure 8B). La nature du polymère et du solvant ne semblent donc pas être des grandeurs déterminantes pour l'épaisseur des films.

1.5.2 Effet de la viscosité sur le spin-coating

Comment varie l'épaisseur des films avec la viscosité de la solution de polymère de spin-coating ? C'est la question à laquelle nous avons essayé de répondre. La viscosité dépend deux paramètres:

- la masse molaire du polymère;
- la concentration en polymère dans la solution de dépôt.

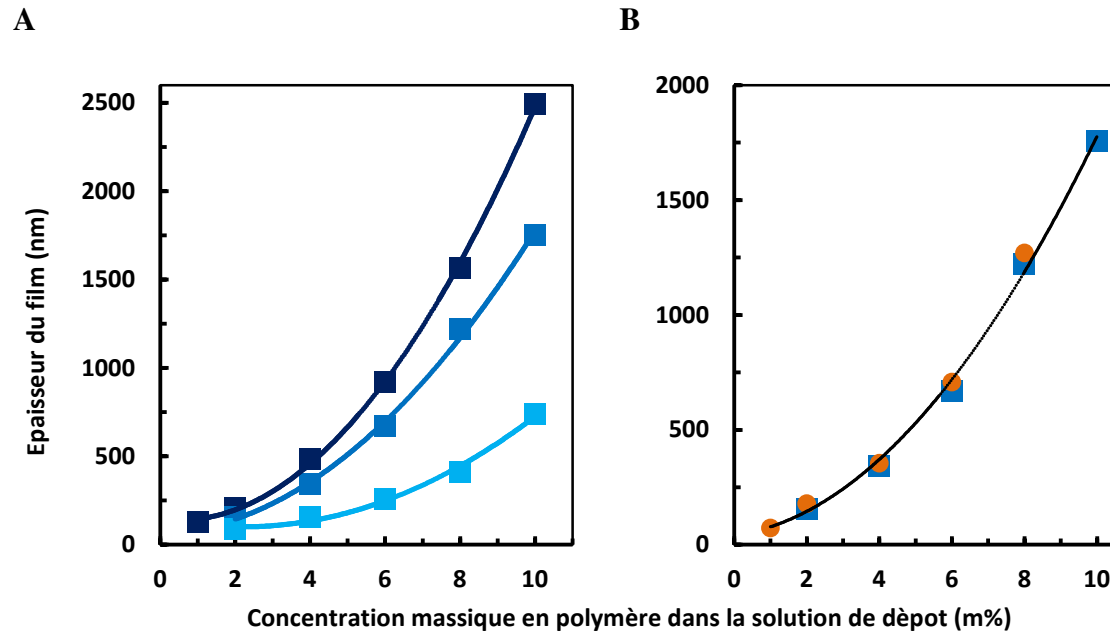


Figure 8 A : Epaisseur sèche de films de pNIPAM en fonction de la concentration de polymère dans la solution de spin-coating pour différentes masses molaires (■ 70 kg/mol, ■ 230 kg/mol, ■ 670 kg/mol). B : Epaisseur sèche de films de ■ pNIPAM et de ● pAA de masses molaires équivalentes (230 kg/mol et 250 kg/mol respectivement) en fonction de la concentration de polymère

Hall et al. ont montré que l'épaisseur de films de polymère obtenus par spin-coating après séchage du solvant s'écrit [9] :

$$h \propto \eta^{1/3} \cdot \omega^{-1/2} \cdot c \quad (\text{éq. 1})$$

où η est la viscosité de la solution de polymère, ω la vitesse de rotation choisie lors du spin-coating et c la concentration en polymère. Cette équation sous estime l'épaisseur obtenue dans les cas où l'évaporation du solvant ne peut être négligée pendant le spin-coating. Les solvants utilisés pour déposer le pNIPAM ou le pAA contiennent une grande proportion de méthanol très volatile. En considérant que tout le solvant était évaporé avant la fin du spin-coating, Extrand a montré que l'on a la relation suivante [10] :

$$h \propto \eta^{1/2} \cdot \omega^{-1/2} \cdot c \quad (\text{éq. 2})$$

La viscosité de solutions de polymères diluées peut s'exprimer en fonction de la concentration et de la masse molaire du polymère comme :

$$\eta \propto c \cdot M^\alpha \quad (\text{éq. 3})$$

avec c la concentration en polymère dans la solution, M la masse molaire et α le paramètre de Mark-Houwink [11, 12]. La valeur du paramètre α est comprise entre 0,5 pour les solvants θ et 0,8 pour les bons solvants. Finalement, la dépendance de l'épaisseur avec la masse molaire et la concentration s'écrit :

$$h \propto \omega^{-1/2} \cdot M^{\alpha/2} \cdot c^{3/2} \quad (\text{éq. 4})$$

Comme toutes les expériences de dépôt par spin-coating ont été réalisées à la même vitesse de rotation (3000 tours/min), nous avons tracé la courbe de l'épaisseur des films présentés sur la figure 8 en fonction de $M^{\alpha/2} \cdot c^{3/2}$, avec $\alpha = 0.8$. La figure 9 montre que toutes les séries de données pour le pNIPAM (pour différentes masses molaires : 70 kg/mol, 230 kg/mol et 670 kg/mol) et le pAA (250 kg/mol) s'alignent sur une courbe maîtresse, en l'occurrence une même droite. La dépendance de la viscosité avec la masse molaire et la concentration est donc bien décrite par le modèle d'Extrand. La nature du solvant et du polymère n'ont ici qu'une très faible influence sur la viscosité de la solution de dépôt et donc sur l'épaisseur des films.

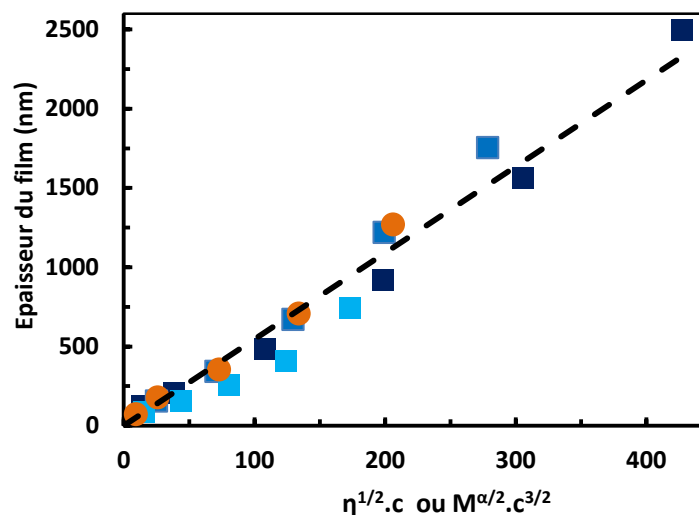


Figure 9 Dépendance de l'épaisseur sèche de films de pNIPAM (de masses molaires ■ 70 kg/mol, ■ 230 kg/mol et ■ 670 kg/mol) et de pAA (● 250 kg/mol) en fonction de la masse molaire et de la concentration en polymère dans la solution de dépôt

Nous avons donc développé une méthode de synthèse simple et versatile de films minces de polymères. Cette méthode exploite la chimie du thiol-ène pour réticuler et greffer un réseau de chaînes polymères préformées et fonctionnalisées. Nous avons illustré la versatilité de cette synthèse par la réalisation de films de pNIPAM et de pAA sur des substrats variés.

Les polymères fonctionnalisés peuvent être obtenus par plusieurs voies de synthèses simples. La synthèse que nous avons privilégiée pour le pNIPAM et le pAA est une synthèse en deux étapes, d'abord une polymérisation radicalaire conventionnelle suivie d'une modification de monomères d'acide acrylique par l'allylamine. Cette synthèse est avantageusement réalisée dans l'eau.

Enfin, nous avons montré comment l'épaisseur des films pouvait être choisie sur une large gamme par le biais de la masse molaire du polymère et de la concentration dans la solution de dépôt.

2 Propriétés stimulables des films d'hydrogels

Ainsi, on peut choisir de façon fine l'épaisseur des films avec la stratégie de synthèse que nous avons développée. Il est également nécessaire de connaître les gonflements de ces films et leur dépendance à l'application d'un stimulus.

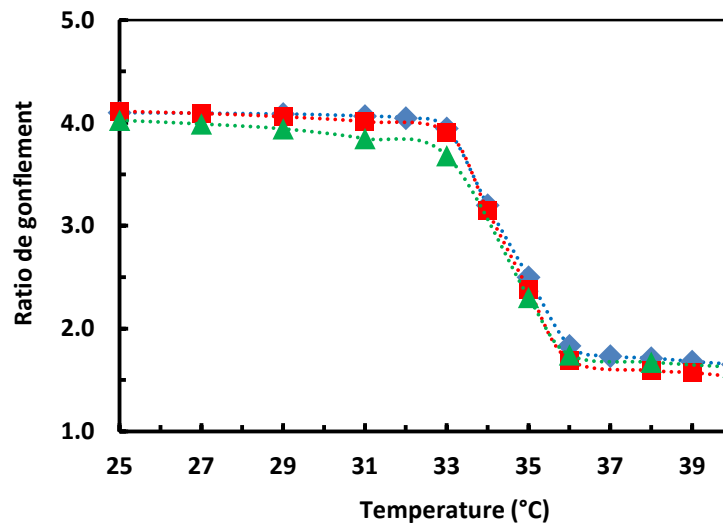
On utilise le ratio de gonflement afin de caractériser le gonflement. Ce ratio est défini comme le rapport entre l'épaisseur du film dans l'eau et l'épaisseur dans l'air. L'humidité peut faire varier la teneur en eau du film dans l'air. Les tests effectués indiquent que cette variation ne dépasse pas 10% pour une humidité allant de 5 à 80% (voir annexe III). On considère donc que l'épaisseur dans l'air est indépendante de l'humidité environnante pour les calculs de ratio de gonflement.

2.1 Propriétés thermo-stimulables des gels de pNIPAM

Les propriétés thermosensibles des films d'hydrogels de pNIPAM ont été montrées en mesurant l'épaisseur des films dans l'eau à différentes températures par ellipsométrie. Les gonflements ont été obtenus pour des films de différentes épaisseurs sèches réalisés à partir du même polymère, fonctionnalisé à 2%, et en utilisant le même excès de réticulant (figure 10A).

Il est difficile d'obtenir des mesures de gonflement très fiables pour des films de pNIPAM d'épaisseurs sèches supérieures à 700 nm par ellipsométrie (l'épaisseur dans l'eau est alors supérieure à 2 μ m). Pour mesurer le gonflement de ces films épais, ils sont intégrés dans un canal microfluidique d'épaisseur connue. Le gonflement du gel va provoquer une diminution du débit dans le canal. Grâce à la connaissance de la relation entre le débit et l'épaisseur libre du canal on peut calculer l'épaisseur du film gonflé (voir chapitre 3, 1.1 pour davantage de détails). Pour montrer qu'il n'y a pas d'effet de confinement et que les propriétés des films sont reproduites sur une très large gamme d'épaisseur nous avons ainsi mesuré les ratios de gonflement d'un film sec de 1200 nm d'épaisseurs à 25, 34 et 40°C (figure 10B). Le gonflement est le même pour tous les films quelle que soit leur épaisseur (de la centaine de nanomètres à plusieurs microns).

A



B

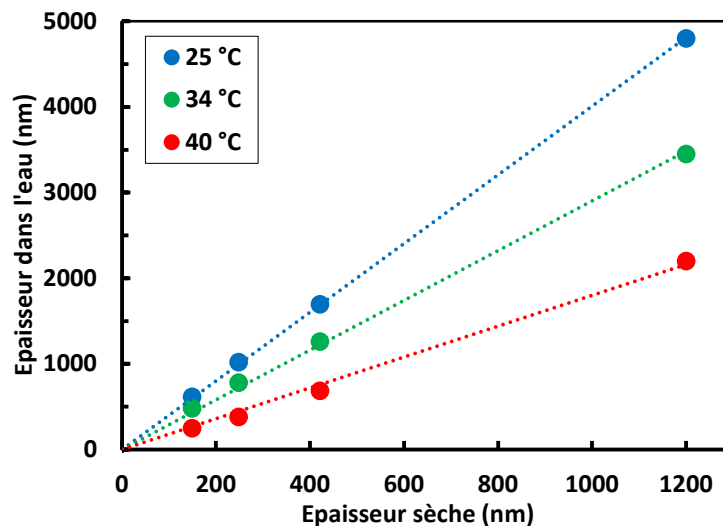


Figure 10 A - Ratios de gonflement pour des films de pNIPAM (taux de modification 2%) d'épaisseurs sèches différentes en fonction de la température (♦ 150 nm, ■ 250 nm, ▲ 420 nm). B – Ratios de gonflement à 25°C (bleu), 34°C (vert) et 40°C (rouge) pour des films d'épaisseurs sèches allant de 150 nm à 1,2 μm .

Le ratio de gonflement est de 4 pour des températures inférieures à la LCST et de 1,5 pour des températures supérieures à la LCST. Cette valeur de 1,5 a été aussi obtenue par les équipes de Kuckling [3] et de Toomey [13, 14]. Le gonflement à l'état effondré est différent de 1, car l'eau n'est pas entièrement expulsée et les hydrogels de pNIPAM conservent une teneur en eau de l'ordre de 30%.

Il est à noter que l'amplitude de la transition de gonflement/dégonflement pour ces films d'hydrogels de pNIPAM est assez élevée (de l'ordre de 3). On obtient la même température de transition de 34°C pour tous les films, indépendamment de l'épaisseur. La température de transition est plutôt attendue à 32°C (et c'est ce que l'on obtient sur les mesures microfluidiques, voir chapitre 3). Par manque de temps, la fiabilité du thermostat de l'ellipsomètre n'a pas été mesurée, mais cette mesure sera effectuée prochainement. La transition est assez abrupte et s'opère sur une plage de seulement 3°C (de 33 à 36°C) ce qui est très intéressant pour les applications exploitant les propriétés thermo-stimulables des hydrogels, comme les micro-vannes.

Concernant la densité de réticulation, on suppose qu'elle est la même pour tous les films. En effet, les hydrogels ont été synthétisés avec le même copolymère fonctionnalisé à 2% et le même excès de réticulant dithioerythritol. Si toutes les conditions expérimentales sont les mêmes - exceptée l'épaisseur des films - il n'y a pas de raison pour que les hydrogels soient chimiquement différents. La réticulation est à priori homogène car les polymères et le réticulant sont déposés de façon homogène (tous les réactifs sont parfaitement dissous dans la solution de dépôt).

En tout état de cause, le taux de réticulation réel ou les hétérogénéités de réticulation sur l'épaisseur du gel sont très difficiles à caractériser. Par exemple, le taux de modification étant de l'ordre de 2%, la spectroscopie IR n'est pas assez sensible pour quantifier la réticulation. Les mesures en XPS ne sont pas non plus pertinentes car elles ne permettent de sonder que quelques nanomètres superficiels de la couche de gel. La mesure des ratios de gonflement est donc le moyen le plus simple et efficace que nous pouvons utiliser pour caractériser la chimie des films d'hydrogels et comparer les taux de réticulation obtenus avec différentes conditions de synthèse.

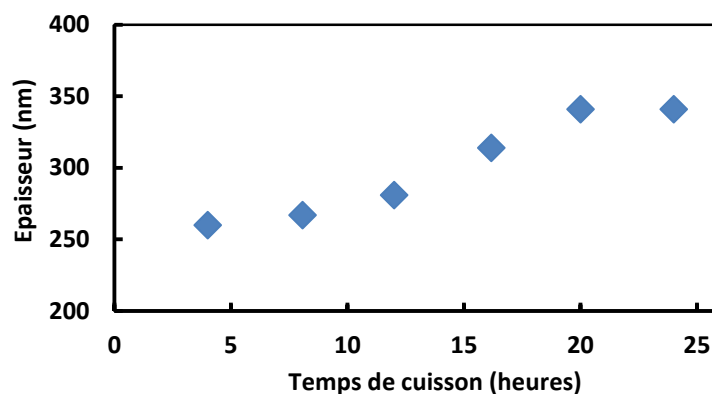
2.2 Variation du taux de réticulation

Le taux de réticulation peut être dépendant de l'avancement de la réaction thiol-ène et donc des conditions de synthèse des films. Le taux de réticulation doit aussi dépendre du taux de modification des polymères utilisés. Ces deux points sont discutés ci-dessous.

2.2.1 Influence du temps de réaction

Pour réaliser la synthèse des films la réaction de réticulation/greffage est activée thermiquement à 120°C pendant 16 heures. Nous avons réalisé une étude de la cinétique de la réaction thiol-ène pour s'assurer que ce temps était bien suffisant pour garantir une bonne reproductibilité des propriétés des films. Plusieurs échantillons ont été préparés à partir d'une même solution de dépôt puis placés à l'étuve pour un temps de réaction variable entre 4 et 24 heures. Le polymère utilisé est un pNIPAM de masse molaire $M_w = 250$ kg/mol, avec un taux de modification de 3%. Il est concentré à 3% en masse dans la solution de dépôt. Un excès de réticulant de 30 fois par rapport aux fonctions « ène » a été introduit. Après réticulation, les échantillons sont rincés et séchés. L'épaisseur sèche et les gonflements dans l'eau à 25°C et à 40°C des films ont été mesurés par ellipsométrie.

A



B

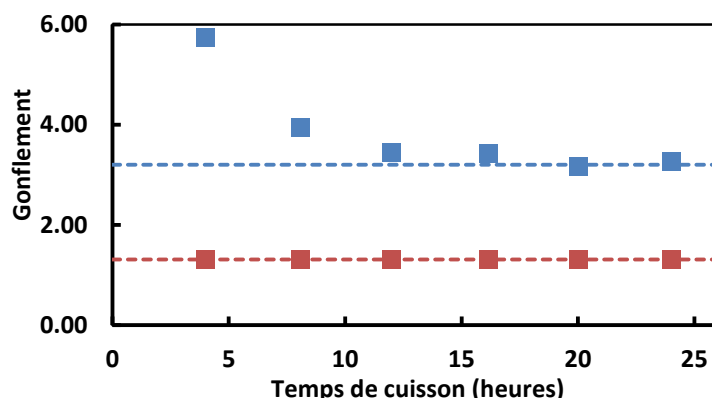


Figure 11 Influence du temps de chauffage. (A) Epaisseur sèche de films de pNIPAM (250 kg/mol, à partir de solution de dépôt à 3% en masse) en fonction du temps de réaction. (B) Ratios de gonflement de ces films dans l'eau à 25°C (symboles bleus) et à 40°C (symboles rouges)

L'épaisseur sèche des films augmente lentement avec le temps de réaction et atteint un plateau après 16 heures (figure 11A). La différence d'épaisseur peut être due à une réaction de réticulation/greffage incomplète et à une extraction des chaînes libres lors du rinçage.

On observe une décroissance du gonflement à 25°C à mesure que le temps de réaction augmente. A partir de 16 heures de recuit des films, le gonflement à 25°C se stabilise vers la valeur de 3 (figure 11B). Cette décroissance s'explique par l'avancement de la réaction de réticulation. En effet, moins l'hydrogel est réticulé plus son gonflement doit être important. La réaction de réticulation/greffage est donc complète au bout de 16 heures.

Un temps de réaction supérieur n'influence plus les propriétés de l'hydrogel. En revanche un temps plus court donne un film moins réticulé avec une épaisseur sèche moins bien contrôlée. Enfin l'épaisseur du film dans l'eau à 40°C ne dépend pas de la réticulation de l'hydrogel. L'effondrement du polymère à des températures supérieures à la LCST ne dépend que de la nature chimique du polymère employé et de son affinité avec le solvant.

2.2.2 Influence du taux de modification des polymères

La mesure de l'épaisseur des films à l'état gonflé est une façon de contrôler la synthèse de l'hydrogel car le gonflement nous renseigne sur la densité de réticulation. Plus un gel est faiblement réticulé plus le gonflement sera important. Le gonflement des hydrogels greffés sur une surface est contraint à la dimension perpendiculaire à la surface (les dimensions de la surface sont infinies comparées à la dimension de l'épaisseur), alors qu'un hydrogel libre gonfle dans les 3 directions. Toomey et al. ont montré que la théorie de Flory-Rehner appliquée au gonflement unidirectionnel était adaptée aux hydrogels greffés [4, 15]. Ils ont déterminé le ratio de gonflement (degree of swelling S) en fonction de la proportion de groupes photo-réliculables (de 0.5% à 14.3%) sur des films de 100 nm d'épaisseur (figure 12).

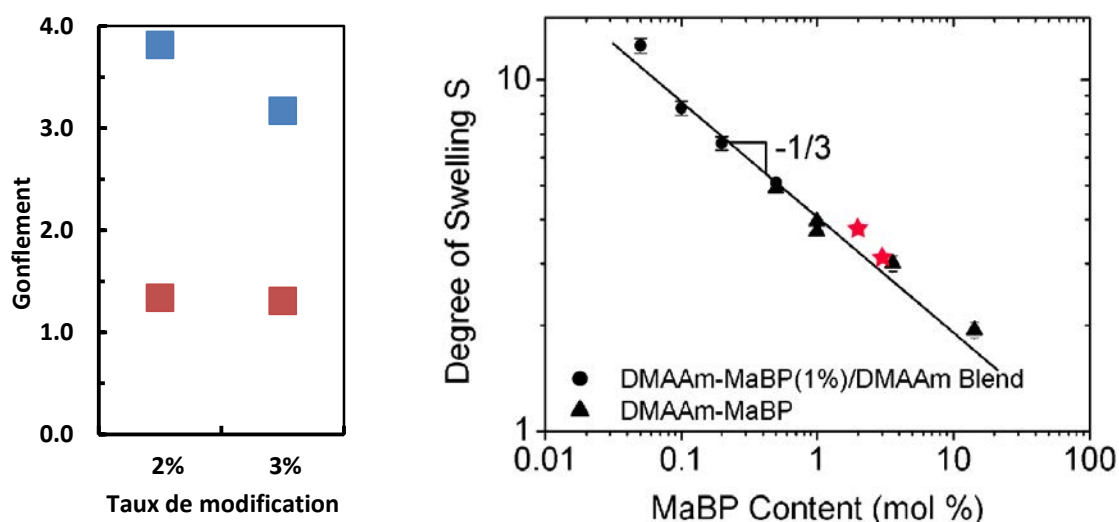


Figure 12 A gauche : Ratios de gonflement d'hydrogels de pNIPAM dans l'eau à 25°C (symboles bleus) et à 40°C (symboles rouges) en fonction du taux de fonctionnalisation en groupes diènes. A droite : Ratios de gonflement d'hydrogels de DMAAM-MaBP en fonction du taux de réticulation (reproduit de [4]) et comparaison avec les gonflements de nos gels de pNIPAM dans l'eau à 25°C (étoiles rouges)

Dans notre cas, des mesures de gonflement à 25°C et 40°C dans l'eau sur des films de pNIPAM synthétisés à partir de polymères modifiés à 2 et 3% ont été réalisées. Les ratios de gonflement de 4 et 3 obtenus avec des polymères modifiés à 2 et 3% respectivement sont en bon accord les résultats de Toomey et al (figure 12).

En résumé, concernant la synthèse et l'avancement de la réaction thiol-ène, nous avons montré que 16 heures d'activation thermique sont nécessaires à l'obtention de films minces reproductibles. Concernant les propriétés stimulables des films d'hydrogels de pNIPAM, ils présentent tous une LCST à 34°C indépendante de l'épaisseur du film et du taux de modification. Le gonflement dans l'eau (pour des températures inférieures à la LCST) et donc l'amplitude du changement de volume peut être ajusté par le taux de modification.

2.3 Propriétés pH-sensibles des gels de pAA

Le degré de gonflement du pAA est dépendant du pH, car il dépend du taux de conversion des groupes carboxyliques en carboxylates. Cette dissociation est observée à pH élevé (pH > pKa). Dans l'eau MilliQ (pH ~6), le pAA est faiblement gonflé (voir

tableau 2). Pour obtenir un gonflement plus important, il est nécessaire d'immerger le film d'hydrogel dans une solution tampon de pH élevé.

Les contre-ions nécessaires à la neutralité des charges dans les polyélectrolytes sont la source d'une force osmotique qui augmente le gonflement par rapport aux gels neutres. Avec un pAA modifié à 2%, on observe un délaminage du film dû à un gonflement trop important lors de l'immersion dans une solution tampon à pH 9 (tampon pH 9,21 CrisonTM). Pour les mesures de gonflement, un film réalisé avec un pAA modifié à 4% a donc été utilisé (tableau 2).

Immergé dans une solution de soude ajustée à pH 9.2 (force ionique 10^{-5}), le film de pAA présente le même état de gonflement que dans l'eau (tableau 2). Il faut utiliser une solution tampon à pH 9 de force ionique élevée pour obtenir le pAA à l'état ionisé gonflé.

Condition de mesure	Eau MilliQ	pH 9,2 (NaOH)	Tampon pH 9
Epaisseur (nm)	780	765	1370
Gonflement	2,1	2,1	3,7

Tableau 2 Epaisseurs et ratios de gonflement d'un film de pAA (épaisseur sèche 370 nm, $M_w = 250\text{kg/mol}$, taux de modification 4%) dans différents milieux aqueux

Pour comprendre l'absence d'augmentation de gonflement du pAA dans la solution à pH 9,2, estimons le nombre d'ions basiques disponibles pour neutraliser les fonctions acides de pAA dans la cellule de mesure de l'ellipsomètre. Expérimentalement, une surface de 2 cm^2 de film de pAA est mise en contact avec quelques millilitres de solution. Le nombre N_{OH^-} d'ions basiques peut être estimé par :

$$N_{OH^-} = C[OH^-] * V \sim 10^{-5} 10^{-3} \sim 10^{-8} \text{ Moles} \quad (\text{éq. 5})$$

où $C[OH^-]$ est la concentration en soude de la solution et V le volume de la cellule de mesure. Le nombre N_{AA} de monomères d'acide acrylique peut lui être estimé ainsi :

$$N_{AA} = H * S * d \sim 400.10^{-9} * 2.10^{-4} * 10^4 \sim 10^{-6} \text{ Moles} \quad (\text{éq. 6})$$

où H est l'épaisseur sèche du film, S la surface du film et d la densité en monomères dans le film sec (de l'ordre de 10^4 Moles/m^3). Il y a donc un déficit de deux ordres de grandeurs en ions de neutralisation. En d'autres termes, le volume de solution de soude dans la chambre de l'ellipsomètre ne fait pas office de réservoir.

Cet effet de neutralisation des hydrogels de pAA a déjà été observé dans des études sur les super-absorbants. Quand il est hydraté, l'acide acrylique, faible, ne se dissocie pas réellement. La dissociation doit être favorisée par ajout d'une base. En revanche, des acides forts comme le pAMPS peuvent se dissocier sans être neutralisés. Le gonflement des gels de pAMPS est donc beaucoup moins dépendant du pH que le gonflement du pAA (figure 13) [16, 17].

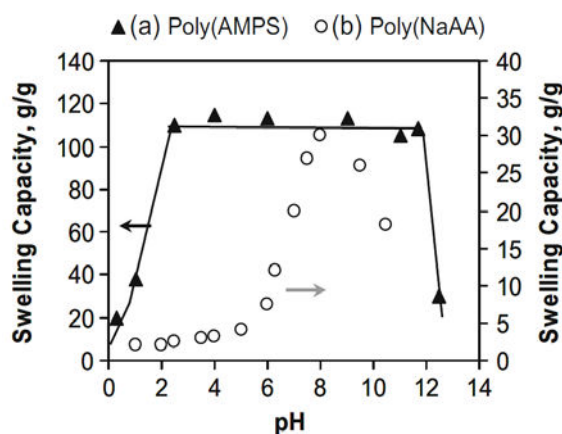


Figure 13 Courbes représentant la dépendance en pH du gonflement d'hydrogels de pAMPS (nano-composites contenant 6% d'argile) et d'hydrogel de pAA (d'après [17]).

Des d'applications, comme la culture cellulaire, peuvent nécessiter un pH neutre. Pour réaliser des actuateurs microfluidiques sensibles au pH ou activés par un champ électrique, il serait donc préférable d'utiliser des polyélectrolytes forts comme le pMAETAC ou le pAMPS.

2.4 Bilan

La synthèse de films déposés sur un substrat fonctionnalisé requiert le suivi d'un processus spécifique. Les différents tests réalisés ont montré que :

- l'épaisseur peut être finement contrôlée, sur une gamme allant de 100 nm à plusieurs microns, via la concentration en polymère dans la solution de dépôt et sa masse molaire ;
- le gonflement des films minces dépend du taux de modification du polymère (i.e. du taux de réticulation de l'hydrogel). Il est de 4 pour les polymères modifiés à 2% que nous utilisons ;
- les propriétés stimulables des hydrogels ne dépendent pas de l'épaisseur des films ;

Les épaisseurs des films, leurs propriétés de transition et les valeurs de gonflement obtenues correspondent aux critères exigés pour des polymères utilisables pour la microfluidique. Concernant les films de pAA, notons tout de même que l'obtention de l'état gonflé nécessite quelques précautions évitables par l'utilisation de polyélectrolytes forts.

Les films minces d'hydrogels répondent donc aux deux premiers critères du cahier des charges microfluidiques, mais ils ne sont pas « localisés », condition indispensable à la réalisation de vannes ou d'actuateurs microfluidiques. La réalisation de dépôts localisés est l'objet de la section suivante.

3 Synthèse de films d'hydrogel par irradiation UV

Du point de vue de la synthèse des films il reste donc un dernier verrou à la réalisation de micro-vannes à films minces d'hydrogels. Il s'agit de la réalisation de dépôts localisés. La mise en place d'un protocole permettant de tels dépôts est décrite dans cette section.

3.1 Mise au point du procédé

Dans le cadre de travaux précédents, il a été proposé d'obtenir des motifs en localisant le greffage de l'hydrogel sur le substrat [18]. La fonctionnalisation locale de la surface permet d'obtenir un greffage local du gel. En nettoyant la surface dans l'eau et à l'aide d'un bain à ultra-sons, la portion non greffée de l'hydrogel est supprimée. Il fallait donc préparer des substrats fonctionnalisés localement avec des fonctions thiols.

Le protocole de préparation de ces substrats à partir d'une couche d'or était le suivant (figure 14) :

- la couche d'or est recouverte avec une résine positive ;
- la résine positive est insolée à travers un masque reproduisant les dessins d'hydrogels que l'on veut obtenir ;
- la résine est développée ;
- la couche d'or et la couche d'accroche de chrome sont dissoutes ;
- la surface de verre mise à nue est silanisée en phase gazeuse (avec du perfluorooctyltrichlorosilane) pour la rendre hydrophobe ;
- les restes de résine positive protégeant les dessins d'or sont dissous ;
- les dessins d'or sont fonctionnalisés par des dithiols suivant le protocole décrit précédemment en 1.3.2.

Cette stratégie comporte plusieurs limites comme le montre la figure 15. On constate que la rupture du réseau polymère entre les zones greffées et non greffées n'est pas franche. De plus, des portions d'hydrogels peuvent s'adsorber sur la surface de verre et ne sont pas enlevées au rinçage. Enfin, l'utilisation prolongée du bain à ultra-sons peut conduire au dégreffage de l'hydrogel même sur les dessins d'or.

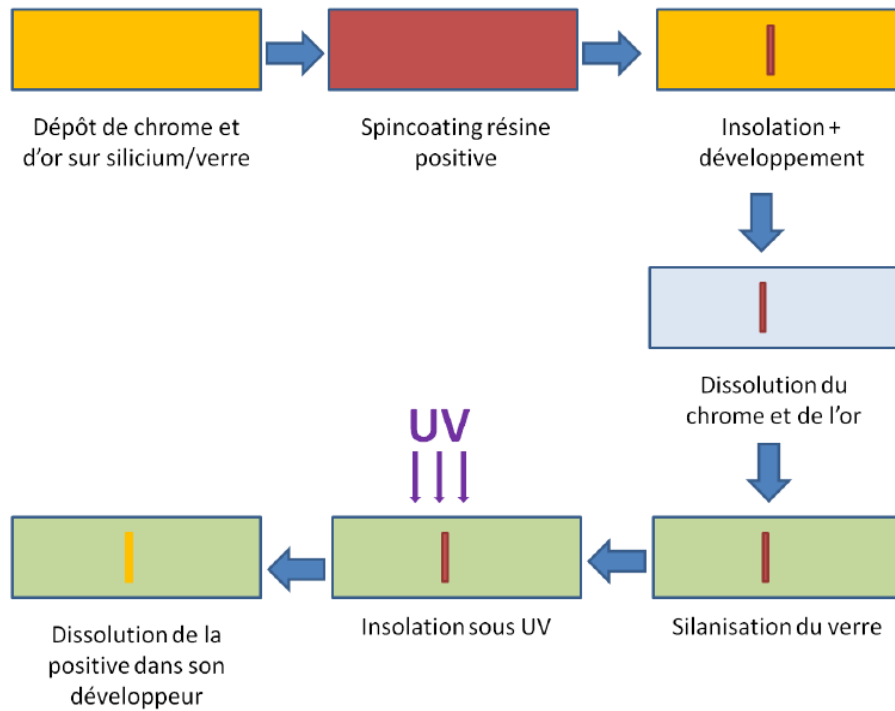


Figure 14 Protocole de préparation de substrat localement fonctionnalisé thiol (extrait de la thèse de Clémence Vergne [18])

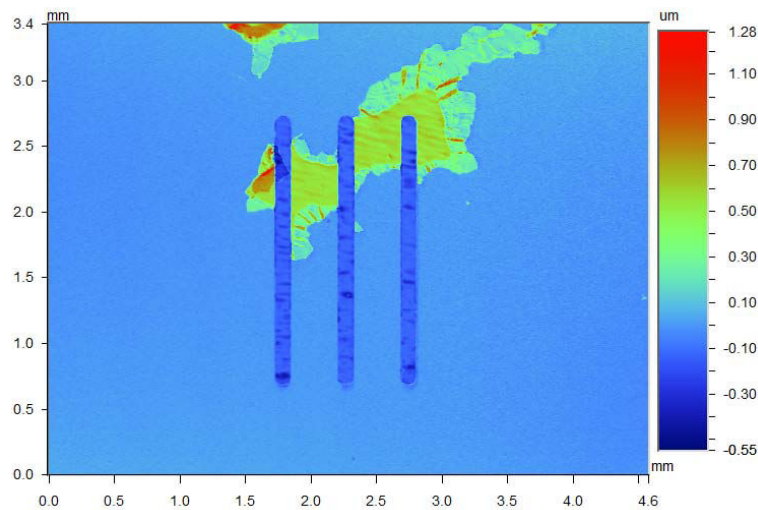


Figure 15 Image par profilométrie optique d'un dépôt de pNIPAM réalisé par activation thermique sur un substrat à motifs. Le substrat de verre apparaît en bleu clair (teinte du zéro). L'hydrogel bien greffé sur les motifs d'or apparaît en épaisseurs négatives (bleu foncé). Des résidus de pNIPAM adsorbés à la surface ou accrochés aux motifs greffés apparaissent en épaisseurs positives (teintes vertes et rouges).

Cette méthode de localisation montre donc une reproductibilité faible et un taux d'échec important. La réalisation de l'activation de la réaction de réticulation/greffage locale a été une solution expérimentée dans cette thèse.

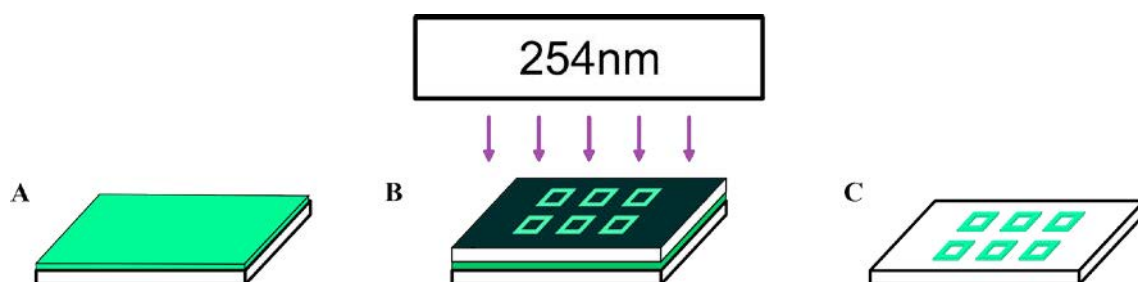


Figure 16 Principe de la photolithographie négative. A Dépôt de la solution réticulable. B Irradiation au travers d'un photo-masque. C Développement par élimination de l'excès non réticulé.

Pour obtenir les moules servant à la fabrication de puce microfluidique en PDMS on utilise couramment la photolithographie dont le principe est illustré figure 16 :

- on dépose une solution photo-réticulable sur un substrat ;
- on appose un masque sur la surface ;
- on irradie la surface pour réticuler la résine là où le masque permet le passage de lumière ;
- après réaction, le masque est retiré et l'excédent de résine non réticulée (i.e. non irradiée) est retiré par rinçage.

On souhaite appliquer une stratégie de photolithographie négative semblable - la solution de polymère fonctionnalisé et de réticulant faisant office de résine - pour synthétiser nos hydrogels. La synthèse par initiation des réactions thiol-ène et thiol-yne sous irradiation UV à 365 nm est décrite dans la littérature [19, 20]. L'inconvénient de cette méthode est la nécessité de photo-initiateurs de type Irgacure. Plus intéressant est une étude publiée par Caruso et al. qui montre que la réaction thiol-ène peut être activée par irradiation en UV profond (à 254 nm) sans ajout d'initiateur ou de catalyseur [21]. Cette méthode d'activation par irradiation en UV profond est plus proche de ce que nous recherchons.

La possibilité d'utiliser une telle activation de la réaction thiol-ène pour établir un protocole de photolithographie permettant l'obtention de motifs d'hydrogels minces greffés à la surface a donc été testée.

3.2 Temps d'irradiation

Pour tester l'activation par irradiation UV à 254 nm et déterminer les paramètres d'irradiation qui permettent l'obtention des films réticulés et greffés, une étude cinétique de la réaction thiol-ène activée par UV a été réalisée. Plusieurs échantillons ont été préparés à partir d'une même solution de dépôt, puis placés sous une lampe UV. La puissance lumineuse reçue par les échantillons est de 1 mW/cm^2 . Les échantillons sont rincés et séchés à différents temps d'irradiation pour être caractérisés. L'épaisseur sèche des films ainsi obtenus est mesurée par ellipsométrie.

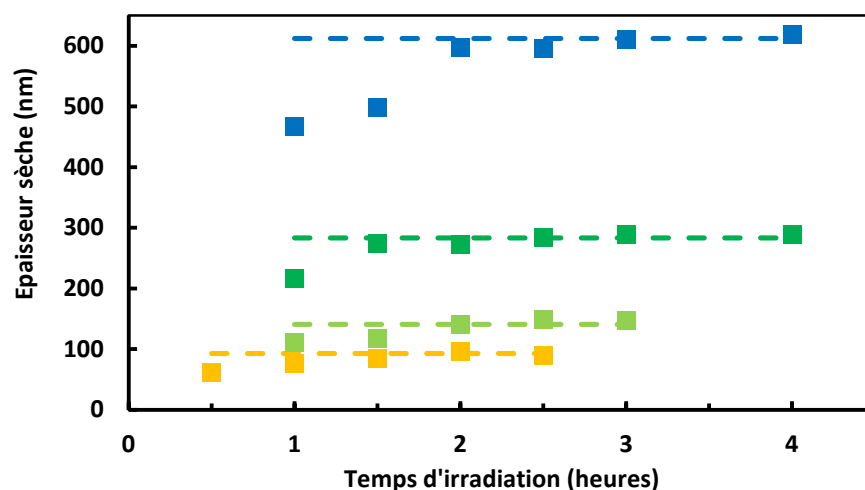
Plusieurs séries d'étude de la cinétique ont été réalisées avec des films obtenus à partir de concentrations différentes en polymère dans la solution de spin-coating, et avec deux polymères différents. Les polymères utilisés sont :

- un pNIPAM de masse molaire $M_w = 250 \text{ kg/mol}$, avec un taux de modification de 2% ;
- un pAA de masse molaire $M_w = 250 \text{ kg/mol}$, avec un taux de modification de 2%.

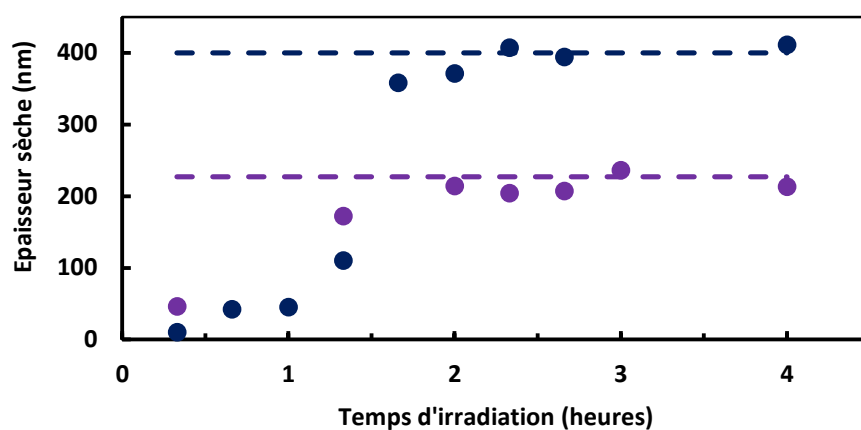
Un excès de réticulant de 30 fois par rapport aux fonctions ène a été introduit dans chaque solution. Pour le pNIPAM les tests ont été effectués avec des solutions concentrées à 1%, 2%, 3% et 5%. Pour le pAA nous avons effectué les tests avec des solutions à 2% et 4%.

La figure 17 présente l'évolution des épaisseurs obtenues en fonction du temps d'irradiation. On observe que toutes les séries tendent vers un plateau après quelques heures. Ce plateau correspond à l'épaisseur obtenue sur un film témoin réalisé à partir de la même solution de dépôt mais dont la réaction thiol-ène a été activée thermiquement à 120°C pendant 16 heures.

A



B



C

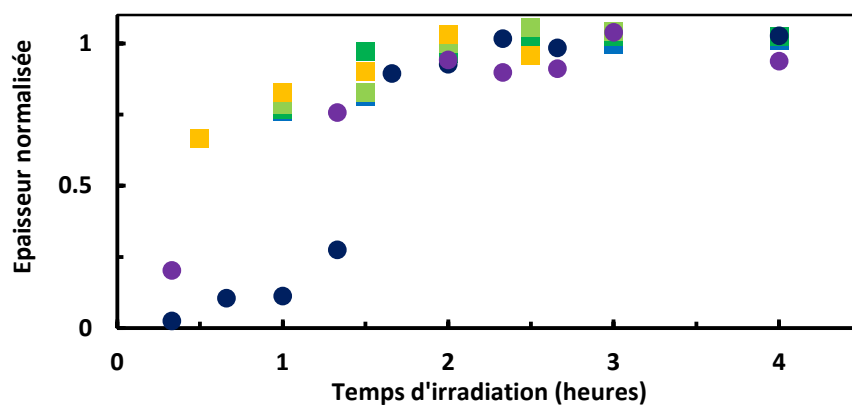


Figure 17 Epaisseur de films d'hydrogels en fonction du temps d'irradiation à 254 nm. (A) Films de pNIPAM à partir de solutions concentrées à : 1%, 2%, 3% et 5% en masse de polymère. (B) Films de pAA à partir de solutions concentrées à : 2% et 4% en masse. (C) Epaisseurs des films normalisées par la valeur du plateau.

Pour analyser l'influence de la concentration (ou de l'épaisseur des films) sur la cinétique de la réaction, toutes les séries ont été normalisées par l'épaisseur du témoin (figure 17C). Toutes les données se rassemblent sur une courbe maîtresse. Quels que soit le type de polymère et l'épaisseur des films réalisés, une durée de 2 heures d'insolation est suffisante pour atteindre le plateau et obtenir un film d'épaisseur reproductible.

L'activation UV permet un gain de temps par rapport à l'activation thermique. Ce gain de temps peut être encore supérieur avec une source UV offrant une puissance plus élevée. En effet, la grandeur déterminant l'avancement de la réaction est l'énergie reçue par unité de surface

$$E = P * t \quad (\text{éq. 7})$$

où P est la puissance lumineuse atteignant la surface et t le temps d'exposition. Cependant, une trop forte dose d'énergie par radiation UV peut provoquer un vieillissement accéléré des polymères. Cet effet est observé pour des films insolés sur des temps plus longs (figure 18).

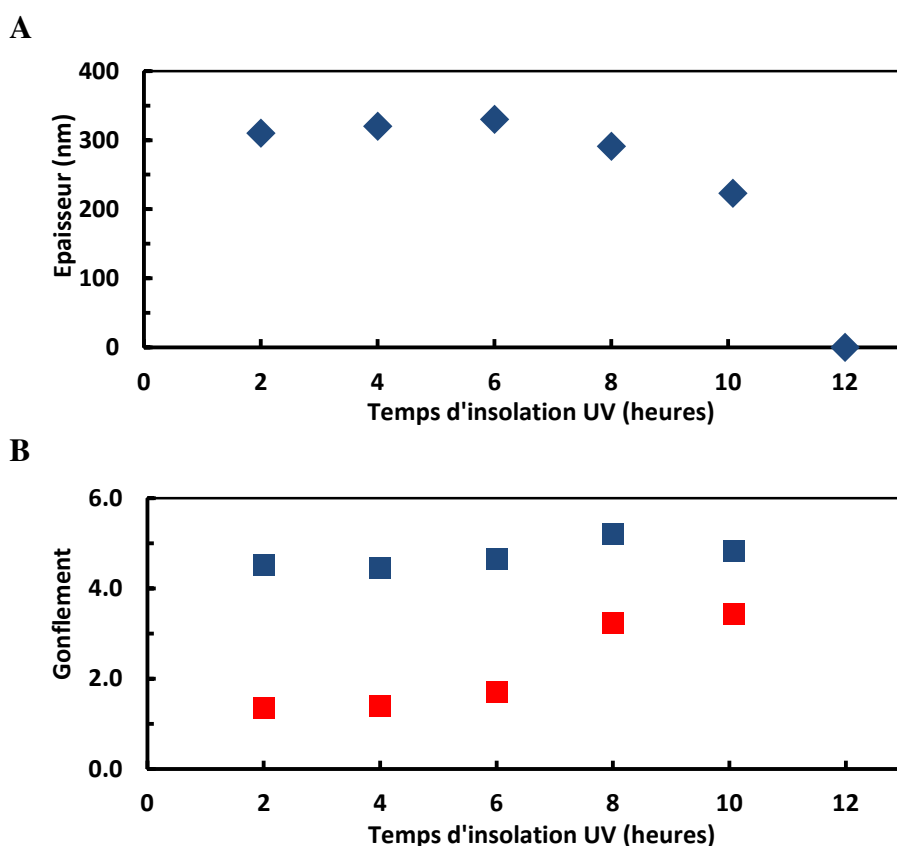


Figure 18 (A) Épaisseurs de films de pNIPAM en fonction du temps d'insolation. (B) Gonflement de ces films de pNIPAM à 25°C (symboles bleus) et à 40°C (symboles rouges)

Pour une durée entre 2 heures et 6 heures d'insolation, l'épaisseur sèche des films reste constante (figure 18A). Ce plateau correspond à l'épaisseur d'un film réticulé thermiquement (voir figure 17). En revanche, l'épaisseur chute après 8 heures d'exposition, et à 12 heures le film est totalement détruit. Si la mesure de l'épaisseur sèche est une indication sur la formation des films, les propriétés de gonflement des films sont liées à la réticulation du réseau de polymère. Les gonflements de ces films à 25°C dans l'eau sont relativement stables même après 8 heures (figure 18B), ce qui indique que le taux de réticulation varie peu. En revanche les gonflements à 40°C augmentent fortement pour des durées d'irradiation avec dégradation des films. Le gonflement à 40°C ne dépend pas du degré de réticulation mais de la nature chimique du polymère. La dégradation observée par irradiation UV prolongée est sans doute due à la dégradation même des motifs NIPAM. Malheureusement, la seule analyse du gonflement ne permet pas d'en savoir d'avantage sur les modifications chimiques apportées à l'hydrogel pour des temps d'exposition prolongés.

En conclusion, avec une puissance lumineuse de 1 mW/cm^2 , les films sont obtenus de façon reproductible, avec une épaisseur et un gonflement contrôlés, pour une durée d'insolation UV de 2 heures à 6 heures à la longueur d'onde de 254 nm. En d'autres termes, l'énergie nécessaire à la réticulation/greffage du film vaut $E_{\text{ret}} \sim 7 \text{ J/cm}^2$, et pour obtenir un film non dégradé, l'insolation doit apporter à la surface une énergie inférieure à 21 J/cm^2 .

3.3 Réaction thiol-ène : irradiation UV et chauffage thermique ?

Il y a donc deux types d'activation de la réaction thiol-ène pour obtenir des films de réseaux polymères réticulés et greffés :

- une activation thermique pendant 16 heures à 120°C sous vide permet de réaliser un revêtement sur toute la surface traitée ;
- une activation par irradiation UV à 254 nm pendant 2 heures permet de réaliser des dépôts localisés.

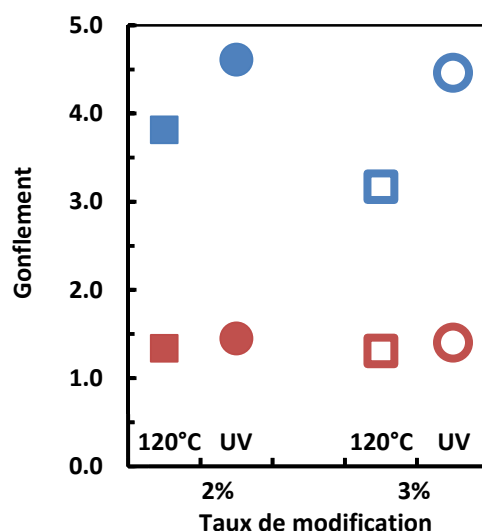


Figure 19 Comparaison des propriétés de gonflement d'hydrogels de pNIPAM en fonction de la méthode de réticulation ($\square$: réticulés thermiquement, $\circ$: réticulés par irradiation UV) et du taux de modification (symboles pleins : pNIPAM modifié à 2%, symboles vides : pNIPAM modifié à 3%) (symboles bleus : gonflement à 25°C, symboles rouges : gonflement à 40°C).

Nous avons réalisé des films selon ces deux méthodes à partir de deux polymères de pNIPAM modifiés à 2 et 3% et de masses molaires comparables. Les gonflements dans l'eau à 25°C de ces films obtenus par activation thermique diminuent avec le taux de modification (figure 19), comme nous l'avons déjà indiqué au 2.2.2. La même tendance s'observe pour les films synthétisés par UV. Pour chaque taux de modification, l'activation UV donne un gonflement plus important que l'activation thermique. Cela indique que le rendement de la réaction de réticulation est probablement plus faible avec l'activation UV par rapport à l'activation thermique.

Afin de mieux comprendre la différence entre les gels obtenus par activation UV ou thermique, nous avons réalisé des spectres d'absorption FTIR-ATR (voir annexe II). Les substrats que nous avons utilisés sont des prismes de silicium (guides d'ondes) fonctionnalisés avec le mercaptotrichlorométhoxysilane. La forte absorption des substrats de silicium pour des nombres d'onde inférieurs à 1600 cm^{-1} (caractéristique des liaisons O-H, Si-O et Si-Si) rend inexploitable les spectres dans cette gamme. Un certain nombre d'information peut cependant être extrait de la gamme $4000 - 1600\text{ cm}^{-1}$.

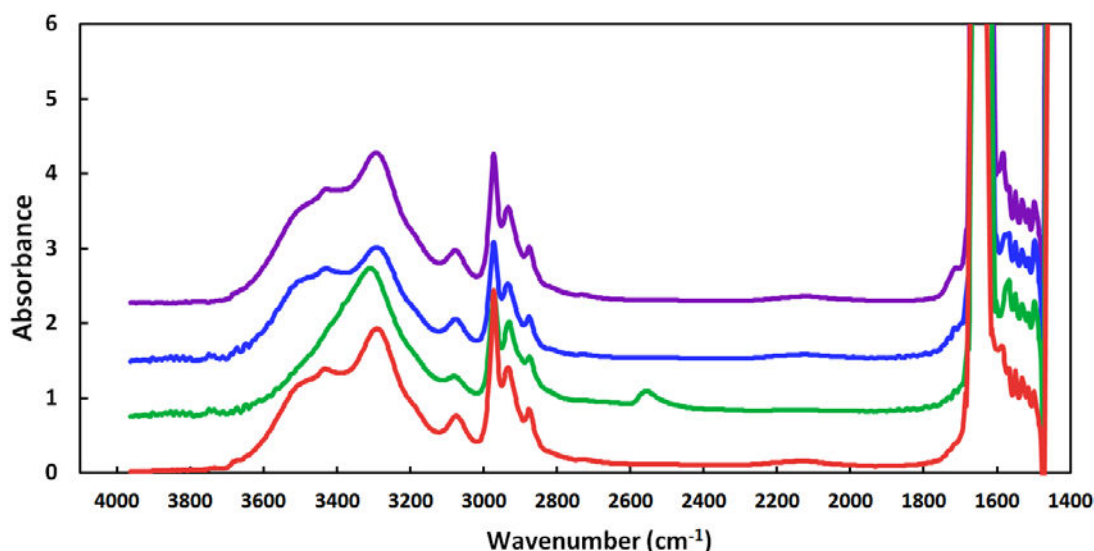


Figure 20 Spectres FTIR-ATR de films de pNIPAM. Les spectres d'absorptions sont réalisés sur des films de pNIPAM à la surface de prismes en silicium (guides d'ondes) : film spin-coaté de pNIPAM seul (rouge), film spin-coaté de pNIPAM et dithioerythritol (vert), film d'hydrogel de pNIPAM obtenu par synthèse thermique (bleu), film d'hydrogel de pNIPAM obtenu après 2 heures d'irradiation UV (violet).

La figure 20 montre les spectres suivants :

- (a) film de pNIPAM seul (rouge) ;
- (b) film de pNIPAM mélangé à du réticulant (vert) ;
- (c) film d'hydrogel de pNIPAM réticulé thermiquement (bleu) ;
- (d) film d'hydrogel de pNIPAM réticulé par insolation à 254 nm (violet).

Tous les spectres présentent les mêmes bandes d'absorption entre 3100 et 2800 cm^{-1} caractéristiques des vibrations d'élongation, symétrique et antisymétrique, de groupes CH, CH₂ et CH₃. Les spectres (a), (c) et (d) montrent un pic à 3430 cm^{-1} dû au groupe amide (N-H) du pNIPAM. Ce pic est masqué sur le spectre (b) par un pic d'absorption large et fort à 3300 cm^{-1} caractéristique des groupes O-H (et des liaisons hydrogènes) que l'on trouve sur le dithioerythritol introduit en large excès. Le pic à 2500 cm^{-1} trahit aussi la présence du réticulant sur le spectre (b) (élongation des liaisons S-H). La disparition de ces deux signatures du dithiol sur les spectres (c) et (d) s'explique par la consommation du réticulant dans la réaction thiol-ène et par l'élimination de l'excès de dithioerythritol lors du rinçage des films.

Malheureusement, il n'est pas possible de voir de différences entre films obtenus par les deux méthodes de réticulation. Cela s'explique par deux raisons principales :

- le pic d'absorption caractéristique de la liaison S-C formée lors de la réticulation apparaît à un nombre d'onde faible (vers 700 cm^{-1}) ;
- les changements de liaisons liés à la réaction thiol-ène sont difficilement observables car le taux de modification du pNIPAM n'est que de 2%.

Les deux méthodes de synthèse donnent donc des films similaires qui se distinguent simplement par une réticulation légèrement plus faible dans le cas de l'activation UV. Opportunément, le gonflement plus important obtenu par activation UV est intéressant pour l'application microfluidique, car la réalisation de motifs d'hydrogel pour réaliser des actuateurs s'accompagne d'un meilleur contraste entre l'état gonflé et l'état effondré.

3.4 Le cas des polyélectrolytes

Avec le pAA, la synthèse par irradiation UV fonctionne de manière satisfaisante pour des films minces (épaisseurs inférieures à 500 nm), avec la même cinétique que pour les synthèses de films de pNIPAM (cf 3.2, figure 17). Les propriétés pH-sensibles des films sont les mêmes avec les deux méthodes de réticulation.

Pour les films plus épais (épaisseurs supérieures à 500 nm), la synthèse par irradiation UV entraîne un mauvais greffage des hydrogels. Ce mauvais greffage est mis en évidence sur la figure 21 où des films de pAA obtenus à partir de solutions de dépôts de plus en plus concentrées en polymères sont photographiés après réticulation par irradiation et rinçage dans l'eau MilliQ. Jusqu'à une concentration massique de 4% (épaisseur sèche de 400 nm), les films sont intacts après rinçage. Au-delà, on observe de larges zones où les films d'hydrogels ont délaminé.

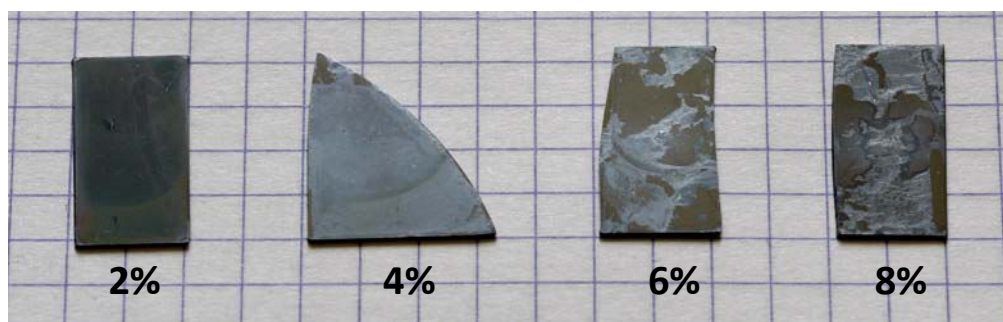


Figure 21 Films de pAA (250kg/mol) obtenus par activation UV pour différentes concentrations de dépôt, après rinçage dans l'eau MilliQ (Echelle : quadrillage de 5 mm).

Avec la synthèse thermique, les films de pAA sont bien greffés à la surface quelles que soit leurs épaisseurs (ou la concentration de la solution de dépôt) (figure 22). En revanche, au-delà de la même valeur seuil de 4% en masse dans la solution de dépôt, un changement d'aspect des films est observé : les films les plus minces sont transparents et présentent une coloration dépendante de l'épaisseur (franges de Newton) ; les films les plus épais ont un aspect mat.

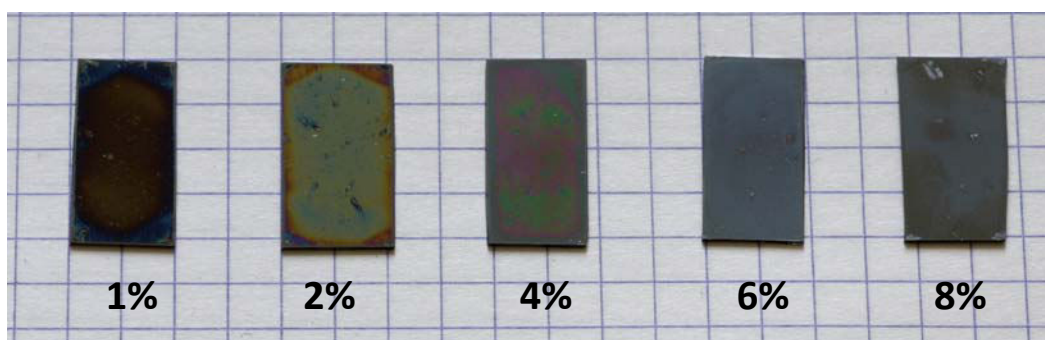


Figure 22 Films de pAA (250kg/mol) obtenus par activation thermique pour différentes concentrations de dépôt, après rinçage dans l'eau MilliQ (Echelle : quadrillage de 5 mm).

Nous n'avons pas, au cours de cette thèse, eu le temps pour mener une investigation complète sur ce problème. On peut cependant avancer l'hypothèse suivante : le solvant utilisé pour le dépôt du pAA n'est pas suffisamment bon, et au-delà de 5% en masse la solution de polymère n'est pas homogène (le polymère n'est pas soluble). Lors du dépôt, le polymère est susceptible de se condenser par endroit au lieu d'être déposé de façon uniforme à l'état vitreux. Cette inhomogénéité de phase serait à l'origine de l'aspect mat et diffus des films et préviendrait le bon greffage des films sur la surface.

Pour résoudre le problème du mauvais dépôt des films épais de polyélectrolytes, nous proposons deux stratégies :

- trouver un meilleur solvant du pAA qui soit aussi adapté au dépôt par spin-coating ;
- en conservant le solvant actuel, expérimenter le dépôt par dip-coating qui permet d'obtenir des films plus épais que le spin-coating à concentration en polymère égale dans la solution de dépôt.

3.5 Dépôts localisés : réalisation des masques

Les motifs sont obtenus en utilisant un masque entre le dépôt de polymère et la lampe UV. Les masques doivent être transparents pour la longueur d'onde 254 nm aux endroits où l'on souhaite obtenir un motif et opaque ailleurs. Pour cela, les masques sont réalisés sur des plaques de quartz. En effet, le verre ou les feuilles plastiques utilisés habituellement pour réaliser des masques de micro-fabrication sont opaques à 254 nm.

Les masques de quartz ont été réutilisés et recyclés par souci d'économie. Nous avons donc choisi de réaliser les masques avec un dépôt de chrome épais (opaque à 254 nm) qui peut-être dessiné par photolithographie.

Les masques sont obtenus de la façon suivante :

- les plaques de quartz sont nettoyées par une solution de piranha ;
- une couche de 100 nm de chrome est déposée à la surface du quartz par évaporation à très basse pression ;
- le design est réalisé sur ordinateur et des masques classiques en plastiques sont imprimés ;
- le design est transféré à la surface du quartz par un procédé de lithographie du chrome illustré sur la figure 23.

Sur la figure 24A, des motifs de pNIPAM de 200 μm de côté et de 800 nm d'épaisseur ont été préparés sur un substrat d'or. L'image a été obtenue par profilométrie optique, le substrat est présenté en gris foncé et le dépôt d'hydrogel en tons clairs proportionnels à l'épaisseur.

Sur la figure 24B, on peut observer des motifs de pNIPAM d'une résolution de 6 μm pour une épaisseur de 250 nm sur un substrat de silicium. Les images ont été obtenues en réflexion avec un microscope en lumière blanche. Le silicium réfléchissant apparaît blanc et les motifs de pNIPAM apparaissent en tons sombres.

Nous n'avons pas mené d'étude systématique et précise sur la résolution accessible par cette méthode, mais l'expérience acquise lors de la micro-fabrication de puces microfluidiques nous permet de l'estimer à une vingtaine de microns pour des films de 2 à 3 microns d'épaisseur.

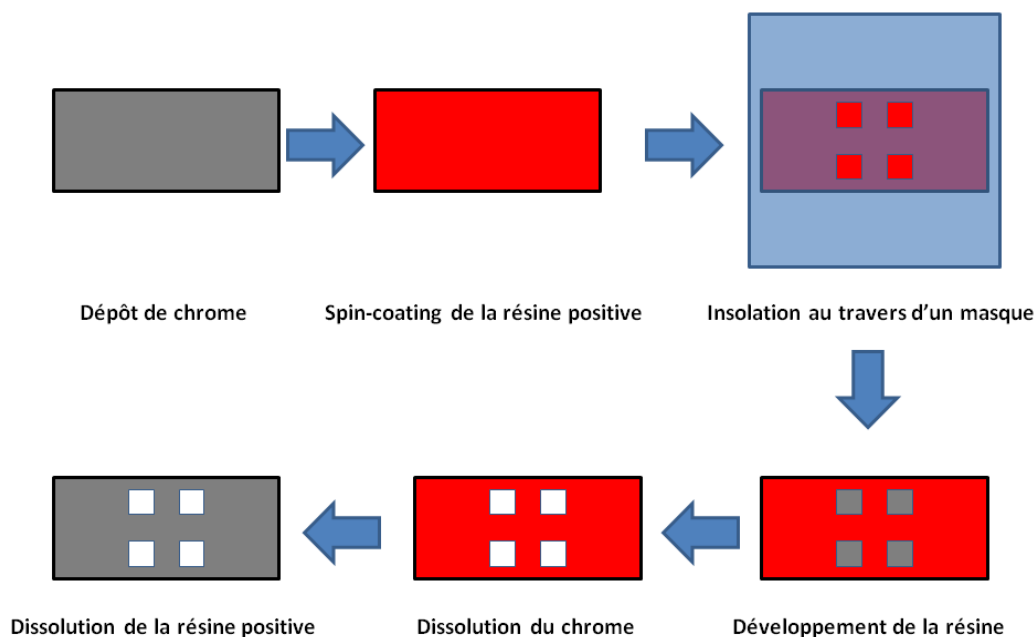


Figure 23 Procédé de photolithographie du chrome

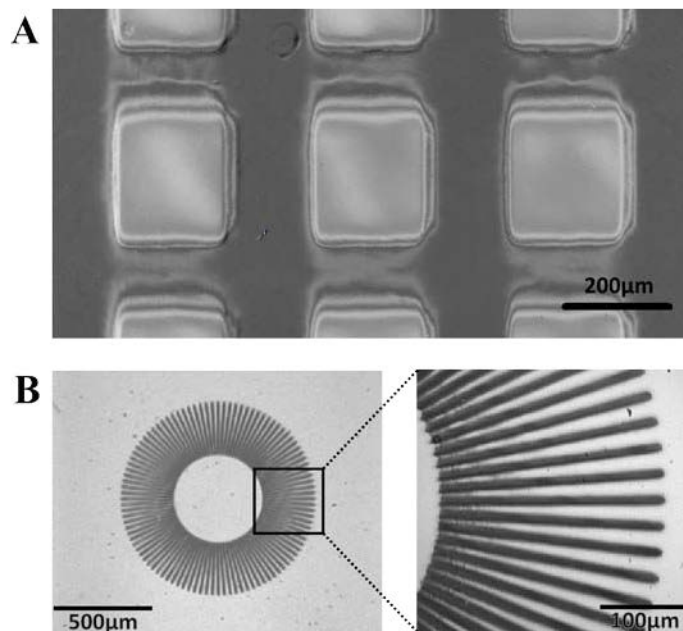


Figure 24 Dépôts d'hydrogels de pNIPAM en motifs localisés

3.6 Lithographie laser : une alternative à la réalisation des masques

Une alternative efficace et performante à l'usage de masques est le recours à une source de lumière collimatée et focalisée, c'est-à-dire un laser. Cela permet d'irradier avec une grande précision le dépôt de polymère de façon localisée. En déplaçant le spot laser sur la surface on peut obtenir des motifs de formes souhaitées. La puissance d'un spot laser étant plus élevée que celle fournie par une lampe à fluorescence on s'attend à un gain de temps sur la réticulation du gel. De plus, cette méthode apporte une économie de moyen et de temps car il n'est plus nécessaire de préparer les photo-masques en chrome sur lame de quartz. Ce procédé de lithographie laser a été testé avec un système DILASE 650 du fabricant KLOÉ, en collaboration avec Loïc D'Eramo, doctorant au laboratoire Gulliver.

3.6.1 Principe

Le schéma de fonctionnement de la DILASE 650 est présenté figure 25. La machine comprend deux lasers émettant aux longueurs d'onde 266 nm et 365 nm, deux lignes de traitement optique et une platine porte-échantillon mobile.

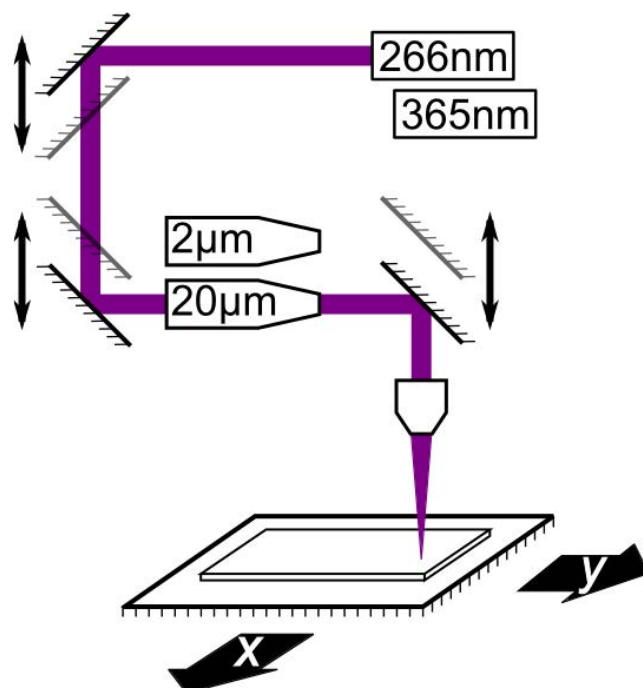


Figure 25 Schéma de fonctionnement de la DILASE

Le laser à 365 nm est utilisé en particulier pour insoler les résines employées habituellement pour la micro-fabrication des puces microfluidiques. Le laser à 266 nm a été ajouté spécialement pour la synthèse de films minces exploitant la chimie du thiol-ène. La longueur d'onde utilisée au cours d'une expérience est sélectionnée grâce à un miroir mobile. Un second miroir mobile permet d'orienter le faisceau laser vers l'une ou deux lignes optiques. Ces lignes optiques fixent la taille du spot laser qui viendra irradier la surface. Deux tailles de diamètre de spot sont possibles : 2 μm et 20 μm . Enfin, un troisième miroir oriente le faisceau vers un objectif de microscope qui peut être réglé en hauteur et permet la focalisation du faisceau sur la surface. La surface à irradier est tenue sur une platine mobile. Le motif d'irradiation souhaité est défini par le déplacement du substrat, le spot laser restant fixe.

Pour obtenir les bonnes conditions d'irradiation (i.e. la bonne quantité d'énergie sur la surface), l'utilisateur a accès à deux paramètres : la puissance du laser et la vitesse d'écriture (c'est-à-dire la vitesse de déplacement du substrat).

3.6.2 Paramètres d'irradiation

Les deux lignes optiques doivent être calibrées. Pour réaliser la calibration nous avons préparé une mire de cent carrés (10x10). Chaque carré est dessiné par un unique passage du spot laser. Sur chaque ligne de la mire la vitesse d'écriture est constante et la puissance du laser varie de 10% à 100% par pas de 10%. Sur chaque colonne la puissance du laser est constante et les vitesses d'écriture varient de 0,02 mm/s à 0,2 mm/s pour la calibration de la ligne optique à 20 μm . Elles varient de 0,2 mm/s à 2 mm/s pour la calibration de la deuxième ligne optique.

La figure 26A montre un profil optique des gels obtenus après application de la mire d'exposition avec le spot laser de 20 μm de diamètre. Nous avons utilisés un pNIPAM modifié à 2% avec une masse molaire de 250 kg/mol concentré à 10% en masse dans la solution de dépôt. Lors du rinçage du gel, les carrés sous-exposés sont éliminés (dans le coin supérieur droit). Les carrés moyennement exposés sont légèrement ondulés, cela est dû au flambage lors du gonflement des hydrogels faiblement réticulés [22].

Le profil optique de la figure 26A permet d'extraire l'épaisseur moyenne de chaque carré de gel. On peut alors produire une « carte de calibration » qui présente l'épaisseur de gel obtenue en fonction des paramètres d'irradiation de la lithographie laser : la vitesse d'écriture et la puissance du laser (figure 26B). Sur la figure 26C est présentée la carte de calibration pour la ligne optique de 2 μm . Les vitesses d'écriture sont plus élevées avec cette deuxième ligne car la puissance lumineuse est concentrée dans un spot plus petit. Un temps d'exposition plus court est donc suffisant pour atteindre l'énergie nécessaire à la réticulation.

Plus précisément, lors de la lithographie laser, une portion de gel est insolée pendant un temps donné par

$$t \sim \frac{\phi}{v} \quad (\text{éq. 8})$$

où ϕ est le diamètre du spot et v la vitesse d'écriture. Notons P la puissance du laser, mesurée en % (nous n'avons pas pu mesurer cette puissance en Watt, nous connaissons seulement le paramètre de commande). La puissance lumineuse atteignant la surface dépend de la taille du spot laser et s'écrit

$$P_{\text{surface}} \sim \frac{P}{\phi^2} \quad (\text{éq. 9})$$

L'énergie reçue par une portion de gel est alors donnée par

$$E \sim P_{\text{surface}} * t \sim \frac{P}{\phi * v} \quad (\text{éq. 10})$$

A puissance du laser constante, l'énergie dépend du produit du diamètre du spot et de la vitesse. Des vitesses 10 fois plus élevées doivent donc être utilisées avec la ligne à 2 μm par rapport à la ligne à 20 μm .

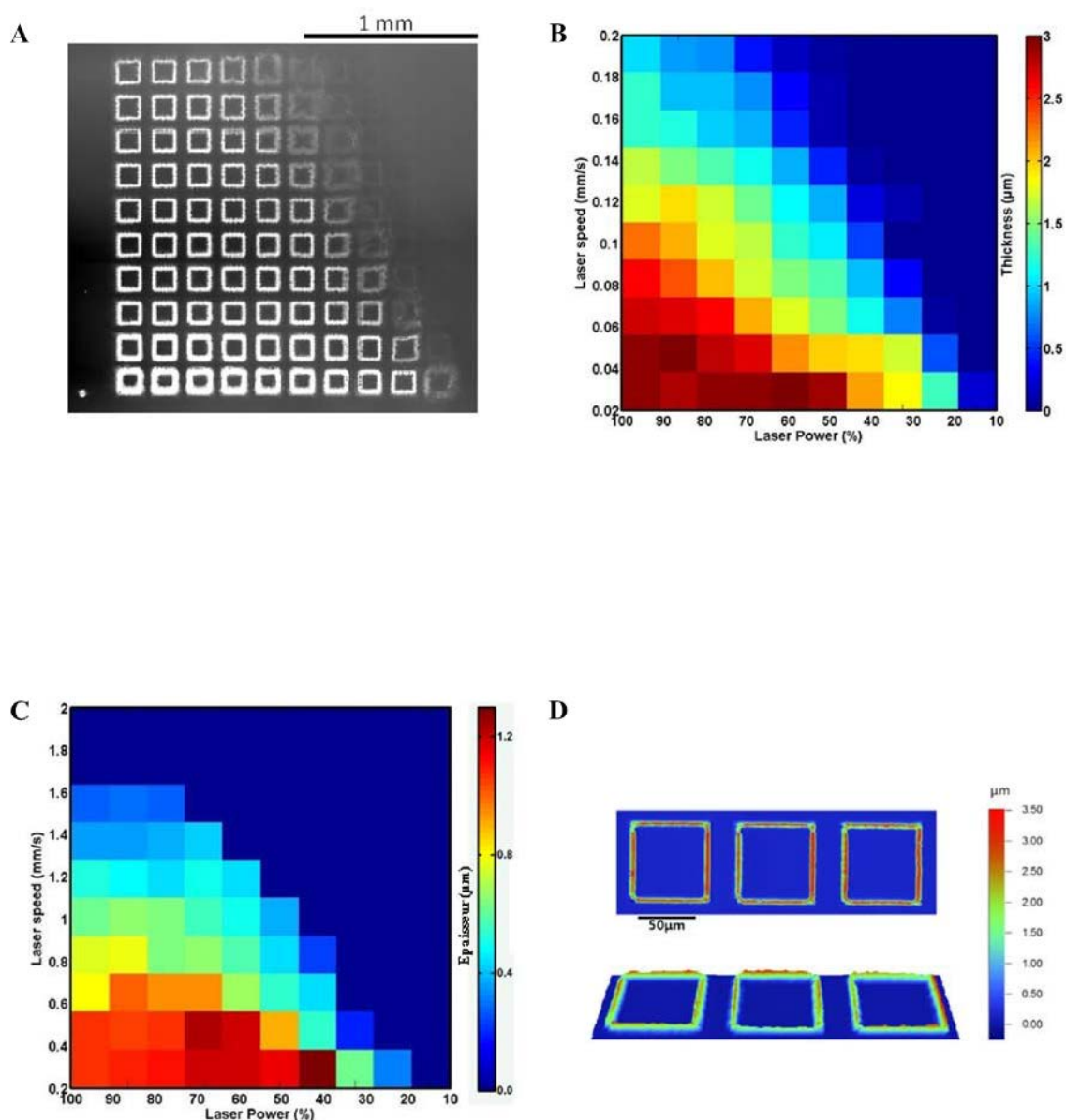


Figure 26 Calibration de la DILASE pour réaliser la lithographie laser des films d'hydrogels. A - Profil optique de la mire de calibration pour le spot de 20 µm (le substrat est en tons sombres, le gel en tons clairs). B - Carte de calibration pour le spot de 20 µm (épaisseur en fonction de la vitesse d'écriture et de la puissance du Laser). C - Carte de calibration pour le spot de 2 µm. D - Profils vu de dessus et vu 3D de motifs obtenus avec le spot de 2 µm.

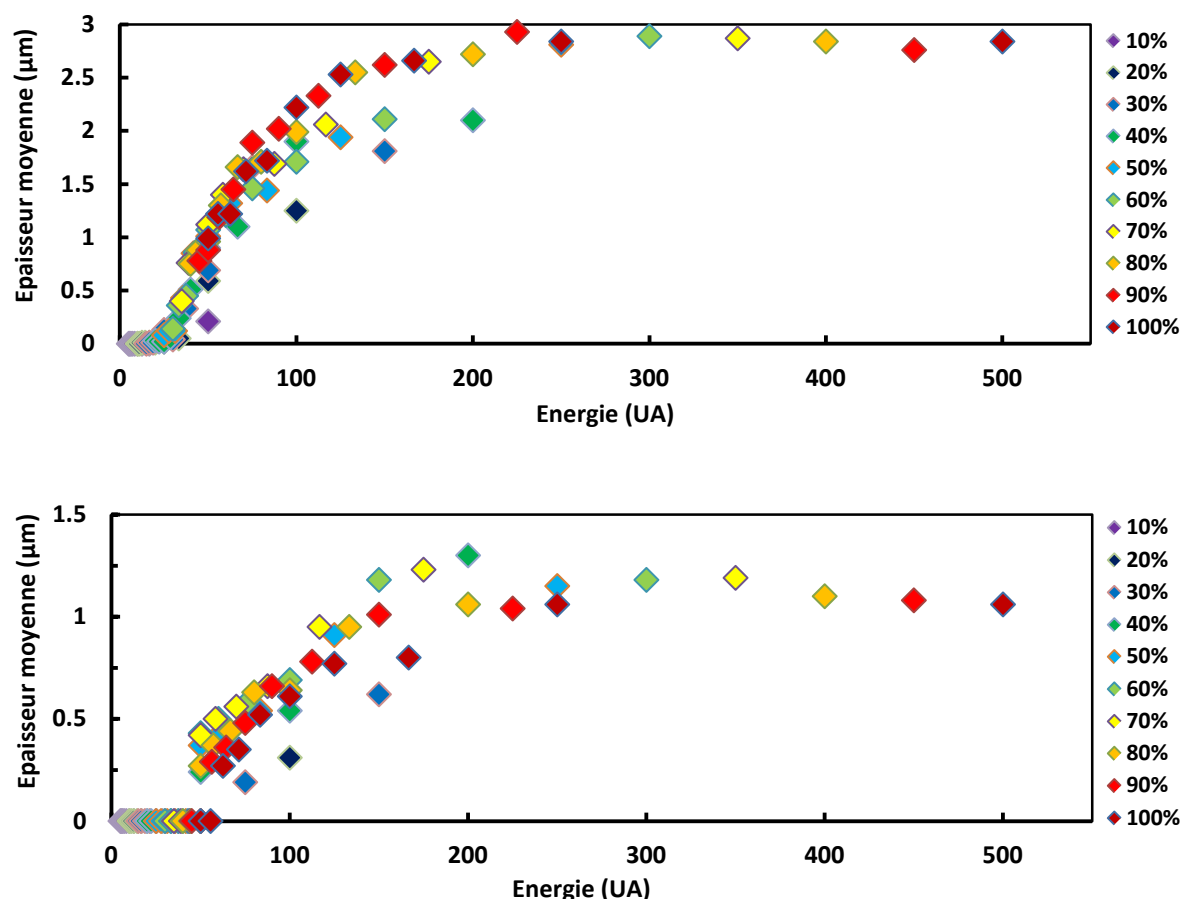


Figure 27 Epaisseur d'hydrogel en fonction de l'énergie reçue par irradiation lors de la lithographie laser. En haut : avec le spot laser de 20 μm. En bas : avec le spot laser de 2 μm.

Les cartes de calibration peuvent alors être représentées sur un graphique montrant l'épaisseur des films en fonction de l'énergie reçue par les portions de films réticulées (figure 27). La cinétique de la réaction thiol-ène est similaire à celle obtenue par l'activation avec la lampe à fluorescence. L'énergie minimale nécessaire pour atteindre le plateau en épaisseur est de 200 UA (Unité Arbitraire). Pour réaliser la lithographie laser sur des films minces d'hydrogels, il faut donc utiliser des paramètres de réglage de la DILASE (vitesse d'écriture et puissance du laser) tels que :

$$200 < E \sim \frac{P}{\phi * v} < 600 \quad (\text{éq. 11})$$

où P est exprimé en %, v en mm/s et ϕ en microns. Des motifs réalisés avec le spot de 2 μm dans la bonne fenêtre d'exposition sont présentés figure 26D. Ces motifs montrent une résolution de 5 μm pour 3 μm d'épaisseur.

En conclusion, la lithographie laser est une alternative très intéressante à la lithographie négative classique. Bien qu'elle représente un investissement plus important, elle permet une économie de temps sur la synthèse des films et dispense de la réalisation des masques. En outre, la résolution accessible avec le spot de 2 μm permet une amélioration de la résolution d'un facteur 4 sur les films épais de plusieurs microns.

Conclusion

Nous avons couplé une expertise en physico-chimie des polymères à la compréhension des contraintes inhérentes à la micro-fabrication des puces. Cette double compétence a permis la mise en lumière des lacunes liées à la méthode de synthèse d'hydrogels utilisée jusqu'à présent pour réaliser des vannes. Les contraintes que doivent satisfaire les micro-vannes à films minces d'hydrogels stimulables ont ainsi pu être mieux définies.

La nouvelle stratégie de synthèse de films minces par la réticulation et le greffage de polymères fonctionnalisés via la réaction thiol-ène permet l'obtention d'hydrogels stimulables répondant à tous les critères nécessaires à la fabrication de micro-vannes. L'épaisseur des films peut être choisie sur une gamme allant de la centaine de nanomètres à plusieurs microns. Le gonflement des gels thermosensibles de pNIPAM peut être ajusté par le taux de modification du polymère et les ratios de gonflement de l'ordre de 4 à 5 sont facilement accessibles.

Cette synthèse peut être réalisée de deux façons :

- par activation thermique, en plaçant les surfaces à revêtir d'un film de polymère dans une étuve à 120°C sous vide pendant 16 heures ;
- par activation UV, en irradiant la surface de polymère à réticuler dans l'UV profond vers 260 nm. Les procédés lithographiques (négative et laser) qui en découlent permettent l'obtention de motifs bien résolus.

La mise en place, au cours de cette thèse, de la voie de synthèse par UV est une étape clef pour mener à bien le projet de vannes microfluidiques. Dans le chapitre suivant, nous montrerons comment cette synthèse permet l'élaboration simple et reproductible d'actuateurs microfluidiques et nous en présenterons les performances.

Références

1. Hoyle, C.E., T.Y. Lee, and T. Roper, *Thiol-enes: chemistry of the past with promise for the future*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2004. **42**(21): p. 5301-5338.
2. Kade, M.J., D.J. Burke, and C.J. Hawker, *The power of thiol-ene chemistry*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2010. **48**(4): p. 743-750.
3. Kuckling, D., M.E. Harmon, and C.W. Frank, *Photo-cross-linkable PNIPAAm copolymers. 1. Synthesis and characterization of constrained temperature-responsive hydrogel layers*. Macromolecules, 2002. **35**(16): p. 6377-6383.
4. Toomey, R., D. Freidank, and J. Rühe, *Swelling behavior of thin, surface-attached polymer networks*. Macromolecules, 2004. **37**(3): p. 882-887.
5. Li, M., *Films minces d'hydrogels stimulables*. 2014, Université Pierre et Marie Curie: Paris.
6. Bokias, G., A. Durand, and D. Hourdet, *Molar mass control of poly (N-isopropylacrylamide) and poly (acrylic acid) in aqueous polymerizations initiated by redox initiators based on persulfates*. Macromolecular Chemistry and Physics, 1998. **199**(7): p. 1387-1392.
7. Li, M., B. Bresson, F. Cousin, C. Fretigny, and Y. Tran, *Submicrometric Films of Surface-Attached Polymer Network with Temperature-Responsive Properties*. Langmuir, 2015.
8. Bain, C.D., E.B. Troughton, Y.T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, and R.G. Nuzzo, *Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(1): p. 321-335.
9. Hall, D.B., P. Underhill, and J.M. Torkelson, *Spin coating of thin and ultrathin polymer films*. Polymer Engineering and Science, 1998. **38**(12): p. 2039-2045.
10. Extrand, C.W., *Spin coating of very thin polymer films*. Polymer Engineering & Science, 1994. **34**(5): p. 390-394.
11. Flory, P. and T. Fox, *Treatment of intrinsic viscosities*. Journal of the American Chemical Society, 1951. **73**(5): p. 1904-1908.

12. Huggins, M.L., *The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration*. Journal of the American Chemical Society, 1942. **64**(11): p. 2716-2718.
13. Vidyasagar, A., J. Majewski, and R. Toomey, *Temperature induced volume-phase transitions in surface-tethered poly (N-isopropylacrylamide) networks*. Macromolecules, 2008. **41**(3): p. 919-924.
14. Vidyasagar, A., H.L. Smith, J. Majewski, and R.G. Toomey, *Continuous and discontinuous volume-phase transitions in surface-tethered, photo-crosslinked poly (N-isopropylacrylamide) networks*. Soft matter, 2009. **5**(23): p. 4733-4738.
15. Flory, P.J. and J. Rehner Jr, *Statistical mechanics of cross-linked polymer networks II. Swelling*. The Journal of Chemical Physics, 1943. **11**(11): p. 521-526.
16. Kabiri, K., S. Faraji-Dana, and M.J. Zohuriaan-Mehr, *Novel sulfobetaine-sulfonic acid-contained superswelling hydrogels*. Polymers for advanced technologies, 2005. **16**(9): p. 659-666.
17. Kabiri, K., M. Zohuriaan-Mehr, H. Mirzadeh, and M. Kheirabadi, *Solvent-, ion- and pH-specific swelling of poly (2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) superabsorbing gels*. Journal of polymer research, 2010. **17**(2): p. 203-212.
18. Vergne, C., *Etude d'objets biomimétiques et de vannes polymères en microfluidique*. 2013, Université Pierre et Marie Curie: Paris.
19. Hensarling, R.M., V.A. Doughty, J.W. Chan, and D.L. Patton, *"Clicking" polymer brushes with thiol-yne chemistry: Indoors and out*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(41): p. 14673-14675.
20. Campos, L.M., I. Meinel, R.G. Guino, M. Schierhorn, N. Gupta, G.D. Stucky, and C.J. Hawker, *Highly Versatile and Robust Materials for Soft Imprint Lithography Based on Thiol-ene Click Chemistry*. Advanced Materials, 2008. **20**(19): p. 3728-3733.
21. Connal, L.A., C.R. Kinnane, A.N. Zelikin, and F. Caruso, *Stabilization and functionalization of polymer multilayers and capsules via thiol-ene click chemistry*. Chemistry of materials, 2009. **21**(4): p. 576-578.
22. DuPont Jr, S.J., R.S. Cates, P.G. Stroot, and R. Toomey, *Swelling-induced instabilities in microscale, surface-confined poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels*. Soft matter, 2010. **6**(16): p. 3876-3882.

Chapitre 3

Actionneurs microfluidiques

Sommaire

1 Gonflement de gel dans un canal microfluidique.....	94
1.1 Hydrodynamique à l'échelle microfluidique.....	94
1.2 Fabrication de puces microfluidiques en NOA	97
1.3 Dispositif expérimental.....	99
1.4 Intensité de fluorescence.....	101
1.4.1 Epaisseur libre dans le canal.....	101
1.4.2 Calibration.....	102
1.5 Gonflement d'un gel	104
2 Vannes thermo-stimulables.....	107
2.1 Fabrication et fonctionnement.....	107
2.1.1 Activation de vannes thermosensibles.....	108
2.1.2 Durabilité.....	110
2.2 Piégeage.....	112
2.2.1 Piégeage de fluide dans une micro-chambre	112
2.2.2 Intégration de 100 vannes sur une micro-puce	114
2.3 Intégration de vannes à hydrogel dans des puces en PDMS.....	116
2.3.1 Fabrication de puces microfluidiques en PDMS.....	117
2.3.2 Problèmes de fuites liés à la présence de l'hydrogel	119
2.3.3 Tenue en pression des systèmes en PDMS.....	121
2.3.4 Caractérisation des vannes dans des canaux en PDMS	122
2.4 Conclusion	124
3 Chambre microfluidique reconfigurable.....	125
3.1 Réalisation d'un enclos dans un canal microfluidique	125
3.2 Intégration à haute densité.....	127
3.3 Etude de la diffusion de la fluorescéine dans les hydrogels de pNIPAM.....	130
3.3.1 Expérience de diffusion	130
3.3.2 Estimations du coefficient de diffusion	133
4 Activation thermique localisée.....	137
4.1 Micro-résistance en or	137
4.2 Temps de réponse des vannes à activation localisée	139
4.3 Localisation de l'actionnement	141
Conclusion	145
Références.....	147

L'objectif de cette thèse est de développer une nouvelle technologie de micro-actionneurs qui puisse répondre aux trois critères suivants :

- facilité de production et faible coût,
- fonctionnement fiable et durable avec un actionnement rapide,
- contrôle de l'activation économe en énergie et en instrumentation.

Dans le cas des vannes, les vannes pneumatiques satisfont les deux premiers critères, mais ne semblent pas pouvoir répondre au dernier. L'approche qui permet la plus grande économie de moyen et d'énergie pour contrôler le flux dans des micro-canaux est l'utilisation d'hydrogels stimulables pour réaliser des vannes.

Dans le chapitre précédent, nous avons exposé une façon simple et versatile de synthétiser des films d'hydrogels greffés stimulables. Ces films peuvent être déposés en motifs et présentent des propriétés de gonflement stimulables compatibles avec la réalisation d'actionneurs microfluidiques. Dans ce chapitre, nous exploitons la transition volumique de ces motifs d'hydrogels greffés de poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM) en les intégrant dans des systèmes microfluidiques pour servir d'actionneurs thermo-activables.

Pour fabriquer des micro-vannes, nous avons choisi de réaliser la synthèse des motifs d'hydrogels greffés sur le substrat préalablement à la micro-fabrication. L'intégration de ces hydrogels synthétisés *ex situ* se fait dans un second temps (figure1).

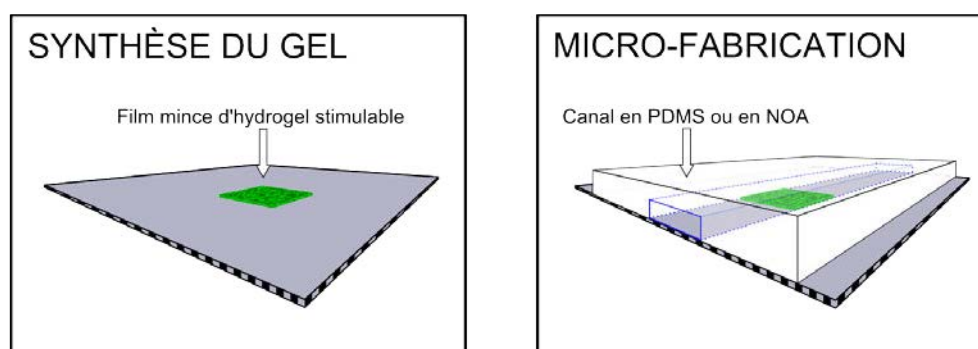


Figure 1 La synthèse des gels est réalisée *ex situ* selon la stratégie présentée au chapitre 2. Dans ce chapitre nous présentons la micro-fabrication des puces et les performances des micro-vannes.

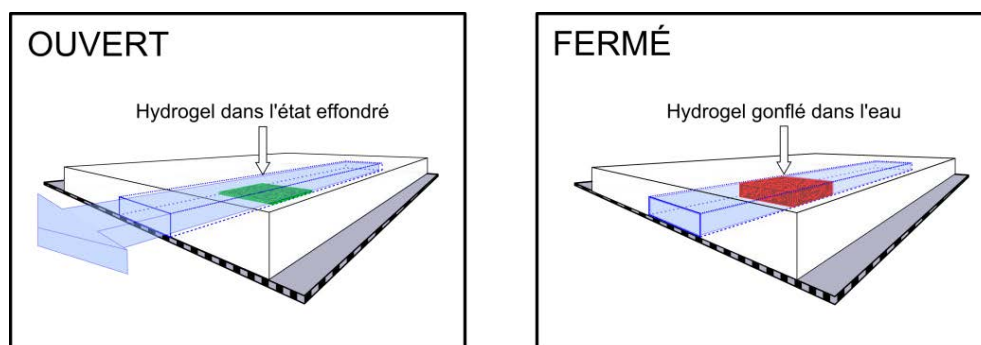


Figure 2 Vue schématique du fonctionnement d'une vanne à base de motifs greffés d'hydrogel stimuable.

Le principe de fonctionnement des micro-vannes en hydrogel de pNIPAM est le suivant (figure 2) :

- à température ambiante, le gel est gonflé et bouche le canal, la vanne est donc fermée ;
- à une température supérieure à la LCST (environ 32°C), le gel de pNIPAM se dégonfle, la vanne est alors ouverte.

La micro-fabrication de tels systèmes est simple comparée aux approches précédentes où l'hydrogel est synthétisé *in situ* [1, 2]. En outre, le greffage chimique sur le substrat de l'hydrogel sous forme de film mince rend la vanne stable et durable. Du fait de l'épaisseur des motifs d'hydrogels, le gonflement/dégonflement peut être très rapide. Nous voulons montrer, dans ce chapitre, que cette approche des vannes à hydrogel aboutit à une technologie qui satisfait les trois critères de fabrication, de performance et de contrôlabilité.

Dans un premier temps, nous présenterons la micro-fabrication de micro-canaux avec un haut rapport d'aspect, ainsi que la méthode d'observation du fonctionnement des vannes utilisée au cours de la thèse. Nous illustrerons l'intérêt de la microscopie de fluorescence pour l'observation de la transition de gonflement d'un motif d'hydrogel dans un micro-canal.

Dans un second temps, nous reporterons les caractéristiques des vannes obtenues avec des films minces de pNIPAM. La température des microsystèmes est fixée sur toute la puce

par un module Peltier. Celui-ci permet de faire varier la température autour de la LCST et d'activer l'ensemble des actionneurs du système.

Dans un troisième temps, nous modifierons le schéma d'intégration des hydrogels afin d'obtenir des micro-puces dont la géométrie du canal est reconfigurable. Ce principe s'avère plus efficace que les micro-vannes pour certaines applications, ce que nous montrerons sur un exemple de piégeage de fluide.

Enfin, nous présenterons une piste de développement pour localiser l'activation des micro-vannes. Nous attacherons de l'importance au développement d'une méthode nécessitant un équipement le plus simple possible, cela afin de démontrer le potentiel de cette technologie de vannes en terme de portabilité.



1 Gonflement de gel dans un canal microfluidique

Afin d'obtenir un bon débit dans les micro-canaux tout en gardant leur épaisseur faible il faut que les micro-canaux aient un rapport d'aspect élevé. Le PDMS est un matériau élastique relativement « mou » qui a tendance à s'effondrer et boucher le canal lorsque le rapport d'aspect est trop grand. Nous avons donc choisi d'utiliser une autre technique de micro-fabrication basée sur une colle optique : la Norland Optical Adhesive (NOA). Dans cette section nous présentons la fabrication de ces systèmes, puis nous montrerons le comportement d'un motif d'hydrogel thermosensible à base de pNIPAM dans son environnement microfluidique.

1.1 Hydrodynamique à l'échelle microfluidique

Afin de justifier certaines caractéristiques expérimentales, tels les ratios de gonflement acceptables pour les hydrogels, le choix du matériau utilisé pour fabriquer les microsystèmes, ou le dimensionnement des micro-canaux, il est important de définir certaines notions hydrodynamiques, et plus particulièrement la notion de résistance hydrodynamique.

L'équation de Navier-Stokes gouvernant les écoulements de fluides newtoniens incompressibles s'écrit :

$$\rho \vec{g} - \nabla \vec{p} + \eta \cdot \nabla^2 \vec{u} = \rho \left(\vec{u} \cdot \nabla \vec{u} + \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} \right) \quad (\text{éq. 1})$$

avec ρ la masse volumique du fluide, $\vec{g}$ la gravité, $\vec{p}$ le champ pression, η la viscosité dynamique et $\vec{u}$ la vitesse du fluide. Le nombre de Reynolds est défini par :

$$Re = \frac{\rho U h}{\eta} \quad (\text{éq. 2})$$

où U est la vitesse caractéristique du fluide et h la dimension caractéristique de l'écoulement. Par exemple, pour un écoulement d'eau, circulant dans un canal de 10 μm d'épaisseur, à une vitesse de 1 cm/s, nous obtenons $Re = 0,1$. Dans ces conditions on

peut négliger les termes inertiels et la gravité. Les écoulements sont alors régis par l'équation de Stokes :

$$\nabla \vec{p} = \eta \cdot \nabla^2 \vec{u} \quad (\text{éq. 3})$$

En microfluidique l'environnement géométrique de l'écoulement est tel que $h \ll w$ et $h \ll L$, où h est l'épaisseur, w la largeur et L la longueur du canal. La résolution de l'équation de Stokes donne un écoulement de Poiseuille dans ce cas. En considérant que la vitesse de l'écoulement est nulle aux parois on peut alors montrer que le débit Q est relié à la chute de pression ΔP par l'expression suivante :

$$Q = \frac{h^3 w}{12 \eta L} \Delta P \quad (\text{éq. 4})$$

La résistance hydrodynamique est alors définie, par analogie avec la résistance en électronique, telle que [3] :

$$\Delta P = RQ \quad (\text{éq. 5})$$

d'où

$$R = \frac{12 \eta L}{h^3 w} \quad (\text{éq. 6})$$

La résistance hydrodynamique évolue comme l'inverse de h^3 , donc plus h est faible, plus la résistance est élevée, et plus il faudra appliquer des pressions élevées. Cette forte dépendance de la résistance hydrodynamique avec l'épaisseur du canal est la raison pour laquelle le ratio de gonflement des hydrogels doit être le plus élevé possible. D'une part cela permet d'avoir un canal plus épais. D'autre part, la vanne à l'état ouvert doit permettre la plus grande ouverture possible afin de ne pas ralentir drastiquement l'écoulement. Le dimensionnement et les matériaux utilisés pour les microsystèmes doivent donc être soigneusement choisis pour optimiser le fonctionnement des vannes et les débits de fluides dans les canaux.

Pour mesurer les débits de fluide dans les micro-canaux, nous utilisons un capteur du fabricant Fluigent (Flow Rate Unit M). Ce capteur a une plage de mesure allant de 100 nL/min à 7000 nL/min. Pour imposer la pression en entrée du micro-canal, nous

utilisons des contrôleurs de pression MFCS™ du même fournisseur. Ces appareils permettent d'imposer une pression d'entrée de 0 à 345 mbar ou de 0 à 1000 mbar suivant les modèles.

Pour réaliser les mesures de débit on veut se placer sur la gamme de débit où nos débitmètres sont les plus précis. On veut donc dimensionner les micro-canaux de sorte qu'un débit de l'ordre de 6000 nL/min puisse être obtenu avec une surpression d'entrée inférieure à 1000 mbar. La résistance hydrodynamique du micro-canal doit donc satisfaire la condition suivante :

$$R \leq \frac{1000\text{mbar}}{6000\text{nL/min}} \simeq 10^{15} \text{ Pa.s.m}^{-3} \quad (\text{éq. 7})$$

La longueur typique L des canaux est d'environ 1 cm, et l'épaisseur h est généralement inférieure à 10 μm . La condition sur la résistance hydrodynamique devient alors une condition sur la largeur w du canal :

$$w \geq \frac{12\eta L}{h^3 R} \simeq \frac{10 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-2}}{10^{-5^3} 10^{15}} \simeq 10^{-4} \text{ m} \quad (\text{éq. 8})$$

Les canaux modèles de test de vannes doivent donc avoir une largeur d'au moins 100 μm pour une épaisseur inférieure à 10 μm . Le rapport d'aspect des micro-canaux, défini comme le rapport entre la largeur et l'épaisseur du canal, sera donc typiquement supérieur à 10.

Le choix des ratios de gonflement pour les hydrogels stimulables est justifié par l'analyse des écoulements dans les micro-canaux qui vient d'être menée. En outre, elle fixe aussi les dimensions des micro-canaux pour des expériences de mesure de débit exploitant la meilleure gamme de sensibilité des débitmètres.

1.2 Fabrication de puces microfluidiques en NOA

Pour obtenir de grands rapports d'aspect pour les canaux, on utilise la méthode des « autocollants microfluidiques » mise au point par Bartolo et al. [4]. Les autocollants sont réalisés à partir d'une résine photo-réductible, la NOA 81, déposée et moulée sur une lamelle de microscopie en verre. Après réticulation et retrait du moule, la résine conserve une couche superficielle non réticulée. Cette couche permet le collage de l'autocollant sur une très grande variété de surfaces.

Le protocole détaillé de fabrication est le suivant (figure 3) :

- la lamelle est percée afin de créer les entrées et sorties des micro-canaux ;
- quelques gouttes de NOA liquide sont déposées sur la lamelle (figure 3A) ;
- la NOA est moulée par gaufrage avec un timbre en PDMS (figure 3B). Le timbre (voir annexe III pour la réalisation des timbres) est préalablement dégazé sous vide afin de faciliter l'élimination des bulles d'air par perméation dans le PDMS lors du moulage ;
- la NOA est insolée (à $\lambda = 365 \text{ nm}$) quelques secondes (8.5 s, 18 mW/cm^2) pour être réticulée. Une couche superficielle de NOA demeure non réticulée au contact du PDMS et permettra l'adhésion de l'autocollant sur le substrat ;
- après retrait du timbre en PDMS, les excès de NOA obstruant les trous dans la lamelle sont retirés (figure 3C) ;
- l'autocollant microfluidique est positionné et pressé sur le substrat comprenant les dépôts d'hydrogels (figure 3D) ;
- la micro-puce est de nouveau insolée ($\lambda = 365 \text{ nm}$, 90 s, 60 mW/cm^2) pour obtenir une bonne adhésion entre l'autocollant et le substrat par réticulation de la couche superficielle de NOA. Eventuellement, la puce peut être recuite à 90°C pendant 2 heures pour finaliser l'adhésion ;
- la micro-puce est désormais prête à l'emploi, il ne manque qu'à rajouter les connectiques (figure 3E).

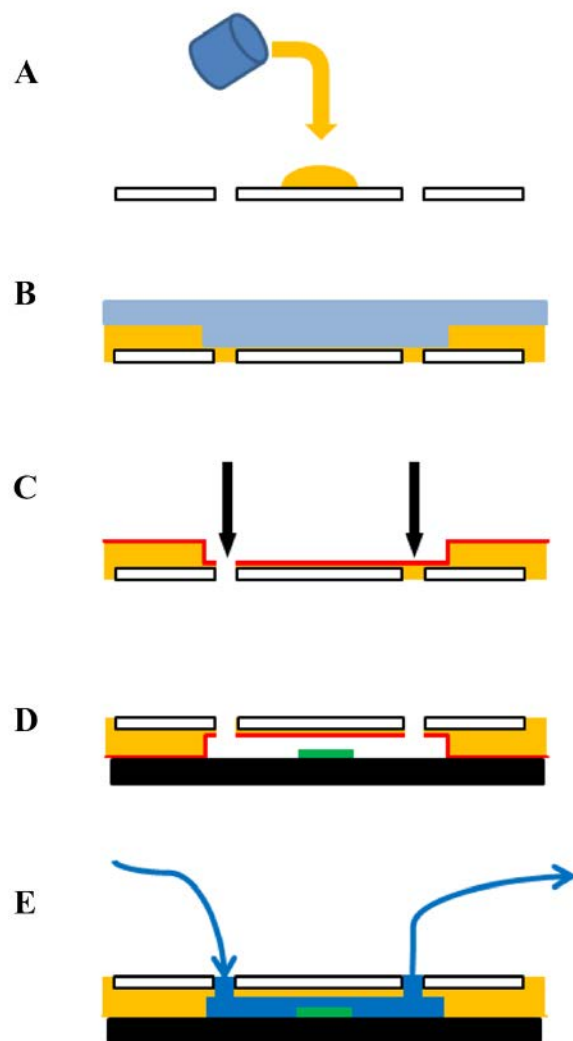


Figure 3 Procédé de fabrication d'une micro-puce en NOA [4]. A – Quelques gouttes de NOA 81 (jaune) liquide sont déposées sur une lamelle de verre percée (blanc). B – La NOA est emboutie avec un timbre en PDMS (bleu). C –Après réticulation, les trous de connexion sont dégagés et une couche de NOA adhésive subsiste (rouge). D – L'autocollant en NOA est positionné sur le substrat (noir) et aligné avec l'hydrogel (vert). E – Après finalisation du collage la puce peut être utilisée.

Les systèmes en NOA sont peu déformables et peuvent résister à des pressions élevées. Ils permettent donc la réalisation de canaux avec un important rapport d'aspect. En outre, les autocollants microfluidiques en NOA adhèrent sur une très grande variété de substrats, silicium, verre ou or. Cette technologie est donc parfaitement adaptée à notre projet d'actionneurs à hydrogels stimulables.

1.3 Dispositif expérimental

Pour réaliser une micro-puce, il suffit de coller un autocollant microfluidique sur un substrat avec les motifs d'hydrogel. Par la suite, pour contrôler les écoulements et observer l'actionnement du gel de pNIPAM un certain nombre d'instruments sont nécessaires. Le dispositif expérimental que nous avons régulièrement utilisé est schématisé sur la figure 4A. Il comprend :

- un microscope muni d'une caméra. Ce dispositif d'acquisition permet des observations en lumière blanche mais aussi en microscopie de fluorescence ;
- un module Peltier/porte-puce. Ce module Peltier permet de réguler la température de la micro-puce ;
- un contrôleur de pression et un porte échantillon/injecteur ;
- un ordinateur qui permet l'interfaçage de tous ces instruments et l'acquisition d'images.

L'équipement présenté sur la figure 4B permet une acquisition d'images à une fréquence de 24 images/seconde. La platine Peltier porte-puce permet de changer la température pour activer les actionneurs à hydrogels. La vitesse maximale pour les rampes en température est de 20°C/min.

Un deuxième dispositif, avec une caméra plus sensible permettant une acquisition jusqu'à une fréquence images de 100 Hz, a aussi été utilisé. Le module Peltier sur ce dispositif réalise des rampes en température à 180°C/min.

Les canaux de nos micro-puces sont très fins, ce qui rend impossible la visualisation des fluides circulant dans les canaux par le simple usage de colorant. Même très fortement concentrés les colorants habituellement utilisés en microfluidique ne permettent pas d'obtenir un bon contraste pour une observation en lumière blanche. Nous avons donc opté pour une observation en fluorescence en faisant circuler dans les micro-canaux une solution de fluorescéine dans l'eau.

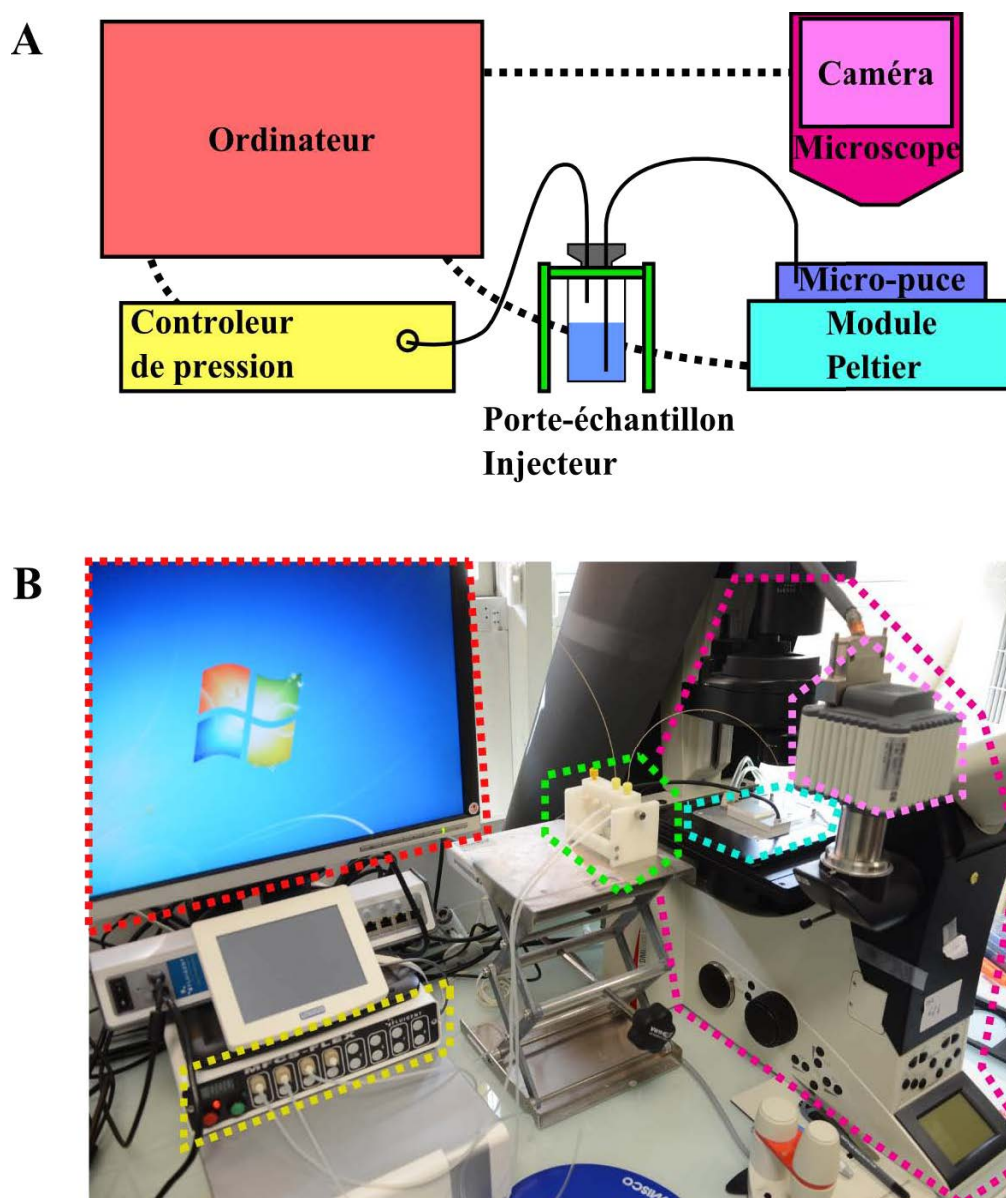


Figure 4 A – Schéma du montage expérimental utilisé pour imager les micro-puces. B – Photographie de la paillasse et des divers équipements du dispositif expérimental.

L'utilisation d'une observation en fluorescence donne un bon contraste entre le canal vide et les emplacements de l'hydrogel. L'intensité de fluorescence peut même être corrélée à l'épaisseur du film d'hydrogel. Nous allons montrer ci-dessous comment ce phénomène peut être exploité pour obtenir une imagerie en trois dimensions de l'hydrogel dans le micro-canal. Le développement de cette technique de profilométrie a été réalisé en collaboration avec Loïc D'Eramo, doctorant au laboratoire Gulliver.

1.4 Intensité de fluorescence

La fluorescéine est une molécule fluorescente à la longueur d'onde de 521 nm (avec une longueur d'onde d'excitation de 494 nm) [5]. La fluorescéine ne pénétrant pas a priori dans le gel, l'intensité de fluorescence doit être différente à l'emplacement de l'hydrogel par rapport au reste du canal.

1.4.1 Epaisseur libre dans le canal

Un motif en pNIPAM en forme d'étoile d'une épaisseur sèche de 1,5 μm a été synthétisé. Ce motif a été intégré dans un canal microfluidique de 8 μm d'épaisseur. Une photographie en fluorescence du motif d'hydrogel dans le canal est présentée figure 5. Le canal vide apparaît en blanc intense, mais à la position de l'hydrogel l'intensité est plus faible car l'épaisseur de fluide fluorescent est plus faible.

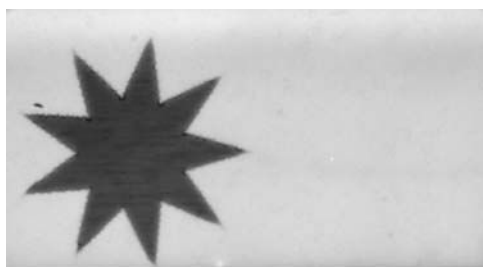


Figure 5 Photographie en fluorescence d'un motif d'hydrogel de pNIPAM dans un micro-canal.

Comme observé ci-dessus et illustré figure 6A, l'intensité de fluorescence dépend de la quantité de fluorescéine et donc de l'épaisseur libre du canal. Afin de vérifier et de quantifier la dépendance entre intensité et épaisseur du canal nous avons réalisé un canal avec un profil en escalier comme sur la figure 6B. Un canal de ce type présente plusieurs épaisseurs de canal observables dans les mêmes conditions expérimentales. L'observation en fluorescence montre bien différents niveaux de luminosité (figure 6C). Les épaisseurs du canal sous chaque palier sont 1,7 μm , 3,2 μm , 4,5 μm , 6 μm et 8 μm .

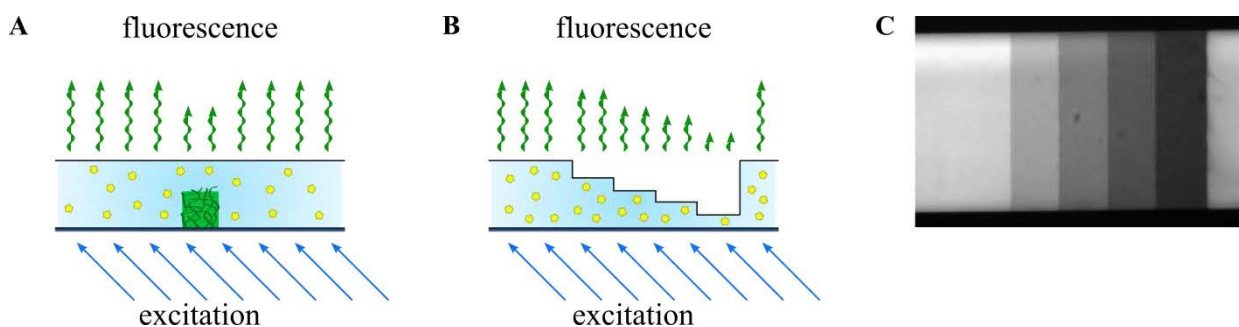


Figure 6 A – A l'emplacement de l'hydrogel, l'épaisseur libre du canal est plus fine donc l'intensité de fluorescence est plus faible. B – De façon équivalente, dans un canal en escalier, l'intensité de fluorescence dépend de l'épaisseur. C – Photographie en fluorescence d'un canal en escalier vu de dessus.

1.4.2 Calibration

Sur le canal de la figure 6C, l'intensité du signal de fluorescence peut être mesurée en niveaux de gris pour 5 épaisseurs de canal différentes. Pour s'affranchir d'une éventuelle dépendance en température de la fluorescence, l'intensité sous chaque palier, a été mesurée pour des températures du système allant de 20 à 50°C (figure 7A). Les intensités ont été normalisées par l'intensité maximale, correspondant à l'épaisseur totale du canal. Les intensités normalisées sont indépendantes de la température (figure 7B).

Pour chaque palier d'épaisseurs, les mesures d'intensités sont moyennées par rapport à la température pour obtenir une intensité normalisée moyenne. Cette valeur est ensuite représentée en fonction de l'épaisseur du canal (figure 7C). Cette calibration met en évidence que l'intensité de fluorescence est en fait simplement proportionnelle à l'épaisseur du canal ou à l'épaisseur de fluide fluorescent dans le canal.

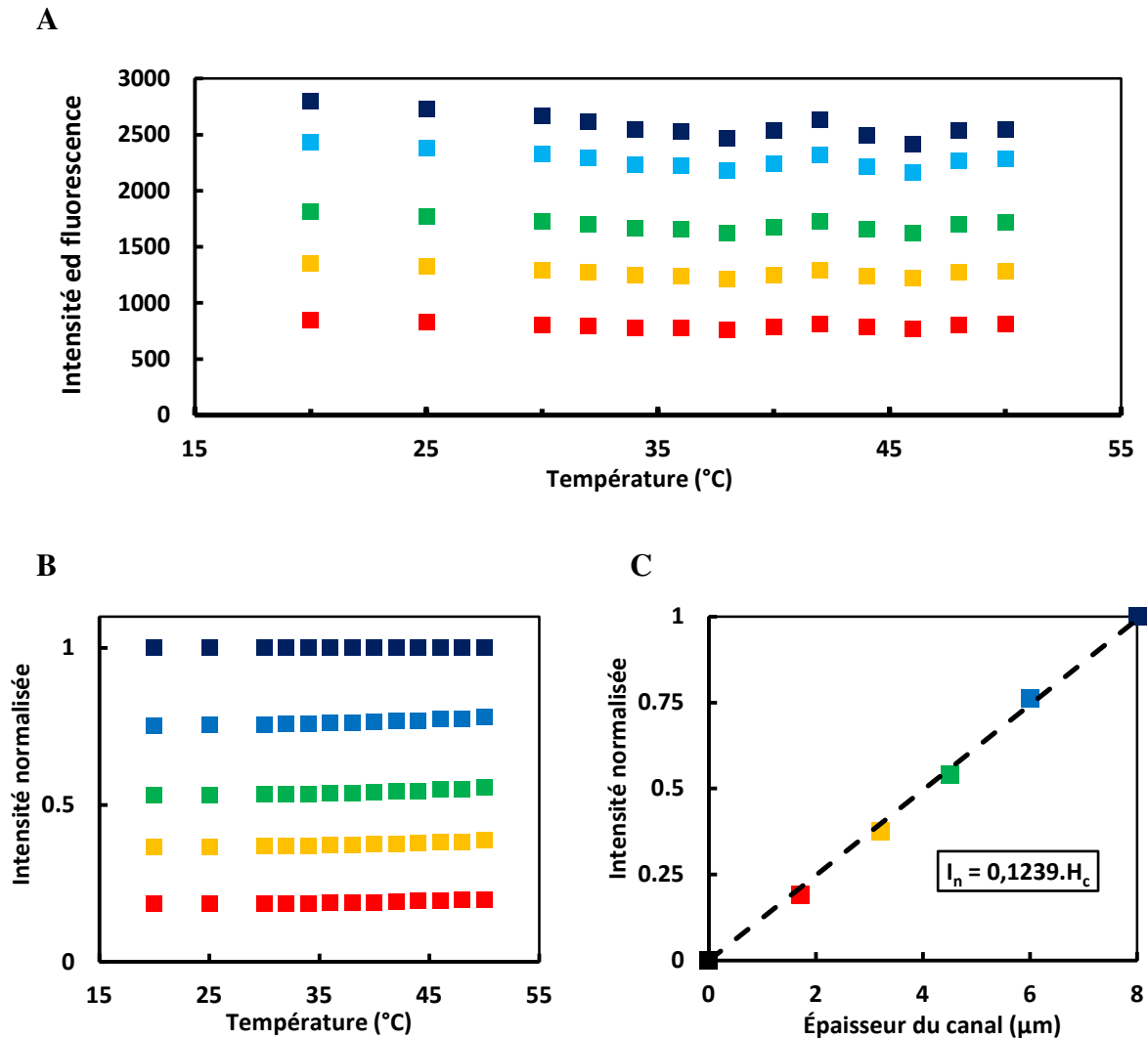


Figure 7 A – Intensité de fluorescence au niveau de chaque paliers en fonction de la température. B – Intensité de fluorescence au niveau de chaque palier normalisée par l'intensité sous le palier à 8 μm . Les intensités normalisées sont indépendantes de la température. C – Dépendance de l'intensité normalisée en fonction de l'épaisseur du canal.

Paliers : ■ 8 μm , ■ 6 μm , ■ 4,5 μm , ■ 3,2 μm , ■ 1,7 μm .

1.5 Gonflement d'un gel

L'intensité de fluorescence permet donc de déterminer l'épaisseur libre dans le canal au-dessus du gel. En connaissant l'épaisseur d'origine du canal, il est donc possible de remonter à l'épaisseur du film d'hydrogel. Pour illustrer ce principe, et pour illustrer le comportement du gel dans un micro-canal, nous avons observé la transition de gonflement/dégonflement du motif d'hydrogel de la figure 5. Des images en fluorescence ont été prises à différentes températures entre 25°C et 45°C. A partir de l'intensité de chaque pixel, l'épaisseur libre du canal a été déterminée grâce à la courbe de calibration (figure 7C). On peut alors reconstituer les profils en 3D des motifs d'hydrogels en fonction de la température (figure 8) :

- au dessus de la LCST, l'hydrogel est dans l'état dégonflé, son épaisseur est donc environ 1,5 fois l'épaisseur sèche (figure 8A) ;
- à la LCST l'hydrogel commence à se gonfler. Il est dans un état de gonflement intermédiaire (figure 8B) ;
- en dessous de la LCST, l'hydrogel est totalement gonflé. L'épaisseur du motif est alors environ 4 fois l'épaisseur sèche (figure 8C).

Le gonflement du gel est homogène sur tout le motif. On n'observe pas d'effet de bord ou de gonflement latéral. On observe sur ces profils une rugosité à la surface de l'hydrogel gonflé. Cette rugosité très faible à l'état sec augmente avec le gonflement du gel. Elle reste cependant faible par rapport à l'épaisseur (de l'ordre de quelques pourcents). La rugosité de la surface libre du gel peut être liée à la déformation de la surface du gel (flambage) liée aux contraintes latérales du fait du greffage covalent du gel sur le substrat. En d'autres termes, comme le gel est greffé, il ne peut gonfler que dans la seule direction perpendiculaire au substrat, d'où les contraintes latérales exercées sur le film de gel. On pourrait craindre que cette rugosité soit à l'origine de fuites pour nos micro-vannes en empêchant une fermeture totale entre la surface du gel et le plafond du canal. En pratique, il n'en est rien car l'hydrogel est suffisamment déformable en surface pour que la surface rugueuse soit planifiée contre la paroi supérieure du canal lors du gonflement du gel.

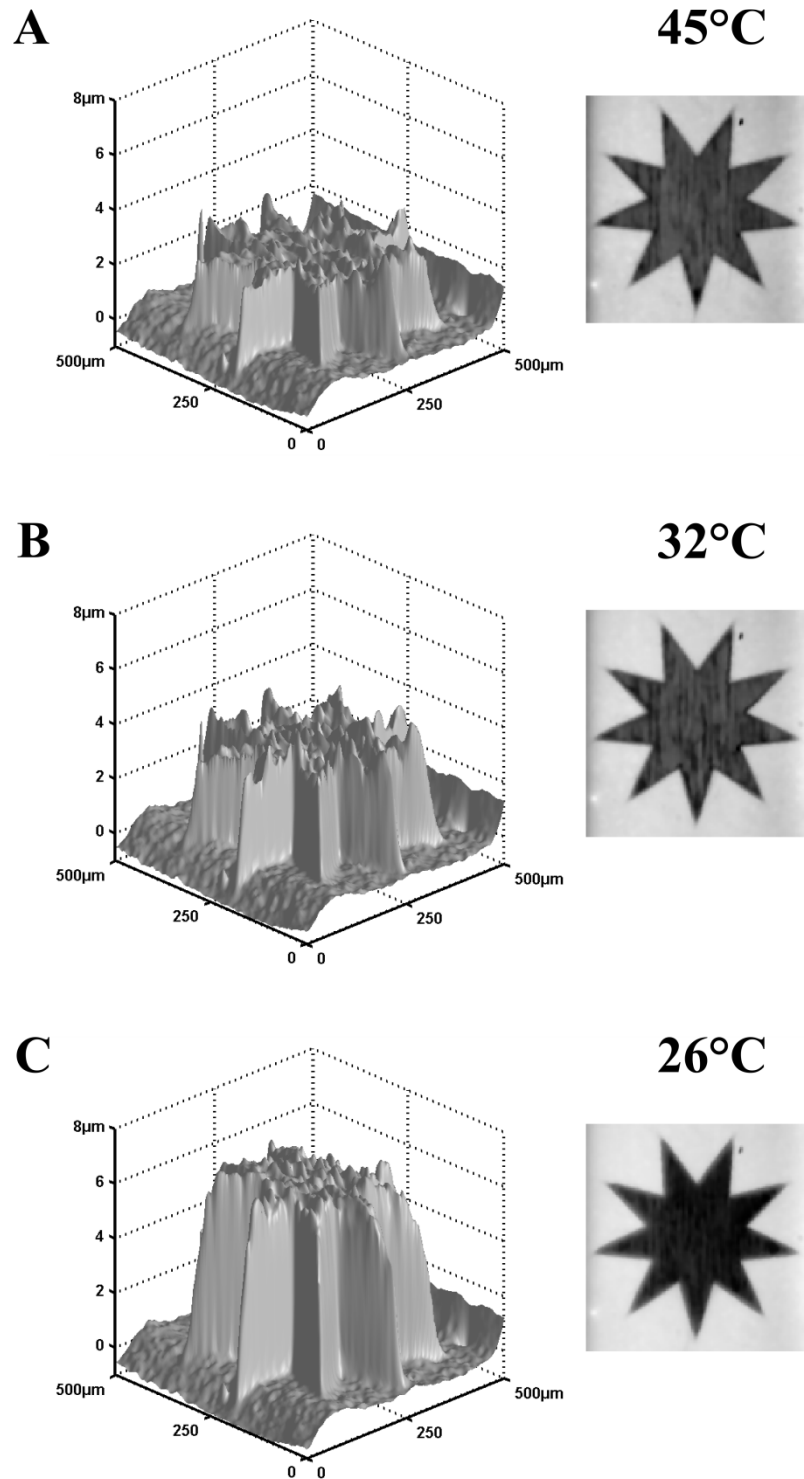


Figure 8 Profils 3D d'un motif d'hydrogel de pNIPAM en fonction de la température. Les profils sont réalisés à partir de l'intensité de fluorescence au dessus du motif. Le motif a une épaisseur sèche de $1,5 \mu\text{m}$ et le canal fait une épaisseur de $8 \mu\text{m}$. A – $T=45^\circ\text{C}$, au dessus de la LCST, l'hydrogel est effondré. B – $T=32^\circ\text{C}$, à la LCST, l'hydrogel est dans un état intermédiaire. C – $T=26^\circ\text{C}$, en dessous de la LCST, l'hydrogel est gonflé.

L'intégration d'hydrogel dans un canal microfluidique s'effectue donc simplement par collage d'un autocollant en NOA au dessus du substrat. Dans l'environnement microfluidique, les hydrogels de pNIPAM conservent leurs propriétés de gonflement thermo-stimulables. Les propriétés de LCST ne sont pas influencées par la présence de soluté dans le fluide circulant, comme la fluorescéine.

2 Vannes thermo-stimulables

Comme la visualisation du gel de pNIPAM dans le micro-canal vient de le confirmer, le ratio de gonflement de l'ordre de 4 est conservé dans le micro-canal. Pour réaliser une micro-vanne il faudra donc bien faire attention à ce que l'épaisseur du canal soit inférieure à 4 fois l'épaisseur sèche des films d'hydrogel.

2.1 Fabrication et fonctionnement

Pour réaliser les micro-vannes, il faut maintenant intégrer les plots d'hydrogels de façon à obstruer le canal lors du gonflement. Pour cela, les plots d'hydrogels sont plus larges que le micro-canal dans lequel ils sont intégrés. Cela permet de faciliter l'alignement du canal sur les motifs d'hydrogels. En effet, on s'assure ainsi que même avec un léger désalignement les motifs d'hydrogels occupent bien toute la largeur du canal. Lors du gonflement l'hydrogel obstruera bien totalement le canal, réalisant ainsi parfaitement son rôle de micro-vanne.

La fabrication des micro-vannes à base de films minces d'hydrogel selon notre nouvelle approche s'effectue donc comme suit (figure 9) :

- les motifs d'hydrogels sont synthétisés et greffés sur le substrat ;
- un autocollant en NOA avec le micro-canal est réalisé ;
- les deux éléments sont alignés et collés ;
- les connectiques nécessaires à l'injection de fluide dans le canal sont ajoutées.

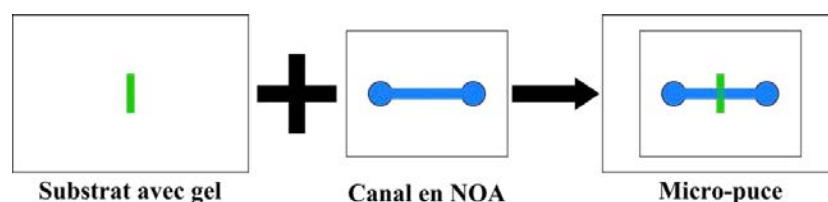


Figure 9 Schéma de fabrication d'une micro-vanne à film mince d'hydrogel. Le motif d'hydrogel constituant la vanne est greffé sur un substrat. Un canal est moulé en NOA sur une lamelle. Les deux éléments sont alignés et collés.

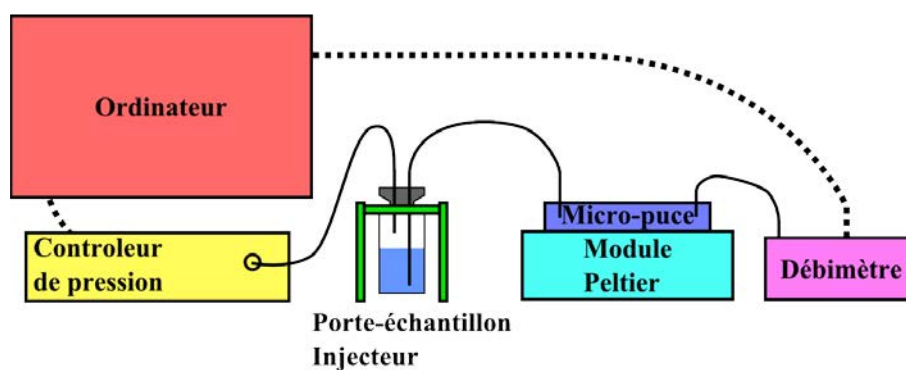


Figure 10 Schéma du dispositif expérimental utilisé pour mesurer le débit dans un micro-canal.

L'actionnement des vannes a été testée par la mesure de débit d'eau ou de solution physiologique (tampon phosphate salin, PBS) dans un micro-canal dans lequel une micro-vanne est intégrée. En faisant varier la température de la micro-puce on peut ouvrir ou fermer la vanne. Un montage différent de celui utilisé pour l'imagerie a donc été utilisé (figure 10). Sur ce montage, la sortie du micro-canal est reliée à un débitmètre. Ce capteur permet la mesure du débit de fluide dans le micro-canal. La température de la puce est fixée par un module Peltier qui permet l'activation de l'ouverture ou la fermeture des vannes via le gonflement/dégonflement des gels de pNIPAM.

2.1.1 Activation de vannes thermosensibles

Les canaux utilisés pour le test des micro-vannes font $400\text{ }\mu\text{m}$ de largeur et $9,4\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur. Pour réaliser les micro-vannes nous avons réalisé des plots d'hydrogel de $600\text{ }\mu\text{m}$ de longueur (ce qui laisse une amplitude de $100\text{ }\mu\text{m}$ sur la précision de l'alignement) et de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur sèche. Des vannes de deux largeurs différentes ont été testées : $100\text{ }\mu\text{m}$ et $50\text{ }\mu\text{m}$.

Afin de se placer sur la meilleure gamme de mesure du débitmètre, la surpression d'injection d'eau dans le canal est de 345 mbar . Un escalier en température entre 20°C et 50°C (puis entre 50°C et 20°C , par marches de 2°C) avec des paliers de 2 minutes est appliqué à la micro-puce. A chaque palier le débit est mesuré. Les débits au travers de la vanne de $100\text{ }\mu\text{m}$ et de $50\text{ }\mu\text{m}$ sont présentés figure 11A et figure 11B respectivement.

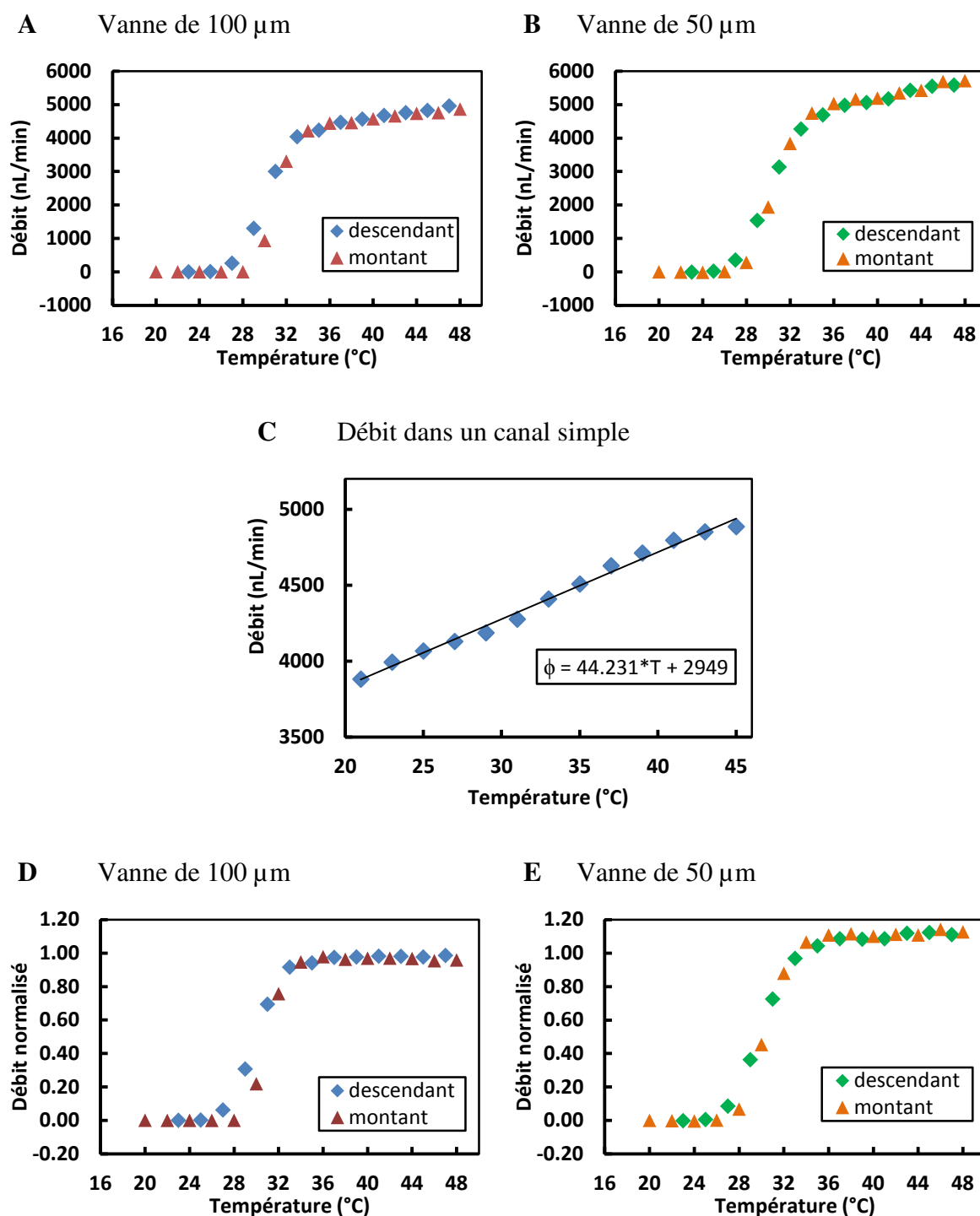


Figure 11 Actionnement de vannes en pNIPAM. A – Débit dans un canal comprenant une vanne de 100 μm de large en fonction de la température de la puce. B – Débit dans un micro-canal comprenant une vanne en pNIPAM de 50 μm de large en fonction de la température de la puce. C – Mesure de débit en fonction de la température dans un canal simple. D – Débit au travers de la vanne de 100 μm normalisé par le débit du canal vide. E – Débit au travers de la vanne de 50 μm normalisé par le débit dans le canal vide.

A basse température (en dessous de la LCST), les deux vannes sont parfaitement fermées et le débit est nul au travers des vannes. La transition de gonflement s'effectue sur quelques degrés autour de la LCST (i.e. autour de 32°C).

Au dessus de la LCST ($T > 34^{\circ}\text{C}$) le débit continue d'augmenter légèrement sans atteindre de plateau jusqu'à 50°C. L'épaisseur du gel est normalement constante en-dessous et au-delà de la LCST (chapitre 2, 2.1). Nous avons donc vérifié que cette variation de débit n'était pas liée à la présence des vannes à hydrogels dans le canal.

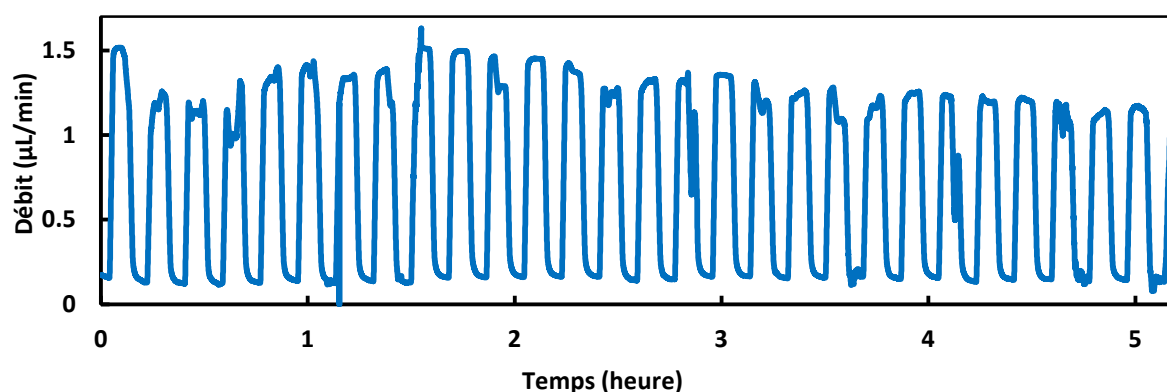
Le débit dans un canal sans micro-vanne en fonction de la température a été mesuré (figure 11C). Ce débit augmente linéairement avec la température. Cette augmentation s'explique par la décroissance de la viscosité de l'eau avec la température, ce qui diminue la résistance hydrodynamique du canal. Pour vérifier que la variation de débit au travers des vannes au-delà de la LCST s'explique par ce phénomène, les débits sont normalisés par le débit dans le canal vide en fonction de la température (figures 11D et 11E). Les débits normalisés au travers des vannes sont constants au dessus de la LCST et sont égaux au débit du canal vide.

Ces mesures indiquent que les vannes fonctionnent en mode ouvert/fermé. Au dessus de la LCST, l'hydrogel est à l'état dégonflé et n'a pas d'effet sur l'écoulement dans le canal. Le débit dans le canal est le même que si il n'y avait pas d'hydrogel. En dessous de la LCST, le canal est bien obstrué par l'hydrogel gonflé et le débit est nul. Il n'y a pas de fuites mesurables avec la précision de mesure dont nous disposons. Dans cette configuration, le débit des fuites est donc inférieur à 100 nL/min. Notons enfin que le fonctionnement des vannes ne montre pas d'hystérésis. L'ouverture et la fermeture des vannes se font à la même température.

2.1.2 Durabilité

Afin de tester la bonne tenue des vannes dans le temps, nous avons effectué un nombre important de cycles avec le module Peltier entre 20°C et 45 °C avec des paliers de 5 min aux deux températures du cycle. Afin de pouvoir assurer les 12 heures d'expérience avec un seul réservoir d'injection de fluide, la surpression d'entrée est imposée à 100 mbar.

A



B

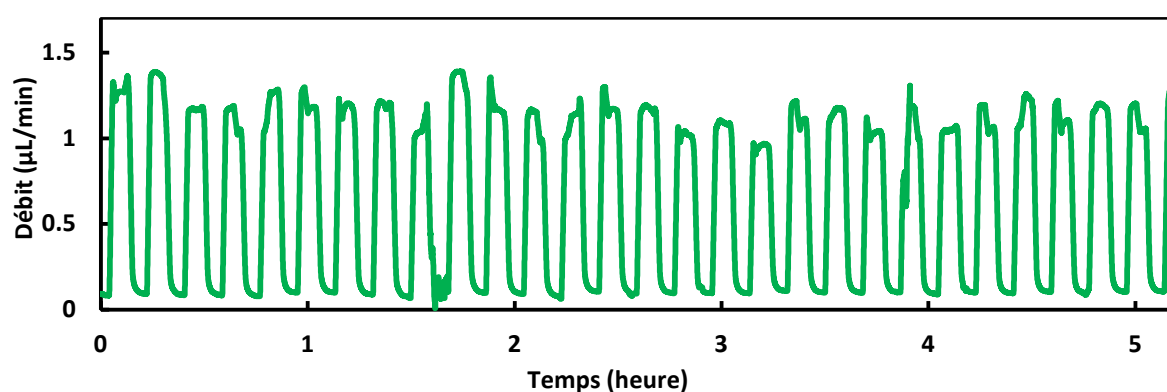


Figure 12 Activations cycliques de micro-vannes à films minces d'hydrogel (mesures réalisées pendant le stage de Margaux Kerdraon). Les 5 premières heures d'une expérience de 12 heures sont montrées. La surpression d'injection est de 100 mbar. A : vanne de 100 μm de large. B : vanne de 50 μm .

Le débit est diminué d'autant, et malheureusement la mesure est plus bruitée à ces niveaux de débits. Les résultats de ces cycles d'activation sur les vannes de 100 μm et 50 μm sont présentés sur la figure 12.

L'actionnement des vannes peut être répété sur plusieurs dizaines de cycles sans dégradation du gel. Les cycles successifs s'effectuent sans dérive du débit ce qui démontre la réversibilité du gonflement/dégonflement de l'hydrogel. En revanche, des fluctuations du débit lors de l'ouverture sont présentes. Ces fluctuations peuvent avoir plusieurs origines :

- l'imprécision de la mesure de débit ;
- l'instabilité de la surpression d'entrée ;
- la présence de poussières ou de bulles dans le fluide circulant dans le canal ;
- des fluctuations de l'épaisseur dégonflée du gel.

L'épaisseur dégonflée du gel ne devrait pas présenter de grandes fluctuations et celles-ci devraient avoir une influence faible sur le débit, car à l'état ouvert, la vanne ne représente qu'une faible part dans la résistance hydrodynamique du système. Pour s'assurer que l'ouverture de la vanne est bien effectif et que le dégonflement du gel n'est pas à l'origine des fluctuations de débit, cette expérience pourra être couplée à la profilométrie par fluorescence que nous avons développée dans la section précédente.

Les vannes à films minces d'hydrogel de pNIPAM ne sont pas détériorées durant les 12 heures de cycles. L'actionnement de ces vannes présente de très bonnes performances par rapport aux vannes en hydrogel proposées jusqu'à aujourd'hui.

2.2 Piégeage

Notre nouvelle approche permet d'obtenir des vannes durables et efficaces. Afin d'illustrer le potentiel applicatif et de visualiser l'ouverture et la fermeture de nos micro-vannes, nous proposons un dispositif permettant de réaliser un piégeage de fluide dans une micro-chambre. Ce genre de dispositif est couramment utilisé sur les laboratoires sur puces pour réaliser des opérations de criblage ou des cultures cellulaires.

2.2.1 Piégeage de fluide dans une micro-chambre

Pour obtenir une micro-chambre, le design le plus simple est d'intégrer deux micro-vannes au travers du micro-canal. Quand les deux vannes sont fermées, elles définissent un espace clos isolé du canal. Afin de pouvoir purger le reste du canal ou acheminer de nouveaux fluides sans perturber la micro-chambre, une dérivation peut être ajoutée.

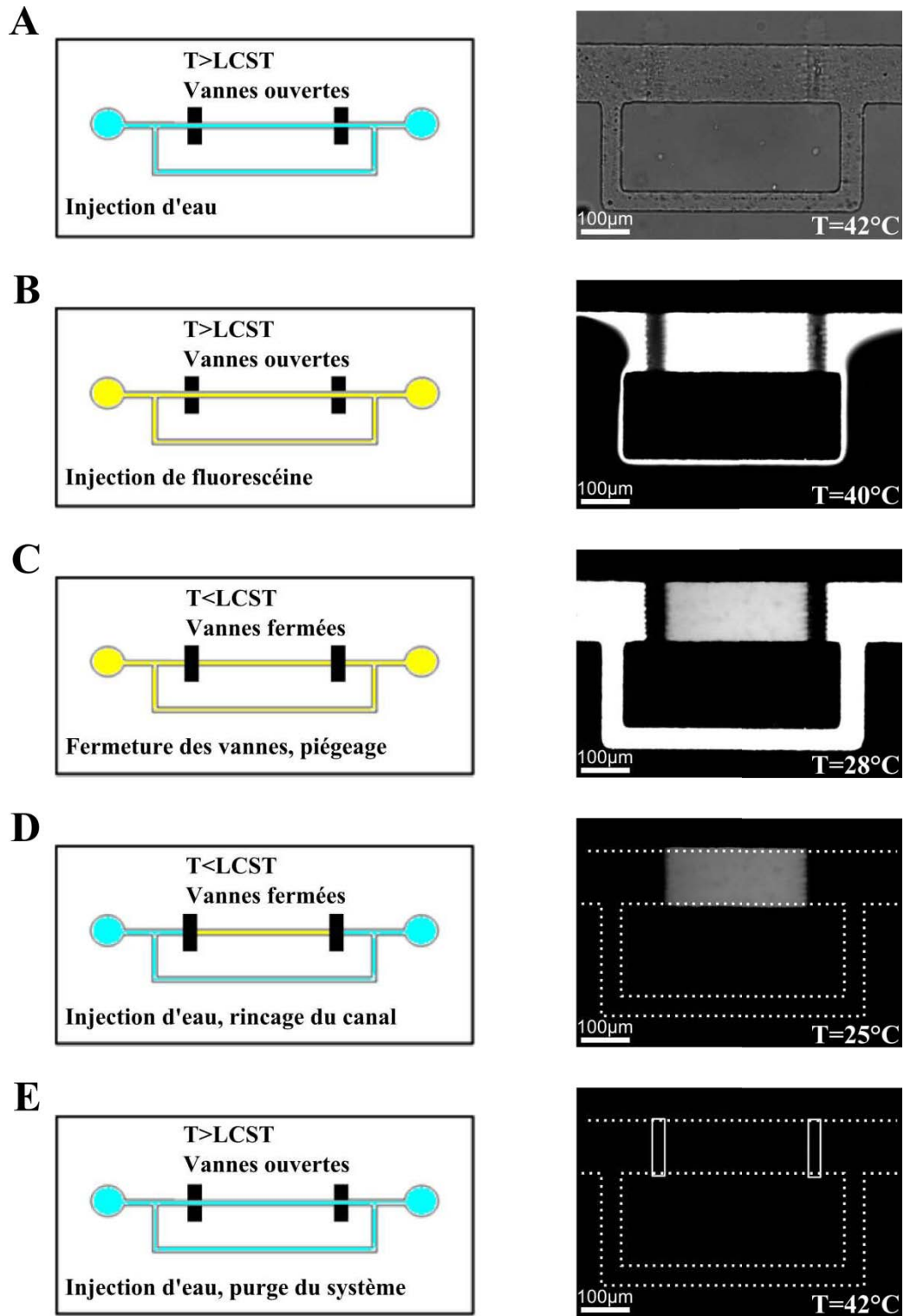


Figure 13 Expérience de piégeage de fluide (réalisée pendant le stage de Bhuwan Ghimire). A – Le micro-canal et la micro-chambre sont remplis d’eau à $T > LCST$ (vannes ouvertes). B – Le fluide à piéger (solution de fluorescéine) est injecté dans la micro-chambre. C – Les vannes sont fermées ($T < LCST$) pour isoler la micro-chambre. D – Le fluide fluorescent est piégé dans la micro-chambre. E – Ouverture des vannes ($T > LCST$) pour libérer le fluide dans la micro-chambre.

Le dispositif utilisé dans nos expériences est illustré sur la figure 13A : un canal de 100 μm de large et de 8 μm d'épaisseur est compartimenté par deux vannes activées simultanément grâce à un module Peltier. Un canal secondaire contourne le compartiment formé par les deux vannes et permet la purge du canal lorsque celles-ci sont fermées.

Une expérience de piégeage se déroule comme suit :

- à $T > \text{LCST}$ les vannes sont ouvertes et le canal peut être rempli d'eau (figure 13A) ;
- à $T > \text{LCST}$, le fluide contenant les espèces à piéger est injecté et remplit la micro-chambre. Ici on utilise une solution de fluorescéine (figure 13B) ;
- la température est abaissée sous la LCST. A $T < \text{LCST}$ les vannes sont fermées et la micro-chambre est isolée du reste du canal (figure 13C) ;
- à $T < \text{LCST}$ on injecte de l'eau pour purger le système de la solution de fluorescéine. Celle-ci demeure uniquement dans la micro-chambre (figure 13D) ;
- enfin pour libérer le fluide piégé il suffit d'augmenter la température au-dessus de la LCST (figure 13E).

2.2.2 Intégration de 100 vannes sur une micro-puce

Une micro-chambre peut donc être réalisée avec les vannes à motifs greffés d'hydrogel stimuable. La question est de savoir si cette technologie a la capacité d'intégrer, sur une même puce, un nombre élevé de vannes. Dans cette optique, nous avons réalisé une micro-puce sur laquelle sont intégrées 100 micro-vannes.

Le microsystème que nous avons utilisé comprend un canal principal ramifié en 5 branches au long desquelles sont réparties 50 micro-chambres. 100 vannes sont nécessaires pour isoler ces micro-chambres. Elles sont réalisées avec des plots d'hydrogel de 1,5 μm d'épaisseurs. Le canal a une hauteur de 6 μm et mesure 300 μm de large.

La figure 14 montre le fonctionnement de cette puce qui, comme précédemment avec un seul piège, permet la rétention étanche de fluide dans 50 micro-chambres scellées par des micro-vannes à films minces d'hydrogel.

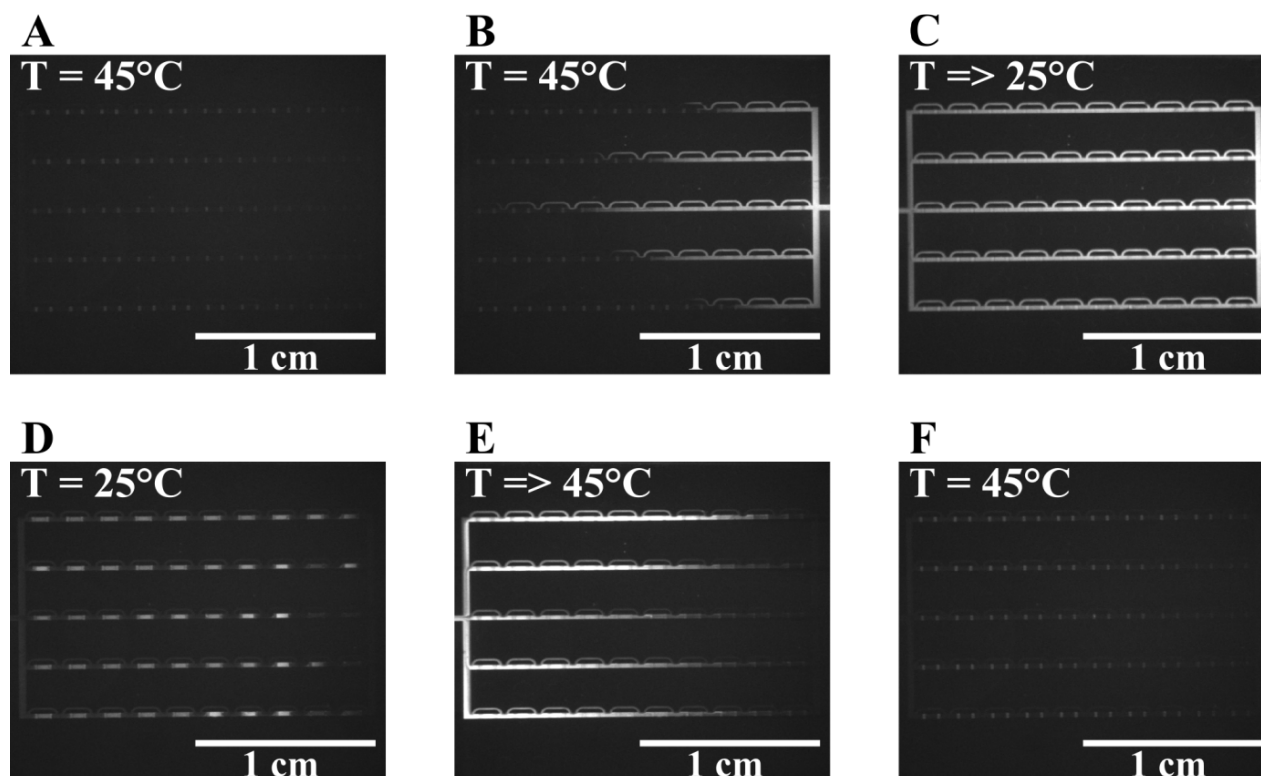


Figure 14 Expérience de piégeage de fluide dans 50 micro-chambres. A – Les micro-chambres sont remplies d’eau à $T > \text{LCST}$ (vannes ouvertes). B – Le fluide à piéger (solution de fluorescéine) est injecté dans la micro-puce. Le flux va de la droite vers la gauche. La solution de fluorescéine progresse dans les branches du canal principal et dans les dérivation jusqu’à remplir totalement la micro-puce. C – Les vannes sont fermées ($T < \text{LCST}$) pour isoler les micro-chambres. D – Le fluide fluorescent est piégé de façon étanche dans les micro-chambres. E – Ouverture des vannes ($T > \text{LCST}$) pour libérer le fluide piégé. La fluorescéine peut de nouveau circuler dans le canal principal. F – La puce est recouverte dans son état initial et prête pour une nouvelle expérience de piégeage.

Le piégeage n’est pas obtenu dans 5 des 50 micro-chambres (figure 14D, coin inférieur droit). Ce résultat s’explique par le fait que le gel est moins épais à cet endroit (mesuré à sec à $1,3 \mu\text{m}$) suite à un dépôt par spin-coating mal contrôlé. Le gel n’étant pas assez épais pour atteindre le plafond du canal à l’état gonflé, les vannes présentent des fuites. La synthèse *ex situ* permet de contrôler les gels avant fermeture du canal et donc de comprendre pourquoi 10% des micro-chambres n’ont pas fonctionné lors de cette expérience. Cette expérience démontre aussi qu’il faut apporter un grand soin à la réalisation d’un dépôt de gel avec une épaisseur homogène sur toute la micro-puce et avec une épaisseur adaptée au micro-canal.

Pour les 45 autres micro-chambres, le piégeage réalisé par deux micro-vannes en hydrogel est effectif pendant plusieurs dizaines de minutes au moins. La décroissance de l'intensité de fluorescence dans les micro-chambres est due au photo-blanchiment de la fluorescéine [6, 7].

En conclusion, nous avons montré que l'intégration de micro-vannes à motifs greffés d'hydrogel stimuable dans des micro-puces fabriquées par la méthode des autocollants en NOA est un processus efficace. Les vannes obtenues ont un fonctionnement réversible et elles montrent une ouverture et une fermeture abrupte et sans hystérésis sur un intervalle de température très réduit autour de la LCST. Les vannes montrent une très bonne durabilité, l'actionnement peut être répété sur des centaines de cycles sans dégradation des plots d'hydrogels. Les micro-puces ainsi fabriquées résistent à des suppressions d'entrée de 1 bar. Cela indique que le collage des autocollants n'est pas perturbé par les traitements effectués sur les substrats permettant de greffer et localiser les hydrogels. Cela montre également que le chevauchement des plots d'hydrogels, plus larges que le canal, n'engendre pas de fuites. Enfin, l'intégration des vannes avec une densité plus élevée est possible.

2.3 Intégration de vannes à hydrogel dans des puces en PDMS

La technologie des autocollants en NOA est bien adaptée à la fabrication de puces avec des micro-vannes selon notre approche. Cependant, il existe d'autres technologies de micro-fabrication et la plus répandue aujourd'hui dans les laboratoires microfluidiques est certainement le PDMS. Cette technologie est probablement celle qui permet la réalisation de micro-puces au plus faible prix.

Le PDMS et la NOA ont des propriétés différentes. Par exemple, le PDMS est perméable aux gaz (comme l'oxygène) ce qui peut être mis à profit dans des applications biologiques. La NOA présente elle une meilleure résistance mécanique (on peut utiliser des surpressions élevées) et une meilleure tenue en température. Il est donc intéressant de pouvoir utiliser plusieurs technologies de micro-fabrication avec nos micro-vannes afin d'adapter le matériau utilisé aux applications visées. Nous avons donc testé la possibilité d'utiliser du PDMS pour réaliser des puces avec nos nouvelles micro-vannes. Cette étude

a été réalisée au cours du stage d'Emilie Bayon et en collaboration avec Loïc D'Eramo au laboratoire Gulliver.

2.3.1 Fabrication de puces microfluidiques en PDMS

L'utilisation du PDMS pour réaliser des puces microfluidiques par réplication d'un moule original a été introduit par l'équipe de Whitesides [8]. La micro-fabrication de puce en PDMS consiste à couler du PDMS non réticulé sur un moule en résine solide. Après réticulation, le PDMS est démoulé puis directement collé sur un substrat plan. Le collage sur des substrats en verre, silicium ou PDMS est simplement obtenu par une activation des surfaces par un traitement plasma.

Le protocole détaillé de fabrication est le suivant :

- on utilise un moule principal (figure 15A) dont la fabrication est détaillée en annexe III ;
- on réalise un mélange de PDMS et de réticulant (9/1 en masse). Les deux composés sont minutieusement mélangés puis le mélange est centrifugé pour éliminer les bulles d'air ;
- le mélange de PDMS liquide est coulé sur le moule (figure 15B). Le tout est ensuite placé sous vide pour éliminer les bulles d'air encore présente dans la mixture très visqueuse ;
- le PDMS est réticulé par activation thermique dans une étuve à 70°C ;
- le PDMS est alors décollé délicatement du moule et les trous correspondants aux entrées et sorties des canaux sont percés à l'aide d'un poinçon (figure 15C) ;
- le substrat en verre ou en silicium et le bloc de PDMS sont traités 1 minute dans un plasma à oxygène. Le traitement oxyde les surfaces et les rend réactives ;
- juste après passage au plasma le PDMS et le substrat sont mis en contact (figure 15E). En quelques secondes le collage est obtenu et il n'est plus possible de séparer le PDMS du substrat sans dégrader le bloc de PDMS ;
- il ne reste plus qu'à connecter la micro-puce pour injecter les fluides (figure 15F).

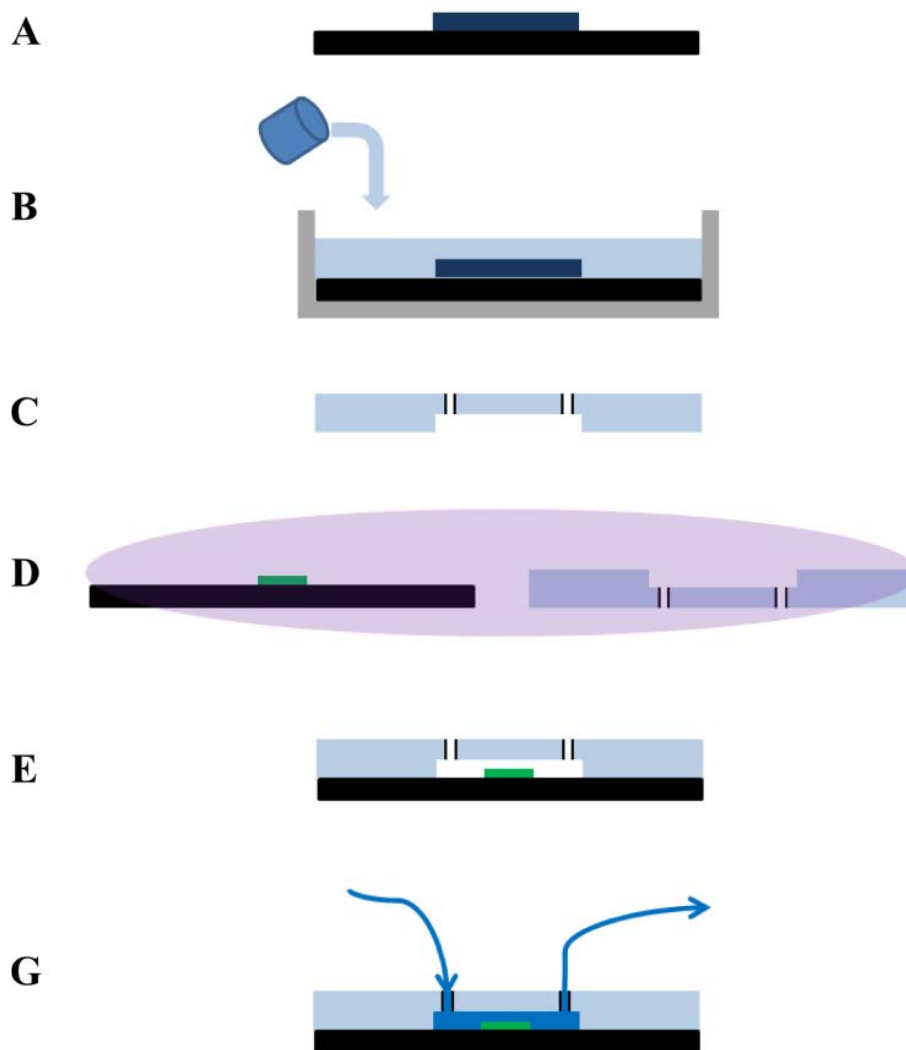


Figure 15 Procédé de fabrication d'une micro-puce en PDMS [8]. **A** – On utilise un moule en résine SU-8 sur wafer de silicium. **B** – Le PDMS non réticulé est coulé sur le moule. Après dégazage, le PDMS est réticulé dans une étuve à 70°C. **C** – Les trous de connexion sont percés avec un poinçon. **D** – Le substrat préparé avec les motifs d'hydrogel et le canal en PDMS sont activés par un plasma à oxygène. **E** – Le canal est collé sur le substrat. **F** – La puce est prête à l'emploi.

Cette méthode fonctionne très bien pour réaliser des puces sans traitement de surface spécifique, c'est-à-dire quand le substrat est simplement une surface de verre, de silicium, ou de PDMS. Dans notre cas, le substrat subit plusieurs traitements afin de pouvoir obtenir les motifs d'hydrogels greffés. Cela implique quelques précautions expérimentales.

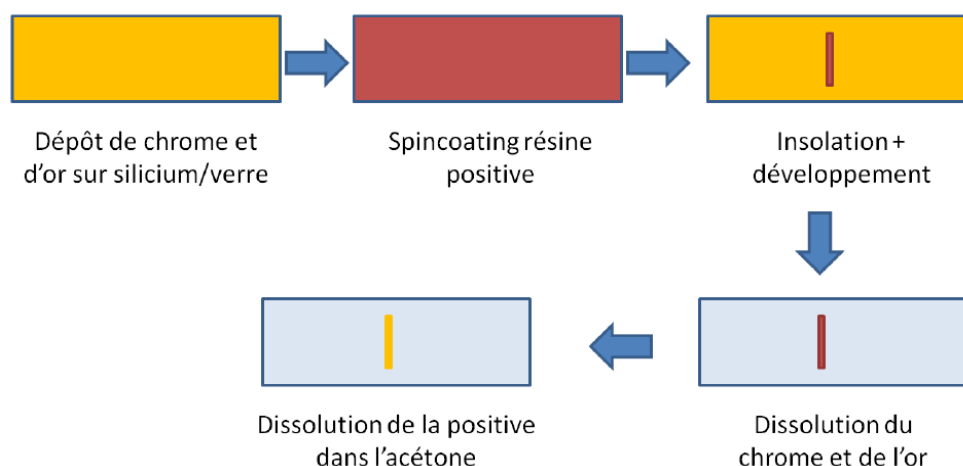


Figure 16 Obtention de motifs d'or sur des surfaces de verre nu

La première des difficultés provient du fait que le PDMS n'adhère ni sur les surfaces d'or, ni les surfaces de verres ou de silicium fonctionnalisées avec des thiols. Cependant, cette fonctionnalisation est indispensable pour greffer l'hydrogel. Nous avons donc recours à des surfaces d'or patternées (figure 16). Les motifs d'or peuvent être fonctionnalisés tandis que le verre est conservé nu pour permettre le collage du PDMS. Les motifs d'or correspondent aux motifs d'hydrogels souhaités. L'hydrogel est ensuite synthétisé par irradiation UV avec un photo-masque aligné sur les motifs d'or.

2.3.2 Problèmes de fuites liés à la présence de l'hydrogel

Pour tester l'intégration de vannes à hydrogel dans des canaux en PDMS le design présenté sur la figure 17A a été réalisé. Le long d'un canal, quatre micro-chambres sont isolées par des paires de vannes de largeurs croissantes (25, 50, 100 et 150 μm). Les plots d'hydrogels mesurent 150 μm de long et 2 μm d'épaisseur. Le canal mesure 8 μm de hauteur. Le PDMS ne permet pas de réaliser des canaux avec un haut rapport d'aspect, une largeur du canal de 50 μm a donc été choisie.

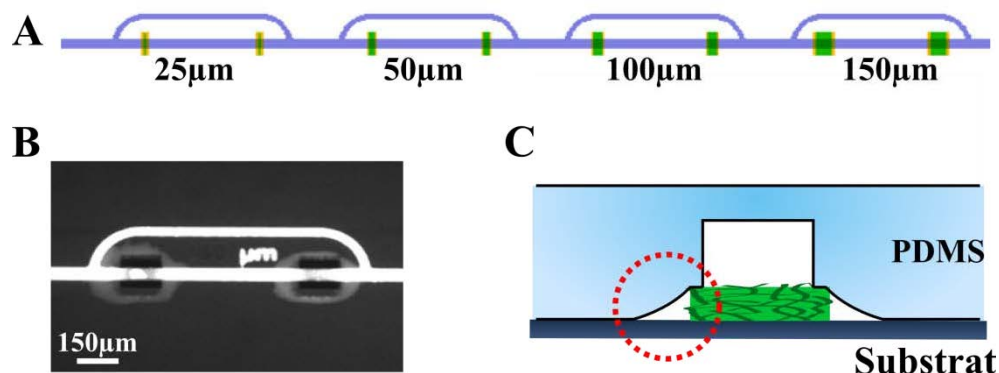


Figure 17 A - Design du système étudié. Celui-ci comprend 4 micro-chambres scellées par des vannes de 25, 50, 100 et 150 μm de largeur. B - Bavure autour des patches de 150 μm après injection de fluorescéine ($T=45^\circ\text{C}$). C - Représentation schématique de la déformation du PDMS au niveau du patch d'hydrogel lors du collage. Le chevauchement du PDMS sur le gel peut être à l'origine de fuites.

Le fonctionnement des vannes est testé par injection de fluorescéine pour réaliser un piégeage dans les micro-chambres. La fluorescéine permet aussi de repérer les fuites autour des vannes par détection de fluorescence en dehors des limites du micro-canal. Les premiers résultats obtenus montrent effectivement des bavures autour de l'ensemble des plots d'hydrogels, ce qui est caractéristique d'une fuite de fluorescéine (figure 17B).

Les plots d'hydrogels mesurent 150 μm de long alors que le canal fait 50 μm de large. Cela facilite l'alignement en permettant une erreur de 50 μm sur le positionnement du canal sur le substrat. Ceci crée une marche de 2 μm de haut que le bloc de PDMS doit amortir. Le fait que le PDMS ne colle pas sur le gel, et qu'il doit accommoder cette marche est certainement à l'origine de ces fuites (figure 17C).

L'alignement du bloc de PDMS sur le substrat est effectué à la main. Il est donc très difficile d'obtenir une précision d'alignement meilleure que les 50 μm prévus. Nous ne pouvons donc pas éliminer le chevauchement du PDMS sur le plot de gel, ou au moins le diminuer, en réduisant la taille des patches de gel. Nous avons donc décidé de modifier la géométrie des patches de sorte à réduire la surface d'hydrogel dépassant du canal, en passant d'un patch rectangulaire à un patch avec une forme hexagonale (figure 18A). Des puces réalisées selon les deux designs ont été utilisées en injectant une solution de fluorescéine avec une pression d'entrée de 345 mbar. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 18.

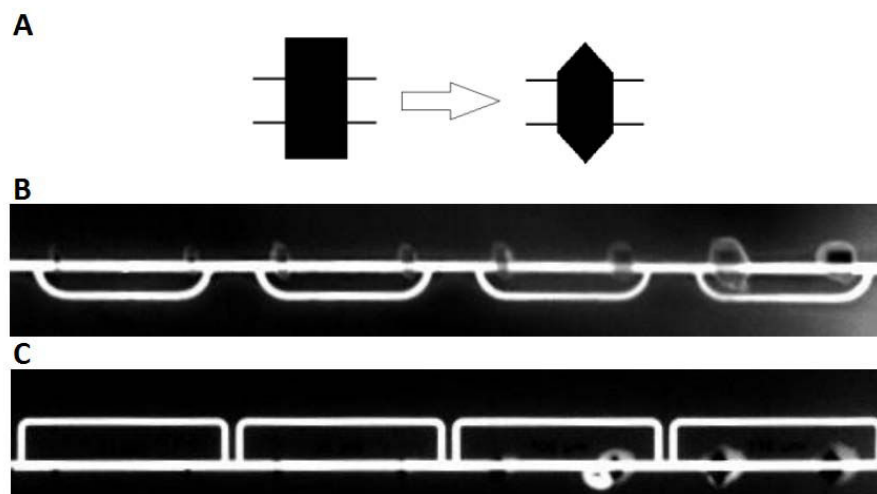


Figure 18 A - Modification de la géométrie des patches du rectangle à l'hexagone. Photos des bavures apparaissant autour des patches avec la géométrie B - rectangulaire ou C - hexagonale.

Grâce au changement de géométrie, les fuites apparaissant autour des vannes lors de l'injection de fluorescéine ont pu être limitées mais pas complètement supprimées. En effet, une nette amélioration a été obtenue pour les patches de 25 et 50 μm mais le problème n'a pas été résolu pour les patches de 100 μm et 150 μm .

2.3.3 Tenue en pression des systèmes en PDMS

Après avoir réalisé plusieurs tests de piégeage de fluorescéine, nous avons constaté que sur une même puce, les fuites autour des patches sont réduites voire inexistantes dans le cas où le fluide est injecté du côté des plus petits patches. Cela est dû au fait que les premiers patches subissent une surpression plus importante que les patches plus éloignés (figure 19A).

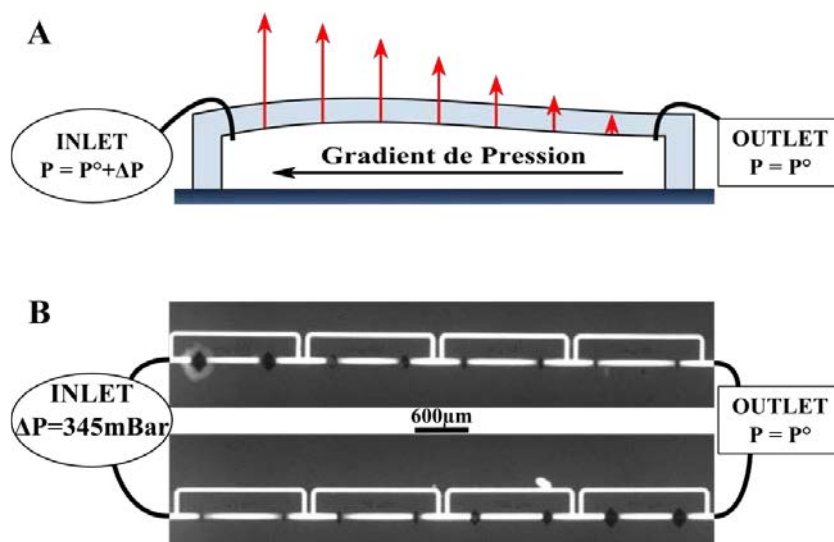


Figure 19 Effet de la surpression sur l'apparition des fuites. A – La différence de pression entre l'intérieur du canal et l'extérieur est maximale vers l'entrée du canal. Le PDMS a donc plus de chance de se décoller à l'entrée. B – Deux canaux réalisés dans les mêmes conditions mais testés en inversant le sens d'injection.

Dans le cas des plus petits patches, la géométrie hexagonale a permis de réduire de façon importante la surface d'hydrogel en dehors du canal. A l'inverse, pour les plus gros patches une grande surface d'hydrogel dépasse toujours du canal. Les zones de chevauchement sont les zones de fragilités où apparaissent les fuites, plus leur surface sera faible moins les forces de pressions auront d'effets néfastes. Ainsi, les vannes avec les plus petits patches résistent mieux à une surpression lors de l'injection d'un fluide. Sur la figure 19B on peut constater que pour deux puces identiques, aucune fuite n'est apparue avec les petits patches vers l'entrée. En revanche, une fuite est apparue autour des vannes de 150 μm lorsqu'elles ont été placées à l'entrée du canal.

2.3.4 Caractérisation des vannes dans des canaux en PDMS

Les problèmes de fuites apparentes étant désormais résolus on peut réaliser une expérience de piégeage de fluorescéine afin de vérifier la bonne étanchéité des vannes dans des canaux en PDMS. Le design permet en outre de tester en une seule expérience quatre largeurs de vannes.

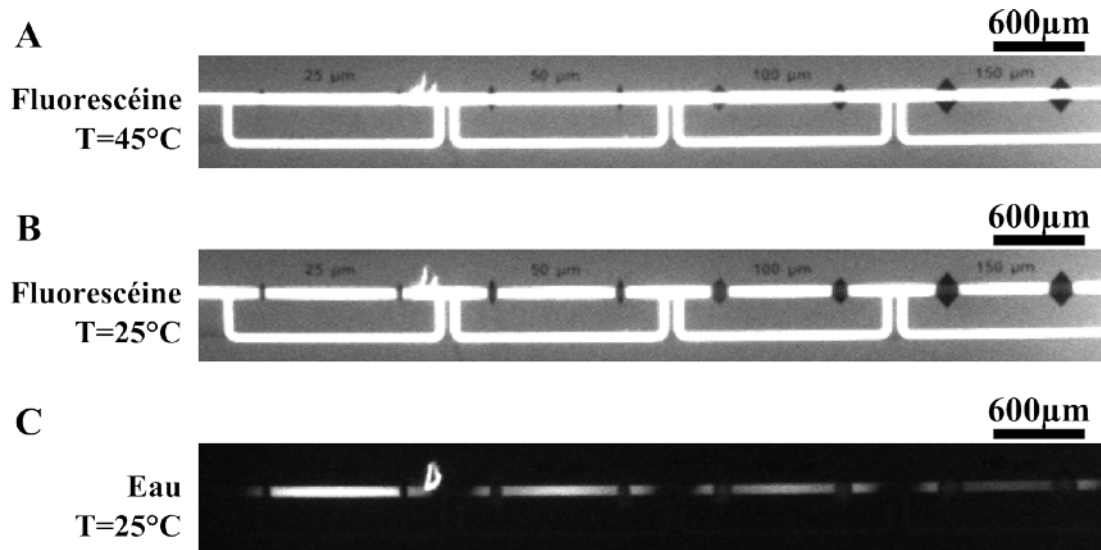


Figure 20 Expérience de piégeage dans des canaux en PDMS. A – A $T > LCST$ les vannes sont ouvertes et les micro-chambres sont remplies de fluorescéine. B – La température est abaissée sous la LCST et les vannes sont fermées. C – De l’eau est injectée dans le micro-canal. La fluorescéine est bien isolée dans les micro-chambres.

L’expérience de piégeage est réalisée avec le même protocole que les expériences précédentes dans les puces en NOA :

- à $T > LCST$ (45°C), le canal est rempli avec une solution de fluorescéine avec une pression d’injection de 345 mbar (figure 20A) ;
- les vannes sont fermées par diminution de la température. La puce est maintenue à $T < LCST$, soit 25°C (figure 20B) ;
- de l’eau est injectée pour nettoyer le canal et révéler le piégeage effectif de la solution fluorescente (figure 20C).

On observe une diminution de la fluorescéine dans les micro-chambres. Cependant, cet abaissement peut être ajusté, pour toutes les chambres, par une exponentielle décroissante avec une constante de temps de l’ordre de 50 secondes. Cela indique que la décroissance est seulement due au photo-blanchiment de la fluorescéine [6, 7].

Le piégeage est donc efficace pour toutes les largeurs de vannes pendant plusieurs minutes. La possibilité de pouvoir utiliser des vannes de 25 μm plutôt que 150 μm apporte une preuve que nos vannes peuvent être avantageusement miniaturisées pour une

intégration à haute densité. Il y a donc un double avantage à utiliser des vannes de 25 μm ou 50 μm :

- les systèmes en PDMS sont moins sensibles à d'éventuels problèmes de fuite ;
- les vannes sont plus petites et peuvent donc être intégrées en plus grand nombre sur des LOC plus complexes.

2.4 Conclusion

Les films minces d'hydrogel de pNIPAM synthétisés préalablement à la micro-fabrication peuvent être intégrés dans des laboratoires sur puces pour obtenir des micro-vannes. La micro-puce peut aussi bien être réalisée avec du PDMS, méthode simple, économique et répandue dans les laboratoires de microfluidique, qu'avec des autocollants en NOA qui apportent une résistance mécanique supérieure. Notre nouvelle approche est donc plus versatile que les vannes pneumatiques, et le matériau de fabrication peut être ajusté aux applications.

Les vannes obtenues ne montrent pas de fuite, le débit est totalement coupé lors de la fermeture. En outre, elles montrent une très bonne tenue dans le temps et un grand nombre de cycles de fermeture/ouverture peuvent être appliqués sans dégradation des micro-vannes. Avec le PDMS, il est toutefois préférable d'utiliser des vannes de faibles largeurs ce qui dans le sens d'une optique de miniaturisation. En revanche, les pressions d'entrées doivent rester plutôt faibles. Avec la NOA, des surpressions de l'ordre du bar sont accessibles sans risque de fuite.

Nous avons montré que la largeur du plot d'hydrogel pouvait être de seulement 25 μm avec une bonne tenue mécanique et une résistance à des surpressions élevées. Le flot direct est stoppé lorsque la vanne est fermée. En revanche, des molécules et particules plus petites que la taille des mailles du réseau de pNIPAM dans l'hydrogel sont susceptibles de diffuser dans le gel. Cette question de la diffusion dans le gel sera discutée dans la prochaine section.

3 Chambre microfluidique reconfigurable

Jusqu'à présent nous avons montré comment obtenir des vannes à hydrogel avec de très bonnes performances grâce à notre nouvelle approche. La fiabilité, la durabilité, la facilité de fabrication et d'actionnement ont été établies. Ici, nous réalisons des systèmes actionnables différents des vannes sur le plan de la fonctionnalité et de la géométrie. Il s'agit de « cages » ou d'« enclos » limités par des parois actionnables qui peuvent être dressées ou ouvertes par changement de température (figure 21).

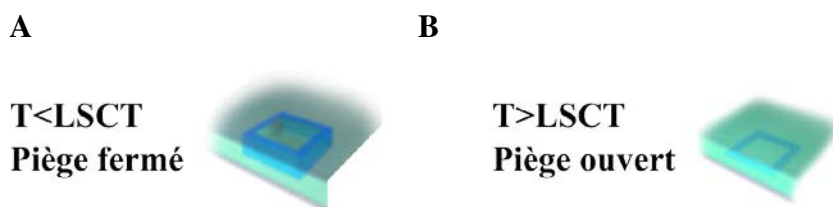


Figure 21 Principe de la chambre microfluidique reconfigurable. A – Lorsque l'hydrogel est gonflé, celui-ci constitue une paroi qui isole une micro-chambre du reste du canal. B - Lorsque l'hydrogel est dégonflé, le mur disparaît et le piège est ouvert.

3.1 Réalisation d'un enclos dans un canal microfluidique

Pour illustrer ce nouveau concept nous avons réalisé un simple enclos dans un canal microfluidique (figure 22). Cet enclos carré de 500 μm de côté est réalisé en hydrogel de pNIPAM. La largeur de la barrière est 50 μm , l'épaisseur sèche de l'hydrogel est 2,5 μm . L'enclos est intégré dans un large canal en NOA de 9,4 μm d'épaisseur. Pour démontrer le bon fonctionnement de cet actionneur, une expérience de piégeage a été réalisée (figure 22) :

- à $T > \text{LCST}$, le gel est effondré. La micro-puce est donc équivalente à un simple canal droit (figure 22A). La fluorescéine est injectée dans le canal, elle peut aller partout et remplit l'enclos (figure 22B) ;

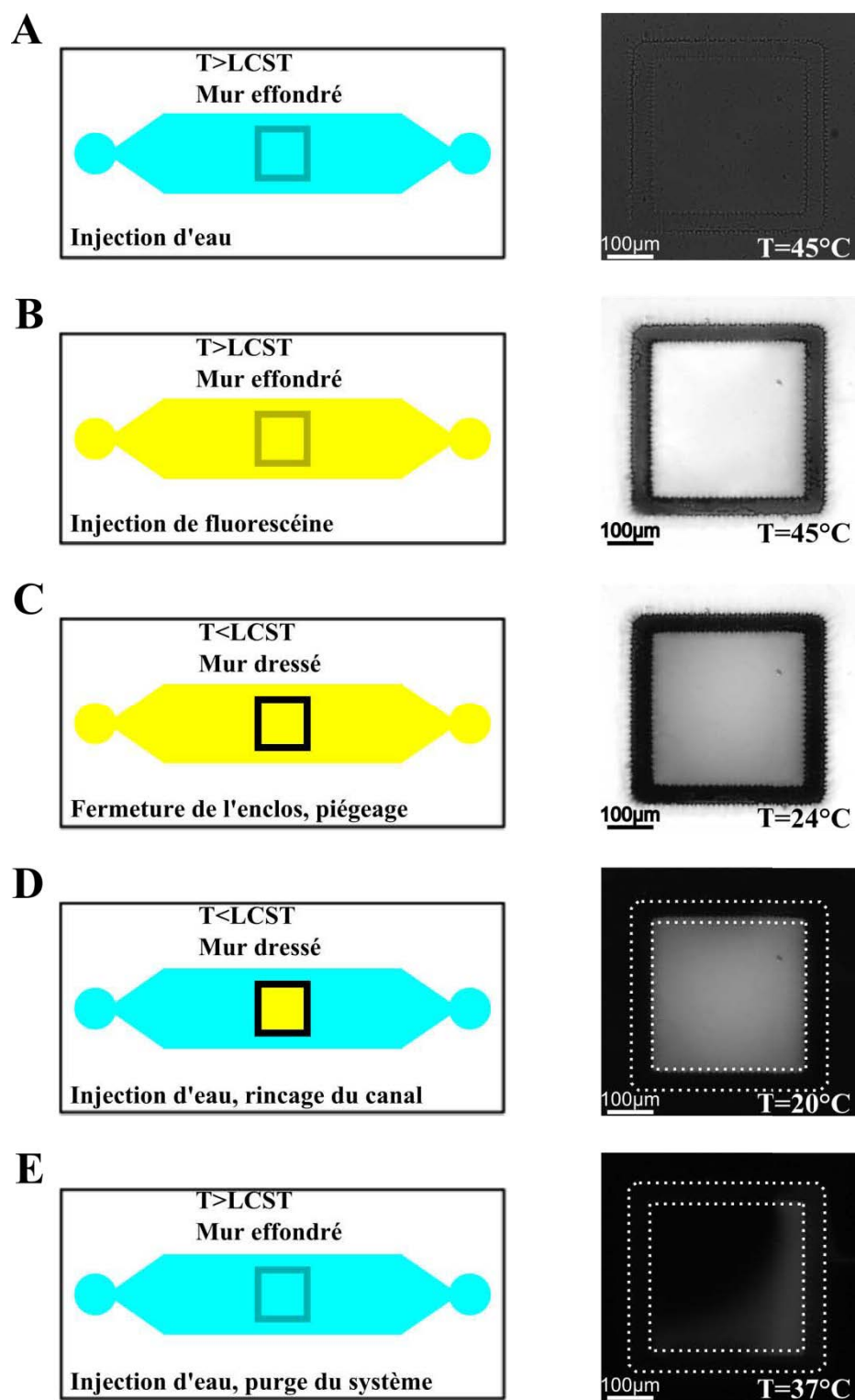


Figure 22 Expérience de piégeage de fluide (réalisée pendant le stage de Bhuwan Ghimire). A – Le micro-canal est rempli d'eau à $T > LCST$ (mur effondré). B – Le fluide à piéger (solution de fluorescéine) est injecté dans le canal. C – Les murs d'hydrogels sont gonflés ($T < LCST$) pour créer la micro-chambre. D – Le fluide fluorescent est piégé dans la micro-chambre. E – Effondrement des murs de l'enclos ($T > LCST$) pour libérer le fluide piégé.

- en abaissant la température sous la LCST, l'hydrogel gonfle. Le mur de l'enclos est ainsi dressé et emprisonne le fluide fluorescent (figure 22C). Lors de l'injection d'eau, la fluorescéine reste piégée dans l'enclos tandis que tout le reste du canal est rincé (figure 22D) ;
- la fluorescéine est libérée en faisant s'effondrer le mur de l'enclos en chauffant la puce au dessus de la LCST (figure 22E).

L'utilisation des hydrogels pour former des éléments reconfigurables permet pour certaines applications une simplification par rapport aux vannes. Ici, la géométrie du canal est simplifiée, les problèmes d'alignement des motifs d'hydrogels par rapport au canal sont éliminés et les chevauchements qui fragilisent les systèmes en PDMS sont évités.

3.2 Intégration à haute densité

L'intégration d'éléments à haute densité est avantageuse pour de nombreuses raisons. D'abord, la miniaturisation entraîne une baisse des quantités de réactifs et donc une diminution des coûts des expériences en microfluidique par rapport aux méthodes classiques. Ensuite, la haute densité permet de réaliser plus de tests plus rapidement ce qui est intéressant pour les applications de criblage ou lorsque l'on doit établir des statistiques fiables sur les échantillons observés.

Sur une micro-puce avec une surface de 2 cm^2 nous avons intégré 50 chambres avec 100 micro-vannes. Sur la même surface, nous pouvons intégrer 3000 enclos reconfigurables (figure 23). Le dessin du canal et des motifs d'hydrogel utilisés correspondent à l'intégration de 44 chambres par mm^2 sur la micro-puce (figure 23A). La densité d'intégration de micro-chambre est donc augmentée de presque deux ordres de grandeur. Les enclos sont circulaires et leur diamètre est de $100 \text{ }\mu\text{m}$. Les murs mesurent $25 \text{ }\mu\text{m}$ de large. Les hydrogels sont synthétisés par irradiation à travers un photo-masque. Un profil 3D de ces motifs, obtenu par un profilomètre interférométrique, est présenté sur la figure 23B

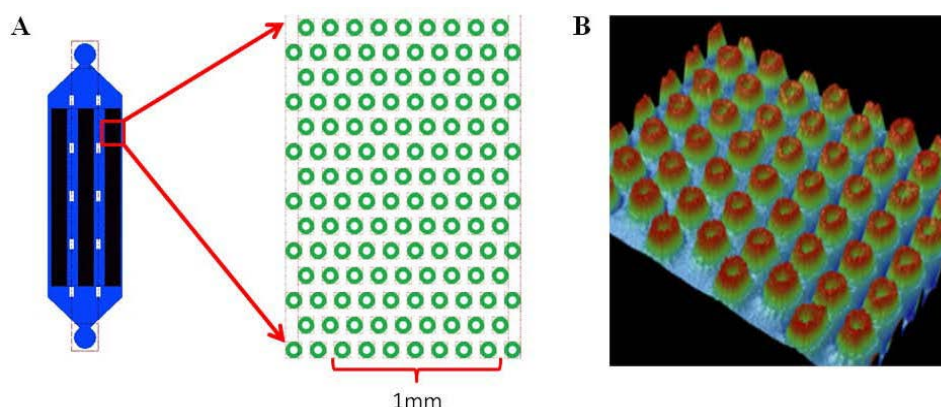


Figure 23 Intégration de 44 chambres microfluidique par mm^2 dans un micro-canal. A – Vu schématique du design du canal et des enclos d'hydrogel. B – Profil en fausse couleur des enclos en pNIPAM (profilométrie optique, mesure à sec par Loïc D'Eramo).

La transition de gonflement dans l'eau de tout ces enclos peut être observée par microscopie à réflexion en lumière blanche (figure 24). A l'aide d'un module Peltier, les 3000 enclos peuvent être dressés ou supprimés par variation de la température. A 25°C , les murs sont gonflés et les enclos fermés. Les murs sont alors invisibles car leur indice optique est proche de celui de l'eau (figure 24A). A 45°C , les murs sont effondrés et la puce est équivalente à un canal très large. Les plots d'hydrogels dégonflés ont un indice optique suffisamment différent de l'eau pour observer une réflexion de la lumière (figure 24C).

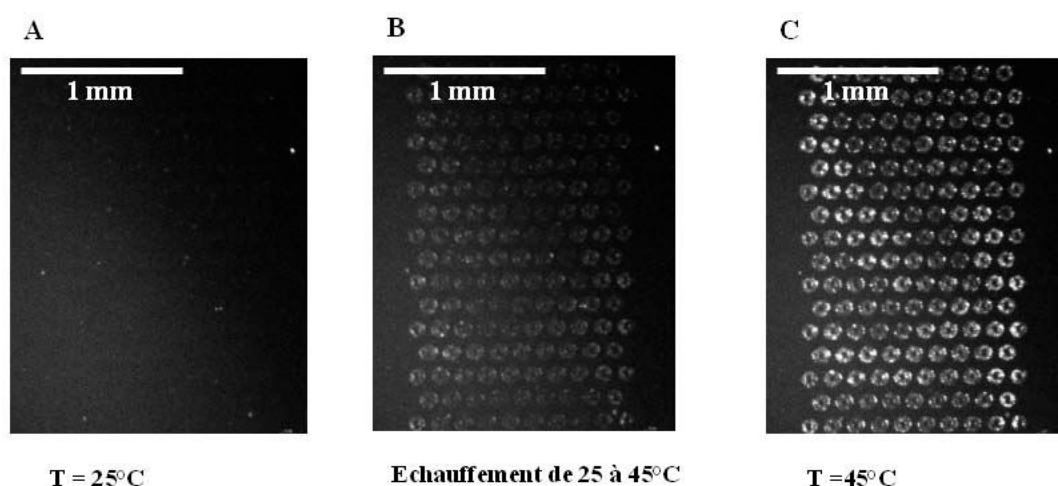


Figure 24 Visualisation en lumière blanche de la transition de gonflement des hydrogels de pNIPAM. A – A 25°C les plots d'hydrogels sont gonflés et leur indice optique est proche de celui de l'eau ce qui les rend invisibles. B – Les plots dégonflent à l'approche de la LCST. C – A 45°C les plots sont effondrés et leur indice optique est suffisamment différent de celui de l'eau pour observer une réflexion de la lumière blanche.

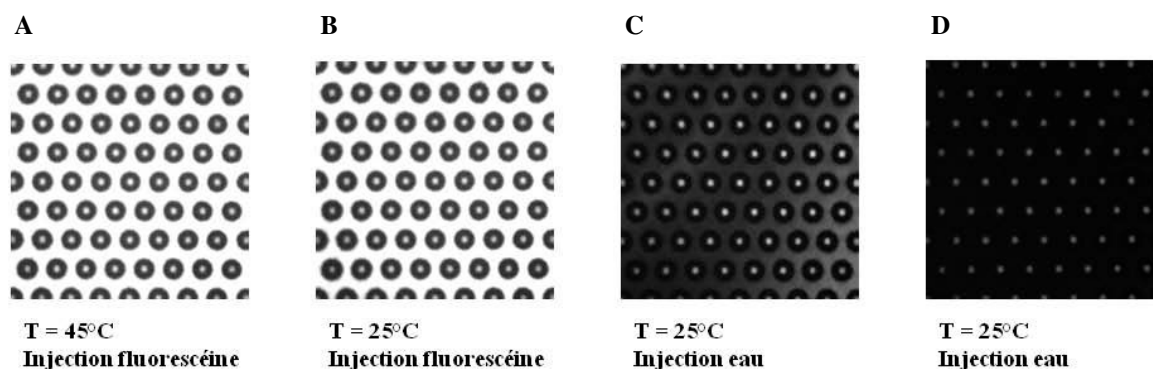


Figure 25 Visualisation du piégeage de la fluorescéine dans les enclos d'hydrogels. A – A $T > LCST$ le enclos sont remplis de fluorescéine. B – Fermeture des enclos par abaissement de la température sous la LCST. C et D – Lors du rinçage du canal avec de l'eau le piégeage est efficace.

Pour démontrer l'efficacité du piégeage de petites molécules dans ces enclos, nous avons injecté une solution de fluorescéine dans cette puce à haute densité de pièges (figure 25A). Lorsque la température est fixée sous la LCST, les murs sont dressés, ce qui s'observe par la diminution de la fluorescence au dessus des hydrogels (figure 25B). Par la suite, de l'eau est injectée dans le micro-canal (figure 25C). Après plusieurs minutes de rinçage, la fluorescéine reste bien piégée dans les micro-chambres (figure 25D).

La réalisation d'enclos reconfigurables, plutôt que l'utilisation de vannes, permet de réaliser des puces avec une densité de chambres bien plus élevée. En effet, avec les vannes la miniaturisation est limitée par les problèmes d'alignement des canaux sur les plots d'hydrogels. Ici ce problème est totalement éliminé. Les pièges reconfigurables présentent donc une alternative intéressante à l'utilisation de vannes pour réaliser des puces à haute densité d'analyses simultanées. La densité d'intégration peut être encore augmentée avec l'utilisation de la lithographie laser qui offre une meilleure résolution. Toutefois, avec la diminution de la largeur des murs d'hydrogel, la diffusion dans le gel ne risque-t-elle pas de devenir manifeste ?

3.3 Etude de la diffusion de la fluorescéine dans les hydrogels de pNIPAM

La question de la fiabilité des vannes vis-à-vis de la diffusion de particules et de molécules de taille inférieure à la taille des pores des hydrogels de pNIPAM est essentielle. En effet, l'intégralité des murs des micro-chambres sont constitués par un hydrogel à l'état gonflé et la largeur de ces murs peut être diminuée afin d'augmenter la densité d'intégration des actionneurs sur les micro-puces.

La mobilité des solutés à l'intérieur des hydrogels est étudiée depuis plusieurs années et plusieurs modèles semi-quantitatifs ont été proposés [9]. La vision générale du problème est que la diffusion est avant tout freinée par des mécanismes de gêne stérique et par des effets hydrodynamiques. Les solutés diffusent dans l'hydrogel à travers les pores de taille plus grande que le rayon hydrodynamique des solutés. Les solutés plus petits que la maille du réseau de polymères réticulés peuvent donc diffuser à travers l'hydrogel qui se comporte comme une membrane semi-perméable.

La taille des pores des gels de pNIPAM que nous utilisons peut être estimée par la taille de la portion de chaînes entre points de réticulations. Le taux de modification du polymère étant de 2%, en considérant que la réaction de réticulation est complète, les portions de chaînes entre points de réticulation contiennent 50 monomères. Pour le pNIPAM, la dimension estimée d'une chaîne gonflée de 50 monomères est au maximum de 2,4 nm [10].

La diffusion d'objets de tailles supérieures à 3 nm devrait donc être quasiment inexistante. Cependant, la fluorescéine a un rayon hydrodynamique de l'ordre de 0,8 nm et est donc susceptible de diffuser au travers des murs de pNIPAM [11].

3.3.1 Expérience de diffusion

Pour déterminer les propriétés de diffusion de la fluorescéine dans les hydrogels de pNIPAM et notamment le temps de piégeage de la fluorescéine par la membrane de gel, nous avons réalisé l'expérience suivante : de l'eau est emprisonnée dans une micro-

chambre et une solution de fluorescéine de concentration constante circule à l'extérieur de l'enclos. La diffusion de la fluorescéine à travers la barrière de pNIPAM est quantifiable par l'évolution de la fluorescence dans l'enclos (figure 26).

La figure 26A présente la situation initiale de l'expérience. De l'eau MilliQ est enfermée dans l'enclos et la température est maintenue à 20°C afin de garder le gel gonflé durant toute l'expérience. Une solution de fluorescéine est en écoulement avec un débit très faible dans le canal. Cela permet de garantir une concentration constante à l'extérieur de l'enclos. Cela va aussi limiter les effets de photo-blanchiment. L'intensité en dehors de l'enclos doit donc être constante au cours de l'expérience. En revanche, la fluorescence doit augmenter dans l'enclos à mesure que la fluorescéine diffuse à travers le mur d'hydrogel.

La figure 26B montre la situation finale. On constate que de la fluorescéine a effectivement diffusé dans la micro-chambre. L'évolution de la fluorescence dans le canal (encadré rouge) et dans l'enclos (encadré bleu) est présentée sur la figure 26C. L'évolution de la fluorescence dans l'enclos montre deux phases distinctes :

- durant la première phase, le signal est constant, c'est-à-dire que la fluorescéine ne passe pas encore dans l'enclos ;
- lors de la deuxième phase, le signal augmente ce qui trahit l'arrivée de fluorescéine dans la micro-chambre.

L'intensité non nulle dans l'enclos lors de la première phase est due à un bruit de mesure lié à la diffusion de la lumière de fluorescence dans le canal par le support de la micro-puce. Cet offset sera soustrait dans la suite de l'analyse.

Les fluctuations de fluorescence dans le canal pendant l'expérience sont un bruit de mesures dû aux variations d'intensité de la lampe et aux variations de fonctionnement du système d'acquisition. La normalisation du signal de fluorescence de l'enclos par ce signal de référence permet de s'affranchir de ce bruit expérimental (figure 26D).

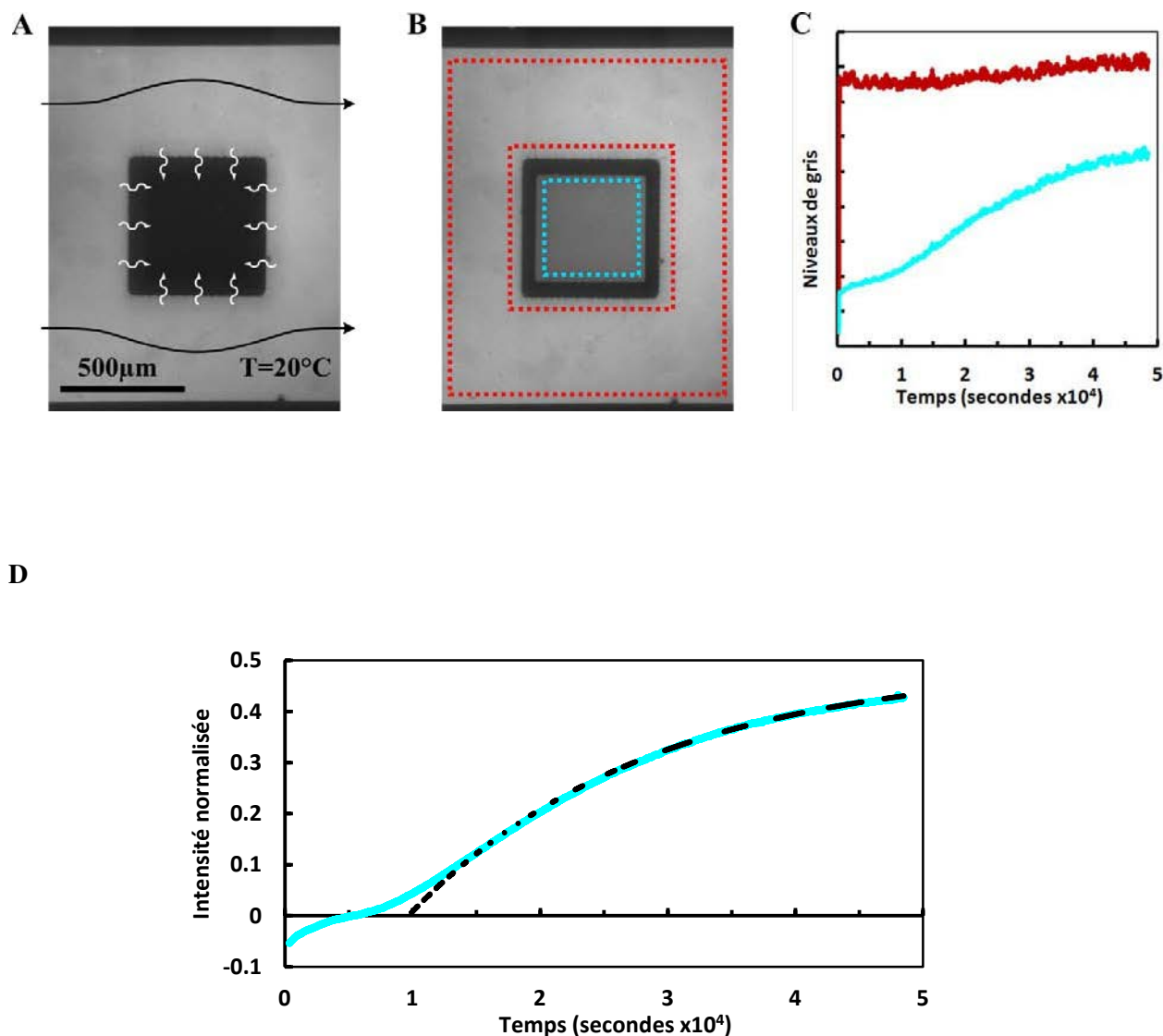


Figure 26 Expérience de piégeage de longue durée pour déterminer les propriétés de diffusion de la fluorescéine dans l'hydrogel de pNIPAM. A – De l'eau est emprisonnée dans l'enclos ($T < \text{LCST}$). Une solution de fluorescéine s'écoule à l'extérieur. La fluorescéine peut diffuser dans la barrière d'hydrogel. B – Après plusieurs heures l'intérieur de l'enclos est devenu fluorescent. On mesure la fluorescence au cours du temps dans l'enclos (encadré bleu) et dans le canal (encadré rouge). C – Niveau de fluorescence dans le canal (rouge) et dans l'enclos (bleu) durant l'expérience. D – Evolution relative de la fluorescence dans l'enclos (bleu). La croissance de la fluorescence est ajustée par une fonction exponentielle retardée.

3.3.2 Estimations du coefficient de diffusion

La durée de la phase 1 et la dynamique de la phase 2 donnent deux estimations du coefficient de diffusion de la fluorescéine dans le gel que nous allons détailler ci-dessous.

Lors de la première phase de l'expérience, on peut considérer que la concentration en fluorescéine dans la chambre est nulle le temps que le flux s'établisse au travers de la barrière, c'est-à-dire pendant :

$$T = \frac{L^2}{D_{gel}} \quad (\text{éq. 9})$$

T est le temps qu'il faut à la fluorescéine pour traverser la barrière de gel de largeur $L = 50 \mu m$. L'ajustement du signal de fluorescence (figure 28A) donne $T = 10^4 s$. On peut donc déduire une estimation du coefficient de diffusion de la fluorescéine dans le gel :

$$D_{gel} = \frac{L^2}{T} \sim \frac{(50 \cdot 10^{-6})^2}{10^4} \sim 2,5 \cdot 10^{-13} m^2 \cdot s^{-1} \quad (\text{éq. 10})$$

Lors de la deuxième phase, nous faisons l'hypothèse que l'intensité de fluorescence dans l'enclos est proportionnelle à la concentration en fluorescéine. Nous considérons aussi que la concentration dans l'enclos est homogène.

Pour justifier la première hypothèse, rappelons que l'intensité de fluorescence I_F s'écrit comme :

$$I_F = \phi_F I_0 (1 - e^{-2,3A}) \quad (\text{éq. 11})$$

où ϕ_F est le rendement de fluorescence de la fluorescéine, I_0 l'intensité incidente d'excitation et A l'absorbance qui s'exprime selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{éq. 12})$$

avec ε le coefficient d'absorption molaire de la fluorescéine, l le trajet optique (égal ici à l'épaisseur du canal, i.e. quelques microns) et C la concentration en fluorescéine. Le coefficient d'absorption molaire est d'environ $10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ (à 490 nm). Dans notre

expérience, la concentration de fluorescéine est au maximum de 10^{-5} mole/Litre et le trajet optique est de l'ordre de $10\text{ }\mu\text{m}$. L'absorbance est donc inférieure à 10^{-3} , c'est-à-dire suffisamment faible pour qu'un développement à l'ordre 1 de l'éq. 11 soit valide :

$$I_F \approx 2,3 \cdot \phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{éq. 13})$$

Cette équation montre le lien de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en fluorescéine.

Pour justifier la deuxième hypothèse, calculons le temps de diffusion τ de la fluorescéine sur la largeur de l'enclos :

$$\tau = \frac{w^2}{D_{\text{eau}}} \sim \frac{(400 \cdot 10^{-6})^2}{4 \cdot 10^{-10}} \sim 4 \cdot 10^2 \text{ s} \quad (\text{éq. 14})$$

où w est la taille de l'enclos et D_{eau} le coefficient de diffusion de la fluorescéine dans l'eau. Le temps nécessaire à l'homogénéisation de la concentration dans l'enclos est bien très petit par rapport à la durée de l'expérience.

Pour décrire l'évolution de la concentration de fluorescéine dans l'enclos lors de la deuxième phase nous utilisons donc le modèle schématisé sur la figure 27 :

- dans le canal (zone I) la concentration reste constante et vaut c_0 ;
- dans l'enclos (zone III) la concentration variable $c(t)$ est homogène ;
- le flux φ de particule à travers la barrière de gel (zone II) est estimé en considérant un profil de concentration linéaire dans le gel et la loi de Fick :

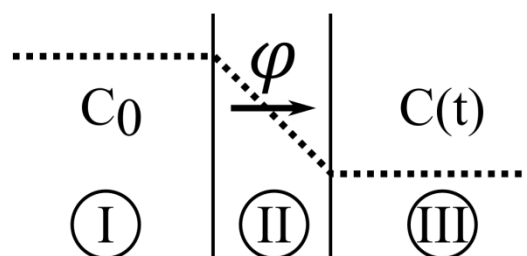


Figure 27 Présentation schématique du modèle utilisé pour ajuster la croissance de la concentration de fluorescéine dans l'enclos.

$$\varphi = D_{gel} \frac{c_0 - c(t)}{L} \quad (\text{éq. 15})$$

Cette approximation de gradient constant dans la barrière de gel s'inspire des problèmes de diffusion de chaleur dans des cas stationnaires ou quasi-stationnaires. Elle est utilisée pour simplifier les problèmes de diffusion dont la résolution analytique est complexe [12, 13].

En intégrant le flux de particules (éq. 15) sur la surface de la barrière, on obtient la variation du nombre de particules dans l'enclos. Par division par le volume de l'enclos, on obtient l'équation différentielle décrivant l'évolution de la concentration dans l'enclos :

$$\frac{dc}{dt} = \frac{4D_{gel}}{Lw} (c_0 - c) \quad (\text{éq. 16})$$

La résolution de cette équation différentielle du premier ordre prédit que la concentration de fluorescéine dans l'enclos évolue comme :

$$c(t) = c_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (\text{éq. 17})$$

où la constante de temps τ vaut :

$$\tau = \frac{Lw}{4D_{gel}} \quad (\text{éq. 18})$$

L'ajustement du signal de fluorescence de la figure 25A donne $\tau = 1,9.10^4$ s. On peut donc déduire une nouvelle estimation du coefficient de diffusion de la fluorescéine dans le gel :

$$D_{gel} = \frac{Lw}{4\tau} \sim \frac{50.10^{-6} 400.10^{-6}}{8.10^4} \sim 2,5 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{éq. 19})$$

Les deux estimations de D_{gel} obtenues avec notre modèle très simple sont identiques. L'expérience de piègeage « inversé » est donc une méthode quantitative de mesure des coefficients de diffusion. En revanche, notre modèle très simplifié n'est pas à même de décrire l'évolution de la fluorescence au niveau de la transition entre les deux phases considérées.

Notons que la présence de l'hydrogel ralentit drastiquement la diffusion de la fluorescéine. De fait, le coefficient de diffusion dans le gel $D_{gel} \sim 2,5 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ est 1700 fois plus petit que le coefficient de diffusion de la fluorescéine dans l'eau. Les petites molécules diffusent effectivement dans l'hydrogel de pNIPAM. Cependant, cette diffusion est très lente. Dans le cas de molécules de rayons hydrodynamiques de 0,8 nm (le cas de la fluorescéine), il faut environ trois heures pour que les molécules traversent une barrière de 50 μm de large. Une barrière de 25 μm , comme celles utilisées sur la puce à haute densité, a donc la capacité de retenir des petites molécules pendant une heure environ. Cette étude pourra être complétée par la caractérisation de la diffusion de molécules chargées par des mesures électrochimiques à travers une barrière de gel (un projet est en cours avec des étudiants de l'ESPCI).

La diffusion n'est par ailleurs pas nécessairement un phénomène néfaste. Par exemple, dans le cas de cultures cellulaires elle peut être mise à profit pour alimenter en nutriments des colonies isolées les unes des autres par une barrière en hydrogel.

4 Activation thermique localisée

Dans cette section, nous allons montrer comment chauffer localement une micro-puce par effet Joule grâce avec des micro-résistances intégrées. Les motivations du développement de l'échauffement localisé sont multiples.

La première motivation est que le chauffage local permet d'individualiser l'activation des actuateurs. Avec le module Peltier, toute la puce est à la même température. Avec le chauffage localisé, certains actuateurs peuvent être activés indépendamment des autres.

La deuxième motivation est d'améliorer le temps de réponse des actuateurs thermosensibles en accélérant le chauffage. En effet, la dynamique de gonflement et dégonflement des hydrogels de pNIPAM est, pour l'instant, limitée par les capacités des modules Peltier qui prennent plusieurs secondes à établir une variation de température suffisante pour activer les hydrogels.

La dernière motivation est la transportabilité des micro-puces. Jusqu'ici, l'état des actuateurs à hydrogel était contrôlé avec un module Peltier. Ce mode de contrôle bien que simple à mettre en œuvre et encombrant. L'utilisation de micro-résistances embarquées sur la puce résout le problème d'encombrement.

Nous allons présenter le principe de l'activation locale par effet Joule et discuterons de son intérêt vis-à-vis de ces trois points. Nous montrerons aussi que l'énergie d'activation d'une micro-vanne par échauffement local peut être faible.

4.1 Micro-résistance en or

L'effet Joule est un effet thermique qui se traduit par une élévation de la température lors du passage d'un courant électrique dans un conducteur. La puissance thermique P dissipée lorsqu'une tension U est appliquée à une résistance R s'exprime comme :

$$P = \frac{U^2}{R} \quad (\text{éq. 20})$$

Pour un conducteur homogène de longueur l et de section S la résistance peut se calculer comme :

$$R = \rho \frac{l}{S} \quad (\text{éq. 21})$$

où ρ est la résistivité du matériau qui traduit sa capacité à s'opposer à la circulation du courant électrique.

Dans notre cas, l'intégration de micro-résistances s'effectue grâce à l'utilisation de substrats en or patternés. En effet, nous avons déjà montré comment obtenir un dépôt d'or en motifs fonctionnalisés sur lesquels un hydrogel peut être greffé. Ici, nous utilisons ces plots d'or comme résistances et ajoutons des pistes de connexion lors de la lithographie de la couche d'or.

Le design d'une puce avec une résistance intégrée est schématisé sur la figure 28A. Le dépôt d'or comprend une micro-résistance et les pistes de connexion. L'hydrogel est greffé sur la résistance en or. Et un canal en NOA est collé sur le substrat au-dessus de la vanne. Un exemple de réalisation de puces avec deux vannes sur micro-résistances intégrées dans deux canaux distincts est photographié sur la figure 28B. On remarque que les connexions ont des terminaisons larges qui permettent d'alimenter la puce en tension grâce à des pointes de touche. Une photographie de la puce dans son support de maintien avec pointes de touche est présentée figure 28C.

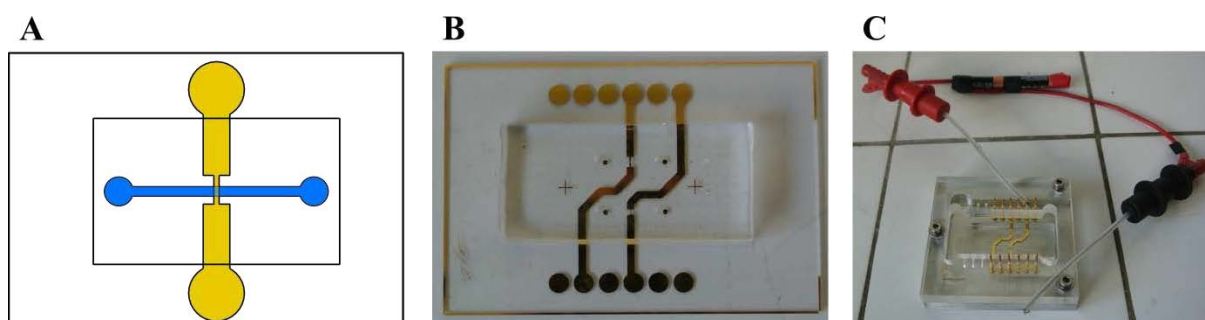


Figure 28 Micro-puce avec micro-résistance intégrée. A – Schéma d'intégration d'une micro-vanne sur une micro-résistance. B – Exemple de micro-puce avec deux vannes. C – Micro-puce dans son support avec pointes de touche. Les pointes de touches permettent la connexion d'une source de tension comme des piles.

4.2 Temps de réponse des vannes à activation localisée

Nous souhaitons réaliser une micro-vanne qui pourra être activée en alimentant la micro-résistance avec de simples piles. Pour cela, une résistance de 250 μm de large et de 1 mm de longueur est réalisée par lithographie d'une couche d'or de 100 nm d'épaisseur. La résistivité de l'or est de $22 \cdot 10^{-9} \Omega \cdot \text{m}$. La résistance théorique donnée par l'équation 18 est de 1 Ω . La résistance totale du circuit, mesurée entre les deux pointes de touche, est de 8 Ω .

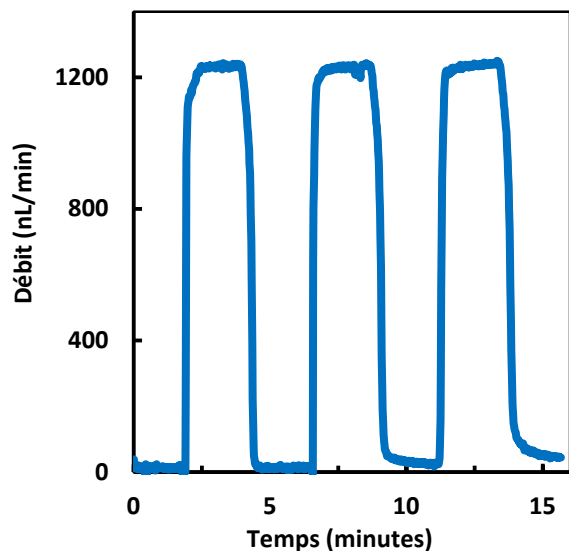
L'hydrogel synthétisé et greffé sur la résistance a une épaisseur de 1,5 μm . Le canal mesure 500 μm de large et 5 μm d'épaisseur. Le bon fonctionnement de la vanne a été vérifié par activation avec des cycles en température entre 25°C et 45°C réalisés avec la platine Peltier (figure 29A). Le temps d'ouverture de la vanne est mesuré à 6 secondes avec le chauffage par Peltier.

Le débit obtenu en branchant une pile AAA (soit 1,6 Volts) ou deux piles en série (3,2 Volts) aux bornes de la résistance est présenté sur la figure 29B. L'élévation de température obtenue avec une pile n'est pas suffisante pour ouvrir totalement la vanne. En revanche, l'utilisation de deux piles en série permet de multiplier par 4 la puissance dissipée par effet Joule et les débits obtenus sont alors très proches de l'activation avec le module Peltier.

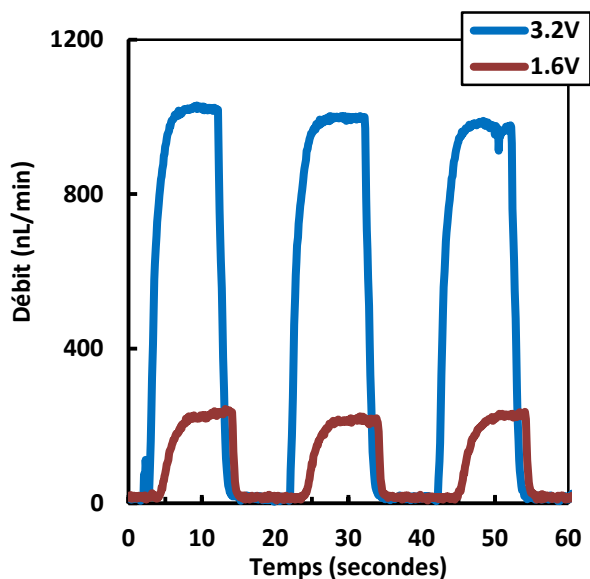
Les figures 29C et 29D montrent l'évolution du débit lors du branchement des piles et lorsque la tension est coupée. Dans les deux cas, la variation du débit peut être ajustée par une courbe exponentielle. Le temps caractéristique obtenu pour l'ouverture de la vanne est de 1 seconde. Pour la fermeture on obtient un temps de 0,5 seconde.

Ces mesures montrent que l'effet Joule généré par des résistances intégrées sur le substrat permet l'activation des vannes en connectant à la puce des piles standards. En outre, les temps d'actuation (ouverture et fermeture) sont divisés par 6. Enfin, utiliser des piles pour actionner ces vannes basées sur des hydrogels permet d'envisager des laboratoires sur puces transportables.

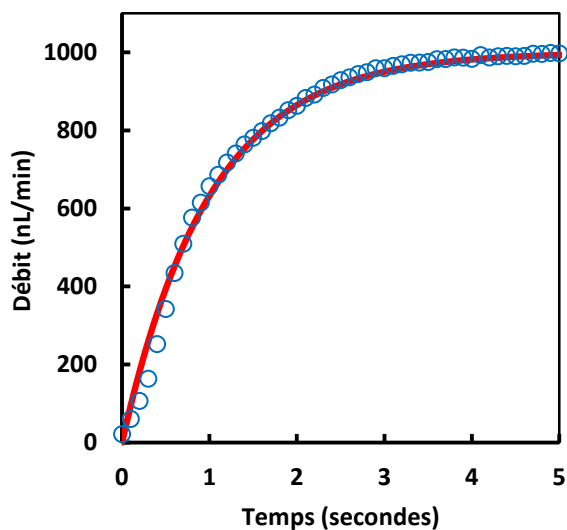
A - Activation par module Peltier tension



B - Activation par application d'une tension



C - Dynamique d'ouverture



D - Dynamique de fermeture

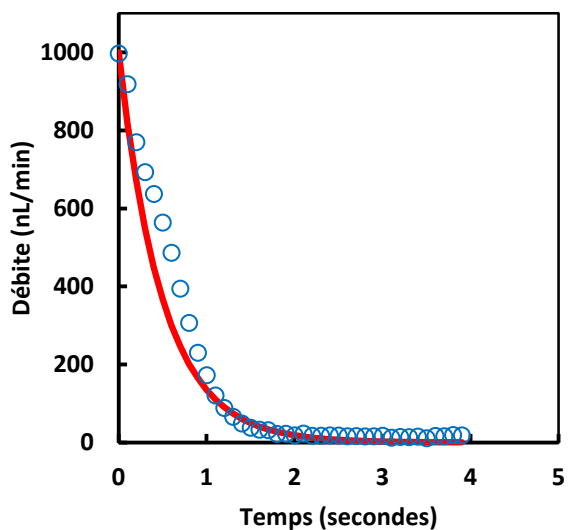


Figure 29 Test d'une vanne à activation locale. A – Test d'activation avec le module Peltier. B – Activation de la vanne par effet Joule en connectant aux bornes de la résistance une pile AAA (rouge) ou deux piles en série (bleu). C – Croissance du débit à travers la vanne lors de la mise sous tension à 3,2 V : données (points bleus) et ajustement exponentiel (trait rouge). D Fermeture de la vanne lorsque la tension est coupée : données (points bleus) et ajustement exponentiel (trait rouge).

4.3 Localisation de l'actionnement

Pour vérifier que l'échauffement est bien localisé à proximité de la résistance nous avons réalisé l'expérience suivante : le même dessin de résistance et le même canal sont utilisés, mais sans la vanne en hydrogel ; la température est mesurée localement dans le canal lors de la mise sous tension de la résistance avec de la rhodamine B.

La rhodamine B possède des propriétés spécifiques de fluorescence en fonction de la température. En particulier, l'intensité de fluorescence décroît lorsque la température augmente. Cette propriété de la rhodamine permet de mesurer la température à l'intérieur du microsystème [14]. La rhodamine est utilisée en solution à 0,1 mM dans l'eau à laquelle on ajoute un tampon carbonate à pH 9,6 concentré à 0,25 M. Pour éviter les problèmes de photo-blanchiment de la rhodamine, l'excitation de la fluorescence par irradiation à 540 nm est synchronisé avec l'acquisition d'image grâce à un obturateur.

La solution de rhodamine B est injectée dans le canal avec un débit constant. Les paramètres d'acquisition étant fixés, une calibration de la réponse en fluorescence de la rhodamine en fonction de la température a été réalisée en fixant la température du micro-canal avec le module Peltier (figure 30A). La puce est ensuite thermostatée dans un « état de référence » à 25°C (figure 30B). Une nouvelle image du canal est prise après la mise sous tension de la résistance figure 30C). Cette dernière image est normalisée par la référence puis est transformée en cartographie 2D de la température dans le micro-canal en utilisant la calibration (figure 30D). La projection de cette carte, perpendiculairement au canal, donne le profil de température le long du canal lors du chauffage via la micro-résistance (figure 30E). Il apparaît qu'un échauffement au dessus de la LCST n'est obtenu qu'au niveau de la micro-résistance.

L'utilisation de résistances intégrées sur le substrat permet donc bien de réaliser des vannes individualisées et activées grâce à un échauffement localisé. Nous apportons donc ici une deuxième preuve de concept importante sur le fort potentiel des vannes à hydrogel.

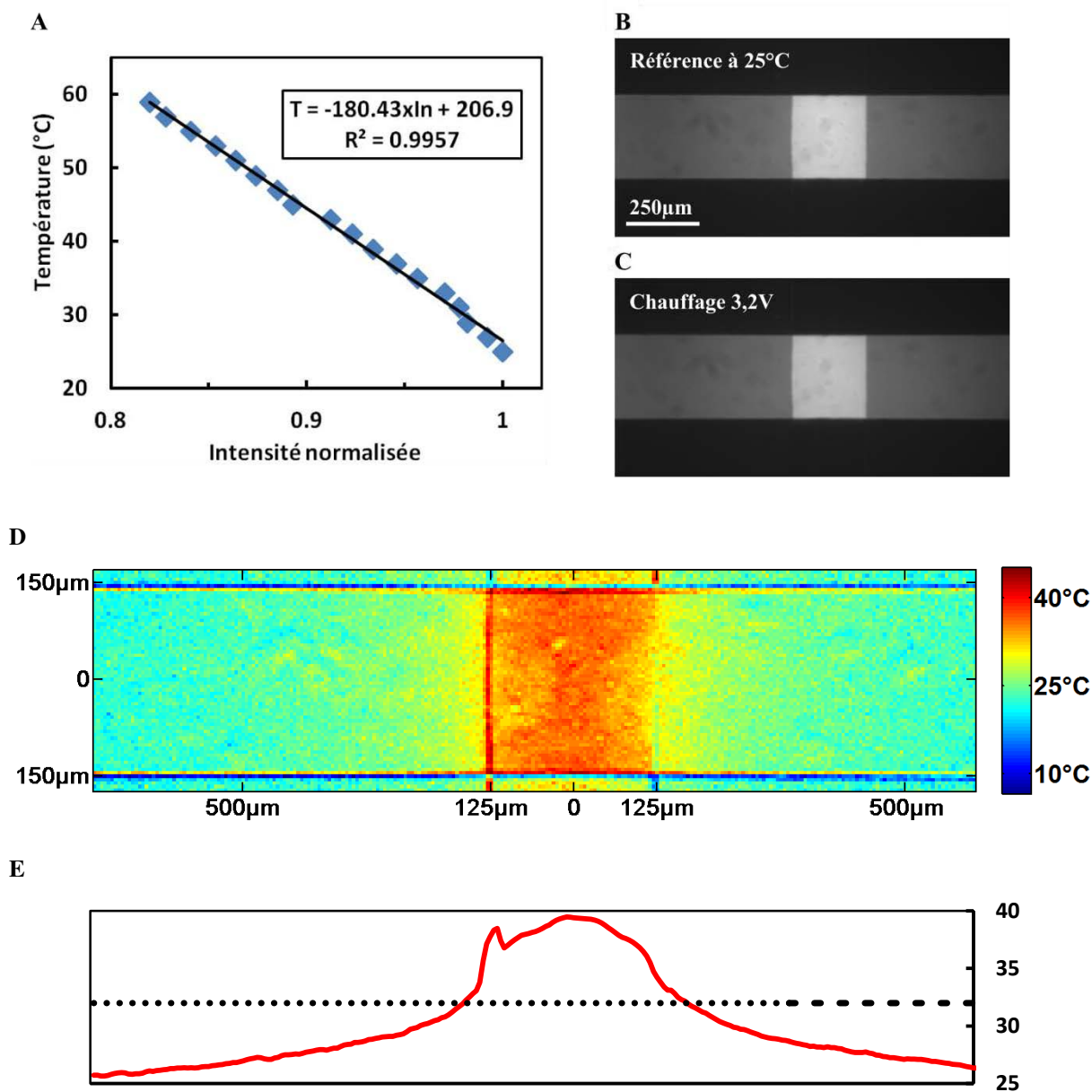


Figure 30 Mesure de température sur la puce. A – Calibration de fluorescence de la rhodamine B en fonction de la température. B – Photographie en fluorescence de la puce thermostatée à 25°C. C – Photographie en fluorescence de la puce lorsque la résistance est alimentée par une tension de 3,2V. D – Carte des températures dans le canal lorsque celui-ci est chauffé par la résistance en or. E – Profil de température le long du canal (rouge). Le trait en pointillé indique la LCST du pNIPAM et délimite la zone d'influence de la micro-résistance.

En résumé, l'utilisation de l'effet Joule et d'un échauffement local permet, d'une part, d'individualiser l'activation des actionneurs à hydrogel et, d'autre part, l'équipement nécessaire pour activer les micro-vannes peut potentiellement être réduit à une simple pile !

Une nuance doit cependant être apportée vis-à-vis de ce dessin de résistance. La résistance du circuit total est très faible, ce qui signifie que le courant électrique qui circule dans la résistance est élevé (de l'ordre de 0,4 Ampère). La conséquence de la faible résistance est donc une puissance dissipée totale importante, celle-ci est supérieure à 1 Watt :

$$P_{diss} = \frac{U^2}{R_{mes}} \sim \frac{3,2^2}{8} \sim 1,3 \text{ W} \quad (\text{éq. 22})$$

Par comparaison avec l'actuation des vannes à mémoire de formes qui ont été présentées en introduction de ce manuscrit [15], cette énergie doit pouvoir être diminuée d'au moins un ordre de grandeur. D'ailleurs, la résistance intégrée est de 1 Ω alors que le circuit total a une résistance de 8 Ω , ce qui veut dire que seulement $1/8^{\text{ème}}$ de l'énergie totale est effectivement dissipée au niveau de la micro-vanne.

Pour améliorer le rendement énergétique de l'échauffement local, il faut augmenter la résistance au niveau de la micro-vanne pour que cette résistance domine la résistance totale. Une façon d'augmenter le contraste de résistivité entre la zone de chauffe et les connectiques est de réaliser la résistance avec une piste étroite en serpentín plutôt qu'une piste droite. En jouant ainsi sur la géométrie une résistance de l'ordre de 50 Ω est réalisable [15].

Un deuxième levier accessible est la résistivité du matériau utilisé. En annexe V, nous présentons la réalisation de résistance de 300 Ω en chrome et or qui permet l'activation des vannes avec une puissance de 30 mW. Le temps du chauffage local et aussi accéléré, l'élévation de température nécessaire à l'activation des vannes est obtenu en 0,1 seconde. Ce design nécessite une lithographie en deux étapes pour la préparation du substrat et les résistances en chrome se dégradent rapidement. Pour que cette méthode devienne reproductible, il est nécessaire de protéger les dépôts de chrome avec une couche d'oxyde de silice par exemple.

La leçon à tirer de ces expériences est que l'augmentation de la résistance locale, ainsi que l'augmentation du contraste de résistivité entre la zone de chauffe et les connectiques, permet une amélioration notable des performances en matière d'énergie d'activation d'une part, et en vitesse d'activation d'autre part. Cependant, l'intégration des résistances doit encore être améliorée, soit par l'utilisation de serpentin en or, soit par protection des couches de chrome, afin d'allier haute résistivité (faible puissance) et durabilité.

En conclusion, les vannes à activation électrique par effet Joule peuvent être activées grâce à un chauffage local avec une énergie aussi faible que 30 mW et un temps caractéristique de l'ordre de 0,1 seconde. Cela place la technologie des vannes à hydrogels stimulables à un haut niveau de performance du point de vue des critères de fonctionnement et de contrôlabilité.

Conclusion

Pour réaliser des actionneurs microfluidiques basés sur des hydrogels stimulables, nous avons proposé une approche avec une synthèse *ex situ* des gels. La micro-fabrication est réalisée en deux étapes :

- la synthèse de films d'hydrogels thermo-stimulables sur un substrat ;
- l'intégration des gels dans les micro-puces lors de la micro-fabrication.

La première étape a été mise au point grâce à une synthèse contrôlée présentée au chapitre 2. La deuxième étape, exposée dans ce chapitre, est simple puisque les systèmes peuvent être fabriqués par les méthodes répandues des autocollants en NOA ou des répliques en PDMS.

Les performances des vannes thermosensibles ainsi obtenues ont été testées. Le fonctionnement s'avère réversible et durable. En outre, les vannes présentent une étanchéité parfaite vis-à-vis du flux direct et la diffusion de petites molécules à travers les barrières d'hydrogels a été mesurée et est faible.

Nous avons montré que les vannes en hydrogel de pNIPAM peuvent être activées avec un équipement réduit à une pile. L'énergie nécessaire à cette activation est seulement de quelques dizaines de milliwatts.

Nous pouvons donc considérer atteint l'objectif fixé de produire une technologie de vannes microfluidiques répondant aux trois critères suivants :

- facilité de fabrication ;
- bonnes performances de fonctionnement ;
- capacité de contrôle des laboratoires sur puces avec un équipement réduit.

Le développement de ces vannes performantes s'appuie sur une maîtrise des techniques de fabrication et sur une synthèse simple et versatile des hydrogels qui prend en compte les contraintes inhérentes à la fabrication des puces. L'intégration des hydrogels dans les micro-canaux a ainsi pu être optimisée.

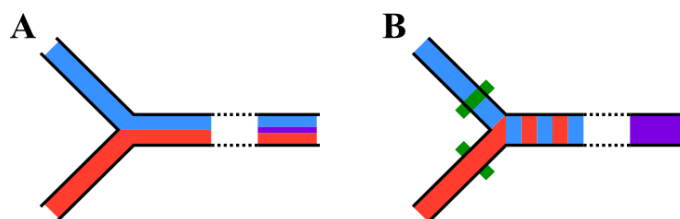


Figure 31 Principe d'un mélangeur microfluidique à une jonction Y. A – En l'absence de vannes un co-flux est établi et le mélange par interdiffusion est long. B – Les vannes alternées entremêlent les fluides ce qui accélère le mélange par diffusion.

L'utilisation de ces vannes ouvre de nombreuses perspectives notamment pour des puces à faible coût et facilement contrôlables. Un exemple simple de fonction réalisable est un mélangeur microfluidique réalisé dans un canal en Y où les deux entrées sont contrôlées par deux vannes indépendantes. Les vannes sont activées alternativement pour mélanger au mieux les phases entrantes (figure 31). En augmentant progressivement la vitesse d'alternance jusqu'à perdre le bon mélange des phases, cette expérience peut aussi être utilisée pour déterminer la fréquence maximale d'utilisation des vannes.

L'approche de fabrication des actionneurs à base d'hydrogels mise au point dans cette thèse permet de réaliser des éléments reconfigurables. La fabrication de ces éléments offre une simplification des géométries pour la réalisation de certaines fonctions comme des micro-chambres. L'impact de tels actionneurs peut être important dans des domaines comme la biologie et le criblage.

Références

1. Bäcker, M., M. Raue, S. Schusser, C. Jeitner, L. Breuer, P. Wagner, A. Poghosian, A. Förster, T. Mang, and M.J. Schöning, *Microfluidic chip with integrated microvalves based on temperature- and pH-responsive hydrogel thin films*. physica status solidi (a), 2012. **209**(5): p. 839-845.
2. Eddington, D.T. and D.J. Beebe, *Flow control with hydrogels*. Advanced drug delivery reviews, 2004. **56**(2): p. 199-210.
3. Tabeling, P., *Introduction to microfluidics*. 2010: Oxford University Press.
4. Bartolo, D., G. Degré, P. Nghe, and V. Studer, *Microfluidic stickers*. Lab on a Chip, 2008. **8**(2): p. 274-279.
5. Sjöback, R., J. Nygren, and M. Kubista, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(6): p. L7-L21.
6. Saylor, J., *Photobleaching of disodium fluorescein in water*. Experiments in fluids, 1995. **18**(6): p. 445-447.
7. Song, L., E. Hennink, I.T. Young, and H.J. Tanke, *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. Biophysical journal, 1995. **68**(6): p. 2588.
8. Duffy, D.C., J.C. McDonald, O.J. Schueller, and G.M. Whitesides, *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
9. Amsden, B., *Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models*. Macromolecules, 1998. **31**(23): p. 8382-8395.
10. Longhi, G., F. Lebon, S. Abbate, and S.L. Fornili, *Molecular dynamics simulation of a model oligomer for poly (N-isopropylamide) in water*. Chemical physics letters, 2004. **386**(1): p. 123-127.
11. Banks, D.S. and C.c. Fradin, *Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding*. Biophysical journal, 2005. **89**(5): p. 2960-2971.

12. Mezin, A., J. Lepage, and P. Abel, *An analytical solution for non-steady-state diffusion through thin films*. Thin solid films, 1996. **272**(1): p. 124-131.
13. Bharat, T.V., *Analytical model for 1-D contaminant diffusion through clay barriers*. Environmental Geotechnics, 2013. **1**(4): p. 210-221.
14. Ross, D., M. Gaitan, and L.E. Locascio, *Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(17): p. 4117-4123.
15. Takehara, H., C. Jiang, K. Uto, M. Ebara, T. Aoyagi, and T. Ichiki, *Novel microfluidic valve technology based on shape memory effect of poly (ϵ -caprolactone)*. Applied Physics Express, 2013. **6**(3): p. 037201.

Conclusion et perspectives

Nous avons défini et appliqué une nouvelle approche des actionneurs microfluidiques basée sur des films minces greffés d'hydrogels stimulables.

Les motivations au développement de cette nouvelle technologie de vannes étaient les suivantes :

- développer une technologie d'actionneurs, en particulier de vannes microfluidiques, dont le contrôle est simplifié par rapport aux technologies existantes permettant ainsi une économie de moyen nécessaire à leur actionnement ;
- simplifier la micro-fabrication des micro-puces avec des actionneurs à hydrogels en s'appuyant sur les techniques classiques de fabrication et sur une synthèse *ex situ* qui permet un meilleur contrôle ;
- obtenir des performances compétitives par rapport aux vannes pneumatiques –les plus utilisées actuellement sur les laboratoires sur puces. C'est-à-dire, avoir un fonctionnement réversible et durable, une absence de fuite (mesurable) et un temps d'actionnement court.

La méthode que nous avons expérimentée dans cette thèse est une synthèse de motifs greffés d'hydrogels formant les actionneurs préalablement à la micro-fabrication. La stratégie d'une synthèse *ex situ* permet de mieux contrôler la fabrication et les propriétés des gels. Nous avons ainsi obtenu des films minces localisés de polymères réticulés et greffés sur le substrat dont les propriétés stimulables peuvent être bien caractérisées et la résistance mécanique améliorée par rapport aux approches *in situ* trouvées jusqu'à maintenant dans la littérature.

Concernant la micro-fabrication, cette méthode permet d'obtenir les micro-puces en deux étapes. La première est la synthèse des motifs de polymères, qui s'effectue par un processus lithographique. La deuxième est le collage des canaux sur le substrat. Les canaux peuvent être réalisés aussi bien par la méthode des autocollants microfluidiques en NOA que par les répliques en PDMS. Cela offre la possibilité d'adapter les matériaux aux applications visées. Enfin, une seule étape d'alignement entre les canaux et les hydrogels est nécessaire lors de la fabrication de la puce.

Les micro-vannes ainsi fabriquées ont été testées sur plusieurs centaines de cycles sans dégradation des hydrogels, sans dérive sur le débit dans les micro-canaux et sans que des fuites soient observées. Le temps de réponse de ces vannes contrôlées par un module Peltier est de l'ordre de quelques secondes. Le temps de réponse a été diminué sous la seconde lorsque le contrôle se fait par le biais de micro-résistances chauffantes intégrées à la puce (par effet Joule).

Nous avons aussi mis en place des micro-chambres reconfigurables. Ces actionneurs remplacent l'utilisation des micro-vannes pour créer une fonction de piégeage avec une géométrie de canal et un alignement simplifiés lors de la micro-fabrication. Ce développement ouvre la voie vers des puces microfluidiques reconfigurables.

Enfin, notre approche nous a permis de mettre en place des micro-puces comprenant plusieurs dizaines de vannes ou plusieurs milliers d'actionneurs reconfigurables, dont l'actionnement était contrôlé par un module Peltier. Cette technologie ouvre donc la voie à une simplification du contrôle des actionneurs microfluidiques qui, dans le cas de vannes pneumatiques, nécessite un appareillage conséquent. En outre, nous avons montré que l'intégration de micro-résistances en or au niveau des vannes dans les micro-puces permettait un actionnement avec un équipement aussi réduit qu'un générateur de tension. Cette preuve de concept permet d'envisager des laboratoires sur puces transportables et utilisables partout.

Pour obtenir les micro-actionneurs selon notre nouvelle approche *ex situ*, il a été nécessaire de développer une synthèse de films minces de polymères greffés sur leur substrat. La stratégie que nous avons utilisée est la réticulation et le greffage simultanés d'un dépôt de chaînes polymères préformées et fonctionnalisées. La réaction de réticulation/greffage est la réaction click thiol-ène. Les chaînes sont donc fonctionnalisées avec des groupes ène et on utilise un réticulant dithiol. La réaction thiol-ène peut être activée thermiquement ou par irradiation UV. A noter que la réaction de réticulation/greffage s'effectue sans ajout d'initiateur ou de catalyseur.

Cette stratégie de synthèse s'avère donc plus simple et versatile que les quelques protocoles de synthèse de films minces décrits dans la littérature. L'épaisseur des films de polymères est ajustée lors du dépôt en fonction de la concentration en polymère dans la

solution de spin-coating ou de la masse molaire du polymère. La gamme des épaisseurs réalisables s'étend de la centaine de nanomètres à plusieurs microns. Nous avons montré qu'il est possible de réaliser très simplement des motifs d'hydrogels greffés avec une résolution latérale de 3 μm .

Cette stratégie permet aussi l'élaboration de réseaux complexes comme des multicouches (inspirées des assemblages layer-by-layer), des réseaux interpénétrés ou des réseaux hybrides. La fabrication de ces films minces de gels à architecture à façon dépassent l'objet de ce manuscrit mais est étudiée au laboratoire SIMM et ouvre un large champ d'applications pour l'exploitation des films minces de polymères.

Au cours de cette thèse, nous avons donc démontré la faisabilité et les performances des actionneurs microfluidiques en hydrogels greffés stimulables. Partant de nos travaux de nombreuses études peuvent être envisagées.

D'un point de vue technologique, il serait intéressant de pouvoir réaliser des vannes normalement fermées ou normalement ouvertes avec une température de transition adaptée à l'application visée par une puce. Il faut donc poursuivre la recherche sur l'élaboration de films minces de polymères avec des propriétés thermo-stimulables différentes, à LCST élevée ou à UCST. Il est nécessaire de disposer d'une gamme de polymères thermosensibles avec différentes températures de transitions. Ce travail est en cours avec la thèse d'Ekkachai Martwong au laboratoire SIMM. Il s'agit de polymères à LCST avec des températures de transition plus élevées que le pNIPAM : le poly(*N*-isopropylmethacrylamide) (pNIPMAM), le poly(*N,N*-méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (pMADAME) ou encore le poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol)) (PEGMA) avec des chaînes plus ou moins longues de PEG. Les films de gels à UCST sont également étudiés comme le poly(méthacrylamide) (pMA) ou encore les polyzwitterions comme le poly(sulfobetaines) qui ont l'avantage d'associer les propriétés anti-fouling aux propriétés UCST..

L'expérience acquise sur les actionneurs thermosensibles doit être également exploitée pour mener à bien l'intégration de films d'hydrogels de polyélectrolytes afin de réaliser des actionneurs électro-sensibles. Le principe de fonctionnement de ces actionneurs est de déplacer les contre-ions du gel chargé par application d'un champ électrique pour

provoquer une transition gonflement-dégonflement (voir annexe VI). La difficulté majeure est la fabrication des électrodes de part et d'autre du gel. Grâce aux expériences acquises sur la mise en place de dispositifs fonctionnant par effet Joule, nous savons intégrer facilement une électrode sur le bas du canal. Cependant l'intégration de la deuxième électrode sur le plafond, isolée du canal et sans risque de court-circuit n'est pas encore résolue. Les hydrogels électro-sensibles présentent une activation « orthogonale » à l'activation thermique (les hydrogels de polyélectrolytes sont insensibles aux variations de température et les hydrogels de pNIPAM sont insensibles à la présence d'un champ électrique) ce qui permet d'imaginer des puces micro-fluidiques reconfigurables multi-états.

D'un point de vue des applications, un certain nombre d'expériences réalisées grâce au recours des vannes pneumatiques ou de la microfluidique digitale pourraient être avantageusement revisitées avec les actionneurs à hydrogels. D'une part, ceux-ci permettent de s'affranchir des contraintes topologiques liées aux vannes grâce à la reconfigurabilité, ce qui simplifie les conceptions des micro-puces. D'autre part, les pièges en hydrogels sont plus accessibles et plus facilement manipulables que des micro-gouttes stockées dans un « drop park ».

L'utilisation des actionneurs à hydrogels offrirait donc une conception simplifiée des laboratoires sur puces, un contrôle et un actionnement de la puce moins exigeant, et donc une certaine diminution des coûts par rapport aux approches actuelles. Il apparaît alors que les actionneurs à hydrogels stimulables pourraient avoir un impact important sur de nombreuses applications de la microfluidique comme le criblage ou la biologie. Cependant, la biocompatibilité de ces systèmes doit encore être démontrée expérimentalement.

Annexes

I - Ellipsométrie.....	159
II – Spectroscopie infrarouge en ATR	165
III – Variations de l'épaisseur d'un film de pnipam avec l'humidité	168
IV – Micro-fabrication des moules en su8 et des timbres en pdms	170
V – Vanne a activation localisée : Effet Joule avec une résistance en chrome	173
VI – Vanne a activation localisée : la vanne électro-sensible	177

I - ELLIPSOMETRIE

L'ellipsométrie est une méthode optique permettant de déterminer les caractéristiques d'un film homogène à la surface d'un substrat réfléchissant. Le principe de la mesure consiste à mesurer et à analyser les variations d'amplitude et de phase d'un faisceau laser après sa réflexion sur le substrat. On peut ainsi déterminer les épaisseurs (de 1 Å à quelques microns) et indices de réfraction du film.

1 Principe de l'ellipsométrie

Lorsque l'on envoie une onde plane sur une surface réfléchissante, la réflexion modifie l'état de polarisation de la lumière. Afin de décrire cette modification, on définit les coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence, respectivement r_p et r_s définis par :

$$r_p = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} = |r_p| \exp(j\delta_p)$$

$$r_s = \frac{E_{sr}}{E_{si}} = |r_s| \exp(j\delta_s)$$

Avec E_{pi} et E_{si} , respectivement les champs électriques parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence et E_{pr} et E_{sr} , respectivement les champs électriques parallèle et perpendiculaire après réflexion. Les coefficients r_p et r_s sont des nombres complexes. Leur module $|r_p|$ et $|r_s|$ représentent la modification de l'amplitude du champ électrique et leur phase δ_p et δ_s , le retard introduit par la réflexion sur le substrat.

L'ellipsométrie est basée sur la mesure des états de polarisation des ondes incidente et réfléchie, et conduit à la détermination de l'ellipticité ρ , qui est le rapport des coefficients complexes r_p et r_s :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \left| \frac{r_p}{r_s} \right| e^{i(\delta_p - \delta_s)} = \tan \psi e^{i\Delta}$$

où $\tan \psi = \left| \frac{r_p}{r_s} \right|$ est le rapport des modules associé à un changement d'amplitude après réflexion sur la surface et $\Delta = \delta_p - \delta_s$, est associé à un changement de phase après réflexion sur la surface.

Les coefficients de réflexion dépendent de l'angle d'incidence et des indices des deux milieux (ceux-ci sont fonctions de la longueur d'onde λ). En pratique, on mesure $\tan \psi$ et $\cos \Delta$. Une mesure effectuée à une incidence et à une longueur d'onde donnée permet de déterminer deux paramètres du film, tels que son épaisseur γ , et son indice de réfraction n . En effet, un calcul numérique à partir des équations ellipsométriques reliant (ψ, Δ) à (n, γ) permet de déduire l'indice de réfraction et l'épaisseur du film à partir de la mesure de $\tan \psi$ et $\cos \Delta$.

Dans le cas d'un wafer de silicium nu, soit un système composé de trois milieux différents, le silicium, la couche d'oxyde natif SiO_2 et le milieu ambiant, il existe deux interfaces 0-1 et 1-2 (figure 1). En calculant les coefficients de réflexion globaux sur un wafer de silicium nu, on obtient une expression théorique de ρ :

$$\rho = \frac{r_{1-0}^p + r_{1-2}^p X}{1 + r_{0-1}^p r_{1-2}^p X} \times \frac{1 + r_{0-1}^s r_{1-2}^s X}{r_{0-1}^s + r_{1-2}^s X}$$

où r_{i-j}^p et r_{i-j}^s sont respectivement les coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire à l'interface i-j. Le coefficient X est défini par $X = \exp \left(-j \frac{4\pi n_0 \cos(\theta_0) e}{\lambda} \right)$, avec e l'épaisseur du film de silice, n_0 l'indice de réfraction du milieu 0 (air ou eau) et θ_0 , l'angle d'incidence du faisceau laser. L'angle d'incidence est choisi proche de l'angle de Brewster, qui correspond à l'angle d'incidence pour lequel le coefficient de réflexion perpendiculaire r_{0-1}^p est nul. A l'interface silicium-air, l'angle de Brewster est proche de 75° alors qu'à l'interface silicium-eau il est de 71° .

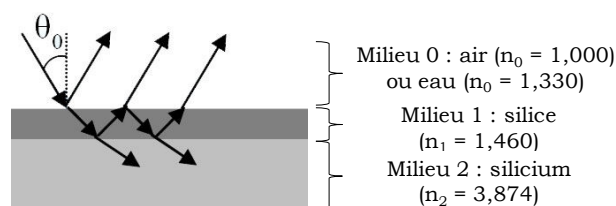


Figure 1 : Cas d'un wafer nu. Les indices de réfraction indiqués sont obtenus à $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ et à température ambiante.

Dans le cas de couches multiples, ce calcul devient fastidieux, car il faut tenir compte des réflexions multiples. Dans le cas d'échantillons très minces (pour des films d'épaisseur inférieure à $100 \text{ \AA}$), on ne peut pas déterminer indépendamment l'indice de réfraction de l'échantillon et l'épaisseur. En effet, un développement au premier ordre des équations paramétriques en (γ/λ) montre que les variations de ψ sont du deuxième ordre et donc négligeables par rapport aux variations de Δ qui sont du premier ordre. La variation de Δ est donc directement proportionnelle à γ . Il faut donc fixer l'indice pour déterminer l'épaisseur.

2 Montage expérimental

2.1 Les mesures à l'air

L'ellipsomètre mono-longueur d'onde utilisé est le modèle SENTECH SE 400 (Figure 2). Il fonctionne suivant le principe de l'analyseur tournant. La source de lumière est un laser He-Ne non polarisé, de longueur d'onde $\lambda = 6328 \text{ \AA}$. A la sortie du polariseur, le faisceau est polarisé rectilignement avec un angle de 45° . Après réflexion sur l'échantillon, l'onde est polarisée elliptiquement. L'analyseur tourne à vitesse constante et est placé devant une photodiode. Le signal est enregistré puis digitalisé durant deux révolutions de l'analyseur. La transformée de Fourier des deux signaux est analysée et permet de déduire les deux angles ellipsométriques ψ et Δ . L'angle d'incidence doit être proche de l'angle de Brewster, afin d'avoir la meilleure sensibilité sur les mesures. L'ellipsomètre utilisé permet de choisir un angle d'incidence d'incrément 5° . On choisit un angle de 70° , proche de l'angle de Brewster pour un substrat de silicium.

Les données obtenues sont exploitées en utilisant le logiciel « ellipsometer » fourni par le constructeur. On utilise un modèle à plusieurs couches de coefficient d'extinction k , d'indice de réfraction n et d'épaisseur γ variables.

La résolution en épaisseur est de l'ordre de l'Angström et la résolution spatiale est de $0,3 \times 0,5 \text{ mm}^2$.

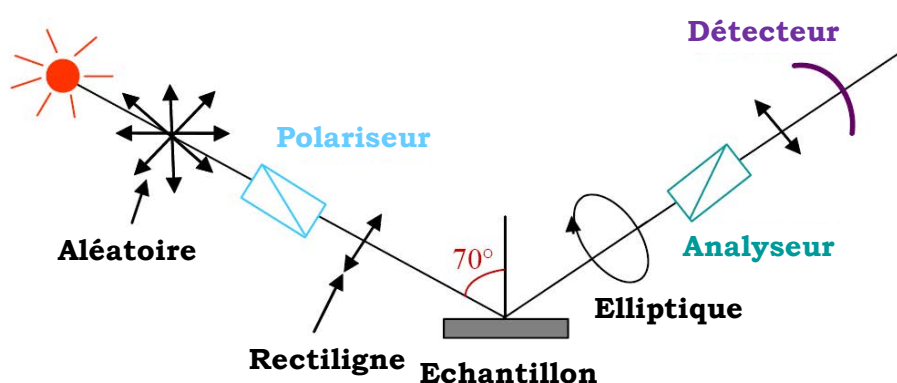


Figure 2 : Montage expérimental de l'ellipsomètre à l'analyseur tournant SENTECH SE 400.

On utilise un modèle à deux couches entre deux milieux semi-infinis (Figure 3). Le milieu semi-infini inférieur est constitué du substrat de silicium d'indice de réfraction 3,874. L'air ambiant est le milieu semi-infini supérieur d'indice de réfraction 1,000.

On considère que la silice et la couche de thiols forment une couche unique, la première couche du modèle, d'indice de réfraction 1,460 et d'épaisseur $\gamma_{Si+Thiol}$, avec $\gamma_{Si+Thiol} = \gamma_{Si} + \gamma_{Thiol}$, où γ_{Si} et γ_{Thiol} sont respectivement les épaisseurs des couches de silice et de thiol.

La couche de polymère constitue la seconde couche du modèle. L'indice de réfraction de cette couche est égal à 1,520 pour un film de poly(*N*-isopropylacrylamide) et à 1,527 pour un film de poly(acide acrylique). L'épaisseur γ des films est alors mesurée.



Figure 3 : Modèle à deux couches pour la détermination de l'épaisseur d'un film de polymère à l'air.

2.2 Les mesures « in situ » en présence de solvant

Afin de déterminer les épaisseurs des brosses de polymère ionique en présence de solvant, nous utilisons un dispositif de cellule liquide (Figure 4). La cellule liquide possède deux fenêtres qui permettent de travailler à 60° . Elle peut être thermostatée entre 10 et 80°C grâce à un thermostat à eau. Le dispositif expérimental nécessite des réglages optiques précautionneux, afin que le maximum de signal atteigne le détecteur.

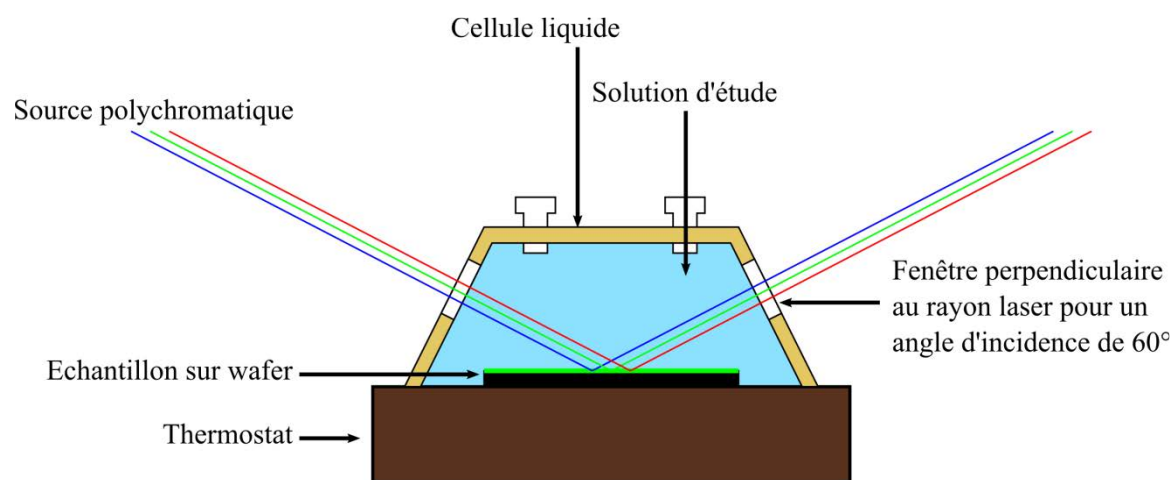


Figure 4 : Schéma de la cellule liquide.

L'ellipsomètre multi-longueur d'onde utilisé est un ellipsomètre NANOFILM (Type EP3) à polariseur tournant. La source de lumière est une lampe xénon de longueur d'onde variable de 200 à 900 nm. Les mesures sont effectuées avec un tracking de l'analyseur,

c'est-à-dire que la position de l'analyseur est ajustée à chaque longueur d'onde pour avoir la meilleure sensibilité à la valeur des paramètres ellipsométriques. Les données obtenues sont exploitées en utilisant le logiciel « Model EP4 » en utilisant un modèle à plusieurs couches comme décrit précédemment (Figure 5).

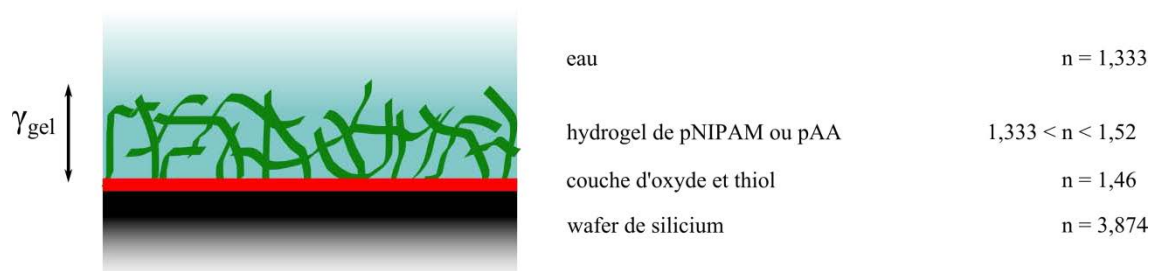


Figure 5 : Modèle à quatre couche pour la détermination de l'épaisseur gonflée L et de l'indice de réfraction n_p d'une brosse de PAA en présence de solvant.

Comme dans l'air, une première couche modélise la couche d'oxyde et la monocouche auto-assemblée de thiol. La seconde couche, d'épaisseur à déterminer, modélise l'hydrogel. L'indice optique de l'hydrogel est compris entre celui de l'eau et celui du polymère sec. Cet indice variable, dépend du gonflement, c'est-à-dire du ratio polymère/eau dans l'hydrogel. L'ajustement des mesures expérimentales permet d'obtenir une estimation de l'épaisseur de la couche et de l'indice optique de l'hydrogel.

II – SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN ATR

La spectroscopie infrarouge en réflexions totales atténuées (Attenuated Total Reflectance : ATR) permet d'analyser une couche mince en contact direct avec un substrat plan. La spectroscopie IR-ATR a été utilisée pour étudier les transformations chimiques des films minces de polymères, dans notre cas lors de l'activation des réactions de réticulation/greffage par chimie thiol-ène.

1 Principe

1.1 Spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge d'une substance est spécifié par la nature, le nombre et les positions relatives des atomes qui la composent. Pour une molécule donnée, seules certaines fréquences infrarouges sont absorbées : elles correspondent à des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle de la molécule. On mesure, en pratique, le logarithme de l'intensité de l'absorption que l'on appelle l'absorbance. La quantité de matière analysée est proportionnelle à l'absorbance. Le spectre d'absorption d'un échantillon représente l'absorbance en fonction de la fréquence d'absorption.

1.2 La technique de réflexions totales atténuées (ATR)

La technique de réflexions totales atténuées ATR permet de mesurer l'absorption infrarouge de couches de polymère très minces (de quelques Å à plusieurs μm) et est donc bien adaptée à l'étude de la réaction de réticulation des films minces d'hydrogels de pNIPAM. Dans son principe, l'ATR est une application de la réflexion spéculaire interne. Les radiations infrarouges pénètrent dans un cristal à faces parallèles, d'indice de réfraction élevé (n_1), en contact avec l'échantillon à analyser, d'indice de réfraction plus faible (n_2). On se place dans des conditions de réflexion totale, soit avec un angle θ_i tel que :

$$\theta_i > \theta_{ic} \text{ avec } \sin\theta_{ic} = \frac{n_2}{n_1} \text{ et } n_1 > n_2$$

Les réflexions internes totales créent une onde évanescente, atténuée exponentiellement à la surface, qui pénètre dans le milieu absorbant sur une longueur de pénétration d_p telle que :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{\sin^2\theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

L'interaction de l'onde évanescente avec l'échantillon conduit à l'absorption de certaines fréquences infrarouges caractéristiques et la mesure de l'énergie transmise dans tout le domaine infrarouge permet l'identification des molécules.

2 Montage expérimental

Nous avons utilisé un spectromètre à Transformée de Fourier de marque Nicolet modèle Magna 500. Un détecteur au tellure de cadmium dopé mercure (MCT-A) de grande sensibilité, refroidi à l'azote liquide, est nécessaire. Nous enregistrons les spectres sur la gamme de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Chaque spectre est une moyenne de 256 acquisitions, enregistrée avec une résolution de 4 cm^{-1} . On soustrait systématiquement le bruit de fond que l'on mesure sur le prisme de silicium nu.

Le silicium est transparent dans une large partie du domaine spectral étudié (1500 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}). Pour faire une analyse quantitative précise, il est nécessaire de se placer dans cette région, car la région 1500 cm^{-1} à 400 cm^{-1} où le silicium est absorbant permet uniquement de déduire des informations qualitatives. Les prismes que nous avons utilisés ont une forme trapézoïdale avec un angle de 45° et des dimensions $72 \times 10 \times 1,5 \text{ mm}^3$ (figure 1). Les dimensions du prisme sont adaptées à la taille de la cellule ATR utilisée.

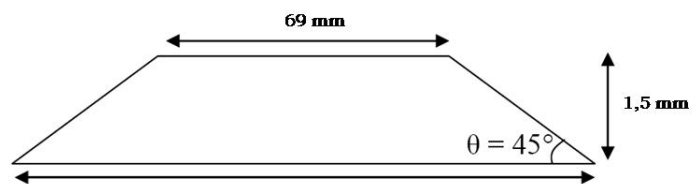


Figure 6 : Dimensions du cristal ATR de silicium.

Le faisceau IR pénètre dans le prisme par le côté biseauté et se réfléchit sur les faces parallèles avec un angle de 45° . Le nombre total de réflexions sur chaque face du prisme de silicium est égal à 25 (figure 2).

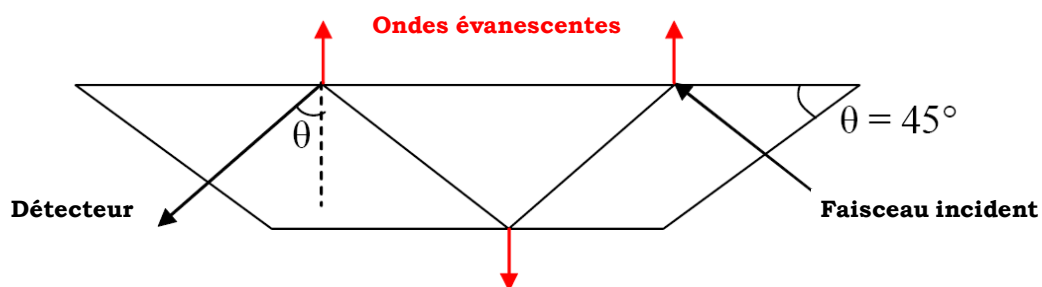


Figure 7 : Réflexions internes et ondes évanescentes du rayonnement IR dans le prisme de silicium.

III – VARIATIONS DE L'ÉPAISSEUR D'UN FILM DE PNIPAM AVEC L'HUMIDITÉ

Pour mesurer la variation de l'épaisseur des films pNIPAM en fonction du taux d'humidité de l'air, la cellule de mesure de l'ellipsomètre a été branchée en circuit fermé sur un bulleur (figure 1). La circulation de l'air est assurée par une pompe péristaltique. Le bulleur est rempli d'une solution en sel saturée. Selon la nature du sel, le taux d'humidité obtenu est différent. Le taux d'humidité obtenu à 25°C en fonction de la nature du sel a été calibré au laboratoire. Les valeurs d'humidité obtenues avec les sels utilisés sont présentées en tableau 1.

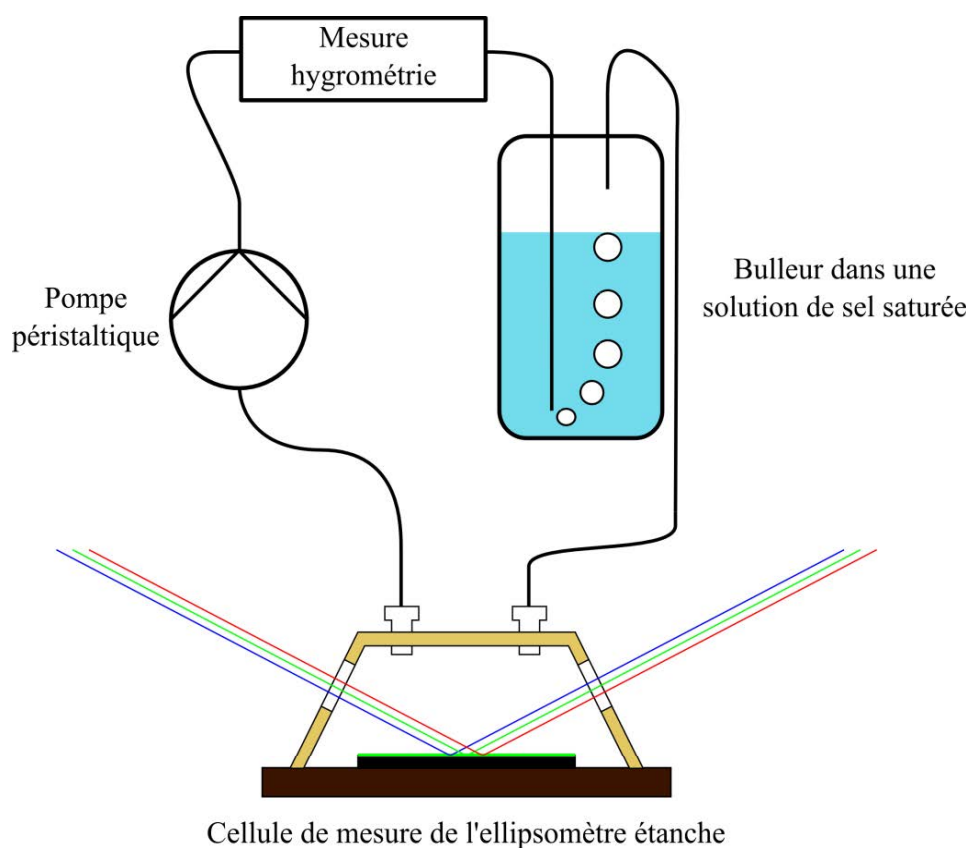


Figure 8 Montage expérimental pour la mesure de l'épaisseur des films en fonction de l'humidité de l'air.

Sel	% _{H2O}
LiCl	0.113
CH ₃ COOK	0.225
MgCl ₂	0.328
K ₂ CO ₃	0.432
NaBr	0.576
NaCl	0.753
KCl	0.843

Tableau 1 Humidité de l'air obtenue à 25°C selon la solution en sel saturée utilisée.

Pour les mesures à 0% d'humidité le flux d'air passe sur de la Drierite™ et pour les mesures à 99% le bulleur est rempli d'eau distillée. Pour réaliser une série de mesures, un échantillon est placé dans la cellule. La circulation en circuit fermé sur la Drierite™ est entretenue jusqu'à stabilisation du taux d'humidité. La première mesure est alors réalisée, puis la solution dans le bulleur est changée. Les solutions sont utilisées par ordre croissant d'humidité obtenue. Pour chaque solution on attend la stabilisation de la mesure d'humidité pour effectuer la mesure d'épaisseur. Une fois toute la série de mesure réalisée pour une surface, on peut changer d'échantillon. Quatre films de pNIPAM de 500 nm d'épaisseur sèche ont été mesurés, puis moyennés. Le graphe ci-dessous montre l'évolution de l'épaisseur des films en fonction de l'humidité. La variation d'épaisseur n'excède pas 10% pour des taux d'humidité de l'air standards.

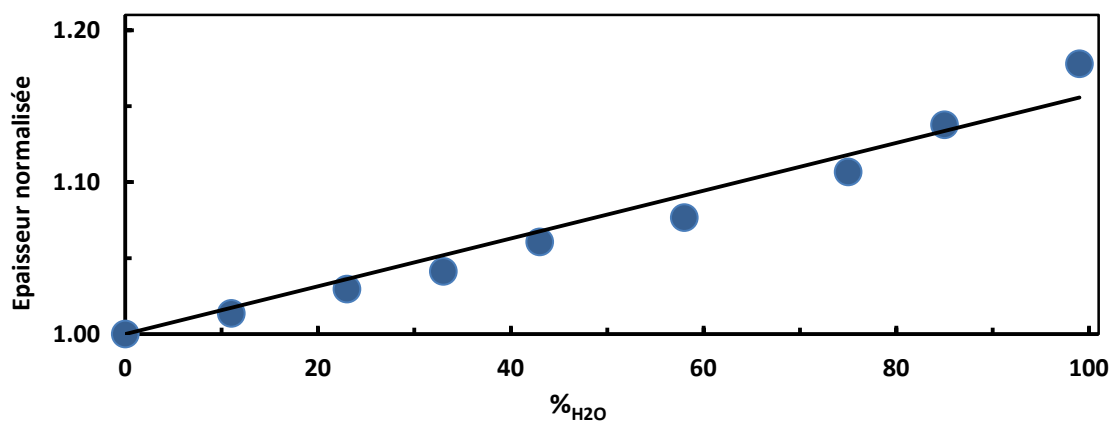


Figure 9 Evolution de l'épaisseur de film de pNIPAM secs avec l'humidité de l'air.

IV – MICRO-FABRICATION DES MOULES EN SU8 ET DES TIMBRES EN PDMS

Dans cette annexe nous décrivons les protocoles de micro-fabrication des moules en SU8 et des timbres en PDMS. Les moules en SU8 sont utilisés pour réaliser des microsystèmes par la méthode des répliques en PDMS. Ils servent aussi à la confection des timbres qui servent eux à emboutir la NOA pour la réalisation de microsystèmes par la méthode des autocollants.

1. Fabrication des moules en SU8

La fabrication du moule sur wafer de silicium se déroule comme suit (figure 10) :

- Nettoyage du wafer de silicium : on commence par mettre le wafer pendant quelques minutes à 200°C pour évaporer les éventuelles traces de solvant de nettoyage résiduelles et déshydrater le wafer. Cette étape, bien que facultative, permet une meilleure adhésion de la résine.
- Spin-coating de la résine : la résine est déposée sur environ 50 à 70% de la surface du wafer que l'on fait tourner 40 secondes entre 1000 et 3000 tours/min. L'épaisseur finale dépend de la viscosité de la résine utilisée et de la vitesse de rotation. Des tables sont fournies par le fabricant de la résine (SU8 de MicroChem) pour estimer les vitesses de rotation et la viscosité appropriée en fonction de l'épaisseur désirée.
- Soft bake : le wafer est immédiatement chauffé pendant un temps dépendant de son épaisseur (de 2min à 15min environ) afin de faire évaporer le solvant et obtenir une couche solide. Il est amené avec un premier palier à 65°C, puis à 95°C afin de minimiser les contraintes mécaniques.
- Insolation de la résine : le wafer est ensuite illuminé par une source UV (17 mW/cm², quelques dizaines de secondes en fonction de l'épaisseur de résine) à travers un masque de contraste : les parties transparentes du masque vont laisser passer le rayonnement UV. Dans ces zones, la résine libère un acide fort qui permet la réticulation ultérieure. Au contraire, les zones situées derrière les

parties noires du masque ne sont pas insolées et seront dissoutes à la fin du procédé.

- Post exposure bake : cette étape de chauffage est réalisée de la même manière que précédemment. Le chauffage à 95°C termine la réaction de réticulation sur les zones insolées.
- Gravure : le wafer est plongé dans un développeur qui va dissoudre les zones non réticulées. Un rinçage à l'isopropanol permet d'arrêter le processus de développement.
- Hard bake : un chauffage final à 200°C pendant environ 15 à 20 min permet de consolider la résine et améliore son adhérence sur le wafer.

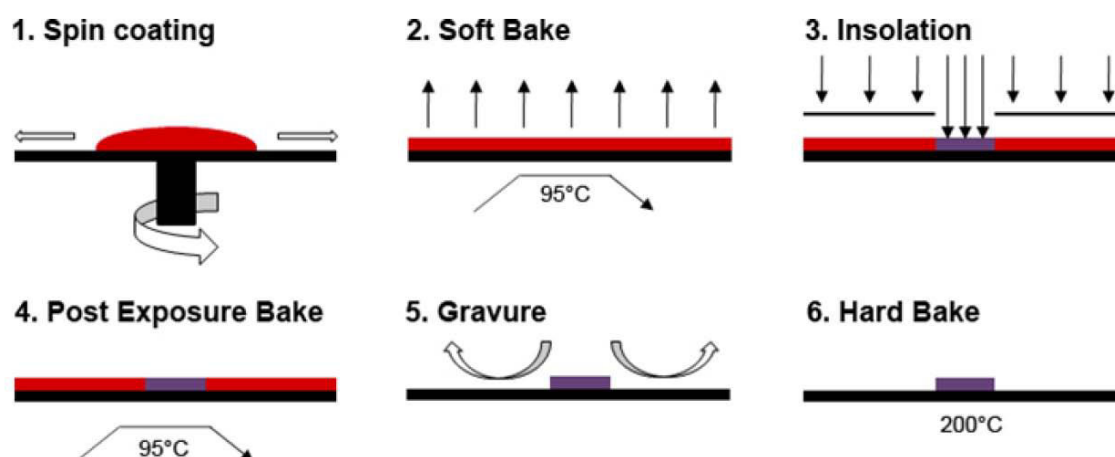


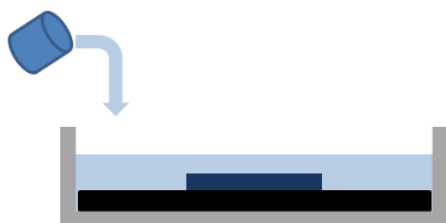
Figure 10 Procédé de fabrication d'un moule par lithographie de résine SU8.

2. Réalisation d'un timbre en PDMS

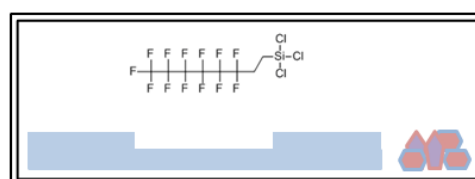
Pour préparer des systèmes en NOA, les premières étapes sont similaires à celle permettant la réalisation de systèmes en PDMS. Pour cela nous réalisons un moule en résine photosensible sur la surface d'un wafer en silicium. Ce moule sert à fabriquer, ce que nous allons appeler un timbre, c'est à dire un moule en PDMS qui correspond au réplica du moule en résine. Le procédé est décrit sur la figure 11 :

- un mélange de monomère et de réticulant liquides est versé sur le moule en silicium et réticulé à 72°C pendant 2h pour former un moule en PDMS solide appelé contre-moule ;
- afin de permettre un moulage de PDMS sur du PDMS, le contre-moule est silanisé. Il est soumis à un plasma d'oxygène puis mis en présence de vapeurs de perfluorooctyl-trichlorosilane. Cette fonctionnalisation va empêcher le collage PDMS/PDMS lors de la réticulation et ainsi permettre le démoulage du timbre ;
- le mélange monomère + réticulant est versé sur le contre-moule et réticulé pendant 45 min à 72°C ;
- une fois le timbre décollé du contre-moule, il est placé pendant 1 heure à 72°C pour terminer la réticulation.

A – Contre-moule



B - Silanisation



C – Moulage PDMS/PDMS



D - Timbre



Figure 11 Procédé de fabrication d'un timbre.

V – VANNE A ACTIVATION LOCALISEE : EFFET JOULE AVEC UNE RESISTANCE EN CHROME

L'utilisation d'une résistance en or nous a apporté la preuve que nos actionneurs microfluidiques pouvaient être individualisés et actionnés avec un simple générateur de tension. Cependant, la géométrie utilisée conduisait à une puissance dissipée élevée. Dans cette annexe nous présentons une étude, réalisée pendant le stage de margaux Kerdraon, sur la réalisation de résistances en chrome qui permettent de palier à ce problème.

1. Dessin de la résistance en chrome

Les substrats que nous utilisons pour réaliser les micro-puces à résistances intégrées sont composés d'une couche de 120 nm d'or déposée sur une couche de 15 nm de chrome. Cette couche de chrome peut-être utilisée pour réaliser des résistances bien plus importantes car sa résistivité de $127.10^{-9} \Omega.m$ est 6 fois plus élevée que celle de l'or. En outre, la couche de chrome étant 8 fois plus fine que la couche d'or, on obtient pour un même design une résistance 48 fois plus élevée.

Néanmoins, la couche d'or reste nécessaire pour obtenir la fonctionnalisation par une couche de thiol du substrat et le greffage de l'hydrogel. Nous avons donc opté pour un design où l'or et le chrome sont alternés (figure 12). Ainsi la résistance électrique est augmentée et le greffage de l'hydrogel est possible pour réaliser une vanne activable localement.

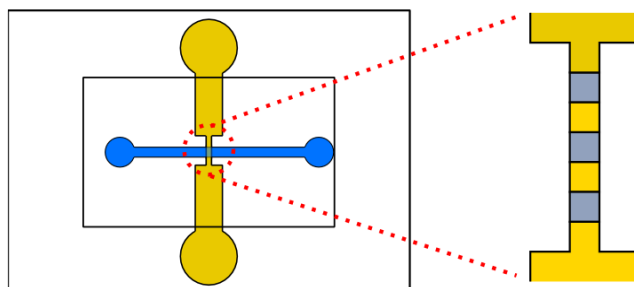


Figure 12 Micro-puce avec micro-résistance intégrée. Zoom sur la structure des résistances en chrome.

Une telle puce a été construite avec une résistance de 50 μm de large et 600 μm de long, composée de 6 pavés d'or et de 6 pavés de chrome de 50 μm de côté. Les connectiques sont réalisées avec de larges pistes en or. L'hydrogel synthétisé sur la résistance a une épaisseur sèche de 2,5 μm . Le canal mesure 400 μm de large et a une hauteur de 9,4 μm (même dimensionnement de vanne et de canal qu'au chapitre 3, 2.1.1, figure 11). La résistance électrique du circuit est mesurée à 300 Ω .

Le débit au travers de cette vanne a été mesuré en fonction de la tension appliquée (figure 13A). L'ouverture de la vanne s'effectue entre 1,5 V et 3 V. A 3 Volts, le débit est comparable à celui obtenu avec une vanne activée avec un module Peltier (cf chapitre 3, figure 11B). Ce design apporte donc un gain significatif par rapport aux résistances en or car la tension de 3 V est conservée mais la résistance est grandement augmentée. La puissance dissipée est donc désormais :

$$P_{diss} = \frac{U^2}{R_{mes}} \sim \frac{3^2}{300} \sim 30 \text{ mW} \quad (\text{éq. 20})$$

Malheureusement, ce design n'est pas durable, la résistance se dégrade rapidement. Par exemple, sur la figure 13B, on peut voir que la deuxième activation de la vanne nécessite une tension supérieure et que la résistance est détruite avant l'activation totale de la vanne (à 3,3 Volts).

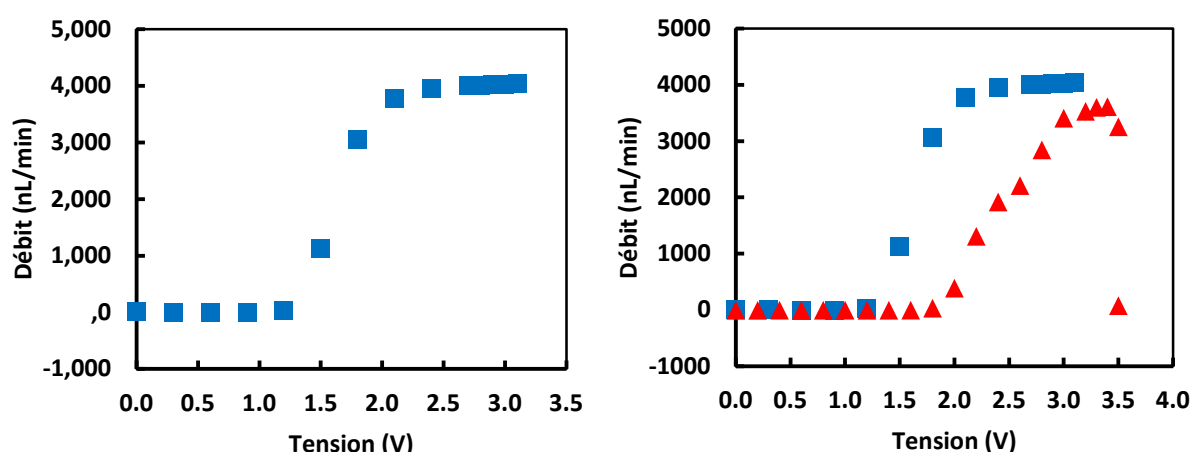


Figure 13 Test d'une vanne à activation locale sur résistance en chrome. A – Premier test d'activation avec tension croissante. B – Deuxième activation en tension croissante. La résistance est dégradée à 3,3 Volts.

2. Localisation et dynamique du chauffage

La localisation du chauffage a été mesurée avec la rhodamine B. Sur la figure 14A une photo en fluorescence d'une résistance en chrome, similaire à celle employée précédemment, dans un canal rempli de solution de rhodamine B à 25°C est présentée. Sur la figure 14B, cette même résistance alimentée par une tension de 3V est photographiée en fluorescence. A partir de ces deux images et d'une calibration de la fluorescence en fonction de la température, une cartographie des températures dans le canal lors de l'échauffement par effet Joule est établie (figure 34C). L'échauffement est localisé au dessus de la résistance.

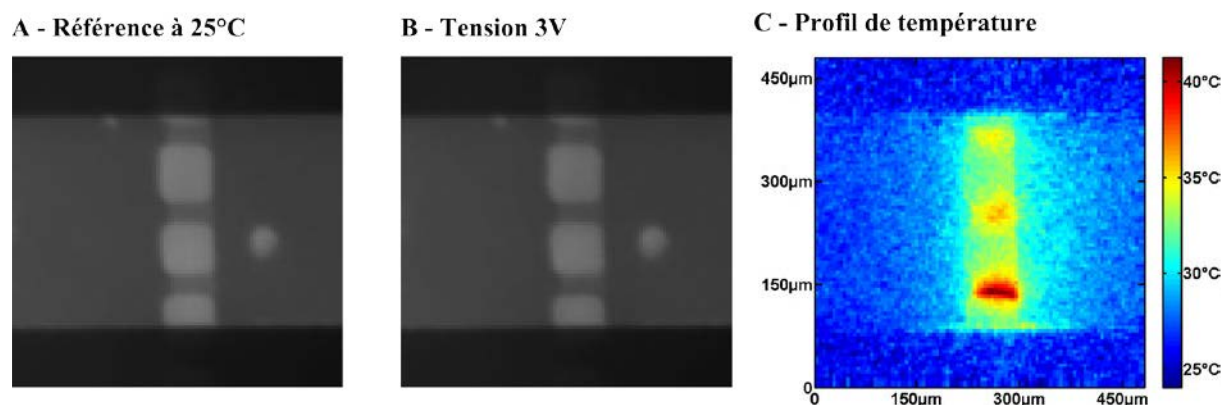


Figure 14 Mesure de température sur la puce. A – Photographie en fluorescence de la puce thermostatée à 25°C. B – Photographie en fluorescence de la puce lorsque la résistance est alimentée par une tension de 3,2V. C – Carte des températures dans le canal lorsque celui-ci est chauffé par la résistance en chrome.

La décroissance de la fluorescence de la rhodamine B lors de cette expérience de chauffage par effet Joule a été suivie avec la caméra à 100 images par seconde. La fluorescence de la rhodamine en fonction du temps lors de l'application d'une tension de 3 Volts est présentée sur la figure 15. La température s'équilibre en 0,2 seconde. Le chauffage local avec des résistances en chrome s'établit donc bien plus rapidement qu'avec les résistances en or. La vitesse de chauffe est augmentée grâce à une meilleure localisation de la résistance et donc à une dissipation de l'énergie thermique par effet Joule sur une zone plus petite.

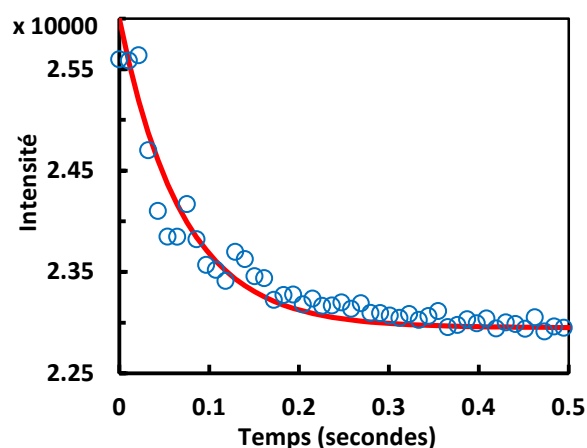


Figure 15 Mesure de la du temps de chauffage avec la résistance en chrome. La décroissance de fluorescence de la rhodamine B (points bleus) est ajustée par une exponentielle décroissante (trait rouge) avec une constante de temps de 0,07 seconde.

Les résistances en chrome sont déjà utilisées avec succès pour assurer un chauffage localisé sur des micro-puces. Dans ces designs, les résistances sont protégées par une fine couche de PDMS. Dans notre cas, les résistances ne sont pas protégées car nous avons besoin de l'or nu pour fonctionnaliser la surface. Une possibilité pour protéger les dépôts de chrome est de déposer une couche d'oxyde de silice au-dessus de la résistance, qui peut, elle, être fonctionnalisée pour le greffage du gel.

VI – VANNE A ACTIVATION LOCALISEE : LA VANNE ELECTRO-SENSIBLE

Un polyélectrolyte est une chaîne polymère portant des charges électriques, sous la forme de groupes ioniques. Le gonflement d'un gel formé d'un réseau réticulé de polyélectrolyte est dû à la pression osmotique des contre-ions et aux interactions coulombiennes qui vont avoir tendance à faire entrer des contre-ions et du solvant dans le gel.

L'application d'un champ électrique sur un tel système a donc un effet majeur sur les propriétés du gel (figure 16).

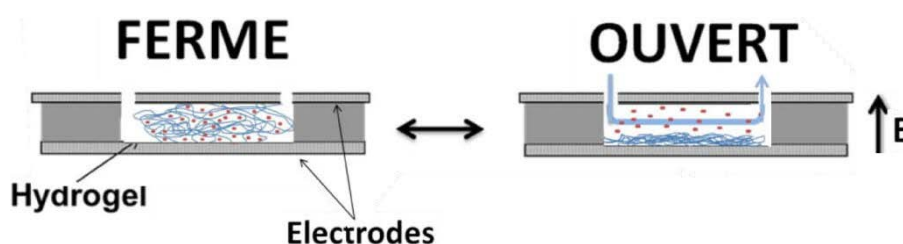


Figure 16 Principe de fonctionnement de la vanne électrosensible. En l'absence de champ électrique, les contre-ions (en rouge) gonflent l'hydrogel (en bleu) et le canal est fermé. Lorsque l'on applique un champ suffisamment intense, les contre-ions se déplacent vers l'électrode opposée à la surface sur laquelle est greffée l'hydrogel, ce qui provoque son effondrement et l'ouverture de la vanne.

Les gels de polyélectrolytes forts, tel que le pAMPS ou pMAETAC, peuvent donc être stimulables par le champ électrique. Dans ces conditions, on peut calculer un ordre de grandeur du champ électrique nécessaire à appliquer pour équilibrer la force osmotique des contre-ions. Soient :

- k la constante de Boltzmann
- T la température
- n la concentration molaire volumique en contre-ions à l'intérieur du gel.
- E l'intensité du champ extérieur appliqué

- e la charge de l'électron
- h l'épaisseur du gel
- V la différence de potentiel de part et d'autre de l'échantillon

On peut écrire la valeur de la pression osmotique des contre-ions :

$$\Pi_{osm} = n.k.T$$

ainsi que la pression due à la force électrique appliquée qui s'oppose à la pression osmotique (pour des contre-ions de charge $+e$) :

$$\Pi_{elec} = E.e.n.h$$

En équilibrant ces forces on obtient

$$E = \frac{V}{h} = \frac{k.T}{h.e}$$

d'où

$$V = \frac{k.T}{e} \approx 25 \text{ mV}$$

On doit appliquer une différence de potentiel relativement faible pour effondrer le gel, mais cela correspond tout de même à un champ de 25 kV/m pour une épaisseur de 10 μm . Outre le développement des synthèses de films minces de polyélectrolytes, la réalisation de telles vannes demande donc de prendre des précautions lors de la fabrication des microsystemes.

Résumé

Nous développons une nouvelle approche des actionneurs microfluidiques à base d'hydrogels stimulables. Contrairement aux approches précédentes, les hydrogels sont synthétisés et greffés à la paroi inférieure du microcanal avant la fermeture du système pour un meilleur contrôle.

Nous utilisons une stratégie de synthèse simple et versatile des films d'hydrogels par chimie click thiol-ène. Les films sont réalisés par dépôt de chaînes polymères préformées en présence de réticulants dithiol sur des surfaces fonctionnalisées thiol. Le greffage et la réticulation s'obtiennent simultanément par activation thermique ou irradiation UV. Des films et des micro-motifs sont ainsi obtenus sur une large gamme d'épaisseur de quelques nanomètres à plusieurs microns.

Nous intégrons les motifs d'hydrogels stimulables dans les microcanaux pour réaliser des actionneurs. Nous nous intéressons aux actionneurs thermosensibles à base d'hydrogels de poly(*N*-isopropylacrylamide). Avec la température, les motifs d'hydrogels gonflent ou dégonflent en absorbant/expulsant l'eau de manière réversible. L'effet est rapide (inférieur à la seconde), la transition abrupte (quelques degrés autour de la LCST à 32°C) et l'amplitude de déformation est importante (gonflement de 400%). Les micro-vannes réalisées avec cette approche innovante présentent de très bonnes performances et une grande durabilité. De nouveaux actionneurs reconfigurables fonctionnant comme des pièges microfluidiques sont également développés avec cette approche.

Cette nouvelle génération d'actionneurs microfluidiques offre de nombreuses perspectives de par la facilité de leur mise en œuvre, leurs performances et l'intégration sur des micro-puces à haute densité.

Abstract

We develop a new method to build microactuators using stimuli-responsive hydrogels. The hydrogel is synthesized with covalent attachment to the microchannel bottom walls prior to closing the microsystem, contrarily to previous approaches, for a better control.

We use a facile and versatile route for the synthesis of stimuli-responsive hydrogel films. It is based on thiol-ene click chemistry. The formation of films is achieved by adding bifunctional thiol molecules as cross-linkers to ene-functionalized preformed polymers on thiol-modified surfaces. The cross-linking and grafting are simultaneously performed either by thermal activation or UV-irradiation. Hydrogel films and micro-patterns are easily obtained in a wide range of thickness from a few nanometers to several microns.

We show that these responsive hydrogels patterns can be integrated into microfluidic channels to build microactuators. We focus on thermo-sensitive actuators made with poly(*N*-isopropylacrylamide). Under temperature, hydrogel patterns reversibly swell or collapse by absorbing/expulsing water. The phase transition is rapid (lower than 1 second), abrupt (a few degrees around the LCST at 32°C) and the deformation amplitude is high (4-fold swelling). Microvalves obtained by this innovative approach exhibit high performances and durability. New reconfigurable actuators functioning as microfluidic traps are also developed using this approach.

This new generation of microfluidic actuators offers wide possibilities owing to their ease of fabrication, their performances and their embedding into high density chips.