HAL open science

Intégration et optimisation de procédés de séparation d'ADN

Jeffrey Teillet

▶ To cite this version:

Jeffrey Teillet. Intégration et optimisation de procédés de séparation d'ADN. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2020. Français. NNT : . tel-03228680v1

HAL Id: tel-03228680

https://laas.hal.science/tel-03228680v1

Submitted on 1 Oct 2020 (v1), last revised 18 May 2021 (v2)

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Jeffrey TEILLET-DEBORDE

Le 11 septembre 2020

Intégration et optimisation de procédés de séparation d'ADN

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Physique**

Unité de recherche :
LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Aurélien BANCAUD

Jury

M. Hervé COTTET, Rapporteur
M. Nicolas CLéMENT, Rapporteur
Mme Marie BRUT, Examinatrice
M. François COUDERC, Examinateur
M. Marius SOCOL, Examinateur
M. Aurélien BANCAUD, Directeur de thèse

Remerciements

J'ai commencé mon éducation universitaire par la physique théorique et quantique et j'aime me souvenir de l'admiration et l'affection que je portais (et que je porte toujours) à ceux qui ont construit et façonné ce domaine. Et qui me rappellent tous les jours que la science et la recherche ne sont plus ces choses austères et isolantes.

« Un expert est quelqu'un qui a fait toutes les erreurs possibles dans un domaine restreint. »

~ Niels Bohr

Ces 3 années de thèses ont été riches en découvertes, projets et rencontres, et il me sera donc difficile de les décrire de façon linéaire. Ce travail de recherche s'inscrit et se nourrit d'un plus vaste projet, il n'est pas une fin en soi. Il est né de mon propre cheminement personnel mais aussi, et surtout du croisement avec bien d'autres, lui faisant prendre de multiples dimensions, que ces remerciements s'efforceront d'illustrer.

En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Aurélien Bancaud, pour sa confiance et son infini disponibilité. *« C'est avec la logique que nous prouvons et avec **l'intuitions** que nous trouvons »* (Henri Poincaré), je ne saurai mieux caractériser sa façon d'enseigner, de guider.

À ceux qui ont accepté de participer à l'étude de mon travail, Monsieur Nicolas Clément, Monsieur Hervé Cottet, Monsieur François Couderc et Monsieur Marius Socol. Pour sa participation dans ce jury et parce que c'est avec elle que mon goût pour la recherche a été lancé, je tiens à remercier tout particulièrement Madame Marie Brut.

Je remercierai les membres de la micro-équipe µLAS, Rémi, Bayan, Nicolas, Inga, Paul, avec qui il a été exaltant d'échanger, de faire avancer de concert ce projet. Je tiens à remercier Quentin, pour sa patience et qui a été un véritable bonheur à encadrer – *désolé pour ce mois d'absence, mais l'appel du Japon a été trop fort…* Et bien-sûr je remercierai tous les membres de l'équipe MILE, pour leur accueil et tous les bons moments partagés. Je remercie d'ailleurs Marion Valette, complice d'organisation et de convivialité.

Je ne remercierai jamais assez les équipes techniques du LAAS qui m'ont accompagnées au quotidien, incarnées notamment par la plateforme microscopie et biologie, avec Sandrine, Charline Julien, Nicolas ; ainsi que la plateforme de fabrication en salle blanche : Aurélie, Rémi, Fabien, Laurent, Adrien.

Je ne peux finir sans remercier mes proches, mes amis, ma table d'habitués de *jeu de rôle*, avec qui j'espère n'avoir pas été plus cruel pendant ces 3 ans qu'à l'accoutumé.

Et enfin mes parents, qui malgré la distance ont toujours été des repères. Je finirai par remercier ma moitié, Julie, pour avoir été d'un soutien indéfectible.

Table des matières

TABLE DES MATIERES 1

INTRODUCTION 7

I. ÉTAT DES LIEUX DE µLAS ET ORIGINE DE L'ETUDE 7

II. ORGANISATION DU MANUSCRIT 8

CHAPITRE 1 - INSTRUMENTS POUR LA SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES : ETAT DES PERFORMANCES ET DES LIMITES 11

I. PHENOMENES DE TRANSPORT POUR LA SEPARATION D'ESPECES 13

A. Phénomène de transport 13

1. Équation d'advection-diffusion 13

2. Diffusion naturelle en régime libre 15

3. Nombre de Péclet 17

B. Les valeurs clefs des techniques de séparation 17

1. Résolution de séparation 17

2. La sélectivité, une description de la distance séparant les espèces 19

3. L'efficacité 19

4. Longueur de résolution 22

C. Séparation de l'ADN 23

1. L'ADN 23

2. Mobilité électrophorétique 24

3. Matrice de polymère 25

II. THEORIE DE L'ELARGISSEMENT DES BANDES 29

A. Sources de dispersion 30

1. Diffusion d'Eddy 30

2. Diffusion longitudinale 31

3. Cinétique des transferts de masses 32

B. Déterminer et estimer ces contributions 33

III. PROCESSUS DE DIFFUSION DANS LES TECHNIQUES DE SEPARATION 33

A. Champ hydrodynamique 34

1. Principe du transport en écoulement de Poiseuille 35

2. Dispersion de Taylor et analyse en dispersion de Taylor 38

B. Le champ électrique comme moteur de séparation 41
1. Les principes du transport en électrophorèse 42
2. Le phénomène d'électro-osmose 43
3. La diffusion dans les techniques d'électrophorèse 45
C. Transport en régime mixte 47
1. Fractionnement par couplage de force 48
2. Double actionnement longitudinal et force transverse à l'écoulement 49
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE 1 52

CHAPITRE 2 - PRESENTATION DE LA TECHNOLOGIE µLAS 53

I. PRESENTATION GENERALE DE µLAS 54
A. Les laboratoires sur puces 54
B. La technologie µLAS 56
II. MECANISMES DE TRANSPORTS DANS µLAS 57
A. La force élastique transverse 57
1. Caractéristique de la solution 57
2. Origine de la force élastique transverse 59
B. La force transverse élastique dans µLAS 60
1. Le cas d'un écoulement de Poiseuille 60
2. Ajout de la force d'électrophorèse en opposition 62
C. Modulation des champs de vitesses pour différentes fonctions et mode de séparation 64
1. Moduler les champs de vitesses 64
2. Les deux différents modes de séparations par µLAS 66
D. Mise en œuvre de la séparation 75
1. Caractéristiques de la solution 75
2. Instrumentation 76
III. FABRICATION DES PUCES EN SILICIUM/VERRE 77
A. Photolithographie 78
1. Revêtement de la résine 78
2. Insolation 79
3. Développement 79
B. Gravure 79
C. Perçage des trous 80
D. Oxydation 80
E. Capotage 80

F. Récapitulatif 80
IV. PROCEDE DE FABRICATION DE PUCES AVEC CANAUX EN 2.5D 81
A. Les motivations 81
B. Principe de fabrication à niveaux de gris 82
C. Génération des fichiers de contrôle du paterne d'écriture laser 84
1. Organisation des fichiers entre eux 84
2. Écriture en des lignes en aller-retour 86
D. Optimisation du protocole de fabrication 87
1. Gammes de tests et résultats généraux 88
2. Gamme de modulation de la puissance du laser : limites et discrétisation 90
3. Défocalisation du laser 91
E. Gravure 92
V. CONCLUSION 95
CHAPITRE 3 - INSTRUMENTATION D'UN BANC EXPERIMENTAL ET SON AUTOMATISATION 97
I. INSTRUMENTATION GENERALE 98
A. Présentation et motivations 98
1. Présentation de la chaîne d'instrumentation et de ses composants 99
2. Organisation du chapitre 100
B. Labview, un logiciel dédié à la programmation instrumentale 101
1. Le langage G, une programmation par flux de données 102
2. Structures de bases 103
3. Structures avancées 107
II. OUTILS DE SEPARATION AUTOMATIQUE INTEGRES 108
A. Plateforme automatisée pour séparation temporelle 112
B. Contrôle de la caméra 114
1. Pilotage de la caméra via LabVIEW 114
2. Données vidéo et structure d'acquisition 115
C. Plateforme de post-traitement des données 116
1. Structure générale du sous-programme 116
2. Fit de multiples pics 117
III. CALIBRAGE DES DIFFERENTS INSTRUMENTS DU BANC EXPERIMENTAL 118
A. Tests de dérive dans le temps 118
1. Tracking des zones 119

2. Mesure de la dérive mécanique du système 120
3. Mesure de la dérive des intensités de pixels 120
B. Calibration des temps de réponses des instruments 121
C. Calibrage de la fonction de fitting pour de multiples pics 123
IV. CONCLUSIONS 124

CHAPITRE 4 - CARACTERISATION ET MINIMISATION DE L'ELARGISSEMENT DES BANDES PENDANT DES MIGRATIONS ELECTRO-HYDRODYNAMIQUES 125

I. INTRODUCTION ET MOTIVATIONS 126
II. MODELE DE TRANSPORT ET DISPERSION 127
A. Modèles de transport et de dispersion pour les cas hydrodynamique et électrophorétique 128
B. Physique de µLAS et prédiction du coefficient de diffusion 128
III. OPTIMISATION DES RESOLUTIONS DE SEPARATION 130
A. Optimisation des résolutions de séparations 132
1. Introduction aux séparation et paramètres d'intérêt 132
2. Plan d'expériences 133
3. Traitement des données et résultats de séparation 133
B. Étude des modes de dispersion 136
1. Diffusion dans les régimes hydrodynamique et électrophorétique 137
2. Diffusion dans un régime d'actionnement électro-hydrodynamique constant 139
3. Minimisation du phénomène d'élargissement des bandes par la modulation temporelle du champ électrique 142
4. Modèle numérique de comparaison 143
IV. DISCUSSIONS SUR LES DIFFERENTES STRATEGIES D'ACTIONNEMENT DU CHAMP ELECTRIQUE 145
V. CONCLUSION 148

CHAPITRE 5 - PERSPECTIVES 149

I. CONSTRUCTION D'UN MODELE NUMERIQUE DE SEPARATION 150
A. Mise en place 150
1. Mode de séparation temporel en format capillaire : Biabooster 150
2. Équation advection-diffusion et une solution 152
3. Temps initial 153

4. Temps de passage 153
5. Coefficient de diffusion 154
6. Résolution de séparation 154
B. Paramétrage du modèle 154
1. Résultats pour la gamme de bas poids moléculaire 155
2. Résultats pour la gamme de haut poids moléculaire 159
C. Coefficient de diffusion effectif 161
D. Quelques résultats prospectifs 162
E. Conclusions et perspectives 164
II. APPLICATION DES PUCES AVEC PENTES GRAVEES PAR LE PROCESSUS DE FABRICATION « GREYSCALE » 166
A. Principe de détection d'un complexe sonde-cible avec µLAS 166
B. Application et résultats préliminaires en format puce 2.5D 168
C. Conclusions et perspectives d'amélioration 170
BILAN ET CONCLUSIONS SUR L'ENSEMBLE DU TRAVAIL EFFECTUE 171
BIBLIOGRAPHIE 173
ANNEXES 187
I. CODES MATLAB POUR LA GENERATION DES FICHIERS POUR LA LITHOGRAPHIE EN NIVEAU DE GRIS 187
A. Code pour générer le .dfl, compilation des lwo 187
B. Code pour générer les pentes 189
C. Code pour générer les .lwo en fonction du design 190
D. Quelques exemples de fichiers terminés 192
1. Exemple d'une ligne dans un .lwo 192
2. Exemple d'un fichier .dfl qui appel un ensemble de .lwo pour créer un design 192
II. CODES DE LA PLATEFORME INSTRUMENTEE 193
A. Plateforme instrumentée générale 193
B. Gestion des instruments 194
1. Contrôleur de pression 194
2. Générateur de tension 195
3. Contrôleur de la source de lumière 196
C. Génération de profils 197
1. Pentes linéaires en tension 197

2. Pentes exponentielles en tension 197
D. Séquence automatisée pour explorer rapidement les espaces de paramètres .. 198
III. RESULTATS SUBSIDIAIRES POUR L'OPTIMISATION DE LA SEPARATION DES BANDES 199
A. Tension/champ 199
B. Vitesses 200
C. Code pour calcul du modèle numérique de comparaison 201
D. Ajout d'une bande de 1000 bp 202
IV. MODELE DE SIMULATION NUMERIQUE 203
A. Code 203
B. Temps initiaux pour le bas poids moléculaire 208
C. Temps initiaux pour le haut poids moléculaire 209

Introduction

I. État des lieux de µLAS et origine de l'étude

A mon arrivée sur le projet µLAS, au début de ce travail donc, une thèse avait été menée à son terme, esquissant les contours de cette nouvelle technologie. Trois autres thèses étaient en cours, avec chacune leurs propres problématiques autours de µLAS et à différents stades d'avancement. Je vais essayer dans cette partie de préambule de dresser le portrait du foisonnement technologique dans lequel µLAS était baigné en 2017 et les différents développements alors menés en parallèle de mon travail au cours de ces dernières années.

Le projet µLAS trouve son origine dans le travail effectué par Hubert Ranchon durant sa thèse. Le format sur puce est décliné sous de multiples designs et l'accent est mis dans un premier temps sur la caractérisation de la dynamique des molécules d'ADN dans un écoulement. Et la technologie µLAS a proprement parlé est définitivement lancée dans son travail adjoint de celui de Rémi Malbec, au cours de sa thèse, en 2016. µLAS est alors définitivement défini comme un outil de séparation et de concentration d'acides nucléiques par un actionnement électro-hydrodynamique au cours de la thèse de R. Malbec. Plusieurs brevets voient le jour dans cette période (WO 2014020271 A1 et WO 2016016470 A1) et un transfert de µLAS se fait vers Adelis (anciennement Picometrics). Ce dernier oriente la fin de son travail vers l'application de la technologie pour la détection de maladie de Huntington, qui fera l'objet d'un article *(Malbec et al., 2019)*.

Dans le même temps, en 2017, Bayan Chami et Nicolas Milon commencent tout deux leur thèse. B. Chami a pour vocation de pousser la technologie dans ses retranchements, afin d'en tirer le meilleur possible. Comprendre la technologie avec l'établissement d'un modèle analytique de la physique µLAS *(Chami et al., 2018)* est la première étape pour en étendre les capacités : optimisation des modèles de puces, des solutions tampons, séparations d'autres acides nucléiques. Du transfert technologique de µLAS vers Adelis naît une collaboration entre cette dernière et le LAAS-CNRS. Les développements industriels mènent au début de la thèse (CIFRE) de N. Milon, avec pour objectif d'étendre le champ d'application de µLAS, alliant

l'approche sur puce microfluidique et l'approche en format capillaire pour séparer notamment les ADN de très haut poids moléculaire.

Les travaux de thèses présentés dans ce manuscrit sont basés sur la technologie µLAS telle qu'elle a été établie antérieurement à mon arrivée en 2017. Et de nombreux développements se sont fait en parallèle de mon travail, qui doit être pris donc comme à part entière et non comme la continuité des travaux que je viens d'énumérer. A cette période l'ensemble des expérimentations était réalisées manuellement en « tournant des boutons ». Dans le cadre exploratoire de la thèse d'H. Ranchon et du début de la thèse de R. Malbec cela ne posait pas de problème majeur. Néanmoins avec les ambitions grandissantes de pousser la technologie dans ses retranchements et le désir d'optimisation des performances, la problématique du « confort d'utilisation », pour accélérer les procédés, s'est posée.

L'objectif est ici de mettre en place un banc d'expérimentation pour µLAS, dont les instruments sont entièrement pilotables via une plateforme informatique, ouvrant la voie de l'automatisation de µLAS. Cette thèse a été entièrement réalisée au LAAS dans ce contexte.

II. Organisation du manuscrit

Ce manuscrit décrit et discute de l'intégration de matériels d'instrumentation pour le système µLAS, pour l'optimisation de l'analyse et de la séparation de molécules d'ADN.

Dans le chapitre 1 nous aborderons les techniques de séparations, leurs approches et stratégies. Et nous essaierons de répondre à cette question qui est posée quand une espèce migre : comment caractériser la compétition entre *advection forcé* et *diffusion naturelle* ? Pour optimiser et améliorer les performances des différentes technologies de séparation ainsi évoquées, il est nécessaire d'introduire les problématiques inhérentes à chacune. Car en effet il existe un large panel de moyens d'actionnements qui font migrer des molécules de multiples façon : par l'hydrodynamique, par l'électrophorèse ou encore des techniques mixant les deux approches.

Dans le chapitre 2 nous introduirons la technologie µLAS et dans quel contexte technologique elle se place. Nous présenterons les principes physiques qui régissent les différentes étapes de fonctionnement de la technologie (concentration et séparation). Nous

aborderons alors les développements réalisés lors de ce travail de thèse sur un mode de séparation temporel qui implique un nouveau modèle de puce. Enfin nous montrerons le travail de développement, à la fois de fabrication technologique mais aussi d'intelligence logicielle, pour mettre en place des gravures de pentes dans du silicium et ainsi enrichir le système µLAS.

Dans le chapitre 3 nous introduirons le travail d'instrumentation réalisé tout au long de ces 3 ans sur un banc d'expérimentation dédié. Ce chapitre sera organisé de façon à introduire un lecteur non averti aux bases et problématiques inhérents à la programmation, à l'instrumentation et à l'automatisation de systèmes pilotables par LabVIEW. Nous nous servirons de ces bases pour ensuite présenter la plateforme ainsi développée pour piloter des expérimentations µLAS. Enfin un tel système nécessite d'être caractérisé car il fait intervenir de nombreux acteurs : des outils informatiques et mécaniques.

Dans le chapitre 4 nous présenterons les résultats de séparation obtenus grâce à la plateforme µLAS complètement intégrée et automatisée. L'analyse de ces résultats a soulevé des questions et par la même occasion une étude de la dispersion dynamique des bandes d'ADN.

Dans le chapitre 5 nous aborderons quelques perspectives d'amélioration, évoquées durant le manuscrit. Nous présenterons dans un premier temps une étude préliminaire réalisée grâce à un modèle de simulation numérique avec pour objectif d'explorer de larges gammes de paramètres. Puis nous présenterons l'application faite de puces 2.5D fabriquées grâce au développement abordé dans le chapitre 2. Ces puces ont été utilisées dans le contexte d'expériences µLAS pour la détection d'une cible spécifique.

Chapitre 1

Instruments pour la séparation des acides nucléiques : état des performances et des limites

Les techniques de biochimie analytique pour la séparation de biomolécules ont connu de nombreuses évolutions accompagnées de changements de formats instrumentaux. Le début du 20e siècle a vu naître la chromatographie d'absorption *(Strain, 1967)*. Cette technologie a connu une telle croissance que l'on peut catégoriser les « enfants de la chromatographie » en au moins 12 types de chromatographies majeurs. Ces techniques peuvent servir plusieurs objectifs, notamment ceux de préparer et d'analyser les constituants d'un mélange. Ces composés d'intérêts (analytes) sont séparés lorsque la technique est dite préparative, et sont identifiés lorsqu'elle est dite analytique. L'identification est souvent faite par comparaison avec des substances déjà connues, dans l'échantillon-même ou via une solution de référence. Les techniques préparatives servent généralement à séparer les espèces d'intérêt en amont à l'application d'autres techniques d'analyse, comme par des techniques de spectroscopie par exemple. En fonction de la phase (Chromatographie en Couche Mince **CCM**, en Phase Gazeuse **CPG**, en Phase Liquide **CPL** …), du support (chromatographie planaire ou sur colonne), de la méthode physique de séparation (chromatographie d'absorption, de partage, d'exclusion stérique …), on obtient une famille extrêmement riche, disposée à répondre à divers besoins, aussi bien applicatifs qu'analytiques, dans de multiples domaines.

En particulier, nous nous intéresserons ici aux techniques de séparation en taille d'acides nucléiques. C'est l'électrophorèse sur gel dans un premier temps *(Stellwagen, 1998)* puis en capillaire *(Wang et al., 2008 ; Liu et al., 2014)* qui se sont rapidement imposées comme les techniques de séparation en taille de référence *(Viovy, 2000a ; Dorfman et al., 2010)* pour les acides nucléiques (ADN, ARN). L'augmentation des performances de ces techniques a été le moteur du développement technologique. L'utilisation de champs pulsés *(Schwartz et al., 1984)* par exemple pour séparer les molécules de très grande taille (> 40 kbp) ou le remplacement des gels par des solutions de polymères dans les capillaires pour des séparations plus rapides et plus efficaces *(Xu & Baba, 2004)*. Enfin l'électrophorèse capillaire, via l'instrumentation de masse et le multiplexage, a permis l'amplification des rendements et de la sensibilité *(Huang et al., 1992 ; Woolley et al., 1994)*.

Ces techniques, associées à ces développements, sont maintenant très utilisées en routine dans les laboratoires pour le diagnostic, l'analyse médico-légale ou encore le séquençage *(Sanger, 1977 ; Karger & Guttman, 2009 ; Sedlazeck et al., 2018)*.

I. Phénomènes de transport pour la séparation d'espèces

Pour séparer des espèces, les techniques de séparation les transportent, les amenant à se différencier via un critère de sélection (taille ou charge par exemple), qui va dépendre du système de transport. La séparation est décrite par deux processus différents : l'advection et la diffusion. Mettre une espèce en mouvement dans un fluide est appelé l'advection. Nous préférerons ce terme au terme convection qui désigne plutôt un transfert de chaleur et à conduction qui fait référence parfois à plusieurs phénomènes. Le processus d'advection entre donc en compétition directe avec la diffusion (Fig. 1.1). Il existe plusieurs types de diffusions, nous aborderons ici le phénomène de diffusion de la matière qui tend à rendre homogène sa concentration dans un système. La première cause de diffusion est l'agitation thermique, déplaçant la matière des zones les plus concentrées vers les zones les plus dépeuplées et induisant un lissage du gradient de concentration.

Ces deux phénomènes sont responsables du transfert des espèces dans le système physique, et ce transfert est décrit par l'équation de transport d'advection-diffusion.

A. Phénomène de transport

1. *Équation d'advection-diffusion*

Le phénomène de transport ou de transfert concerne de multiple grandeurs (chaleur ou matière par exemple), le rendant présent dans divers champs de la physique et de la chimie. Nous discuterons ici du transfert massique principalement. L'origine de l'advection peut être une ou plusieurs forces externes qui agissent directement sur l'espèce ou la particule. À la différence de l'advection, la diffusion a pour source une inhomogénéité. La propension des systèmes physico-chimiques à rendre cette grandeur uniforme provoque sa redistribution spatiale.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla.(D\nabla \mathrm{c}) - \nabla.(\mathbf{v}\mathrm{c}) + \mathrm{S} \tag{1.1}$$

L'équation générale met en jeu l'espèce concernée (ici c sa concentration) et décrit son comportement en fonction de plusieurs paramètres. Prenons et gardons l'image d'une

concentration de sel qui serait transportée dans un canal. Ces paramètres peuvent être intrinsèques à l'espèce, par exemple D est son coefficient de diffusion. Nous verrons par la suite en fonction des cas que le coefficient de diffusion peut être constant ou dépendre des propriétés du système ou des paramètres d'actuation, et que souvent c'est une grandeur bien définie mais peu évidente à mesurer. D'autres paramètres de l'équation d'advection-diffusion dépendent directement et exclusivement du système. Le champ de vitesses $\boldsymbol{v}$ décrit le déplacement de l'espèce, par exemple dans le cadre d'un fluide dans un tube. C'est alors la vitesse $\boldsymbol{v}$ du fluide qui sert de véhicule pour le sel dans le canal. À contrario $\boldsymbol{v}$ peut aussi être la vitesse de la particule chargée se déplaçant sous l'effet d'un champ électrique. Si on applique un champ électrique dans le canal, le sel se déplacera en réponse au flux d'ions en mouvement dans le fluide, le fluide n'étant pas en mouvement à proprement parlé. Enfin S représente les sources (création) et fuites (destruction) pour l'espèce. Ce terme dépend à la fois des propriétés de l'espèce (réaction chimique, …) et des propriétés du système.

On explicitera 2 termes de l'équation qui décrivent les deux processus de transfert mis en jeu ici :

- $\nabla.(D\nabla \mathrm{c})$ décrit le processus de diffusion. ∇ est la divergence, le gradient de la valeur c. Un pic de concentration tend à s'aplanir, comblant le manque qui existait autour du maxima local. L'inverse est bien-sûr vrai pour un minima local qui tend à se combler.
- $-\nabla.(\mathbf{v}\mathrm{c})$, quant à lui décrit l'advection. Ce terme explicite et tient compte du fait que la concentration locale dépend du transport par la vitesse $\boldsymbol{v}$. On peut imager cela par un pic de concentration en sel à l'entrée d'un canal, via une injection soudaine par exemple, qui est transférée par $\boldsymbol{v}$ et mesurée à la sortie.

Finalement, on parlera ici de procédé d'*advection forcée* pour appuyer le fait que la migration fait partie du processus d'actionnement et de *diffusion naturelle* pour accentuer la perspective de l'obstacle que représente cet acteur non contrôlé.

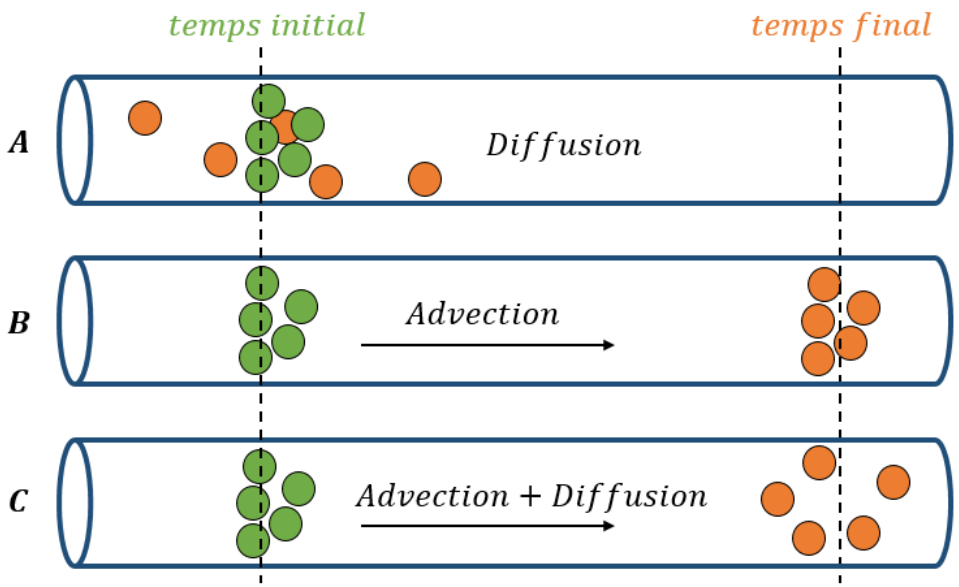


Figure 1.1 Schéma explicatif présentant 3 cas distincts du processus d'advection-Diffusion. En vert, l'état initial du groupe de particule, est ensuite altéré par ledit processus, jusqu'à son état final, en orange. **(A)** Diffusion naturelle seule : les particules investissent l'espace autours de leur position initiale. À l'échelle du groupe, on observe aucun déplacement. **(B)** Advection forcée : les particules sont transportées selon v, une vitesse de migration. **(C)** Advection-diffusion : les particules sont translatées par le processus d'advection, toujours selon v, et diffusent en même temps, d'où l'élargissement du nuage final.

2. Diffusion naturelle en régime libre

Il me faut rendre compte d'un phénomène important qui joue un rôle dans chacun des processus explicités par la suite : celui de la diffusion en régime libre. Le phénomène de diffusion par mouvement brownien *(Brown, 1828)* qui décrit le mouvement provoqué par l'entrechoquement de petits objets comme des particules avec les petites molécules présentes en phase liquide. Ces chocs conduisent la particule à être toujours en mouvement, suivant une trajectoire irrégulière. C'est un phénomène primordial, qui entre en jeu dans tous les systèmes et procédés, à l'origine de la notion de processus stochastique et difficilement modélisable de par le caractère aléatoire du mouvement. Contrairement au phénomène de l'advection il n'y a pas de mouvement d'ensemble induit par le mouvement brownien et statistiquement le déplacement est nul. Évidemment, les particules ne sont pas immobiles au cours du temps, ce sont les barycentres des trajectoires qui ne sont pas en mouvement.

a. Déplacement quadratique moyen

Alors, comment décrire et caractériser ce mouvement dans des conditions si particulières ? Le calcul stochastique introduit la notion de variable aléatoire qui évolue au cours du temps. Pour caractériser les propriétés statistiques du mouvement il convient alors d'établir et de décrire ces chocs aléatoires dont découle ce type de mouvement. Que ce soit par des approches physiques *(Einstein, 1906 ; Langevin, 1908)* ou mathématique *(Bachelier, 1900 ; Lévy, 1965)* il est devenu courant de caractériser le mouvement brownien par son déplacement quadratique moyen $\langle X^2(t) \rangle$.

Cette grandeur est reliée à la mesure de la distance moyenne, parcourue par les particules, qui est non nulle en moyenne au cours du temps. Fait notable, ce déplacement quadratique moyen est proportionnel au temps :

$$\langle X^2(t) \rangle = 2dDt \tag{1.2}$$

avec d la dimension dans laquelle le mouvement se déroule (linéaire, plan ou en 3 dimensions par exemple), D le coefficient de diffusion et t le temps écoulé.

b. Coefficient de diffusion

Il est donc possible de caractériser ce phénomène par une grandeur déjà évoquée, le coefficient de diffusion D. Le coefficient de diffusion est donné en phase liquide par la loi de Stokes-Einstein (Équ. 1.3) qui se base sur les lois du mouvement brownien et la force exercée par le fluide sur la particule *(Einstein, 1905 ; Sutherland et al., 1905)* :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi a \eta} \tag{1.3}$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, a la taille équivalente de la particule, souvent c'est son rayon hydrodynamique, et η la viscosité du fluide.

On notera que le phénomène de diffusion est accentué par la température et qu'un fluide plus visqueux aura tendance à minimiser ce phénomène. Ce sont deux facteurs qui seront très importants pour la suite.

3. Nombre de Péclet

Il existe un nombre sans dimension pour caractériser un système et sa tendance en matière de transport. Ce nombre est un indice pour indiquer si la méthode est plus ou moins diffusive. Le nombre de Péclet (Équ. 1.4) est défini comme le rapport entre les deux types de transports présentés jusqu'alors : transport par advection et transport par diffusion.

$$P_e = \frac{L_c v}{D} \tag{1.4}$$

On voit apparaître dans le nombre de Péclet une longueur L_c et une vitesse v qui sont des paramètres qui peuvent caractériser la particule ou le système selon le cas considéré et le point de vu adopté. Dans le premier cas L_c correspond au rayon hydrodynamique de la particule, dans le second cas L_c correspond au diamètre de la canalisation. Le coefficient de diffusion impliqué dans le phénomène de transport apparaît au dénominateur pour rendre compte du phénomène homonyme. Néanmoins on notera qu'il peut être difficile de caractériser un système via ce nombre lorsque le champ de vitesse n'est pas uniforme dans l'espace.

B. Les valeurs clefs des techniques de séparation

On a jusqu'ici abordé les généralités de la théorie des phénomènes de transfert. Avant de détailler plus avant les cas particuliers qui en découlent, il est nécessaire d'évoquer la détection et la caractérisation de ces phénomènes. En effet, c'est la finalité de toute technique de séparation de faire migrer pour séparer, pour analyser et/ou pour caractériser. La détection de la séparation doit donc être bien définie dans deux buts distincts : l'analyse et l'optimisation. Une bonne compréhension du phénomène de transport se manifestant dans le système peut mener à une meilleure performance de détection, et vice-versa.

1. Résolution de séparation

La donnée typique en sortie d'une expérience de séparation ressemble à un profil illustré en figure 1.2. Ce profil correspond à une intensité de fluorescence ou de courant, en espace ou en temps, cela ne modifie pas les définitions des valeurs fondamentales qui vont être précisées ci-dessous. Ces espèces ont migré, ont été transférées, et la détection peut intervenir à n'importe quel moment de ce transfert, elle peut même intervenir en continu tout le long du transport.

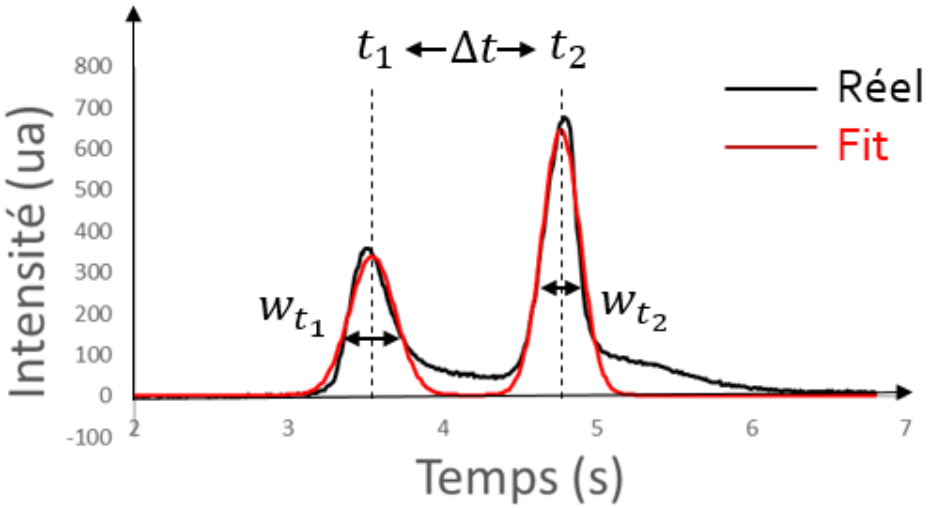


Figure 1.2 **Profil d'intensité (courbe noire) de deux espèces différentes, ou de la même espèce présentant deux tailles différentes.** Les pics sont ici ajustés par des fonctions mathématiques de type gaussiennes (courbes rouges).

Les profils représentent des distributions d'espèces au cours du temps qui ont migré pendant un certain temps et ont parcouru une certaine distance dans un système physique. De ce type de profil peuvent être extraites plusieurs données, les deux principales étant les temps de migration et les largeurs de chacun des pics (dans la fig. 1.2 deux pics sont présentés). La résolution de séparation R_s (Équ. 1.4) est décrite comme le ratio entre la distance (temporelle ou spatiale) entre les pics, et la moyenne des largeurs des bandes *(Buel et al., 2001)* :

$$R_s = 2\frac{\Delta t}{(w_{t_1} + w_{t_2})} \tag{1.5}$$

Optimiser la résolution c'est améliorer les performances d'une technique qui vise à séparer des espèces *(Buel et al., 2001 ; Giddings et al., 1969 ; Heller et al., 1999)*. Dans les techniques d'analyse de type chromatographie, les termes *sélectivité* et *efficacité* font référence dans le vocabulaire. Ils désignent respectivement la distance inter-pics et la largeur moyenne des pics. Nous discutons ces termes plus en détails dans les parties suivantes.

2. La sélectivité, une description de la distance séparant les espèces

Soit un mélange de i espèces en solution (i = 2 dans la figure 1.2). Les analytes migrent et l'espèce i migre pendant un temps t_i avant de passer devant un détecteur. Ce temps est aussi souvent annoté temps de migration (t_m) ou de rétention (t_R). Les différents pics peuvent donc être primairement caractérisés par leurs temps de migration respectifs. Mais il est plus courant de rendre compte de la différence de temps de migration avec Δt ou Δx.

Si t_i dépend de la longueur de migration L de l'injecteur au détecteur et de sa vitesse v_i on peut alors définir :

$$\Delta t = L\frac{\Delta v}{v} \tag{1.6}$$

avec v la moyenne des vitesses des espèces. Il apparaît alors que la distance inter-pics dépend linéairement de la longueur de migration L. La différence de vitesses relatives, $\Delta v/_v$ aussi appelée *sélectivité*, dépend du type de phénomènes mis en œuvre dans la technique de séparation, que l'on pourra appeler mécanismes de séparation.

Une première approche qui peut être considérée pour augmenter la résolution de séparation R_s est d'augmenter *la sélectivité*, ce qui revient à accentuer la distance inter-pics Δt. Ceci dépend du mécanisme de séparation et devra être adapté à la technique employée.

3. L'efficacité, une description de la largeur des pics

Le deuxième attribut de ces pics d'intensité sont leurs largeurs. Il existe de multiples façons de mesurer la largeur d'un pic.

La largeur des pics est une donnée extraite des profils d'intensités. Cette mesure peut paraître évidente à réaliser mais nécessite une définition rigoureuse *(Yamaguchi et al., 2015)*. On assimile les pics d'un profil à des gaussiennes, un ajustement (*fit* en anglais) est nécessaire. Ce *fit* peut être réalisé mathématiquement ou via des logiciels spécialisés.

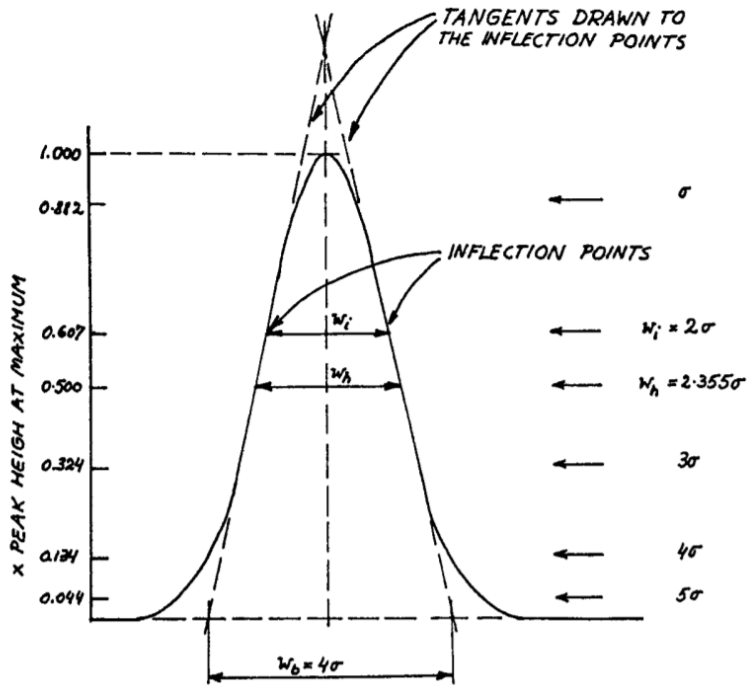


Figure 1.3 Les différentes largeurs d'un pic (assimilé à une gaussienne) sont présentées ici. Plusieurs largeurs peuvent être mesurées pour un même pic. Les plus courantes sont la largeur à mi-hauteur w_h et la largeur à la base w_b. Ces largeurs, pour plusieurs hauteurs, sont exprimées en fonction de la variance de la distribution $\boldsymbol{\sigma}$ *(Yamaguchi et al, 2015)*.

Il est possible ensuite de définir la largeur de la gaussienne correspondante via la variance de la distribution σ :

$$w_h = 2\sigma\sqrt{2\ln(2)} \tag{1.7}$$

C'est la mesure de la largeur à mi-hauteur, notée w_h ou $w_{0.5}$ (souvent notée dans la littérature aussi **FWHM** pour *Full Width at Half Maximum*), qui reste la plus courante mais il est aussi possible de trouver la mesure de la largeur à la base de la gaussienne, notée W ou W_b.

C'est le nombre de plateaux théoriques, N, qui décrit *l'efficacité* d'une technique de séparation *(Heller et al., 1999)*, peu importe la méthode employée pour mesurer la largeur d'un pic donné :

$$N = 5.54\frac{t^2}{{w_{0.5}}^2} \tag{1.8}$$

$$N = 16\frac{t^2}{W^2} \tag{1.9}$$

Les deux exemples précédents de calcul du nombre de plateaux théoriques sont donnés en fonction de la largeur à mi-hauteur et de la largeur à la base de la gaussienne *(Bristow et al., 1977)*. Par mesure de comparaison, on exprimera donc l'efficacité d'une technique par son nombre de plateaux théoriques standardisée par la longueur de migration exprimée en m (nombre de plateaux / m).

Néanmoins, un pic réel tend à être asymétrique avec l'apparition de phénomènes de *tailing* notamment, qui est l'apparition d'une traîne derrière le pic, et qui peut être plus ou moins prononcée *(Foley et al., 1983&1987)*. Le calcul du nombre de plateaux en utilisant $w_{0.5}$ (Équ. 1.8) tend à donner de bons résultats et est très largement utilisée pour sa polyvalence *(Buel et al., 2001)* et sa facilité de mise en place. Néanmoins cette méthode conduit à un gonflement du nombre de plateaux pour des pics plus large, contrairement au calcul de N avec W (Équ. 1.9). Ce dernier présente quant à lui la faiblesse d'être moins fiable pour des pics asymétriques.

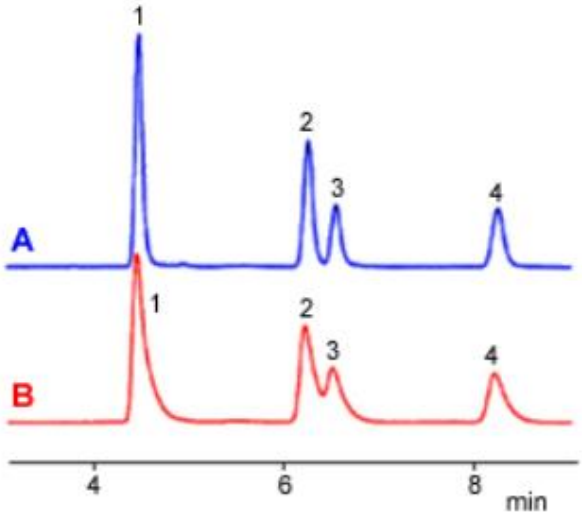


Figure 1.4 Deux Chromatogrammes présentant **(A)** des pics peu déformés : fins et symétriques, **(B)** des pics sujet au *tailing*, une déformation du pic apparaît *(Shimadzu, 2020)*. Ces deux profils sont ensuite utilisés pour différents calculs de nombre de plateaux (figure 1.5).

Le tableau de la figure 1.5 présente des données extraites du site de Shimadzu pour illustrer les différentes méthodes de calcul du nombre de plateaux N en fonction des méthodes de mesure de largeur de pics. Ici ne sont résumées que deux méthodes de calcul, mais l'étude *(Shimadzu, 2020)* en présente et compare quatre au total.

	A				B			
	1	2	3	4	1	2	3	4
W	15649	20444	20389	22245	5972	7917	-	9957
$w_{0.5}$	14061	18516	20309	21447	5773	7692	5795	9707

Figure 1.5 **Tableau récapitulatif :** présentant le calcul du nombre de plateau N pour les 4 pics des chromatogrammes A et B (1, 2, 3 et 4) de la figure précédente (Fig. 1.4). En fonction des différentes mesures de largeurs $w_{0.5}$ et W réalisées sur ces pics et des caractéristiques des profils (présence d'asymétries ou de recouvrements) les méthodes de calcul peuvent présenter des résultats bien différents. Enfin, on notera que N est très élevé, et présente donc les meilleures performances pour le profil A, celui où les pics ne sont pas déformés.

On peut remarquer que la méthode de calcul du nombre de plateaux avec $w_{0.5}$ conduit à des résultats plus petits de 10% environ pour un chromatogramme normal par rapport à la méthode de calcul utilisant la largeur à la base w. Cette différence est plutôt de l'ordre de 2% lorsque les bandes sont déformées. Cette méthode tend donc à surévaluer le nombre de plateaux lorsque les pics présentent des déformations. Il est intéressant et nécessaire de normaliser le nombre de plateaux par la longueur de migration ramenée au mètre.

Au final pour maximiser la résolution de séparation il faut augmenter le nombre de plateaux et donc limiter l'élargissement des pics. Cet élargissement peut puiser sa source dans diverses origines : différents processus de diffusion (Brownienne, Taylor, thermique …), dispersion, largeur de la bande à l'injection ou à sa concentration.

Ces facteurs peuvent se combiner de surcroît, rendant la caractérisation des phénomènes non évidente, et donc son optimisation plus difficile à identifier.

4. La longueur de résolution

Dans le cas spécifique de séparation d'ADN il devient pratique néanmoins de normaliser la résolution de séparation. La base (b) ou la paire de base (pb) sont les unités élémentaires pour définir, respectivement, la résolution par base ou paire de base *(Buel et al., 2001 ; Giddings et al., 1969)* :

$$R_b = 2\frac{\Delta t}{(N_2 - N_1)(w_{t_1} + w_{t_2})} \tag{1.10}$$

N_1 et N_2 sont les tailles des fragments en question, en nombre de bases ou paire de bases. Une valeur de $R_b = 1$ équivaut à des pics qui se croisent à mi-hauteur avec une différence de taille de l'ordre de la base, ou paire de bases. Si on inverse l'équation 1.10 on obtient la longueur de résolution (**RSL** pour *Resolution Length*) *(Buel et al., 2001 ; Yamaguchi et al., 2015)* :

$$\mathrm{RSL} = \frac{1}{R_b} \tag{1.11}$$

Cette valeur défini la plus petite longueur d'ADN qui peut être résolue par le système.

C. Séparation de l'ADN

1. L'ADN

Nous avons jusqu'alors fait référence à un objectif de séparation d'espèces. Dans le cadre de ma thèse la motivation principale était la séparation de l'ADN. Nous ferons donc référence aux acides nucléiques comme espèces d'intérêt à séparer.

Les acides nucléiques regroupent l'ADN double-brin (**dsDNA** pour *double-stranded DNA*), l'ADN simple-brin (**ssDNA** pour *single-stranded DNA*) et l'ARN. Toutes ces molécules sont composées de séquences de nucléotides que nous appellerons des bases et qui s'assemblent en chaînes de monomères liées par un squelette de phosphates. Les acides nucléiques sont donc chargés négativement en solution aqueuse. La forme la plus courante de l'ADN est la double-hélice, en effet ces nucléotides se couplent en paires de bases (A/T, C/G) *(Watson and Crick, 1953 ; Viovy et al., 2000)*.

Selon la forme de l'ADN les propriétés de la molécule au cours d'une séparation peuvent varier grandement. Cette séquence de nucléotides peut être représentée par des billes enfilées en collier, elles-mêmes rassemblées en cylindres (Fig. 1.6). Ces cylindres de longueur l_p caractérisent la rigidité de la chaîne, l_p étant la longueur de persistance. Celle-ci dépend de la force ionique de la solution. La conformation générale de la chaîne peut être illustrée par une

sphère de rayon $R_g = l_k\sqrt{N_k/6}$, où $l_k = 2l_p$ est la longueur de Kuhn et N_k le nombre de segments de Kuhn, soit le nombre de cylindres.

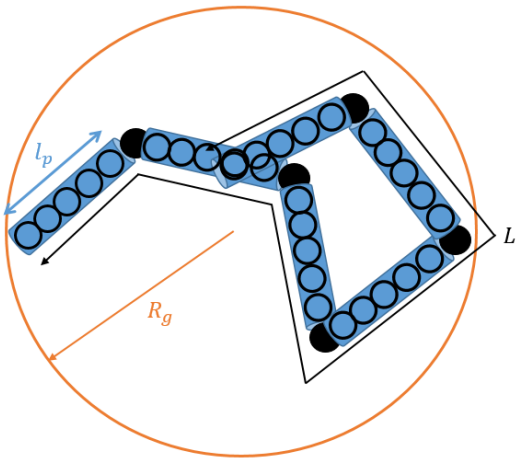


Figure 1.6 Un poly-électrolyte fait d'une séquence de monomères : la chaîne adopte une conformation aléatoire que l'on peut paramétrer avec le rayon de giration R_g et la longueur de persistance l_p. L représente la longueur de contour, soit la longueur totale de la chaîne.

2. Mobilité électrophorétique

Quand un polymère chargé, comme les acides nucléiques, est en solution, il se forme deux couches ioniques à son pourtour. La première, la couche de Stern, est formée de contre-ions, très peu mobiles (l'énergie électrostatique d'interaction avec la molécule est supérieur à l'énergie d'agitation thermique), la deuxième de Debye est constituée d'ions mobiles. La longueur de Debye correspond à un régime de décroissance exponentielle du champ électrique selon une longueur caractéristique $\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_b k_B T}{2e^2 I}}$, avec ϵ_0 et ϵ_b respectivement, les permittivités du vide et du milieu, e la charge d'un électron et I la force ionique du milieu.

Quand un champ électrique est appliqué, les mouvements de liquide ont lieu dans la couche de Debye et le reste du liquide est à l'équilibre. Comme cette couche est beaucoup plus petite que la longueur de Kuhn, il est possible d'appliquer un modèle de champ de force local identique pour tous les segments de Kuhn. La mobilité électrophorétique, rapport de la vitesse d'un monomère sur le champ électrique qui lui est imposé, pour un segment peut ainsi être définie *(Manning et al., 1978 ; Dorfman, 2010)* par :

$$\mu_0 = \frac{v}{E} = \frac{q_k}{\xi_K} \tag{1.12}$$

avec q_k la charge d'un segment de Kuhn et ξ_K le coefficient de friction d'un monomère lors du déplacement de la chaîne dans le fluide.

Lorsqu'il n'y a pas de champ électrique, les mouvements de liquide provoqués par les mouvements des monomères sont propagés dans le liquide à grande portée. Il y a alors des interactions hydrodynamiques entre les segments de la chaîne, ce qui fait que la chaîne se comporte comme une sphère de rayon R_g imperméable au fluide *(Zimm, 1945&1948)*. Ce modèle est particulièrement important pour la séparation par sédimentation analytique, mais pas particulièrement pour l'électrophorèse.

Pour revenir au cas de l'électrophorèse, la chaîne se comporte comme une série de segments indépendants *(Richter, 1984 ; Ahlrichs, 2001)*. Le modèle de Rouse *(Rouse, 1953)* démontre alors que le coefficient de friction appliquée sur la molécule ξ_C est proportionnel au nombre de segments de Kuhn $N_k\xi_K$ (Équ. 1.13) *(Y et al.e, 2018)*. La conséquence directe est que la mobilité électrophorétique de la molécule ne dépend plus de la taille de la chaîne *(Long et al., 1996)*.

$$\mu_0^{Rouse} = \frac{Q}{\xi_C} = \frac{N_k q_k}{N_k \xi_k} \tag{1.13}$$

3. Matrice de polymère

Les processus de séparation consistent très souvent en un système contenant une phase mobile, la solution d'élution. Ces systèmes peuvent aussi avoir une phase dite figée, une structure solide (membrane, piliers, …) pour faire obstacle au transport de l'espèce avec la phase mobile. Historiquement les gels de polymères ont été introduits dans les techniques de séparation d'acides nucléiques et de protéines comme phase figée *(Stellwagen, 1998)*.

Le gel à proprement parler est une structure de macromolécules réticulés, diluées dans une solution tampon. Ce matériau ne présente aucun écoulement quand il est stable. Lors de la polymérisation le gel est figé en une matrice de pores qui agissent comme un véritable réseau de chemins que les molécules peuvent emprunter. Ces pores peuvent être caractérisés par une taille caractéristique b, très importante car elle définit la taille de molécules pouvant être

séparées dans ce gel. Deux types de gels sont très classiques dans les séparations d'acides nucléiques, l'agarose et le polyacrylamide, dont les tailles de pores sont, respectivement, $b_{agarose}$~200 à 500 nm et $b_{polyacrylamide}$~5 à 100 nm *(Viovy et al., 2000)*.

C'est alors l'interaction entre les chaînes d'analytes et la matrice de polymère qui induit une différence de mobilité en fonction de la taille des molécules. Les ADN de petites tailles, par rapport à la taille des pores, iront plus vite, se faufilant aisément entre les mailles du réseau, alors que les grandes tailles auront plus de mal à naviguer entre les obstacles. Cette différenciation en taille se fait par interaction physique entre les molécules et la matrice de polymère et ne dépend pas du champ appliqué. Les interactions peuvent être d'origine purement stérique ou encore d'origine électrostatique. On retrouve cette caractéristique autant dans les techniques dites *hydrodynamiques* comme la chromatographie hydrodynamique ou la chromatographie à exclusion stérique, que des méthodes d'électrophorèse, sur gel ou en capillaire. Il existe deux grands modèles qui décrivent le déplacement des molécules dans les gels en fonction de leur rayon de giration. Ces modèles ont été décrit ainsi dans le cadre de l'électrophorèse en gel.

a. Mécanisme de filtration d'Ogston

Lorsque le rayon de giration R_g est plus petit ou du même ordre de grandeur que la taille des pores du gel, le modèle du volume libre, élaborée par Ogston, est utilisé. Ce modèle décrit le mécanisme d'interaction entre les molécules et les pores (Fig. 1.7). La fraction de volume libre f est donnée par le ratio entre la mobilité μ des molécules *(Rodbard, 1970)* en gel et μ_0 en solution libre. Cette fraction est alors évaluée par :

$$f = \frac{\mu}{\mu_0} = e^{-K_R C} \tag{1.14}$$

Ainsi on peut définir la notion de coefficient de retard K_R, avec C la concentration du gel en polymère. Ce coefficient de retard est proportionnel à $(r + R)^3$ *(Viovy et al., 1993&2000)*, avec, r le rayon effectif des obstacles dans le gel et R le rayon effectif de la molécule. Il est donc théoriquement *(Ogston, 1958)* possible de calculer la mobilité électrophorétique de molécules dans un système composé de nano-pores en estimant la fraction de volume libre.

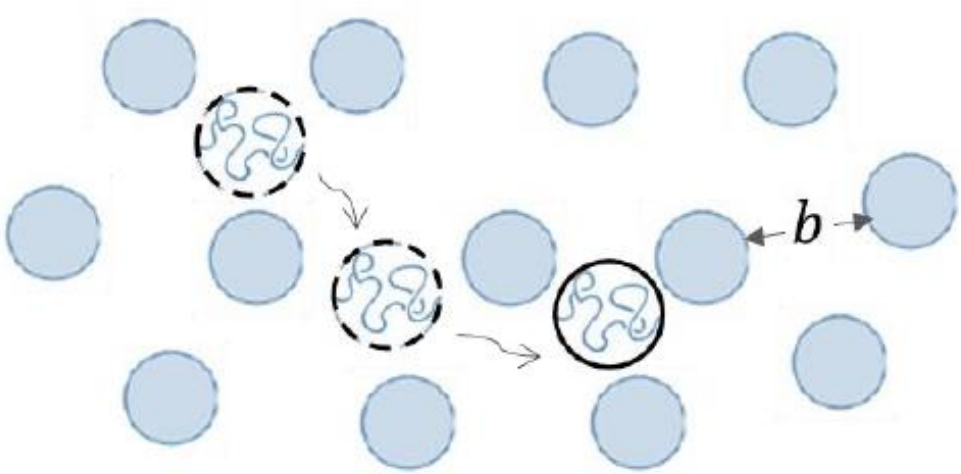


Figure 1.7 Mécanisme de filtration d'Ogston. $R_g < b$, le rayon de giration de la molécule est plus petit que la taille moyenne des pores dans le gel, la molécule d'ADN est en conformation de bobine repliée est se déplace dans cette conformation *(Salieb-Beugelaar et al., 2009).*

L'étude présentée par *(Giddings et al., 1968)* propose plusieurs calculs de fraction de volume libre et de coefficients de retard pour diverses formes régulières ou aléatoire de pores et pour des molécules sphériques ou asymétriques *(Han et al., 2008)*.

b. Mécanisme de reptation biaisée

Quand le rayon de giration est supérieur à la taille des pores dans le gel c'est le modèle de reptation biaisée qui est utilisé. Le mouvement impliqué dans ce mécanisme a été décrit par de Gennes comme le déplacement d'un serpent dans l'herbe *(De Gennes, 1979)*. La molécule doit contourner les obstacles, en une conformation plus étirée, comme suivant un tube dont les murs sont les pores du gel (Fig. 1.8).

Ce type de mouvement peut être divisé en deux mécanismes secondaires, la reptation biaisée sans orientation et la reptation biaisée avec orientation. La différence entre ces deux régimes réside en l'intensité du champ électrique (intensité du champ responsable de l'advection en général) par rapport à la taille des molécules *(Heller et al., 1994 ; Viovy et al., 1996)*.

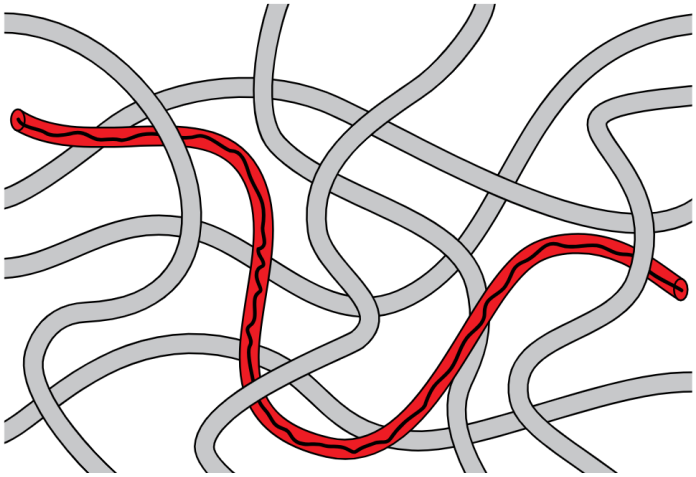


Figure 1.8 **Mécanisme de reptation biaisée.** $R_g > b$, la molécule, de rayon de giration plus grand que la taille moyenne des pores dans le gel, suit alors un « tube » qui chemine entre les pores du gel, en une conformation plus étirée.

Pour des molécules de petites tailles ou des champ faibles, l'intensité de l'advection laisse la molécule dans sa conformation repliée *(Viovy et al., 1993)*. Alors que pour des molécules plus grandes ou des champs très intenses la molécule s'oriente dans le sens de celui-ci *(Slater, 2009)*. Dans ce dernier cas de figure la mobilité devient indépendante de la taille.

(Viovy et al., 1996) révise le mécanisme de reptation biaisée en prenant en compte et en introduisant les fluctuations de l'ADN dans le modèle. Les prédictions de ce modèle sont en bon accord avec les résultats expérimentaux *(Heller et al., 1994)*. La mobilité de l'ADN ainsi définie peut être exprimée en fonction la taille de la molécule, et des pores, respectivement l_k et b *(Duke et al, 1994)*.

$$\frac{\mu}{\mu_0} = \left\{ \left[\frac{(b/l_k)^2}{3N_k} \right]^2 + \left[\frac{2\varepsilon_k (b/l_k)^2}{5 + 2\alpha\varepsilon_k (b/l_k)^2} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}} \tag{1.15}$$

Avec $\frac{\mu}{\mu_0}$ le ratio entre la mobilité de l'ADN dans le gel et en solution libre. l_k et N_k sont, respectivement, la longueur de Kuhn et le nombre de segments de Kuhn. b est la taille moyenne des pores dans le gel. ε_k est un paramètre sans dimension représentant l'effet réduit du champ électrique sur chaque segment de Kuhn, $\varepsilon_k = \frac{\eta {l_k}^2 \mu_0 E}{k_B T}$, avec η la viscosité du solvant et E l'amplitude du champ électrique appliqué. Enfin α est un paramètre ajusté via les résultats

expérimentaux et les simulations (~ 3), qui limite la fraction des mobilités $\frac{\mu}{\mu_0}$, dans le cas de très grandes molécules ou des amplitudes de champs électrique très importantes.

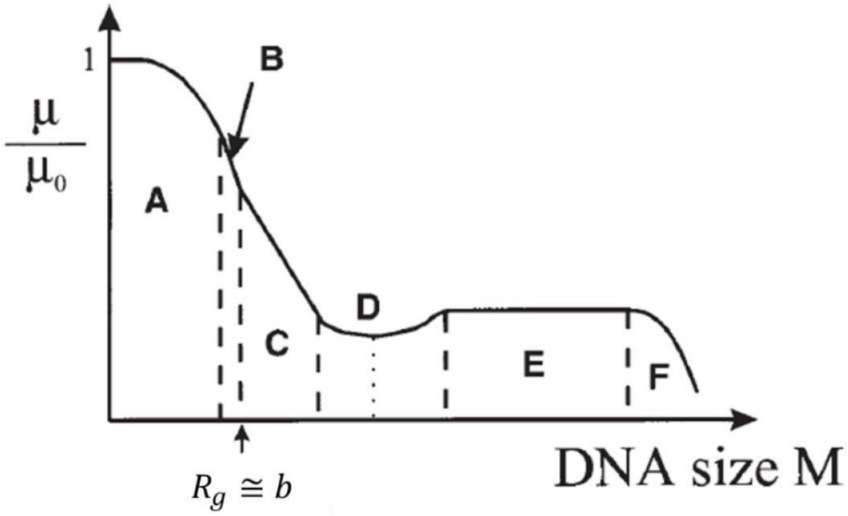


Figure 1.9 Schématisation des différents régimes des mécanismes de séparation en électrophorèse en gel, diagramme de $\frac{\mu}{\mu_0}$ en fonction du poids moléculaire de l'ADN *M*. **(A)** Mécanisme de filtration d'Ogston, la mobilité varie exponentiellement avec la taille de l'ADN. **(B)** Piégeage entropique lorsque la taille de l'ADN est de l'ordre de celle des pores et le champ électrique faible. **(C)** Reptation sans orientation. **(D)** Transition entre les mécanismes de reptation sans et avec orientation. Cette transition est caractérisée par une « inversion », expliquée par un changement de conformation, les molécules de plus haut poids molécule se déplacent alors plus vite que les plus petites *(Doi, 1988)*. **(E)** Reptation avec orientation, un plateau est observé, la mobilité est indépendante de la taille de la molécule. **(F)** Expliqué par le fait que certaines molécules sont si grandes qu'elles ne pénètrent même pas dans la matrice. Extrait de *(Slater, 2001).*

II. Théorie de l'élargissement des bandes

L'élargissement des pics est un phénomène qui conduit à une perte de performance pour les techniques de séparation, comme nous l'avons souligné précédemment. L'élargissement d'un pic, d'une bande, a un impact négatif sur la résolution et réduit la précision pour quantifier les espèces présentes dans un échantillon. Identifier l'origine de l'élargissement des bandes est donc une étape nécessaire pour en limiter les contrecoups. Nous allons aborder dans cette partie les différents facteurs qui ont été identifiés comme principaux contributeurs à ce phénomène.

J. J. Van Deemter proposa une théorie qui combine toutes les sources identifiées alors. L'étude *(Van Deemter, 1956)* est alors réalisée sur les mécanismes d'élargissement des bandes

en chromatographie linéaire non-idéale. Cette étude relie alors ces sources de non-idéalité avec la vitesse de ce processus d'élargissement des bandes. Cette théorie introduit trois premiers contributeurs à ce mécanisme qui sont représentés par chacun des trois termes de droite de l'équation 1.16. Il introduit avec cette équation une représentation (Fig. 1.10) du nombre de plateaux théoriques en fonction de la vitesse de la solution. Cette équation permet de définir un optimum pour le fonctionnement du système de séparation en terme de dispersion en fonction de la vitesse de migration.

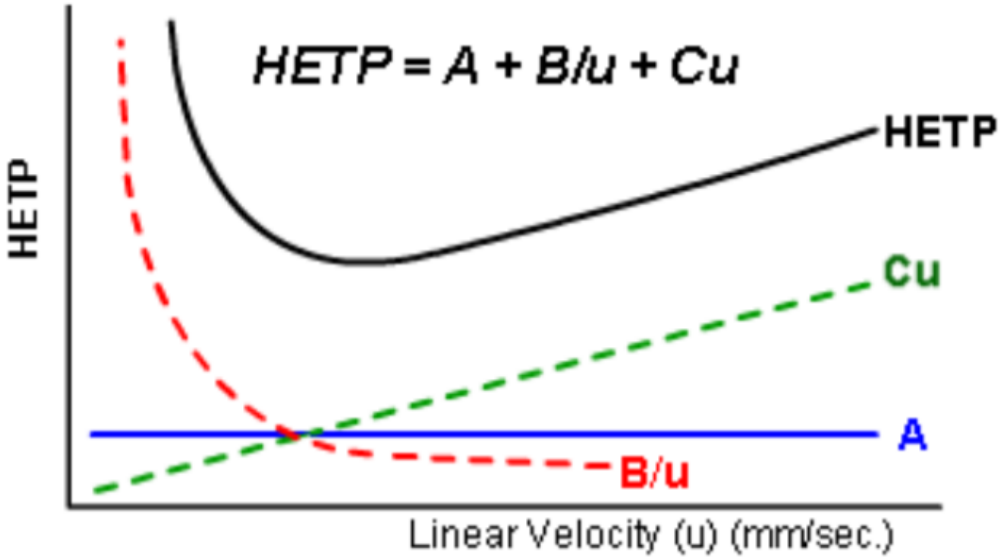


Figure 1.10 **Équation de Van Deemter et sa représentation graphique.** **HETP** est l'acronyme de *Height Equivalent to the Theoretical Plate* qui signifie la hauteur équivalente au nombre de plateaux théoriques. C'est le ratio entre la longueur de la colonne de chromatographie et le nombre de plateaux théoriques.

$$HETP = A + {}^{B}/_{v} + Cv \qquad (1.16)$$

Ce modèle permet donc de prédire, en théorie, une vitesse optimale pour laquelle l'efficacité sera maximale. L'explication des différents termes de l'équation 1.16 se fera dans les prochaines sous-parties.

A. Sources de dispersion

1. Diffusion d'Eddy

Le terme générique *diffusion d'Eddy* fait référence à toutes les variations induites soit dans les lignes de courant de la phase mobile autours des pores ou des différents chemins que les molécules peuvent suivre. Comme dans une structure de gel de polymères par exemple. En d'autres termes, une même gamme de taille de molécule peut prendre de multiples chemins au cours de la migration (Fig. 1.11) et disperse donc plus.

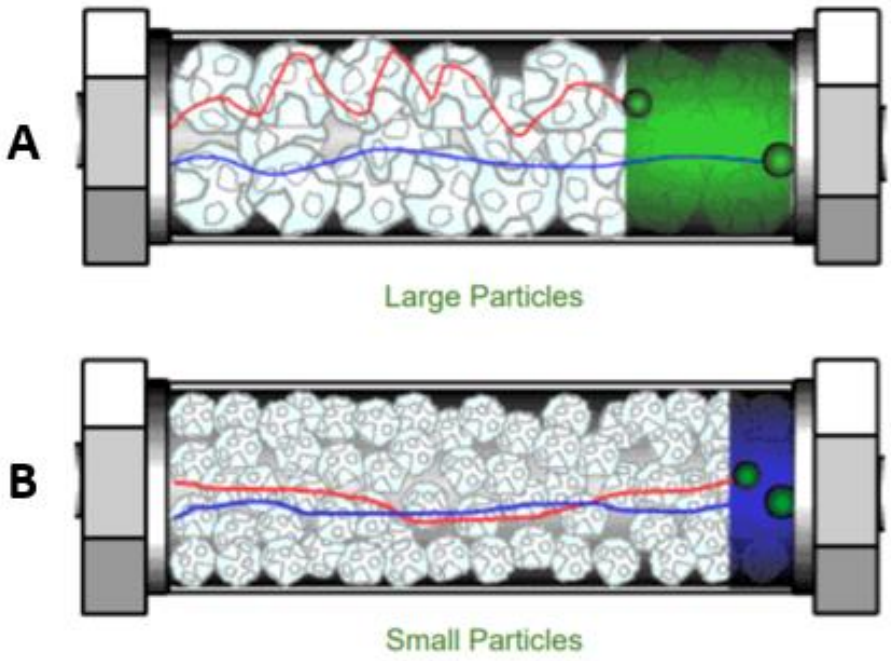


Figure 1.11 Schéma de l'effet d'élargissement de bandes dû à la diffusion d'Eddy. Quand **(A)** les pores sont grands par rapport aux molécules, il y a multiplications des chemins possibles, il y a plus de dispersion. À l'inverse quand **(B)** les pores sont petits par rapport à la taille des molécules, il y a moins de dispersion.

La diffusion d'*Eddy* correspond au terme *A* de l'équation 1.16. On peut remarquer qu'introduit de la sorte, en ne dépendant pas de la vitesse de la phase mobile, il suffirait d'utiliser des gels présentant des pores plus petits ou qu'il faudrait un échantillon de molécules avec très peu de variation en gamme de taille pour améliorer les performances d'une technique de séparation. Une idée pour minimiser ce terme est d'employer des matrices manufacturées de manière à être la plus régulière possible et qui permettent donc de réduire fortement les

variations de migration. Or nous avons vu dans la partie I.C.3 que la vitesse influe sur la conformation de la molécule lors de sa migration, et que la conformation peut changer le mécanisme de déplacement de cette dernière. Cet exemple montre en partie les limites de cette approche phénoménologique, qui doit être couplée à des modèles physique de dispersion pour être complètement convaincante.

2. Diffusion longitudinale

La diffusion naturelle tend, par mouvement brownien, à disperser un pic de molécules en raison du gradient de concentration. Ce facteur est appelé « longitudinal » parce que c'est dans la direction parallèle à l'écoulement qu'il a le plus d'impact. Il n'est pas anodin de noter que la diffusion s'effectue néanmoins dans toutes directions.

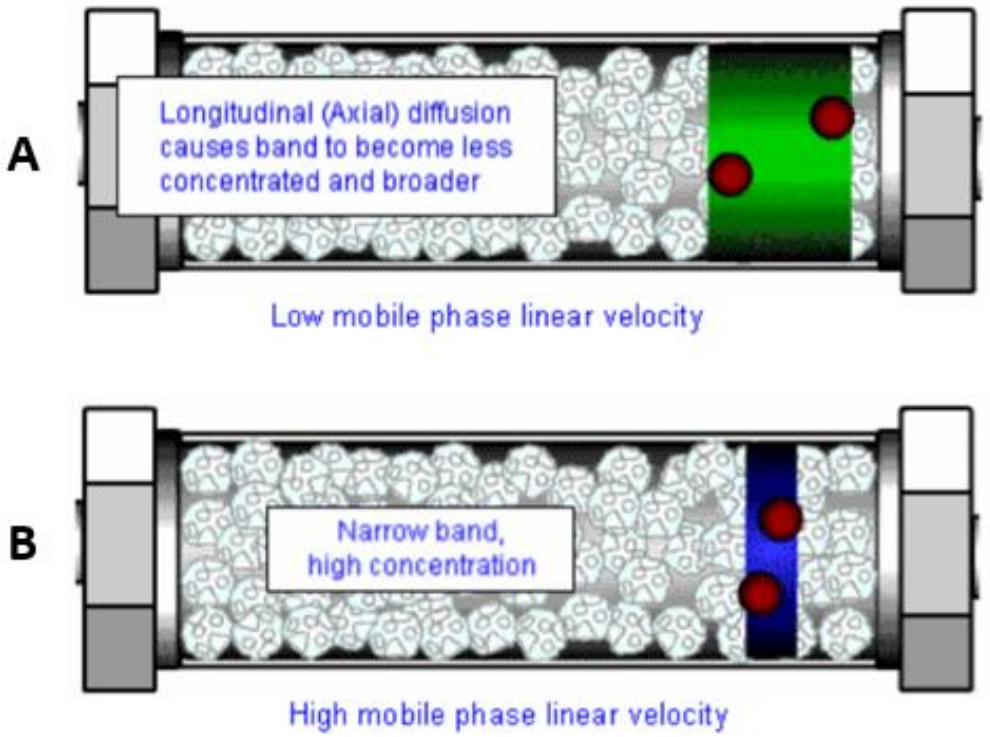


Figure 1.12 Schéma présentant l'effet d'élargissement de bandes dû à la diffusion longitudinale. Cet Effet dépend principalement du temps de migration et donc de la vitesse, quand cette dernière est **(A)** faible, l'échantillon reste longtemps dans le système, permettant à la diffusion longitudinale de le disperser ; **(B)** grande, l'échantillon est transporté rapidement, réduisant ainsi l'effet de la diffusion.

L'effet de la diffusion longitudinale est fortement lié aux paramètres géométriques du système (longueur de canalisation, diamètre d'un capillaire, …) ou aux temps de migration. Une canalisation très longue aura un impact négatif sur l'élargissement d'un pic qui pourra être réduit par un temps de migration très court. C'est pourquoi le terme B de l'équation 1.16, qui représente l'effet de la diffusion longitudinale, est en connexion avec la vitesse (Fig. 1.12).

3. Cinétique des transferts de masses

Le dernier terme de l'équation apparaît par la structure poreuse du medium. La phase mobile dans ces pores est dite stagnante. Une molécule dans cette phase stagnante ne perçoit plus la vitesse de l'écoulement autour des pores et voit son déplacement assujetti au mécanisme de diffusion naturelle. On peut donc affecter à chaque particule un certain de temps de résidence dans la phase stagnante, pendant lequel la molécule ne migre plus.

Alors, la différence de vitesse de migration vient ici de la différence entre les molécules qui n'entrent pas dans les pores et celles qui rentrent et qui peuvent avoir un long temps de résidence dans la phase stagnante. La vitesse de la phase mobile a, ici encore, un impact certain sur ce terme C de l'équation 1.16, linaire cette fois par contre. Plus cette vitesse v est petite et plus les molécules ont le temps de diffuser dans les pores et d'accentuer la dispersion.

B. Déterminer et estimer ces contributions

Les études sur l'élargissement des bandes ont contribué à l'amélioration des performances des techniques chromatographiques. L'équation initialement établie par Van Deemter pour la chromatographie en phase gazeuse s'est avérée efficace pour optimiser des séparations en chromatographie en phase liquide. Beaucoup de phénomènes physiques sont les mêmes ou sont très proches, d'où l'importance de leur identification. Et la méthode n'a pas tardé à se reporter sur l'optimisation d'autres techniques comme en électrophorèse capillaire par exemple *(Xue et al., 1994 ; Heller et al. , 2001)*.

Et bien que l'on trouve encore des références aux termes introduit par Van Deemter, il est plus fréquent maintenant de trouver des équations qui adopte la forme suivante *(Rebscher et al., 1994)* :

$$\sigma_{Total}{}^{2} = \sum_{contributions} \sigma^{2} \tag{1.17}$$

Avec $\sigma_{Total}{}^{2}$ la variance totale d'un profile de pic lors d'une séparation. La déviation standard d'un pic est proportionnelle à largeur à mi-hauteur $w_{0.5}$, un paramètre mesurable relativement facilement. Dans la somme des variances des contributions peuvent être trouvés des facteurs déjà cités comme : la diffusion d'*Eddy*, la diffusion longitudinale ou la cinétique des transferts de masse. Mais de nouveaux paramètres sont reconnus, comme la variance due au gradient de température ou la variance due à l'instrumentation de l'élargissement de la bande.

III. Processus de diffusion dans les techniques de séparation

Dans cette section nous parcourrons certaines techniques de séparation, en exposant leur principe de mise en œuvre et jusqu'à développer les avantages et les inconvénients qu'elles imposent lorsqu'il s'agit de mesurer un coefficient de diffusion et certaines des solutions proposées technologiquement/instrumentalement pour contrer les points négatifs soulevés. Les méthodes de présentation et de groupement sont nombreuses et ce n'est pas le but de ce chapitre de faire une *review* exhaustive. J'ai donc choisi de présenter les procédés en fonction du ou des champs de force qui induisent le processus physique de migration.

Seront successivement présentés :

- Champ hydrodynamique : Les techniques de séparations basées sur un champ de force hydrodynamique. L'advection via un champ de vitesse dans un fluide mis en mouvement par une chute de pression et la dispersion de Taylor seront présentées comme en compétition.
- Champ électrophorétique : Les techniques de migrations qui font intervenir un champ électrique.
- Champs mixtes : des méthodes mixtes existent. Ces dernières font intervenir un champ de pression et un champ électrique entre autres, dans le même sens ou dans des sens opposés.

A. Champ hydrodynamique

Il existe de nombreux procédés de séparations basés sur l'utilisation d'un champ hydrodynamique pour induire une migration d'espèces. Néanmoins comme évoqué précédemment le champ de force est un outil, qui doit amener la différenciation sur un paramètre physique. Les procédés qui se fondent sur un champ hydrodynamique s'appuient préférentiellement sur des paramètres liés à la taille (rayon de giration, centre de masse, …).

L'équation d'advection-diffusion (Équ. 1.1) peut être simplifiée (Équ. 1.18). Dans la plupart des systèmes le coefficient de diffusion est constant, le fluide est incompressible et il n'y a ni sources ni fuites *(Probstein, 1994 ; Bird, 2002)*.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - \mathbf{v}.\nabla c \tag{1.18}$$

1. *Principe du transport en écoulement de Poiseuille*

Un champ de force hydrodynamique dans une canalisation est décrit par un écoulement laminaire, appelé écoulement de Poiseuille. La loi de Hagen-Poiseuille (1840) relie la viscosité et le débit dans une canalisation lorsqu'une différence est appliquée entre ses deux extrémités. Dans l'équation 1.18 l'expression du champ de vitesse contient toute l'information quant au phénomène d'advection. La loi de Poiseuille démontre les expressions du champ de vitesse dans un écoulement de Poiseuille pour une conduite cylindrique. Dans une canalisation (Fig. 1.13) de rayon R et de longueur L, la vitesse en fonction de la côte dans le tube est donnée par :

$$v(r) = v_{\max}(1 - \frac{r^2}{R^2}) \tag{1.19}$$

avec v_{max} la vitesse au centre du tube. La vitesse maximale dépend du gradient de pression $\Delta P = P_s - P_e$ le long du et de la viscosité du fluide η :

$$v_{max} = \frac{R^2 \Delta P}{4\eta L} \tag{1.20}$$

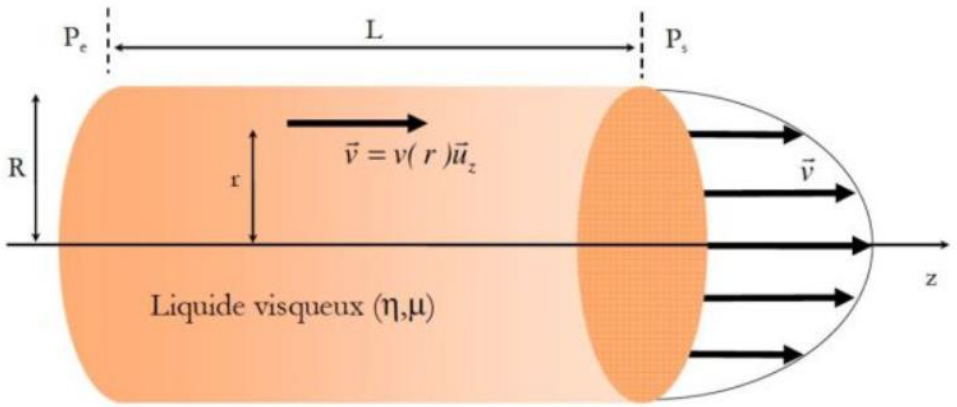


Figure 1.13 Schéma d'un écoulement de Poiseuille dans une conduite cylindrique. Le profil de vitesses est dit parabolique, l'amplitude de la vitesse dépend de *r*, la distance au centre de la canalisation.

Toutes les techniques n'opèrent pas dans des capillaires, beaucoup font intervenir des systèmes de fentes microfluidiques. La géométrie est alors rectangulaire (Fig. 1.14) et le profil de vitesse et moins évident à calculer (Équ. 1.21).

$$v(z) = 4v_{max}\frac{z}{H}(1-\frac{z}{H}) \tag{1.21}$$

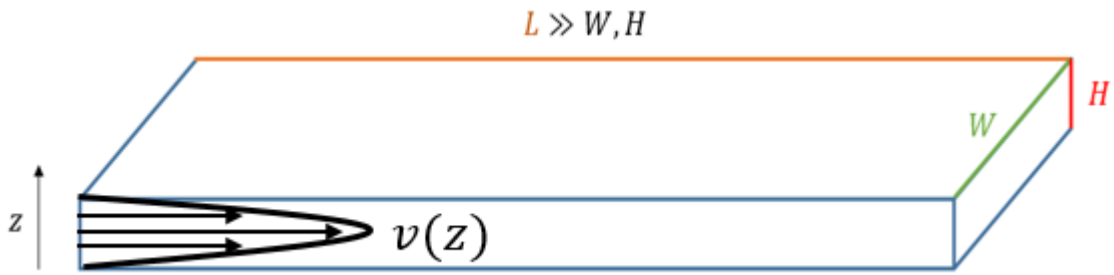


Figure 1.14 Schéma d'une fente microfluidique. La migration s'effectue selon *L*, très grand devant les autres paramètres géométriques de la fente : la largeur *W* et la hauteur *H*. La variation de la vitesse se fait selon la hauteur *z* de la canalisation dans ce cas-là.

a. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (**SEC**, pour *Size-Exclusion Chromatography*) et très utilisée en étude des polymères et pour la séparation de biomolécules en fonction de leur rayon hydrodynamique *(Hecker, 1987)*. La phase figée en SEC est constituée d'un gel poreux

perméable. En raison de leur taille les grandes molécules ne peuvent que plus ou moins pénétrer dans les pores du gel polymère. Ces derniers agissent comme un véritable labyrinthe pour les plus petites molécules.

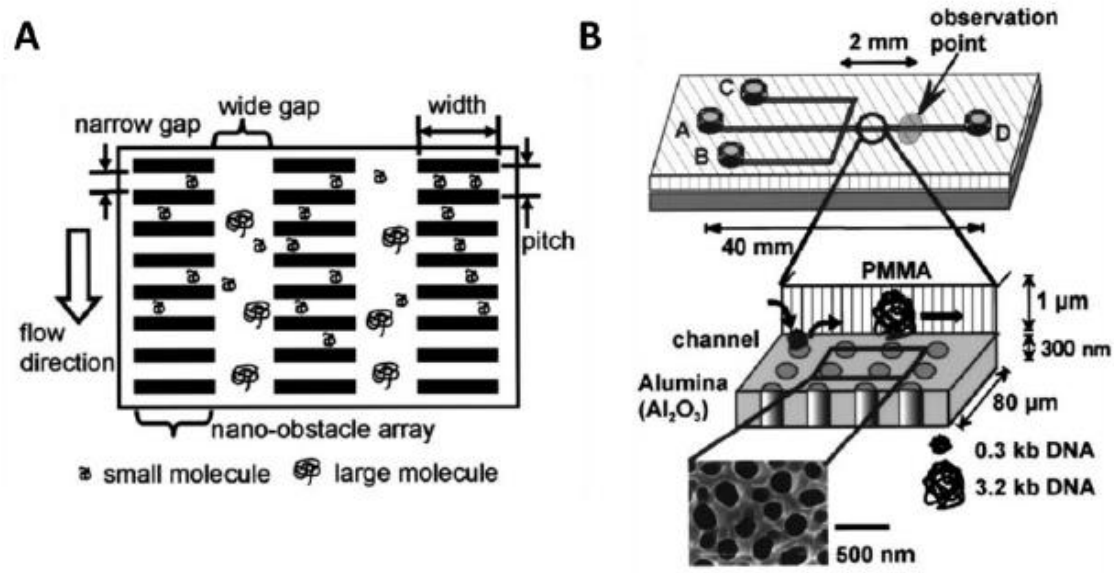


Figure 1.15 Exemples de Chromatographie à exclusion stérique sur puces microfluidiques. **(A)** Structure d'un système SEC *(Baba et al., 2003)*. La structure est manufacturée de telle sorte que les grandes molécules ne puissent pas accéder à certaines régions *« narrow gaps »*, elles vont ainsi plus vite que les petites molécules qui naviguent de zones en zones au gré de leur migration. **(B)** Une puce microfluidique avec des nano-pores assemblés sous forme de membrane fabriquée en oxyde d'aluminium *(Sano et al., 2003)*.

L'un des désavantages majeurs à ce procédé est le temps de migration très long. Pour ne pas étendre les molécules et garder leur encombrement stérique la technique est limité à une vitesse d'écoulement très faible. Plusieurs études ont permis de montrer que la séparation en SEC dépend principalement de la forme de la molécule *(Sun, 2004 ; Wang, 2010)*.

b. Chromatographie hydrodynamique

La technique de chromatographie hydrodynamique (**HDC**, pour *Hydrodynamic Chromatography*), comme pour la SEC, sépare les espèces en fonction de leur taille et l'encombrement stérique des molécules est le paramètre de discrimination. Les grandes

molécules avec un centre de masse volumineux ne peuvent pas s'approcher des murs. Or, le profil de Poiseuille impose des vitesses plus importantes au centre du système. Les grandes molécules vont donc plus vite que les petites. Les études ont montré que le paramètre crucial ici est le rapport entre la hauteur du canal et la taille des molécules *(Noel, 1978 ; Tijssen, 1986)*.

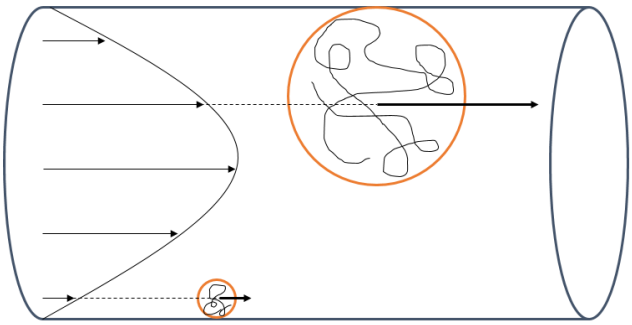


Figure 1.16 Schéma explicatif de la chromatographie hydrodynamique. Un écoulement de Poiseuille induit une variation de la vitesse selon la hauteur de la canalisation. Les grandes molécules accèdent principalement aux grandes vitesses, ne pouvant se rapprocher des parois. Au contraire, les petites molécules explorent l'ensemble des vitesses accessibles. En moyenne les grandes molécules migrent plus rapidement que les petites.

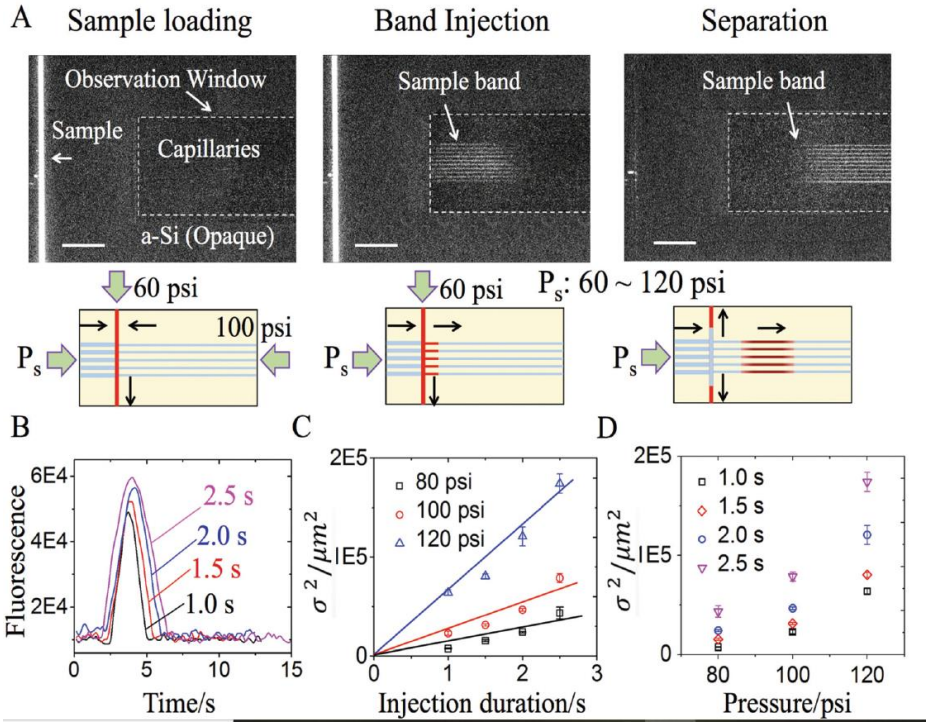


Figure 1.17 Schéma d'injection par pression. **(A)** Image en fluorescence et diagrammes correspondants dans la zone d'injection. Échelle: 200 µm. **(B)** Chromatogrammes des bandes formées pour différentes durées d'injection (pour la même pression de 100 psi). **(C et D)** Variance des bandes **(C)** en fonction de plusieurs temps d'injection pour différentes pressions et **(D)** inversement. Extrait de *(Duan, 2017)*.

Contrairement à la chromatographie à exclusion stérique, la chromatographie hydrodynamique se fait en gel non poreux et ne présente pas la problématique de la forme de la molécule au cours de sa migration. Elle offre donc des vitesses de séparation plus élevées. Néanmoins elle peut être difficilement utilisée avec des molécules de bas poids moléculaire *(Tijssen, 1986)*.

2. Dispersion de Taylor et analyse en dispersion de Taylor

En effet, les techniques qui se basent sur un champ hydrodynamique sont relativement simples et rapides à mettre en place.

Dans un flux laminaire de Poiseuille, responsable de la convection, le profil de vitesse est en réalité très dispersif. Parallèlement à l'axe de l'écoulement, le front du soluté devient parabolique, dû à la forme du profil de vitesse (Fig. 1.18 A&B). En l'absence d'un quelconque autre processus, de diffusion notamment mais un autre champ source d'advection aussi, la bande continuerai sa déformation en suivant cet axe. Mais comme évoqué précédemment il existe une compétition perpétuelle entre advection et diffusion. Et en particulier la diffusion radiale (Fig. 1.18 C), naturelle, dû au mouvement brownien et à l'agitation thermique, tend à homogénéiser les pics de concentration (au centre de la canalisation à l'avant de la bande) et les zones pauvres en concentration (au centre de la canalisation à l'arrière de la bande). Cet évasement d'une bande dans l'axe de l'écoulement sous l'effet d'un phénomène d'advection et de diffusion est connu comme la dispersion de Taylor.

La dispersion de la bande est directement reliée à la diffusivité des molécules. C'est cette diffusivité qui redistribue donc les molécules selon l'axe transversal du canal, mais aussi selon l'axe longitudinal à terme.

La dispersion peut être caractérisée par deux régimes distincts. Le premier, transitoire, est représenté par les figures 1.18 A et B. Si le temps de migration est plus court que le temps caractéristique de diffusion du soluté $\frac{R^2}{D}$ dans la canalisation, l'équilibre entre advection et diffusion n'est pas atteint et il n'y a pas dispersion de Taylor. Le deuxième régime, représenté dans la figure 1.18 C et D, est le régime en dispersion de Taylor, atteint lorsque le temps de migration est supérieur à ce temps caractéristique diffusion au sein du capillaire.

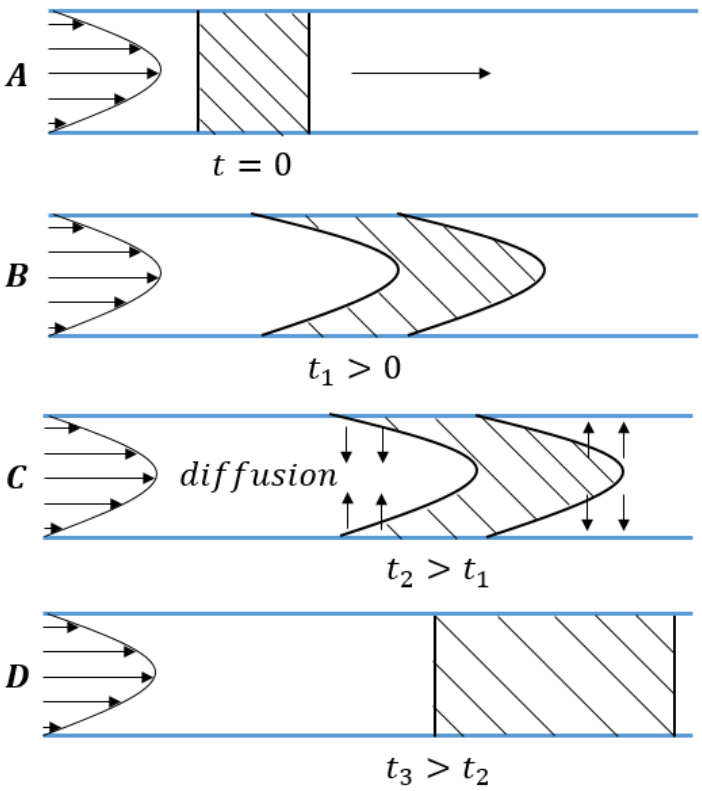


Figure 1.18 Schéma de la dispersion de Taylor. **(A)** Bande dans un capillaire soumis à un écoulement laminaire de Poiseuille. **(B)** Déformation de la bande par le profil parabolique de vitesse, entraînant son advection. **(C)** Effet de la diffusion qui tend à homogénéiser l'asymétrie de la bande. **(D)** Bande après un certain temps de migration tend à être symétrique à nouveau.

Il apparaît, contre intuitivement, que des molécules avec des coefficients de diffusion faibles seront à terme plus dispersés que ceux avec des coefficients de diffusion plus élevés. Cette quantification de la dispersion est dépendante du temps de migration et de la position du soluté dans le système, comme décrit dans l'équation d'advection-diffusion, qui régit ce système :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = k\nabla^2 c \tag{1.22}$$

La constante k est le coefficient de dispersion et est lié, entre autre, au coefficient de diffusion par $k = \frac{R^2 v^2}{48D}$, où v est la vitesse moyenne du fluide.

L'analyse en dispersion de Taylor, étoffée par Aris, présente une bonne description des phénomènes et des grandeurs qui les régissent. k peut être mesuré et permet donc de remonter

à un coefficient de diffusion moyen de molécules ou particules sans contraintes explicites sinon celles évoquées plus haut. En inversant l'équation 1.3 il est même possible de remonter à un rayon hydrodynamique moyen $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$. Cette information donne une idée de la conformation générale des molécules pendant leur migration.

L'analyse en dispersion de Taylor a été surtout exploitée pour rendre compte du coefficient de diffusion de molécules à bas poids moléculaire, comme des polyméthylènes *(Chen, 1985)* et des polystyrènes *(Barooah, 1986)* en solution diluée. Pourtant cette méthode n'est pas tant utilisée *(Ouano, 1972 ; Grushka, 1974)*. L'analyse en dispersion de Taylor en capillaire a permis d'évaluer les coefficients de diffusion d'acides aminés et de protéines *(Bello, 1994)*.

(Mes et al, 1999) reportent dans leur étude une comparaison de l'analyse en dispersion de Taylor avec la mesure du coefficient de diffusion par diverses méthodes, comme en chromatographie hydrodynamique ou en chromatographie par exclusion stérique.

Dans une étude de *(Cottet, 2007)*, ils ont appliqué la TDA (pour *Taylor Dispersion Analysis*) pour déterminer le coefficient de diffusion de macromolécules dendritiques et remonter à leur rayon hydrodynamique. Cette méthode ne nécessite pas de calibration au préalable comme d'autres techniques (DLS et SEC-DLS) et est plus simple à mettre en place. La figure 1.19 permet de comparer les valeurs de rayons hydrodynamiques obtenus entre ces trois méthodes. On y constate clairement des valeurs plus importantes pour les méthodes de DLS et SEC qu'en TDA.

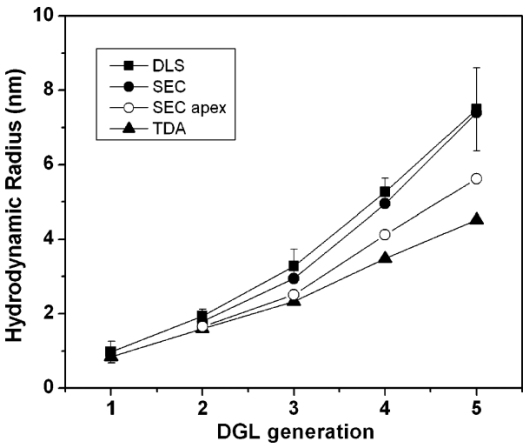


Figure 1.19 Comparaison des rayons hydrodynamiques (nm) obtenus par plusieurs méthodes : DLS, SEC avec triple détection, et TDA. On notera que plus la taille des agrégats est élevée (DGL generation) et plus l'écart se creuse entre les mesures des différentes techniques.

Cette différence montre que cette dernière méthode est moins impactée par les agrégats de polymères présents dans la solution. Plus les molécules occupent de l'espace (DGL generation) et plus ce facteur induit une erreur dans les mesurent via DLS et SEC-DLS.

B. Le champ électrique comme moteur de séparation

Les techniques de séparation qui font intervenir un champ électrique comme moteur de l'advection ont connu un véritable essor en biochimie ou biologie moléculaire. Elles ont été développées pour la séparation de protéines et d'acides nucléiques, sur gel, en discriminant les espèces via leur charge. En raison des différences en les porteurs de charges, les conditions de l'électrophorèse ou du système, les vitesses de migration des espèces vont être différentes.

D'abord mise en place dans des cuves d'électrophorèse en gel de polymère, des derniers présentent plusieurs inconvénients, notamment leur faible débit d'analyse. La technique a été développée et adaptée en capillaire (**CE** pour *Capillary Electrophoresis*) dans une optique de performance. L'utilisation de très petits volumes d'échantillons, l'efficacité et des temps de migration courts sont des avantages qui ont largement contribués à la popularité de la technique. La migration en électrophorèse capillaire est très riche et bien décrite dans la littérature comme en atteste la figure 1.20.

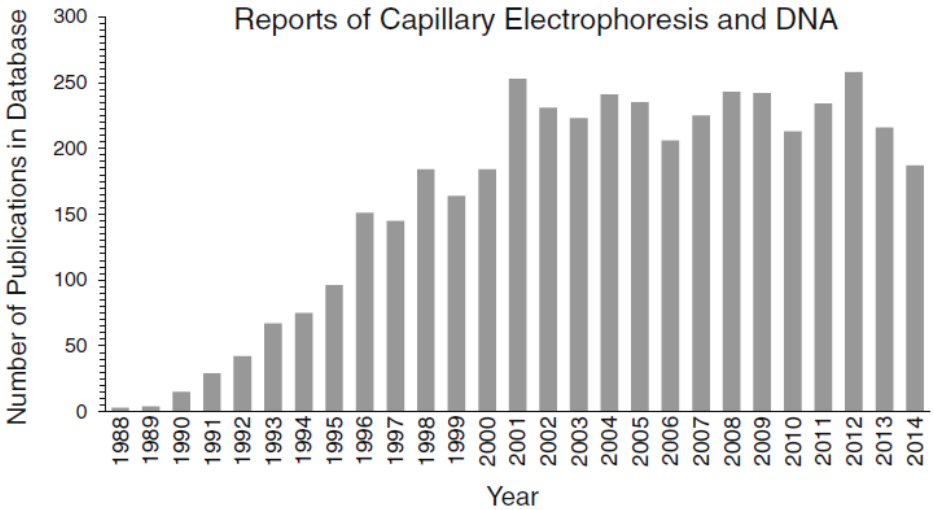


Figure 1.20 Nombre de publications portant sur des séparations en électrophorèse de l'ADN. Extrait de la base de donnée SciFinder, ce graphique montre explicitement l'intérêt grandissant pour les techniques d'électrophorèses capillaires portées sur l'ADN depuis 30 ans.

1. Les principes du transport en électrophorèse

La technique a été introduite dans les années 1960, conçue pour séparer des espèces par rapport à leur charge et leur taille, en fonction de l'équilibre entre force électrique et friction hydrodynamique. Elle a connu un développement important lié à l'idée d'utiliser un capillaire pour conduire la migration, ce qui a permis d'augmenter les surfaces d'échange thermique et donc de diminuer les problèmes d'échauffement par effet Joule.

Le champ responsable de l'advection est ici électrique. L'application d'une tension, via une source de courant haute tension, entre deux électrodes qui sont positionnées à l'entrée et à la sortie du capillaire, initie la migration de toutes les espèces chargées qui sont en solution (Fig. 1.21 A). Contrairement à l'hydrodynamique le profil du champ de vitesse est ici plan (Fig. 1.21 B). Il en résulte que la différence entre les vitesses de migration, qui mène à la séparation, s'effectue en fonction des différentes mobilités électrophorétiques définies dans l'équation 1.12. Il existe plusieurs méthodes de détection en fin de migration : par absorbance UV ou par spectroscopie de fluorescence en incorporant des traceurs fluorescents à l'espèce d'intérêt. Il existe aussi des systèmes d'analyse en ampérométrie ou colorimétrie.

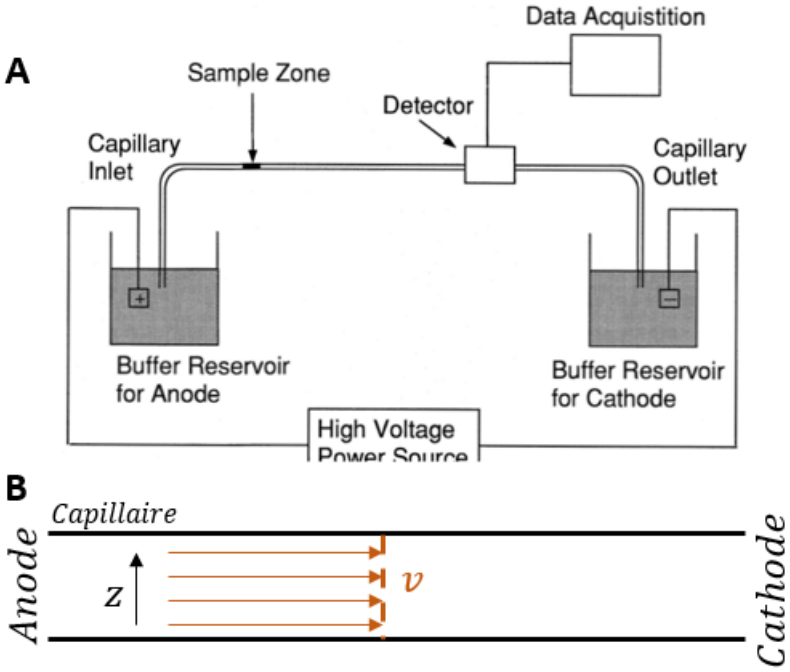


Figure 1.21 Principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire. **(A)** Schéma du montage classique d'une électrophorèse capillaire. Une source de tension alimente des électrodes en solutions de part et d'autre du capillaire. La différence de potentiel induit une migration des charges. **(B)** Dans le capillaire la vitesse dépend alors de la mobilité électrophorétique et de l'intensité du champ d'électrophorèse $v_E = \mu_0 E$. On notera que cette vitesse ne dépend pas de z, la hauteur dans la canalisation, comme c'était le cas hydrodynamique.

2. Le phénomène d'électro-osmose

L'électro-osmose (**EOF**, pour *Electro-Osmotic Flow*) est un phénomène résultant de l'application du champ électrique. Les ions mobiles de la couche de Debye, près de l'interface entre la solution et le mur, sont mis en mouvement par la force de Coulomb. L'EOF c'est le mouvement du fluide qui est entraîné, via les liaisons visqueuses, par le mouvement de ces charges.

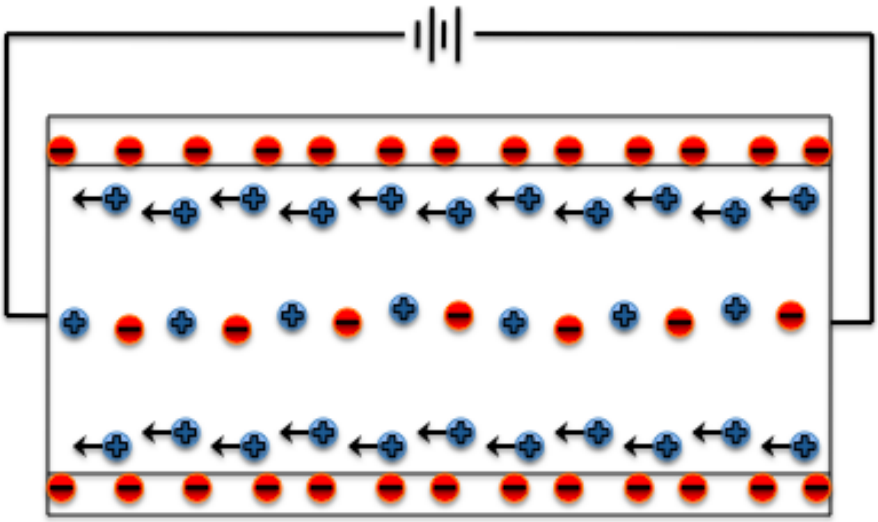


Figure 1.22 Schéma explicatif du flux électro-osmotique. Les ions près des surfaces, mobiles, sont entraînés par le champ électrique, qui à leur tour entraînent le fluide de de par sa viscosité.

Le phénomène d'électro-osmose est décrit dans la littérature à la fois comme un allié et un ennemi et c'est un phénomène clé avec lequel il faut composer en électrophorèse capillaire. L'EOF est très utilisé pour transporter des analytes en chimie analytique *(Skoog 2007)* et dans des systèmes microfluidiques *(Bruus 2007, Kirby 2010)*. Les vitesses en EOF ne dépendent pas de la taille du système, cette technique offre donc un avantage considérable face à l'hydrodynamique où la pression nécessaire pour augmenter la vitesse est étroitement liée à aux dimensions du canal. Ici la tension à appliquer est indépendante de la taille du capillaire. L'effet du flux électro-osmotique peut être réduit, quand il est indésirable, en faisant du *coating* des murs du système, avec des polymères spécifiques par exemple.

Les techniques de séparation reposant exclusivement sur un flux électro-osmotique sont néanmoins très sensibles *(Ross 2001, Ghosal 2003)*. Un autre désavantage inhérent aux

systèmes qui utilisent un champ électrique est que maintenir ce champ provoque une hydrolyse de l'eau aux électrodes. Certains produits de cette réaction, comme le peroxyde d'hydrogène, peuvent poser des problèmes (changement de pH par exemple) pour certains milieux, biologiques notamment. Cette réaction produit aussi des bulles qui peuvent soit bouger complètement des canalisations ou au minimum changer beaucoup les propriétés de transport dans le système *(Rebscher 1994)*. Ces problèmes sont régulièrement soulevés et des solutions proposées, comme un changement de matériaux pour les électrodes. *(Erlandsson, 2011)* proposent quelques pistes de pompes électro-osmotiques sans hydrolyse de l'eau, sans générer de bulles et en ne modifiant pas le pH de la solution.

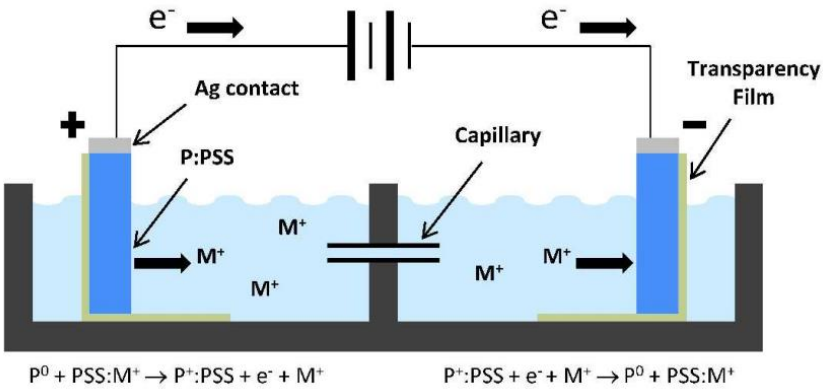


Figure 1.23 Représentation schématique d'une pompe électro-osmotique, présentant les réactions électrochimiques qui s'effectuent aux électrodes entre les poly(3,4-ethylenedioxythiophene) et le poly(styrenesulfonate) ainsi que le transport des électrons/cations qui en résultent. Extrait de *(Erlandsson, 2011)*.

3. La diffusion dans les techniques d'électrophorèse

Alors que l'électrophorèse sur gel ou en capillaire a connu cet élan d'attractivité, le phénomène de dispersion dans ces systèmes n'a pas été autant décrit et étudié que celui de l'advection *(Slater, 1993 ; Stellwagen, 2002 ; Xue, 1994)*. Pretorius en 1974, Slater en 1993 puis Rebscher en 1994 ont établi les bases de la théorie des contributions à l'élargissement d'une bande en électrophorèse.

Il existe une origine moléculaire de l'élargissement des bandes liée à la conformation des molécules dans la direction du champ électrique, qui n'existe pas pour une pelote à l'équilibre thermodynamique *(Slater, 1995&2001)*. Le gradient de tension utilisé en

électrophorèse impose également un gradient de température qui dépend du système et de sa géométrie. Le passage du courant est d'autant augmenté dans le cas où la tension est appliquée en continue, dissipant son énergie dans la solution, menant à l'augmentation de la température. Or la mobilité électrophorétique et le coefficient de diffusion translationnel dépendent de la température. Un gradient de vitesse apparaît ainsi dans le capillaire *(Jorgenson, 1983)*. *(Grushka, 1989)* ont montré dans une étude qu'il était possible de contrer cet effet en ajoutant un champ hydrodynamique pour contrer l'effet de dispersion thermique dans les capillaires. L'utilisation d'un écoulement de Poiseuille pour compenser cet effet (Fig. 1.24) mène à de bons résultats expérimentaux et met en place les bases des techniques utilisant plusieurs champs de force *(Hertén, 1967 ; Gobie, 1990)*.

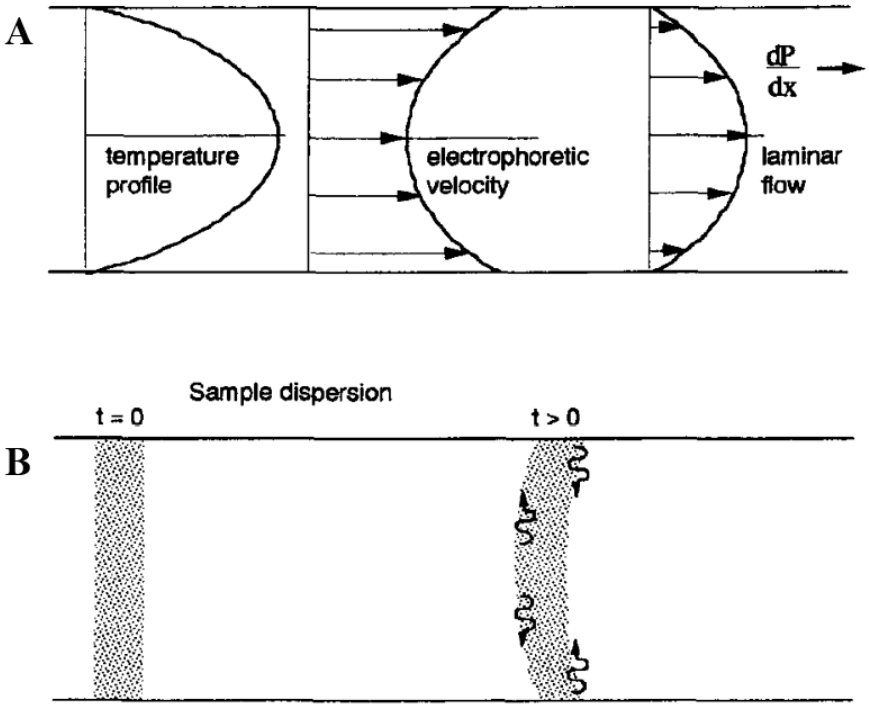


Figure 1.24 Présentation de la dispersion de Taylor pour contrer l'effet de la température dans un capillaire. **(A)** L'opposition d'un flux laminaire à l'électrophorèse induit et compense la distorsion du profile. **(B)** Au temps $t = 0$ la bande n'a pas encore été dispersée. Après un certain temps de migration $t > 0$ de migration par électrophorèse plus un flux laminaire de Poiseuille, on mesure la dispersion du profile. Extrait de *(Grushka, 1989)*.

Ces études se sont basées sur le modèle du cylindre électriquement chauffé *(Bird, 1960)*, alors bien établi et l'ont adapté aux outils spécifiques de l'électrophorèse *(Coxon, 1974 ; Hinkley, 1975)*, et notamment le capillaire *(Grushka, 1989)*.

La géométrie du système en tant qu'origine d'une contribution de la dispersion de la bande est une donnée qui a été bien identifiée. *(Xue et al., 1994)* ont montré les effets des déformations ou de géométries non-uniformes sur l'élargissement des bandes. La géométrie est inhérente au système et sert généralement un objectif propre à l'étude, il peut être alors difficile de réduire cette contribution. Mais elle peut être réduite en combinant par exemple les influences d'autres géométries. *(Paegel, 2000)* combinent dans une étude, des suites de virages pour atteindre de meilleures performances de séparation (Fig. 1.25). Alors que des virages dans des capillaires n'a que peu d'impact en soi, si ces virages sont incorporés pour étendre la longueur de la canalisation, la qualité de résolution pourrait être compromise.

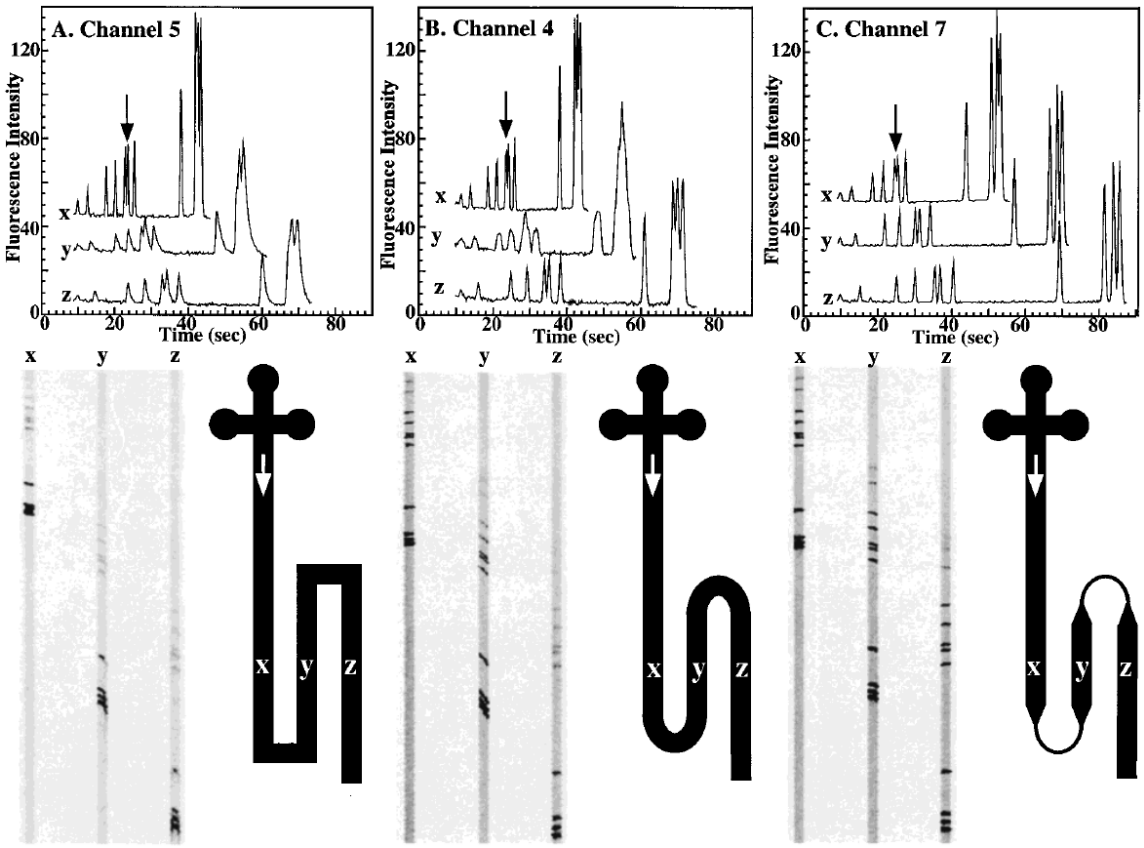


Figure 1.25 Profils d'électrophorèse aux trois points de détection x, y et z pour différentes formes et agencements de géométries. Trois exemples de design de canal sont présentés, en-dessous de leur profil de séparation. **(A)** Suite de virages rectangulaires. **(B)** Suite de virages en U. **(C)** Un design présentant des virages effilés. Les fragments (digestion d'une gamme d'ADN ϕX174 *Hae*III) sont de longueur 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 paires de bases. Les pics 271 et de 281 bp sont indiqués par des flèches. Extrait de *(Paegel, 2000).*

C. Transport en régime mixte

Nous noterons dans un premier temps qu'une technique de transport dite en régime mixte fait intervenir plusieurs champs responsables de l'advection. Il existe de nombreuses technologies qui tire parti des deux types de champs que nous avons abordés jusque-là, à savoir un champ hydrodynamique et un champ électrophorétique. Au début des années 2000 *(Zheng, 2002&2003)* ont introduit un champ électrophorétique en plus d'un champ hydrodynamique pour effectuer la séparation de fragments d'ADN dans des capillaires, en l'absence de matrice solide. Contrairement aux séparations de fragments d'ADN effectuées en chromatographie hydrodynamique *(Wang, 2012)* la combinaison des deux champs amène de multiples avantages. La technique est moins sensible au colmatage, elle est plus rapide et nécessite moins de pression dû à des diamètres de capillaire plus important. La composition de ces deux forces, hydrodynamique et électrophorétique induit un nouveau type d'écoulement, l'écoulement transverse. Il existe néanmoins d'autres techniques qui tirent parti de plusieurs champs d'actionnement.

1. *Fractionnement par couplage de force*

À l'origine le fractionnement par couplage de force (**FFF**, pour *Field Flow-Fractionation*) est une technique qui a été décrite par J. Calvin Giddings en 1966 et les phénomènes physiques mis en jeu sont similaires à la chromatographie hydrodynamique. En effet la technique consiste en un champ laminaire de Poiseuille et un autre champ, externe, perpendiculaire à l'écoulement *(Williams, 1992&1994)*, dont la combinaison est responsable de l'advection des molécules (Fig. 1.26).

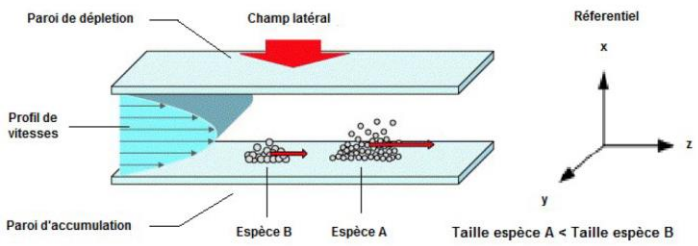


Figure 1.26 **Schéma du principe de séparation par la méthode de Fractionnement par couplage Flux-Force.** Le champ laminaire de Poiseuille amène les espèces A et B dans la zone de séparation. Là, l'application d'un champ secondaire, perpendiculaire à l'axe de migration, discrimine une espèce par rapport à l'autre, en les plaquant plus ou moins contre la paroi d'accumulation. Extrait de *(Williams, 1992).*

Le champ hydrodynamique est noté comme porteur car il amène les molécules dans le système, généralement un canal de faible épaisseur. Le champ externe, quant à lui, qui peut être d'origines diverses (électrique, thermique, centrifuge, …), plaque les molécules lors de leur migration près d'une paroi, dite d'accumulation. C'est en fonction de l'interaction des analytes avec ce champ que l'on pourra déterminer une force et un temps de rétention *(Messaud, 2009)*. L'ajout de cette fonction de rétention au système d'advection hydrodynamique permet à la FFF d'avoir de très bonnes performances. Les paramètres d'actionnement, modulables, amènent une large gamme de tailles d'espèces pouvant être séparées, allant de la macromolécule *(Moon, 2004)* à la particule *(Contado, 2007)*. Plusieurs séparation d'ADN et ssDNA ont été reportés utilisant cette technique, offrant de bonnes performances *(Wahlund, 1989 ; Chen, 2005)*.

En raison de l'interaction entre les molécules et le champ externe, il est possible de déterminer une force de plaquage exercée par ce dernier. La diffusion des molécules, naturelle ou par mouvement brownien, entre en compétition avec ces deux phénomènes de transport.

2. Double actionnement longitudinal et force transverse à l'écoulement

En FFF le champ de force externe est transverse à l'écoulement. Il est possible d'obtenir cet effet en utilisant un actionnement électro-hydrodynamique longitudinal en profitant des propriétés de déformation et d'orientation des molécules d'ADN. *(Zheng, 2002&2003)* ont en particulier démontré que l'action conjointe ou en opposition de ces deux champs entraînait la migration vers le centre ou vers les parois du capillaire, respectivement. Cette force transverse apparaît aussi bien en solution élastique qu'en solution viscoélastique.

a. Fluides Newtoniens

La technique décrite par Yeung et Zheng, qui a permis la séparation de l'ADN λ (48.5 kbp) et de l'ADN ΦX174 (5.3 kbp), est réalisée en capillaire de 75 µm de diamètre, sur 42 cm de long.

Lorsque les champs électro-hydrodynamiques sont appliqués conjointement dans la même direction, les molécules migrent vers le centre de la canalisation. Si les deux champs sont appliqués en opposition, les molécules migrent vers les parois du capillaire. Ils ont alors remarqué que la vitesse de migration transverse d'une molécule dépend, entre autre, de sa taille.

Néanmoins cette dernière donnée n'entre en ligne de compte qu'en régime transitoire, une fois l'écoulement en régime permanent atteint, elle n'influe plus sur la hauteur dans le canal et donc plus aucune différenciation n'est possible. Un schéma de séparation avec flux hydrodynamique non continue a alors été introduit (Fig. 1.27).

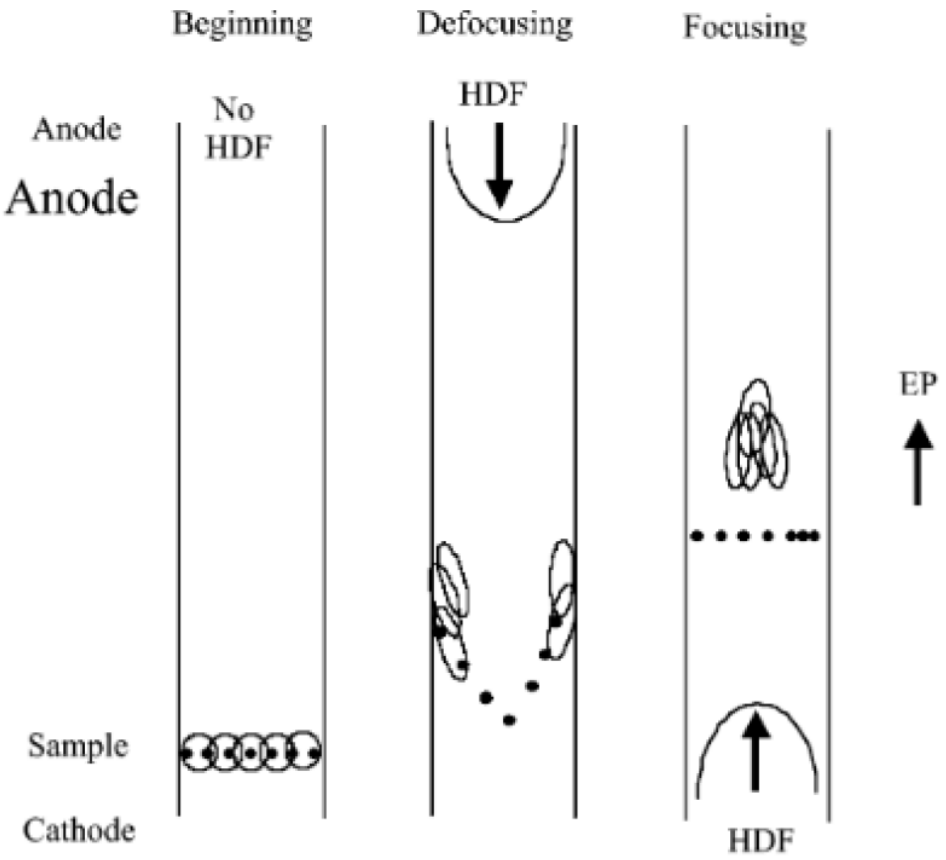


Figure 1.27 **Deux schémas de migrations en fluide Newtonien avec (à gauche) l'état initial.** Ces séparations font intervenir un champ hydrodynamique et un champ électrophorétique **(au milieu)** en opposition, les particules sont éloignées du centre la canalisation en fonction de leurs tailles. À l'inverse **(à droite)** les champs sont dans le même sens, les particules sont focalisées vers le centre de la canalisation, toujours selon leur taille. Tiré de (*Yeung et Zheng, 2003*).

- Il y a premièrement application d'un champ hydrodynamique en opposition avec le champ électrique pour faire migrer rapidement les molécules avec une taille plus importante vers les parois (Fig. 1.27, B, cercles vides). C'est la première étape de séparation.
- Deuxièmement le champ hydrodynamique est inversé, donc dans le même sens que la force électrophorétique, les grandes molécules sont accélérées rapidement et focalisées au centre du canal. C'est la deuxième étape de séparation.

Les deux tailles d'ADN, λ (48.5 kbp) et ΦX174 (5.3 kbp), ont été séparées ainsi en 20 minutes. Mais la technique décrite ainsi était relativement laborieuse à mettre en place. Nous noterons qu'avec les avancées en instrumentation et en automatisation des systèmes et des tâches c'est un procédé qui serait maintenant beaucoup plus facile à explorer.

Enfin, il convient de noter que les murs intérieurs des capillaires utilisés lors des séparations sont préalablement *recouverts* par adsorption d'un polymère polyacrylamide. C'est un procédé très courant pour atténuer le phénomène d'électro-osmose en électrophorèse capillaire. Or ces polymères ont des propriétés viscoélastiques et la question d'une trace résiduelle de ces effets dans la solution n'a jamais été clairement traitée.

b. ***Fluides non Newtoniens***

Le phénomène de migration transverse au transport dans un fluide non Newtonien, donc viscoélastique, est plutôt bien décrit. La première expression de cette force a été introduit dans une étude menée par *(Leshansky, 2007)*.

$$F_e \sim a^3 \left(\frac{\partial N_1}{\partial z}\right) \tag{1.23}$$

Cette force transverse est d'origine élastique ; en effet le phénomène de migration transverse n'a pas été observé dans une solution purement visqueuse comme du glycérol. Elle dépend explicitement de a la taille de la molécule et de $N_1 = 2\eta\tau\dot{\gamma}^2$, la différence de contraintes normales pour un fluide de Maxwell *(Chami, 2018)*. On y voit apparaître, notamment, les propriétés rhéologiques du fluide comme η sa viscosité et τ le temps de relaxation de la matrice. $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement du fluide lorsqu'il subit une contrainte. *(Leshansky, 2007)* ont mené l'étude sur la focalisation de billes de 8 µm dans une canalisation de 20 µm de diamètre. Dans la continuité de l'étude du phénomène de migration avec des billes, l'étude *(Seo, 2014)* a étendu la gamme de taille de bille ainsi que la gamme de débit de l'écoulement dans le capillaire (Fig. 1.28).

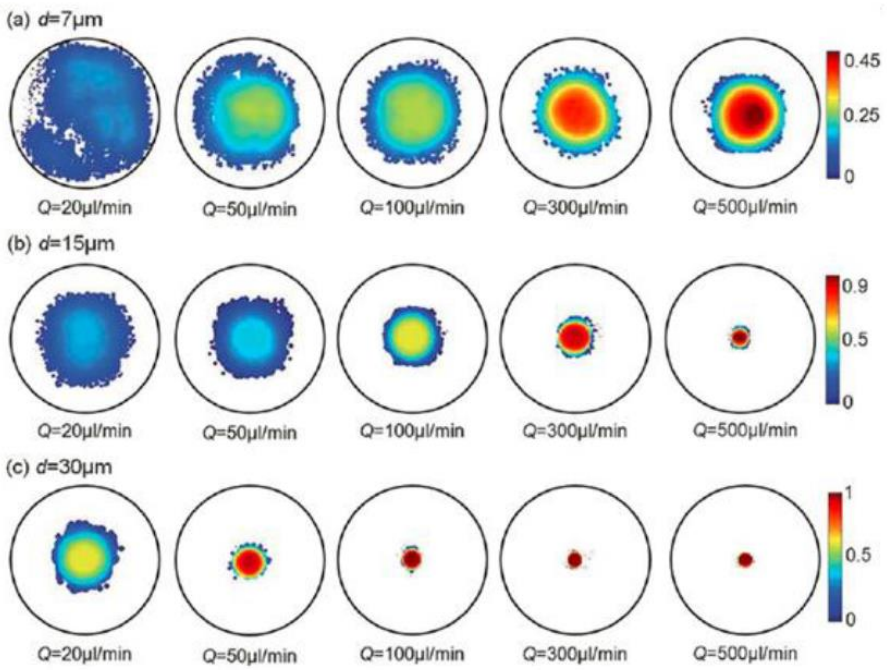


Figure 1.28 Variation de la concentration et de la distribution de particules dans une canalisation en fonction de la taille de cette dernière et de la vitesse d'écoulement. L'étude met en jeu 3 tailles de particules, **(a)** d = 7 µm **(b)** d = 15 µm et **(c)** d = 30 µm, dans une canalisation de diamètre D = 300 µm, dans une solution viscoélastique de 8% PVP 360 kDa, pour différentes vitesses d'écoulement. On peut remarquer une augmentation de l'effet de focalisation soit lorsque le débit augmente soit lorsque la taille des particules augmente. Tiré de *(Seo, 2014).*

IV. Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre nous avons introduit les bases des phénomènes de transport. Cette étape est essentielle pour la compréhension des tenants et des aboutissants de l'optimisation de la technologie µLAS. µLAS sera présenté dans le chapitre 2 comme une technique de séparation mixte faisant intervenir un champ hydrodynamique et un champ électrique. Nous avons vu ici qu'un champ hydrodynamique permet des séparations rapides mais est un processus très dispersif. Les techniques d'électrophorèse capillaire ou sur puce sont très répandues et sont très bien définies, elles permettent des séparations d'une grande gamme de molécules d'intérêt avec de bonnes performances. Enfin nous avons vu que les technologies qui mettent en place un déplacement transverse à l'écoulement, que ce soit par fractionnement de couplage flux-force ou en tirant partie de la force élastique transverse, sont intéressante car elles ont le potentiel d'offrir un contrôle fin de la position de la molécule dans le système. Les processus physiques doivent être mieux définis pour permettre une exploitation optimale de ces technologies.

Chapitre 2

Présentation de la technologie µLAS

I. Présentation générale de µLAS

La technologie µLAS (pour micro-Laboratoire pour l'Analyse et la Séparation) est une technique microfluidique qui intègre plusieurs fonctions en un dispositif miniaturisé. La technologie peut être rangée dans la catégorie des laboratoires sur puce, dérivant eux-mêmes des systèmes microélectromécaniques (MEMS, pour *MicroElectroMechanical Systems*, *Grayson, 2004 ; Nguyen, 2002*).

A. Les laboratoires sur puces

Le premier pas vers ces systèmes miniaturisés a été amorcé par l'intégration de semi-conducteurs au sein de puces électroniques via des techniques de microfabrication [~ 1954] (photolithographie, gravure chimique …). Les procédés de fabrication comme la lithographie sont d'abord appliqués pour la production de détecteurs de pression *(Barker, 1966)*. Les outils nécessaires à la microfluidique commencent à émerger : les canaux, capillaires et autres valves, ce qui conduit à ce qui est considéré comme la première itération d'analyse par chromatographie en gaz sur puce *(Terry, 1979 ; Angell, 1983)*. Une dizaine d'années plus tard le développement de la microfluidique prend un tournant nouveau avec le développement des outils, micro-pompes et systèmes de mesure des écoulements, permettant l'analyse des fluides et la fabrication de senseurs chimiques *(Manz, 1990)*.

Ces nombreux systèmes émergeant sont alors réunis sous la notion de systèmes pour l'analyse chimique totale (**microTAS**, pour *miniaturized Total chemical Analysis Systems*). Les concepts des microTAS se sont étendus à l'intégration complète des séquences des procédés utilisés en laboratoires, incluant à présent des étapes de lavage ou de prétraitement des échantillons en plus des étapes plus classiques de séparation ou d'analyse.

Les laboratoires sur puces (**LOC**, pour *Lab-On-Chip*), des systèmes plus spécialisés n'incorporant pas toutes les étapes d'analyses de la séquence complète, sont développés pour étudier les objets d'intérêt en chimie analytique et biologie moléculaire (Fig. 2.1) : ADN, protéines, cellules, sucres… Les LOCs présentent de nombreux avantages, ils peuvent manipuler de très petits volumes d'échantillon ($\sim pL$), ils sont compacts ($< cm^2$) et donc propices à la parallélisation des chaînes d'analyse, ils proposent un bon contrôle des processus

grâces aux temps d'analyse rapides et ils sont versatiles dans le développement et l'intégration de nouvelles fonctions.

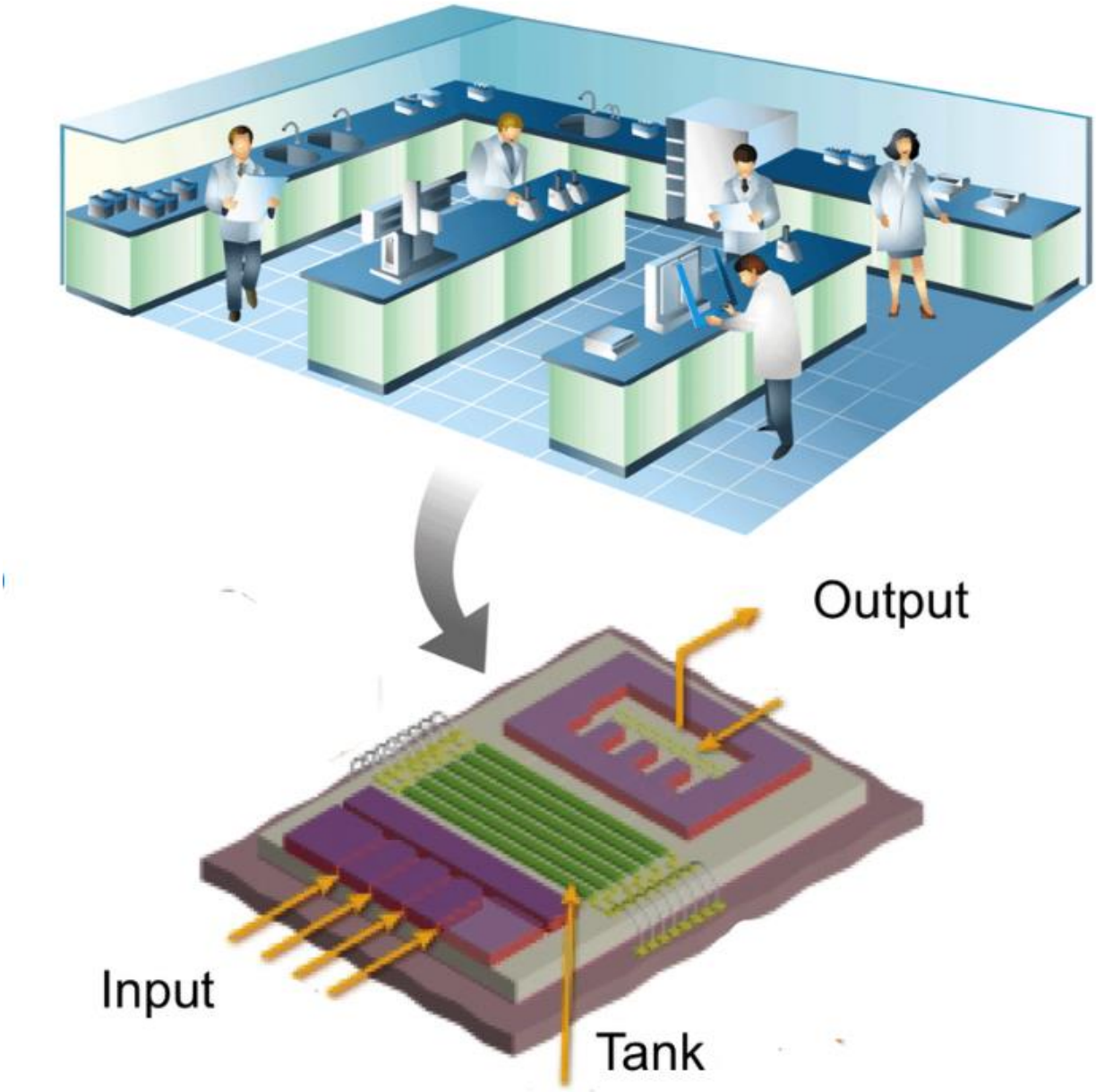


Figure 2.1 Représentation schématique du concept de laboratoire sur puce. Les procédés couramment mis en place sur paillasse de laboratoire sont intégrés « *en ligne* » sur une puce de micro-électronique et/ou de microfluidique.

B. La technologie µLAS

µLAS est donc une technologie intégrant plusieurs fonctions d'analyse au sein d'un dispositif microfluidique. Elle permet la séparation de l'ADN sans matrice solide par le principe de migration viscoélastique transverse. C'est la composition d'un écoulement hydrodynamique et d'une électrophorèse en opposition qui induit une séparation de type µLAS. Cette technique est appliquée en format puce microfluidique mais aussi au format capillaire à Adelis. La séparation et la concentration simultanées d'espèces sont les deux fonctions principales dont est capable µLAS. La figure 2.2 présente une puce microfluidique associée à son support. Le dispositif est encapsulé dans ce support, scellé via un système de serrage à vis. De manière à éviter toute fuite, des anneaux en caoutchouc sont rajoutés entre le support et la puce. Les réservoirs servent à l'injection de l'échantillon et de branchement pour le système de gestion de la pression. Les électrodes traversent les réservoirs pour appliquer la tension et donc le champ électrique dans la solution.

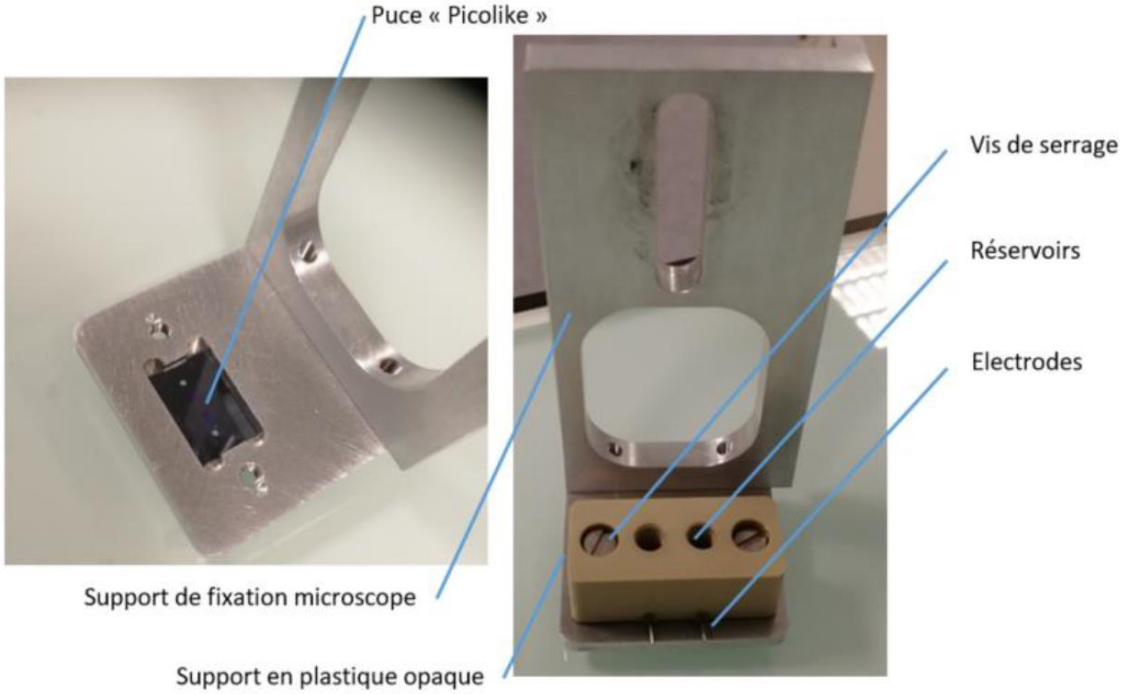


Figure 2.2 Schéma du système tout-intégré µLAS et puce microfluidique. Support en deux parties, une partie en aluminium, réceptionnant la puce et une partie en plastique pour sceller le système, avec des réservoirs et des injecteurs. La puce est fabriquée en silicium et en verre

Une gamme de sous-systèmes (géométries de puces, matériaux de puces, porte-puce) a été conçue puis intégrée au sein de la technologie µLAS au fil du temps pour enrichir son panel d'activités et développer de nouvelles fonctions et applications.

II. Mécanismes de transports dans µLAS

A. La force élastique transverse

1. Caractéristique de la solution

La plupart des techniques décrites dans le chapitre 1 comme les chromatographies emploient, au moins historiquement, des matrices solides, la phase stable et immobile dans les colonnes de séparations. Et comme abordé dans la partie I.C.3 *(p. 25)* du Chapitre 1, de plus en plus de technologies mettent en place des matrices de polymères visqueux ou viscoélastiques, qui remplissent à la fois les rôles de phase mobile et de phase stationnaire. La technologie µLAS repose sur l'utilisation de ces polymères et notamment sur leurs propriétés viscoélastiques pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur gamme de taille (< 1 kbp) pour induire une migration transverse de ces molécules. Il faut noter que pour les séparations des ADN de plus grande taille, la migration transverse existe aussi dans les fluides visqueux *(Usta et al., 2007 ; Milon, 2019)* du fait de l'anisotropie des molécules d'ADN, qui sont déformées par l'écoulement de cisaillement avec une configuration étirée, ce qui se traduit par une force électrophorétique anisotrope le long de la molécule *vs.* perpendiculairement à elle et au total une force électrophorétique légèrement orientée vers la paroi.

Ces solutions de polymère sont obtenues par dissolution d'une poudre dans une solution tampon, et ce, jusqu'à ce qu'une concentration seuil c^* (Équ. 2.1) soit atteinte. Cette concentration caractéristique, aussi appelée concentration critique de recouvrement, marque le passage entre un régime dilué de la solution de polymère (les molécules sont éloignées les unes des autres et n'interagissent pas) au régime semi-dilué. Dans ce régime les fragments de polymères ne sont plus dans une conformation pelote. Le réseau ainsi formé voit ses nœuds

éloignés d'une longueur caractéristique ξ qui correspond rayon de giration R_g du polymère dans une certaine limite (Fig. 2.3).

$$c^* = \frac{3M_W}{4\pi R_g^3 N_A} \tag{2.1}$$

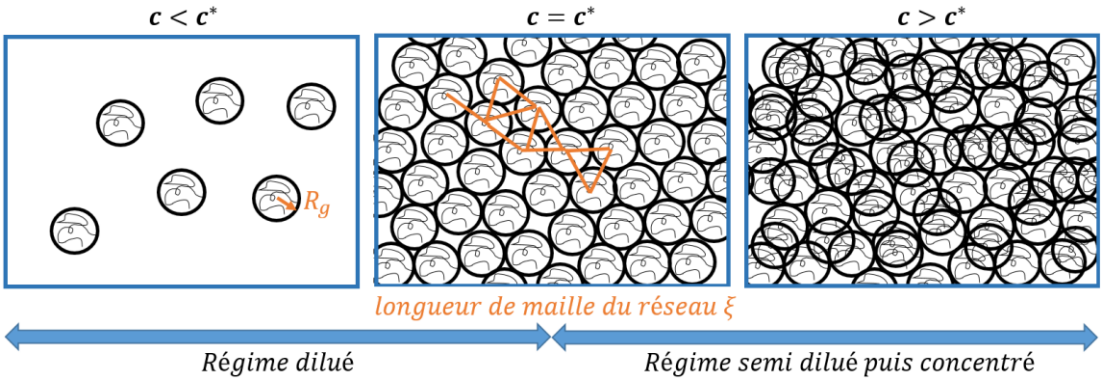


Figure 2.3 Schéma de l'effet de l'augmentation de la concentration sur les chaînes de polymères en solution. c^* est la concentration critique de recouvrement, R_g est le rayon de giration et $\xi = R_g$ quand la solution est la concentration de recouvrement.

Avec M_W la masse molaire du polymère et N_A le nombre d'Avogadro. En continuant d'augmenter la concentration en polymère, ξ diminue et il y a enchevêtrement des fragments. Le régime enchevêtré est le régime qui nous intéresse tout particulièrement ici. Toute dynamique de déplacement des chaînes de polymère aux temps longs est alors décrite par un modèle de reptation *(De Gennes, 1979 ; Heller, 1994)*.

La longueur de Kuhn d'une chaîne d'ADN représente 100 nm, ce qui est beaucoup plus long que la longueur de recouvrement pour des polymères synthétiques neutres, de l'ordre de quelques nm. Le milieu enchevêtré peut alors être considéré comme un milieu continu aux propriétés viscoélastiques. Dans ce milieu, on peut utiliser le modèle de Rouse pour approximer la dynamique des chaînes d'ADN entre elles (car les interactions hydrodynamiques sont écrantées par l'ensemble des chaînes de polymère du milieu viscoélastiques), comme ceci a été introduit dans le Chapitre 1 I.C.1 *(p. 23)*. Dans ce modèle les séquences d'ADN sont assimilées à des billes connectées entre elles par des ressorts harmoniques et la réponse globale de la chaîne est la somme de chaque sous-unité, au sens de chaque segment de Kuhn. Pour la suite, nous nous placerons dans le cadre de ce régime enchevêtré.

2. Origine de la force élastique transverse

Le phénomène de migration transverse dans les fluides viscoélastiques est relativement bien décrit, mais dans notre cas nécessite d'introduire quelques grandeurs pour être bien appréhendé. Dans cette partie, nous allons dépeindre l'ensemble des principaux paramètres lors de la séparation avec µLAS. Nous commencerons par la description générale des contraintes imposées par le flux hydrodynamique, puis nous complexifierons en rajoutant au système le champ électrique.

Le système est composé d'un canal de hauteur H, la molécule d'intérêt est assimilée à une particule sphérique de rayon a qui se déplace dans une matrice de polymères enchevêtrés. Dans la partie précédente, nous avons justement introduit les propriétés mécaniques inhérentes au milieu de migration, un fluide caractérisé par sa viscosité η et son module élastique E. Mais nous voulons aussi connaître l'ensemble des forces, et notamment la force transverse, qui s'appliquent sur la particule pour pouvoir décrire complétement son déplacement. Et pour cela il est nécessaire d'introduire les notions de contrainte, et de déformation, que nous noterons respectivement σ et γ.

Tous les fluides qui s'écoulent près d'une paroi subissent un taux de cisaillement près de cette barrière solide. La définition de la condition de non-glissement *(Doi et al., 1988)* impose une vitesse nulle du fluide à cette surface fixe, alors qu'à une certaine hauteur (relative à la paroi) la vitesse doit être celle de l'écoulement. Cette zone, appelée couche limite, décrit donc l'interface entre les parois des canalisations et le fluide. Ce gradient de vitesse dans la couche limite dépend de la viscosité du fluide. En effet la viscosité induit un frottement entre les différentes couches du fluide dans cette zone, les couches les plus lentes tendant à freiner les plus rapide et inversement.

Ce phénomène est décrit par le taux de cisaillement dans le fluide $\dot{\gamma} = \frac{v_{max}}{h}$ qui dépend de la vitesse maximum de l'écoulement v_{max} et de la hauteur h de la couche limite, ou de la zone cisaillée. Les fluides newtoniens dans un champ laminaire subissent une contrainte de cisaillement, donc tangentielle à l'écoulement, qui dépend du gradient de vitesse et de la viscosité $\sigma_c(z) = \eta \frac{\partial v_x(z)}{\partial z}$, pour un écoulement se faisant selon la direction x. Pour un fluide newtonien cette viscosité η est constante, mais dans le cas des fluides non-newtonien nous l'appellerons viscosité dynamique car elle est susceptible de dépendre de la vitesse du fluide $\eta(v)$.

Vouloir écrire une expression de la force transverse qui s'applique sur la particule sphérique c'est revenir à écrire la différence de forces qui s'exercent sur les parties haute et basse de la particule. Ces forces sont normales à la surface de la particule et donc tangentielles à l'écoulement.

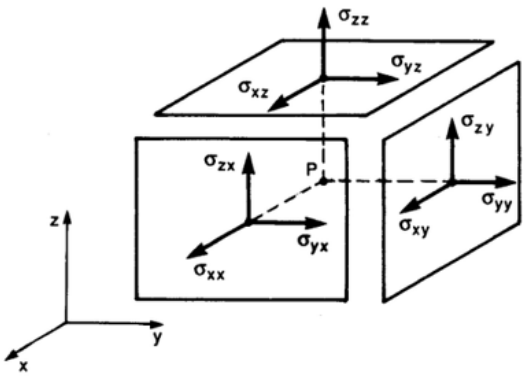
B. La force transverse élastique dans µLAS

Cette partie a pour objectif d'aborder le concept de force élastique transverse appliquée au cas d'une séparation via µLAS. La modélisation de ce phénomène physique n'ayant pas fait l'objet de cette thèse, cette partie n'a pour vocation que de permettre au lecteur d'appréhender cette force, son origine et son influence au sein du système µLAS. Pour plus de détails sur cette force et µLAS, il est vivement recommandé de s'intéresser à la thèse de Bayan Chami *(Chami, 2019)*.

Nous aborderons d'abord le système sous le point de vue d'une particule dans un fluide viscoélastique, transportée par un écoulement laminaire de Poiseuille dans une canalisation. Puis nous ajouterons l'action du champ électrique en opposition dans un second temps.

1. *Le cas d'un écoulement de Poiseuille*

L'état de contrainte d'un système est décrit par le tenseur des contraintes, qui se présente sous la forme d'une matrice 3x3 lorsque le système est décrit en 3 dimensions $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ (Fig. 2.4).



$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{yx} & \sigma_{zx} \\ \sigma_{xy} & \sigma_{yy} & \sigma_{zy} \\ \sigma_{xz} & \sigma_{yz} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}$$

Figure 2.4 Composantes du tenseur des contraintes σ. **(à gauche)** La représentation spatiale des directions des composantes des contraintes. **(à droite)** La correspondance dans la matrice du tenseur des contraintes.

Dans le cas d'un fluide viscoélastique on peut faire l'approximation du modèle de Maxwell pour représenter le fluide comme la combinaison d'un amortisseur (composante visqueuse, de viscosité η) et d'un ressort (composante élastique, avec module élastique E). La contrainte principale σ_t et la déformation totale γ_t associée sont reliées aux contraintes et déformations de l'amortisseur (a) et du ressort (r) par : $\sigma_t = \sigma_a = \sigma_r$ et $\gamma_t = \gamma_a + \gamma_r$.

La contrainte liée à l'amortisseur est associée à la dérivée de la déformation (cisaillement $\dot{\gamma}_a$) : $\sigma_a = \eta\dot{\gamma}_a$, alors que la contrainte élastique est reliée à la déformation (élongation γ_r) par la loi de Hook : $\sigma_r = E\gamma_r$. On peut relier alors la déformation totale (taux de cisaillement total du fluide $\dot{\gamma}_t$) à la contrainte totale σ subie par le fluide via l'équation de Maxwell : $\eta\dot{\gamma}_t = \sigma + \tau\dot{\sigma}$, avec $\tau = \frac{\eta}{E}$ le temps de relaxation du fluide.

Dans un écoulement de Poiseuille, la contrainte est orientée selon $\vec{x}$ (Fig. 2.5). En utilisant le formalisme illustré dans la figure 2.4, on peut écrire la contrainte de cisaillement normale à l'écoulement $\sigma_{zz} = -2\eta\tau\dot{\gamma}^2$, et les autres composantes principales σ_{xx} et σ_{yy} sont nulles. L'état des contraintes est dit uniaxiale. La différence de contrainte pour un fluide de Maxwell s'écrit alors :

$$N_1 = \sigma_{xx} - \sigma_{zz} = 2\eta\tau\dot{\gamma}^2 \tag{2.2}$$

N_1 représente dans ce cas l'excès de pression dans la direction tangentielle à l'écoulement.

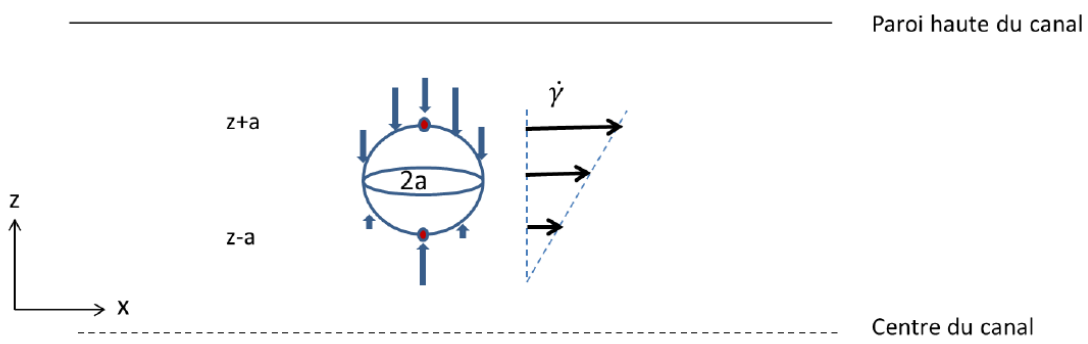


Figure 2.5 Schéma d'une particule sphérique de rayon a dans un canal et un fluide viscoélastique. Par application d'un écoulement de Poiseuille, le gradient de vitesse induit un cisaillement dont découle la différence de pression entre le dessus et le dessous de la particule.

La différence entre ces pressions éprouvées par la particule au-dessus et au-dessous, permet d'exprimer la force transverse dans le fluide viscoélastique soumis au champ laminaire de Poiseuille.

$$F_T \sim 2\pi\eta\tau a^3 \frac{\partial \dot{\gamma}(z)^2}{\partial z} \tag{2.3}$$

Nous pouvons noter que cette force transverse dépend de la taille de la particule et du taux de cisaillement dans le fluide *(Lee et al., 2010)*. En analysant simplement cette expression on peut en déduire quelques phénomènes simples. La force pousse la bille vers les cisaillements les plus faibles, donc vers le centre du canal. Donc en écoulement de Poiseuille simple, on retrouve bien cet effet de focalisation des particules au centre du canal.

2. Ajout de la force d'électrophorèse en opposition

Nous avons donc pu constater dans la partie précédente l'effet de la focalisation du champ hydrodynamique sur une particule sphérique dans une solution viscoélastique. La séparation par µLAS repose également sur un champ électrique, appliqué en opposition au flux hydrodynamique, système présenté schématiquement en figure 2.6.

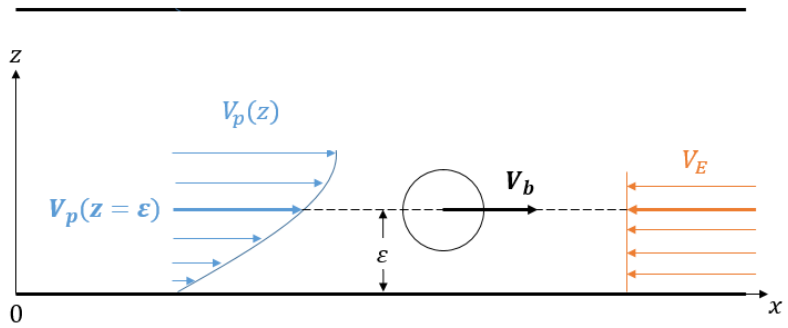


Figure 2.6 Particule sphérique de rayon a soumise à un flux hydrodynamique et un champ électrophorétique, près d'une paroi du canal.

Pour estimer la force transverse dans ces conditions il faut estimer les variations de vitesses au-dessus et au-dessous de la particule, induites par l'ajout de la force électrophorétique. Ces variations, une fois intégrées à l'expression de la force donnée en 2.3, et l'expression du champ de Poiseuille, présentée au Chapitre 1 III.A.1 *(p. 35)*, ce qui a été décrit et modélisé par *(Chami et al., 2018)*, nous donne l'expression suivante :

$$F_T^{el}(\varepsilon) = -32\pi K\eta\tau\frac{a}{h}v_{max}v_E(1-\frac{2\varepsilon}{h}) \tag{2.4}$$

Avec K une constante de Maxwell, η la viscosité, τ le temps de relaxation du fluide, a le rayon de la particule, h le diamètre ou hauteur de la canalisation, v_{max} la vitesse maximale de l'écoulement, v_E la vitesse électrophorétique et ε la position de la molécule dans la canalisation. Cette force a une orientation opposée au cas sans champ électrique, elle a donc tendance à ramener les particules vers les parois de la canalisation. Très près du mur, il a été proposé que la force décroit linéairement jusqu'à 0 au mur, avec une réponse analogue à un ressort élastique de constant k :

$$F_{T_{wall}}^{el}(\varepsilon) \simeq -32\pi K'\eta\tau\frac{a}{h}v_{max}v_E\frac{\varepsilon}{h} \equiv -k\varepsilon \tag{2.5}$$

avec $K' = kh/l$ une constante adimensionnelle et l une distance pour décrire la portée de la force. Cette hypothèse est valable pour une distance $\varepsilon \gtrsim 3a$ en raison de l'estimation du taux de cisaillement fait de part et d'autre de la sphère.

Notons que cette force dépend des paramètres intrinsèques de la solution comme la viscosité et l'élasticité, et géométriques du système tels que la hauteur du canal (le diamètre pour un capillaire). Les paramètres d'actionnement interviennent évidemment mais il est surtout intéressant de noter que l'intensité de cette force dépend linéairement de la taille de l'objet. Il apparaît alors une hauteur ε de focalisation pour une taille a et une hauteur de canal h donnée (et pour les même paramètres d'actionnement bien-sûr). Or le champ hydrodynamique est dépendant en z donc chaque taille a a une vitesse différente. C'est donc la position radiale des molécules dans le canal, induite par la force transverse élastique, qui permet leur séparation dans l'écoulement hydrodynamique. La notion de position moyenne $\langle z\rangle$ devient alors importante pour évaluer l'impact des paramètres de séparation :

$$\langle z\rangle = \sqrt{\frac{2k_BT}{\pi k}} \tag{2.6}$$

L'écart quadratique à cette moyenne peut être évaluée par $\langle\delta z^2\rangle = \langle z^2\rangle - \langle z\rangle^2 = \langle z\rangle^2(\pi/2-1)$.

Donc lors d'une séparation µLAS les différentes tailles de fragments d'ADN sont introduites dans le canal et soumises d'abord au champ hydrodynamique, elles sont focalisées au centre (Fig. 2.7 A), correspondant au phénomène décrit en partie II.B.2 *(page précédente)*. Puis un champ électrique est ajouté, contraire à l'écoulement hydrodynamique, la force transverse change alors de sens, faisant migrer les molécules vers les parois du canal. En fonction de leurs tailles, les molécules sont plus ou moins ralenties en raison de la compétition entre vitesse hydrodynamique dans un sens, vitesse électrophorétique dans l'autre et hauteur dans le canal (Fig. 2.7 B).

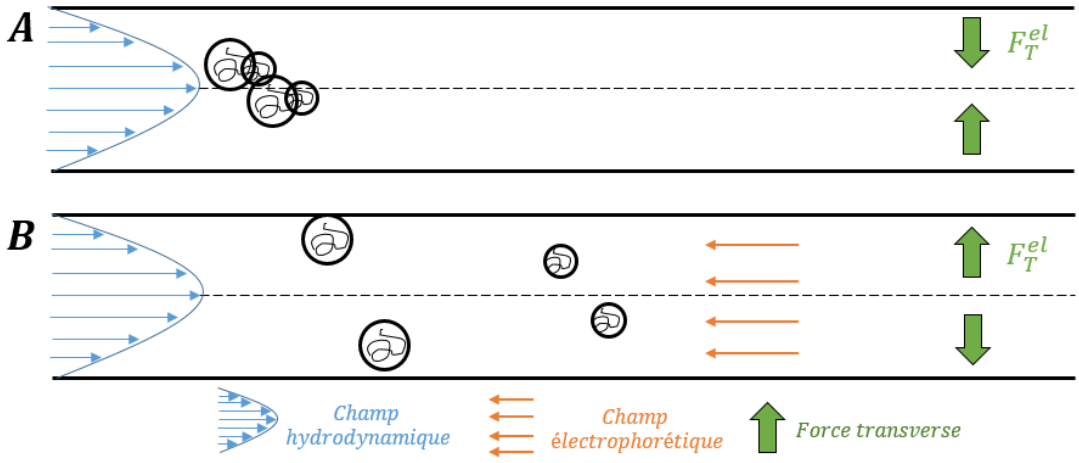


Figure 2 Erreur ! Il n'y a pas de texte répondant à ce style dans ce document.**.7** **Une représentation schématique des étapes de séparation par µLAS dans un canal.** **(A)** Actionnement de la migration par un champ hydrodynamique qui focalise les molécules au centre du canal. **(B)** Ajout du champ électrique en opposition, la force transverse change de sens et induit des vitesses de migration différentes pour chaque taille.

C. Modulation des champs de vitesses pour différentes fonctions et mode de séparation

1. *Moduler les champs de vitesses*

L'idée de moduler les champs de vitesses est un concept fortement lié à la dépendance de la force transverse en ces vitesses. En effet, la force transverse élastique dépend des vitesses électrique et hydrodynamique, et les particules possèdent une vitesse qui dépend directement de la hauteur de focalisation et donc de leur taille. Il est alors apparu qu'il était possible de

contrôler cette hauteur de focalisation non pas en modulant les paramètres d'actionnement mais en jouant sur la géométrie du système. Et cela pour faire varier l'intensité de la force transverse spatialement dans les canaux de la puce.

Une constriction a été introduite dans les canaux pour jouer sur la dépendance des vitesses aux lois de conservation du débit et du champ électrique. La vitesse varie avec la largeur du canal, et plus précisément, par conservation, la vitesse augmente lorsque la largeur du canal diminue (Fig. 2.8).

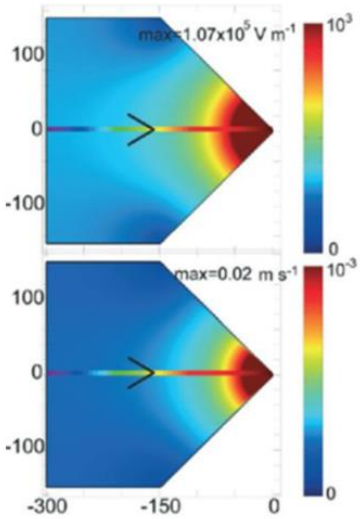


Figure 2.8 Modélisation des amplitudes des champs de vitesses **(haut)** électriques et **(bas)** hydrodynamiques par éléments finis *(Ranchon et al., 2016).*

L'intensité de la force transverse est plus faible lorsque le canal est large et n'influence donc pas beaucoup la migration des molécules, qui restent à des hauteurs proches du centre. L'hydrodynamique domine donc et les molécules migrent vers la constriction, dans le sens de l'écoulement. À la pointe de la constriction, lorsque la largeur du canal est très faible, l'intensité de la force transverse est très importante et plaque les molécules au plus près de la paroi. Dans cette région c'est l'électrophorèse, ne dépendant pas de la hauteur des molécules, qui domine et inverse la migration. Or dans cette constriction, entre ces deux régions limites, il existe une position où, pour une taille fixe et des conditions d'actionnement (pression et tension) données, les deux vitesses se compensent. C'est la fonction de concentration par µLAS.

Beaucoup de technologies microTAS sont capables de réaliser ces étapes de concentration et séparation de manière séquentielle. Mais en se reposant sur la force transverse

qui dépend des champs de vitesses, mais aussi de la taille il est possible de concentrer et de séparer les molécules en simultané. Donc pour des conditions d'actionnement donnés plusieurs tailles de molécules vont avoir des positions d'équilibres différentes dans la constriction. En effet, en entrant dans la partie moins large du canal les molécules de plus grandes tailles sont rapidement être redirigées vers les parois, la force transverse est proportionnelle à la taille, et trouve donc une position d'équilibre. Ce qui n'est pas encore le cas pour une molécule plus petite, la force transverse s'exerçant sur elle étant plus faible, elle est plus haute dans le canal et donc continuera sa migration dans la constriction par l'écoulement hydrodynamique. En continuant ainsi les molécules de petites tailles rencontrent au fur et à mesure des champs plus importants, de même pour la force transverse qui les maintient à une hauteur où les vitesses se compensent au final. La concentration et la séparation se font en simultané et en continu. L'écoulement hydrodynamique amène constamment le matériel qui a été injecté en amont de la constriction, la séparation est enrichie au fur et à mesure du temps.

2. Les deux différents modes de séparations par µLAS

Deux modes différents de concentration et séparation existent et qui découlent des concepts évoqués plus haut. Premièrement le mode de séparation et concentration spatial, qui fait écho directement à la partie précédente et qui a été développé pour la majeure partie dans les thèses de *(Malbec, 2018)* et *(Chami, 2019)*. Le deuxième mode de séparation et de concentration est le mode temporel. Ce mode peut être décliné en deux sous-catégories qui s'appuient sur deux supports différents : le capillaire et la puce. Le format µLAS en capillaire a été grandement exploité lors de la thèse de Nicolas Milon *(Milon, 2019)* et a été adapté sur puce pour des séparations plus rapides durant cette thèse. Les géométries des systèmes et séquences de réglages varient entre ces deux stratégies d'actionnement. Bien que le mode spatial et le mode temporel sur capillaire soient bien établis et antérieurs à mon travail, je les présenterai dans la suite de cette partie, après avoir présenté le développement effectué sur le mode de séparation temporel sur puce « picolike », en mettant en place un formalisme renouvelé, mettant l'accent sur la séquence d'actionnement des instruments pour mettre en place les étapes de concentration/séparation spécifique au mode ou au format. Ce choix est fortement lié à la volonté de définir très précisément les suites de réglages des paramètres d'actionnement pour pouvoir ensuite les intégrer dans l'instrumentation de façon automatique (Chapitre 3).

a. Séparation dans le temps des bandes d'ADN sur puce « picolike »

La concentration et la séparation temporelle sur puce par µLAS peut se faire avec plusieurs formats, notamment sur puce ou en capillaire. Je présenterai ici le format puce avec géométrie dite « picolike », car c'est avec cette géométrie que la totalité des expérimentations présentées dans ce manuscrit ont été réalisées. Je présenterai succinctement les possibilités et développements liés aux séparations temporelles réalisées sur puce « en T » dans une partie à venir. L'ensemble des modes de concentration et séparation (temporelle puis spatiale) seront décrit par une ou plusieurs séquences d'actionnement.

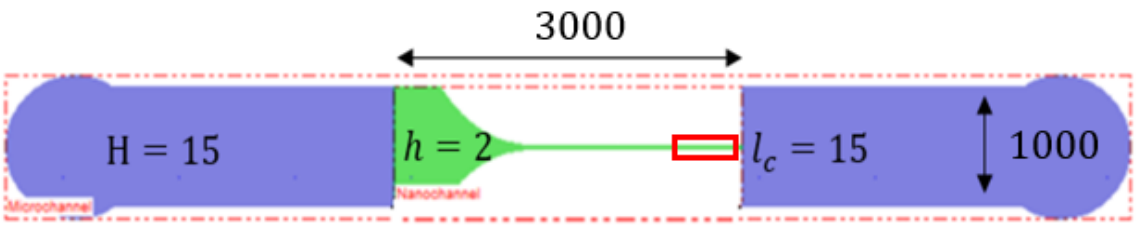


Figure 2.9 Concept d'une puce pour concentration et séparation temporelle par µLAS. H et h sont les deux profondeurs de canaux et l_c est la largeur à la constriction. La zone de détection (rectangle rouge) est placée à la toute fin du petit canal après la constriction. Toutes les dimensions sont en µm.

La géométrie *picolike* consiste en une canalisation présentant deux régions (Fig. 2.9). Comme dans le cas de la séparation spatiale, la puce possède deux profondeurs. La partie bleue sert à l'injection des solutions, cette région est profonde pour imposer le minimum de résistance hydrodynamique afin d'amener du matériel en continue jusqu'à la constriction. Notons aussi que cette partie doit être assez longue pour limiter au maximum l'influence de la marche entre les deux profondeurs, qui peut déformer les lignes de champs de l'écoulement. La partie verte quant à elle sert à la concentration et à la séparation. La forme de la constriction est retrouvée à nouveau dans ce mode, comme en séparation spatiale, mais cette fois elle est suivie d'un canal long (1600 µm) et fin (15 µm). Alors que la concentration apparaît au même endroit que précédemment, c'est-à-dire dans la constriction.

Avec cette géométrie il n'y a pas concentration et séparation en simultanée. La résistance dans ce modèle de puce (Fig. 2.9) est presque 100x supérieur au modèle présenté en Fig. 2.14 ($R_{h,picolike} \cong 130\eta\ \mu m^{-3}$ contre $R_{h,spatiale} \cong 2\eta\ \mu m^{-3}$). Et toute la résistance

hydrodynamique de la puce est située dans ce long canal ($R_{h,long\ canal} \cong 129\eta\ \mu m^{-3}$ contre $R_{h,constriction} \cong 1\eta\ \mu m^{-3}$). La force transverse est la plus importante dans le petit canal, où les molécules sont plaquées aux parois et repoussées en arrière par la force électrophorétique (sur la droite de la Fig. 2.10 A). La constriction ne sert alors plus que de concentrateur car les positions d'équilibre par tailles sont très resserrées.

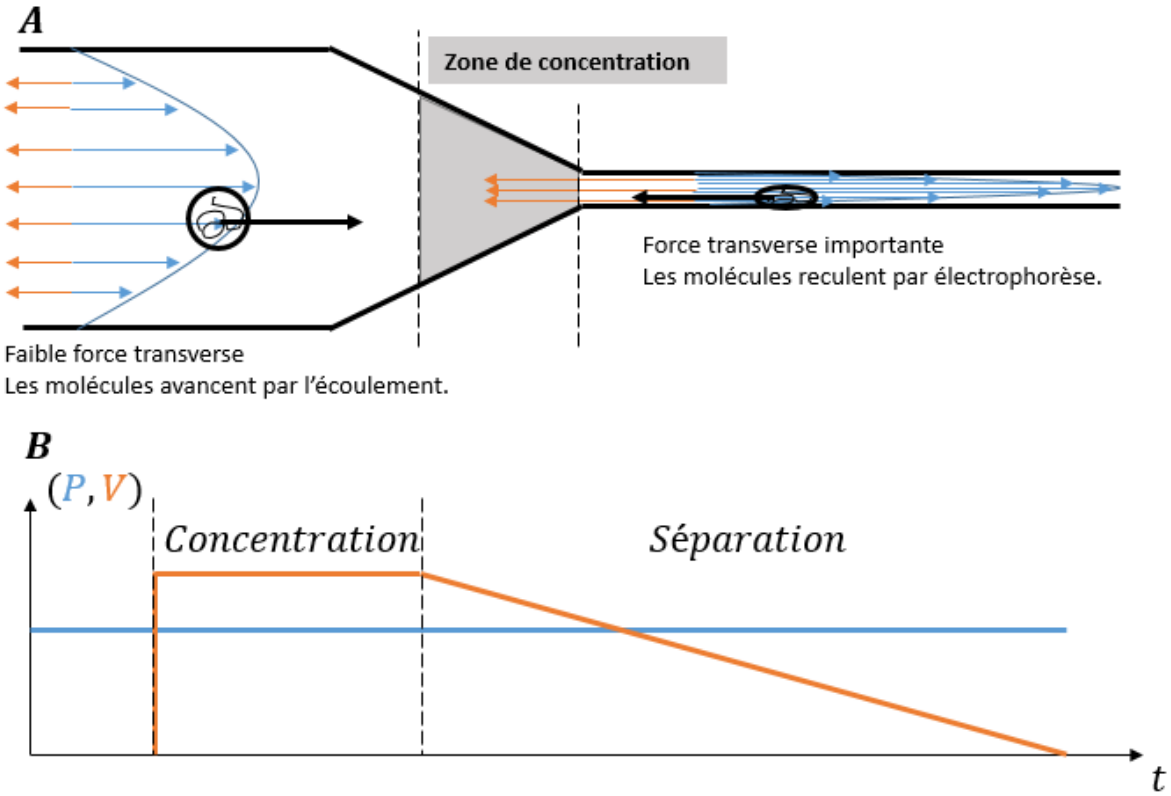


Figure 2.10 Mode d'actionnement pour séparation temporelle par µLAS. **(A)** Concepts de concentration et de séparation en mode temporel. **(B)** Séquence d'actionnement des paramètres de pression et de tension pour réaliser une concentration et une séparation temporelle par µLAS.

Plusieurs séquences d'actionnement sont possibles, je présenterai ici en détails la séquence d'actionnement générale qui sera utilisée dans le chapitre 4 pour les expériences de séparation. Il est néanmoins possible de décliner cette séquence de multiple façon, ce que nous avons fait en fonction de nos objectifs. La séquence (Fig. 2.10 B) consiste en l'application de l'hydrodynamique et de l'électrophorèse pour concentrer les molécules. Il y a enrichissement de toutes les tailles mélangées en une seule et unique bande dans la zone de concentration. Après un certain temps de concentration, le voltage est diminué pour amorcer la phase de

séparation. La manière dont la tension décroit influence directement la vitesse électrophorétique, dont dépend la force transverse. Donc pour une taille donnée la force transverse va petit à petit diminuer, permettant à la molécule d'accrocher les vitesses hydrodynamiques plus élevées, qui ne sont plus compensées par le champ électrique. La bande de la taille définie commence sa migration dans le petit canal.

D'autres séquences d'actionnement ont été mise au point pour l'étude et la comparaison des modes de dispersion d'une bande lors de sa migration par µLAS dans le système *picolike*. Ces séquences sont résumées dans la figure 2.11 et nous les retrouverons dans le Chapitre 4 III.B, p. 136.

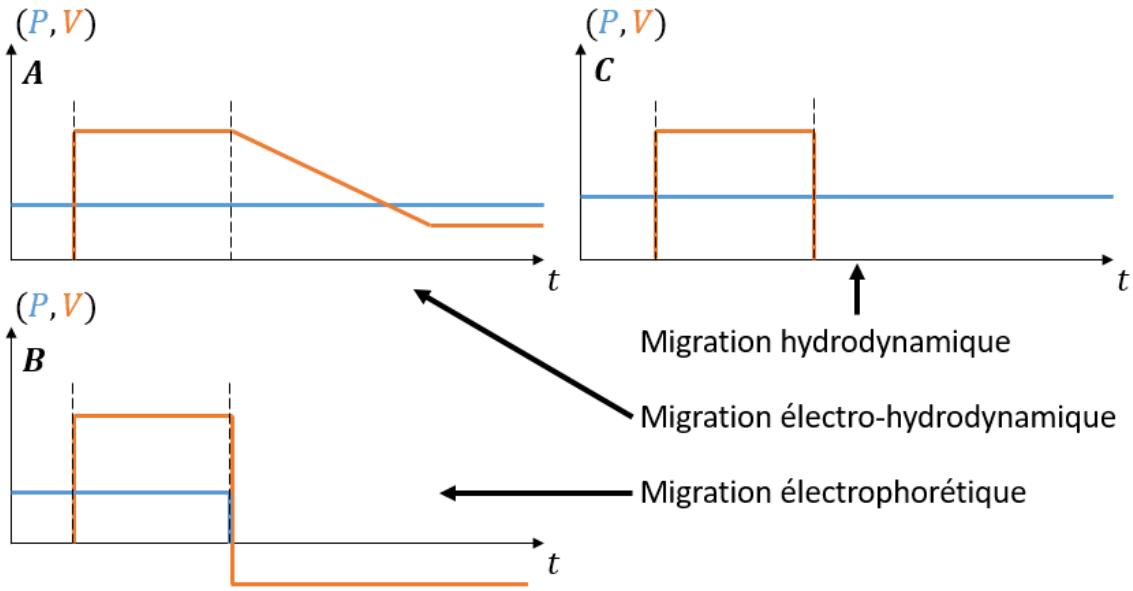


Figure 2.11 **Séquences d'actionnement pour l'étude des modes de dispersion.** Le paramétrage des instruments et leur synchronisation nous permettra d'étudier **(A)** la migration électro-hydrodynamique (µLAS), **(B)** la migration hydrodynamique et **(C)** la migration électrophorétique.

La mesure consiste en l'intégration de l'ensemble des pixels d'une région d'intérêt (ROI, pour *Region Of Interest*) en fin de migration du petit canal. Les bandes passent successivement devant cette ROI (Fig. 2.12) après un certain temps de migration. La différenciation entre les bandes se fait donc bien en temps, un temps de passage qui peut être défini par rapport soit à un temps zéro (le début de la décroissance de la tension par exemple) soit leur temps de début de migration. Nous verrons plus tard que ce temps de départ est très

important à définir et mesurer, la deuxième option étant plus juste bien que plus difficile d'accès.

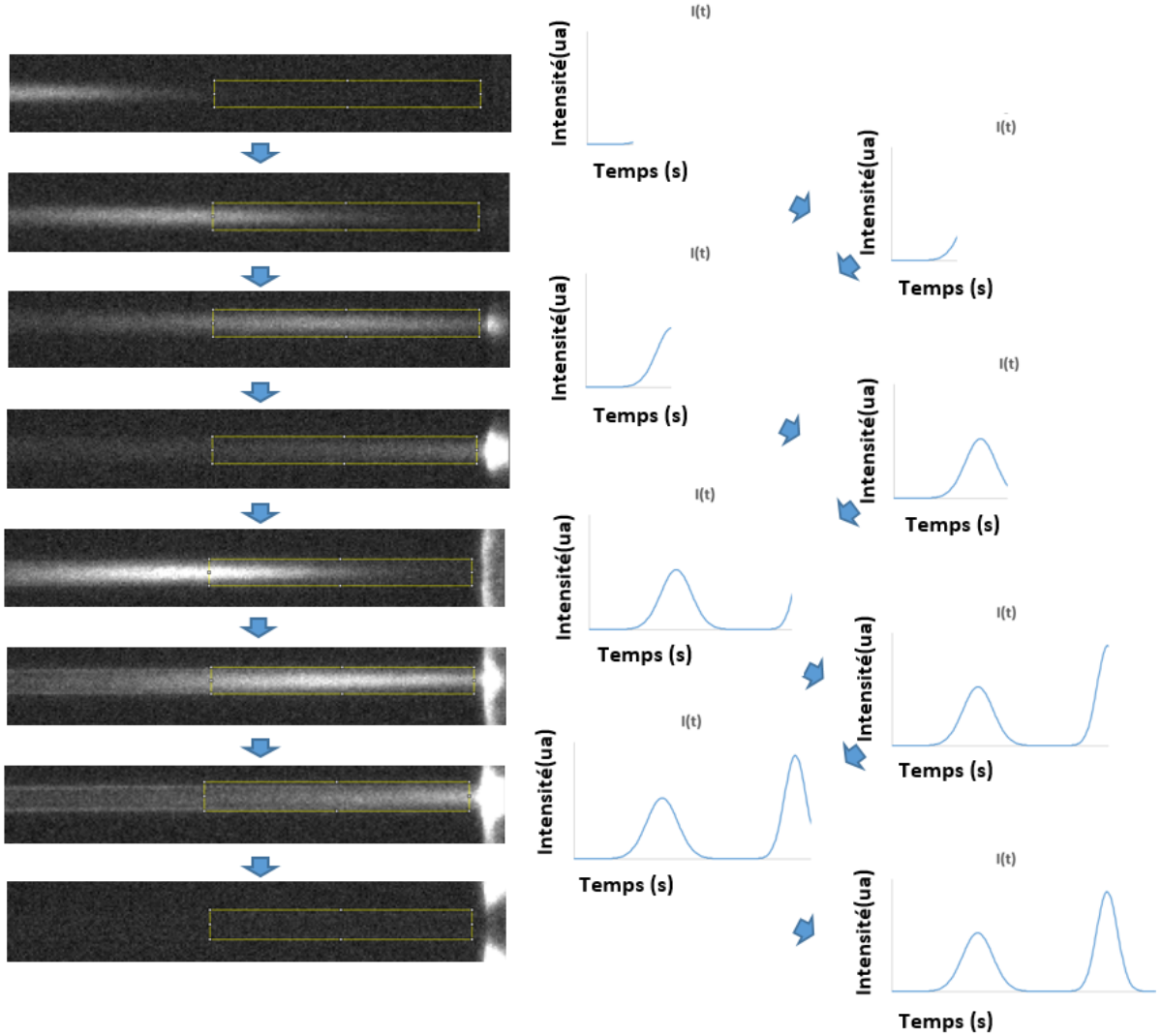


Figure 2.12 Cinétique des bandes et profils d'intensités correspondants. Les deux bandes d'ADN (600 et 1000 bp) passent devant la ROI après leur migration dans le petit canal. Les images sont séparées par intervalle de temps de 200 ms.

b. Séparation dans le temps des bandes d'ADN sur puce en « T »

Les séparations par µLAS en mode temporel peuvent aussi être effectuées avec un autre design de puces, les puces avec croisement en T. Ces puces ont fait l'objet d'une étude complémentaire au format capillaire de séparation d'ADN de poids moléculaire élevés (0.5 – 150 kbp) (non présentée ici) pour notamment permettre des séparations plus rapides et diminuer la consommation des solutions tampons et des échantillons. Ces puces présentent une profondeur unique (h = 3 µm) et peuvent donc être manufacturées rapidement en une seule étape de fabrication. La séparation est réalisée tout au long de la partie droite entre les réservoirs 2 et 4, sur 36 mm (Fig. 2.13 A).

La séparation s'effectue en deux étapes qui nécessites l'actionnement de la pression et de la tension conjointement sur les quatre réservoirs. La première étape est une étape de concentration et celle-ci ne concerne que les réservoirs 1 et 3 (Fig. 2.13 A et B/en haut). La seconde étape prend la suite directe de la première, le basculement entre concentration et séparation doit synchroniser les différents réglages des instruments.

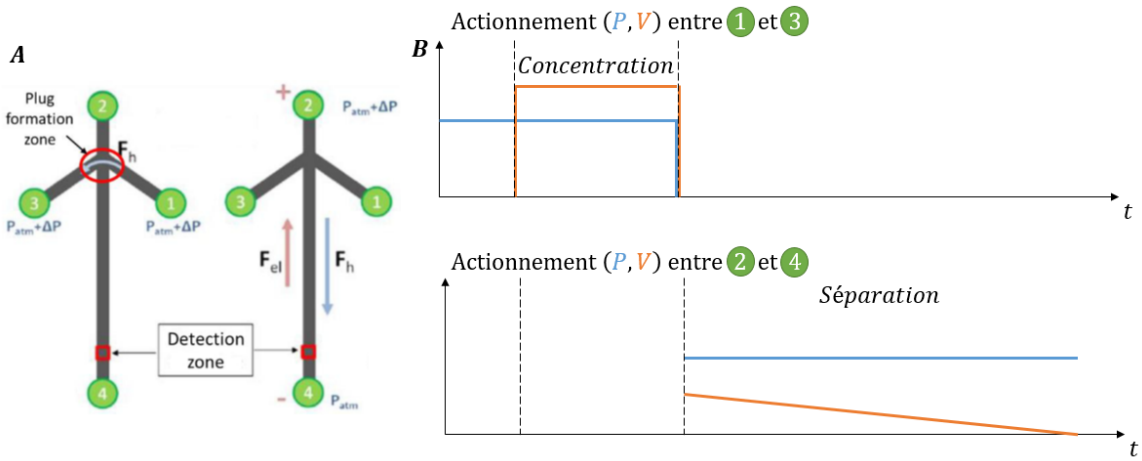


Figure 2.13 Mode de séparation temporelle par µLAS sur puce dans un canal en T. **(A)** Dans la première étape (à gauche), une pression est appliquée entre réservoirs 1 et 3 pour introduire l'échantillon dans l'intersection, l'ADN est concentrée dans cette zone (cercle rouge). Dans la deuxième étape (à droite), une tension est appliquée entre les réservoirs 2 et 4 avec un flux hydrodynamique appliqué en opposition. Le détecteur est placé à l'extrémité du canal de séparation (carré rouge) pour détecter les accumulations de bandes d'ADN qui passent. Extrait de *(Milon, 2019)*. **(B)** Schéma des séquences d'actionnement pour ce mode de séparation et ce format. Sur ces puces il y a 4 réservoirs, ce qui multiplie les actionnements mais permet une concentration contrôlée de la quantité d'ADN avant

la séparation, contrairement au format puce « picolike » où la concentration se poursuit en continue.

Ce modèle de puce offre des vitesses d'écoulement assez proche du capillaire (0.6 mm/s) mais la possibilité d'application de champs électriques plus important (40 V/cm). La figure 2.14 présente une séparation d'un « *kb extend ladder* », c'est-à-dire de bandes de 0.5 à 48.5 kbp avec l'ajout d'une bande de 150 kbp, réalisée en 5 minutes.

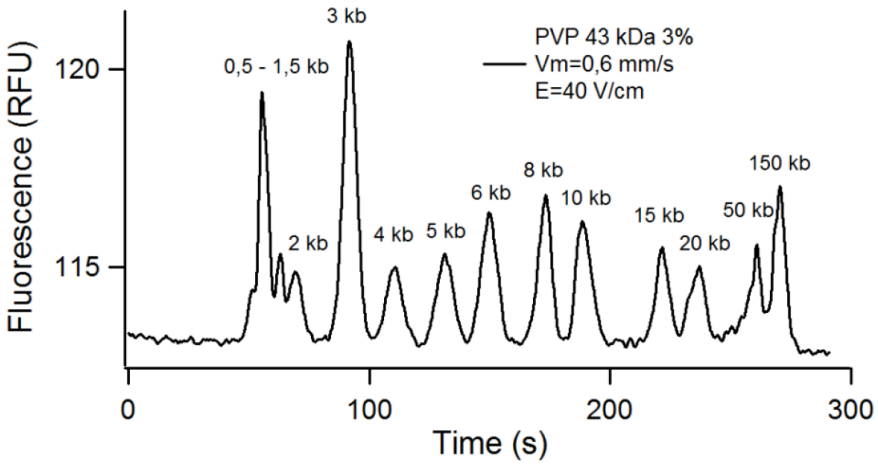


Figure 2.14 **Profil de séparation du *kb extend ladder* + une bande de 150 kbp sur puce avec un canal en T.** Cette séparation a été réalisée avec un tampon PVP 43 kDa à 3%. Extrait de *(Milon, 2019)*.

c. Séparation dans l'espace des bandes d'ADN

Le mode de séparation spatiale par µLAS a déjà abordé dans les parties précédentes puisque c'est le mode historique de la technologie. La puce microfluidique est une canalisation constituée de deux régions avec des profondeurs différentes (Fig. 2.15). Un canal droit et une constriction qui sert à induire la modulation dans les champs de vitesses comme décrit dans la partie précédente.

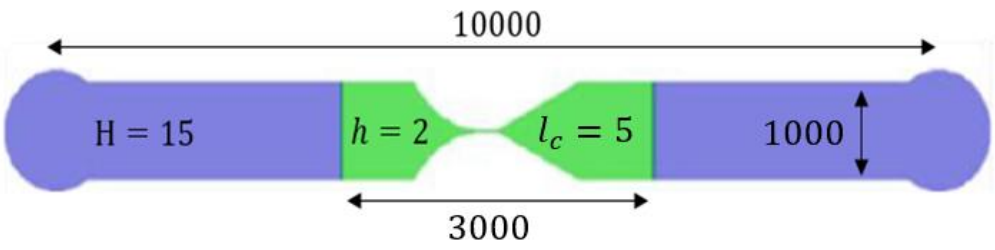


Figure 2.15 Concept d'une puce pour séparation spatiale par µLAS. H et h sont les deux profondeurs des canaux, l_c est la largeur à la constriction. On remarque l'asymétrie dans les constrictions, on peut distinguer un entonnoir droit et un entonnoir avec une forme en x^3. Toutes les dimensions sont en µm.

Deux types de séquences d'actionnement des champs, hydrodynamique et électrophorétique, sont montrés en figure 2.16 A et C. La première séquence (Fig. 2.16 A) commence toujours par l'actionnement de la pression pour induire l'écoulement hydrodynamique. Les molécules migrent alors vers la constriction. Puis, sans modifier la pression, le voltage est appliqué de façon à générer un champ électrique opposé avec le sens de l'écoulement. La concentration et la séparation se font alors rapidement en même temps. Les petites molécules se concentrent au plus proche de la constriction, et plus vite. Les différentes tailles sont regroupées sous forme de bandes (Fig. 2.16 B) dont l'intensité augmente au cours du temps. Lorsque le champ électrique est éteint, l'écoulement pousse les bandes hors de la constriction. La deuxième séquence est similaire en principe mais change l'actionnement du champ électrique. Cette séquence, constituée de deux phases distinctes, commence par l'application d'une basse tension pendant quelques secondes, pour concentrer principalement les plus larges molécules. Puis la deuxième phase consiste en l'augmentation du champ électrique par l'application d'une haute tension, ce qui concentre et sépare l'ensemble des tailles.

Cette seconde séquence présente au moins deux avantages indéniables par rapport à la première. La première séquence présente la problématique des bandes de petite taille qui se concentrent rapidement et fusionnent, rendant impossible leur distinction (Fig. 2.16 B/4 proche de la constriction). Même après des temps plus longs la deuxième séquence ne présente pas ce désavantage (Fig. 2.16 D/3 proche de la constriction). La deuxième problématique est celle des bandes des grandes tailles qui sont difficilement distinguables par la première séquence d'actionnement (Fig. 2.16 B/4 loin de la constriction) contrairement à la seconde technique qui

permet d'identifier clairement l'ensemble des bandes, même les grandes tailles (Fig. 2.16 D/3 loin de la constriction).

Enfin ce mode est qualifié de mode de concentration et séparation spatial car les bandes de différentes tailles sont spatialement détectées, une certaine cote par rapport au bout de la constriction peut leur être attribuée à chacune (Fig. 2.17). En mode spatiale on mesure donc une distance entre une origine dans l'espace (le bout de la constriction par exemple) ou les distances séparant les bandes entre elles (pour calculer la résolution par exemple). Alors qu'en mode de séparation temporelle on mesure le temps à une origine (déclencheur) ou entre les bandes.

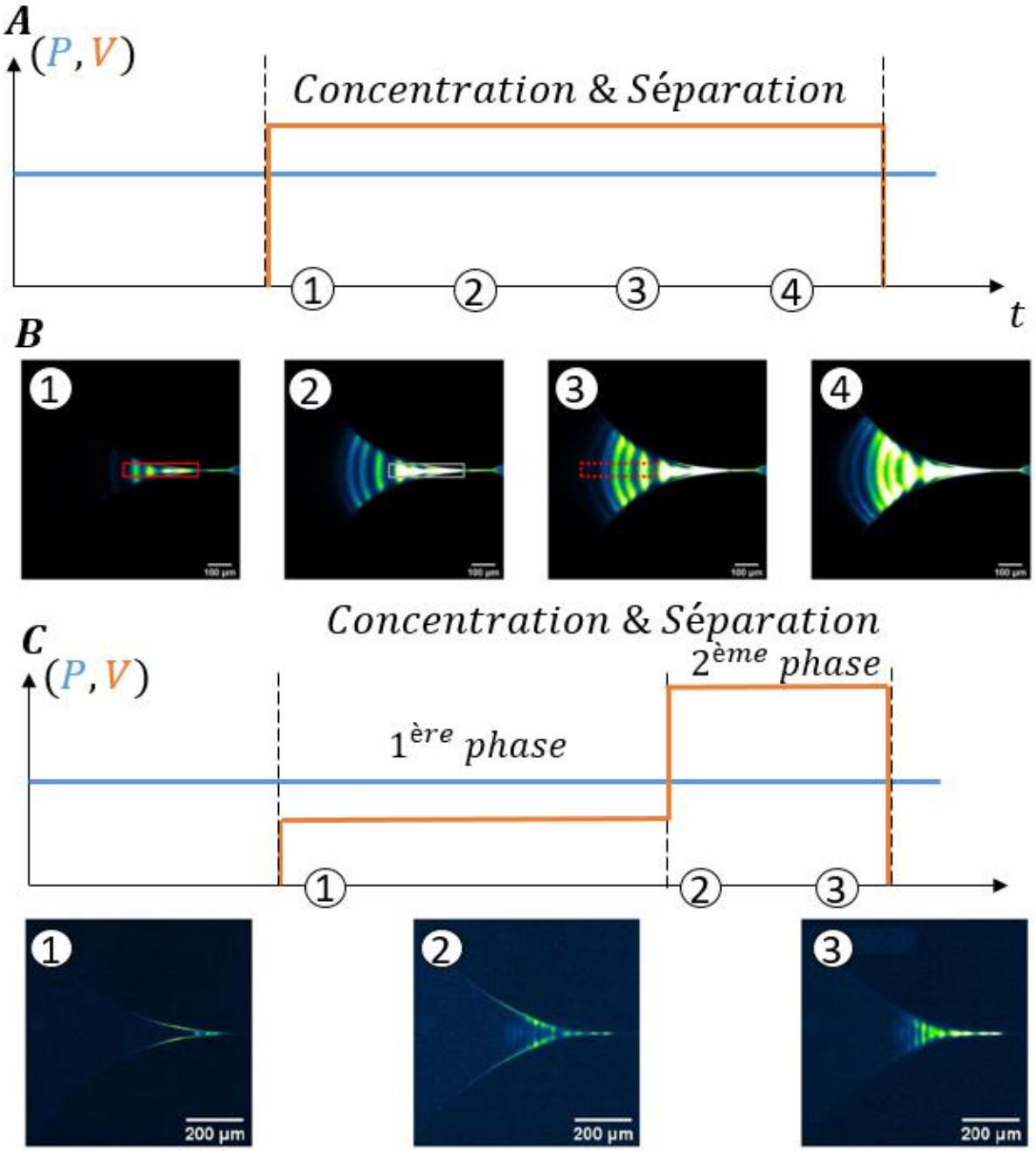


Figure 2.16 Concentration et séparation en mode spatial par µLAS. **(A)** Première séquence d'actuation à pression et tension constantes pour initier la concentration et la séparation. **(B)** Séquence temporelle correspondante, montrant la concentration et la séparation d'un ladder 50bp d'ADN avec des conditions d'actionnement de P = 9 bar et V = 400 V pendant 16 secondes. **(C)** Deuxième séquence qu'actionnement avec deux plateaux de tensions. **(D)** Séquence temporelle correspondante, montrant la concentration et la séparation du même ladder, cette fois à P = 7 bar, le premier plateau de tension V = 70 V, le deuxième plateau de tension V = 200 V, et ce pendant 50 secondes.

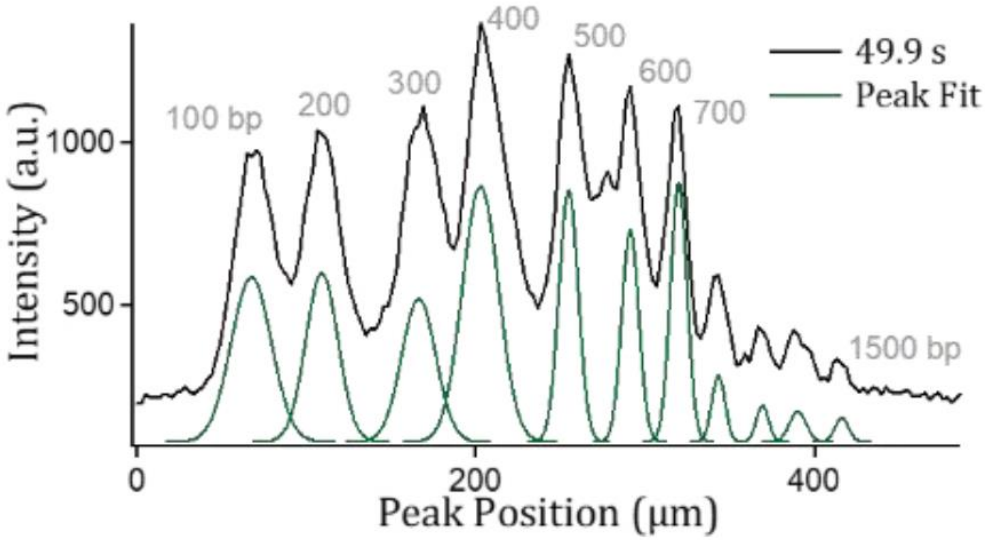


Figure 2.17 Profil d'intensité de fluorescence après la séparation et concentration par µLAS. C'est la deuxième séquence d'actionnement qui a été utilisée. On peut distinguer clairement les 11 bandes du 100bp ladder.

D. Mise en œuvre de la séparation

Nous verrons dans la prochaine partie comment se déroule une séparation par µLAS et mise en place techniquement.

1. *Caractéristiques de la solution*

L'échantillon à analyser (ADN, ARN, …) est dilué dans une solution de polymère viscoélastique comme du PVP (pour polyvynilpyrolydone). La solution tampon est composée de TBE (pour Tris-Borate-EDTA) 1x, qui est fréquemment utilisé, pour stabiliser les ions en solution, en électrophorèse classique.

La majeure partie des expérimentations présentées dans ce manuscrit ont été menées avec du PVP de poids moléculaire 360 kDa dilué à 5%, ce qui est au-dessus de la concentration seuil c^* de 1% calculée avec l'équation 2.1. La viscosité de la solution préparée ainsi est de $\eta = 25$ cP. Les autres paramètres caractéristiques de la solution comme son élasticité ont un impact important sur la séparation, via la force transverse notamment et les champs de vitesses. Pour une caractérisation de l'élasticité de nos solutions nous conseillons de se référer au protocole décrit dans *(Naillon et al., 2019)*, avec qui nous avons collaboré, ainsi que quelques valeurs associées à leur étude :

Polymer solution	Microrheololgy η (mPa.s)	Microrheololgy τ_{MR} (ms)	CaBER η (mPa.s)	CaBER τ_C (ms)	τ_{MR} / τ_C
PVP 1.3 MDa 6 %	43.8	31	47.5	1.37	23,00
PVP 1.3 MDa 3 %	15	17	12	0.27	63,00
PVP 40 KDa 20%	14.5	15.3	27	0.2	77,00
PVP 360kDa 4%	12.4	7	?	?	?

Figure 2.18 **Caractérisation des solutions avec comparaison des valeurs mesurées par micro-rhéologie et par la technique CaBER.** L'estimation des viscosités η sont en bon accord entre les deux techniques, néanmoins on peut remarquer que pour des solutions de viscosité supérieur à 7 cP. Tiré de *(Naillon et al., 2019)*

2. Instrumentation

Jusqu'ici nous avons évoqué des moteurs d'actionnement comme la pression ou un champ électrique pour induire les différents mécanismes de migration, concentration et séparation au sein de µLAS. Le montage au complet avec la description de son système d'automatisation et sa caractérisation seront développé dans le chapitre 3 notamment dans les détails.

Il est néanmoins important de présenter brièvement ces systèmes d'actionnement utilisés (Fig. 2.19) :

- En bleu : un système de contrôle de pression (MFCS-EZ 7 bar, Fluigent).
- En vert : une carte d'acquisition NI-DAQ USB multi I/O (National Instrument) qui génère des basses tension (entre -10 et 10 V). Ce système est couplé à un amplificateur de tension x100 pour générer des tensions plus hautes.
- En orange : une caméra sCMOS (hamamatsu, ORCA Flash 4.0 lt+)
- En violet : une base de microscope (Olympus) servant de support. Cette base est équipée, notamment, d'un objectif 10X d'ouverture numérique 0.5.
- En noir : un système de génération de lumière (SOLA, Lumencor) LED, relié au microscope via une fibre optique.
- En rouge : l'ordinateur auquel est relié l'ensemble de ces sous-systèmes, pour centraliser les contrôles au sein d'une seule interface.

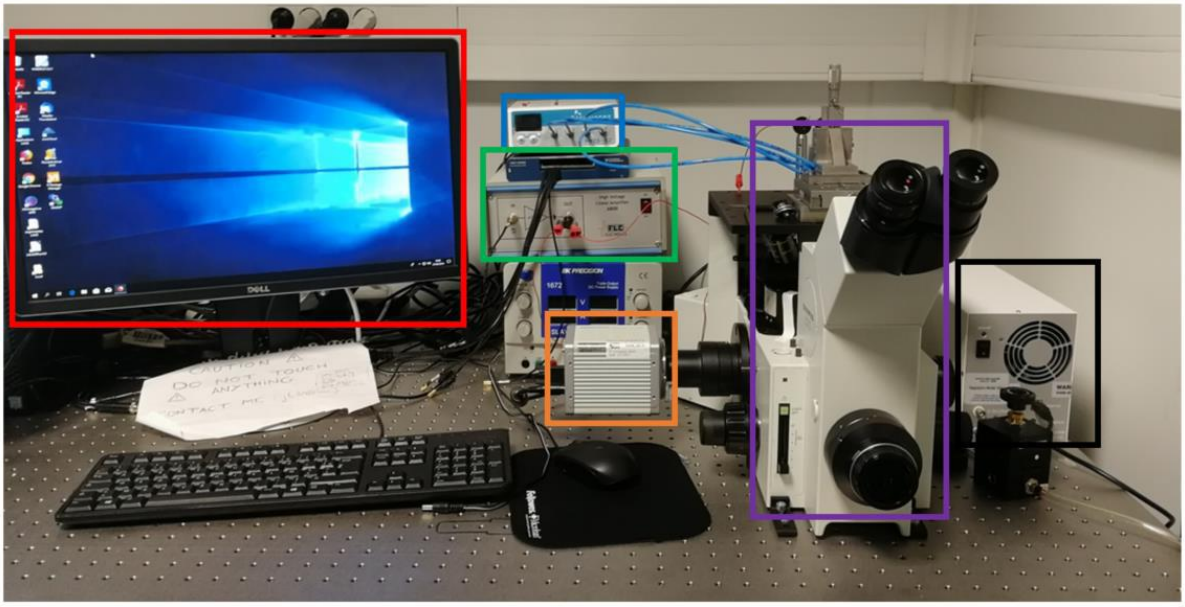


Figure 2.19 Banc d'expérimentation. L'ensemble des sous-systèmes sont reliés à un ordinateur qui assure le contrôle et la synchronisation des instruments.

La base de microscope Olympus a été désossée pour en fixer toutes les parties mobiles (la tourelle de focus principalement). Pour assurer le bon mouvement dans le plan (X, Y) du support de puce au-dessus de l'objectif (observation par-dessous) nous avons monté deux platines millimétriques. Ces platines servent à naviguer le long des dimensions de la puce. Une troisième platine, micrométrique, a été installée afin de contrôler la cote du focus (Z). La précision de cette platine est de 0.5 µm et possède un double système de blocage pour assurer le minimum de dérive *(voir Chapitre 3 III.A.2, p. 120)*.

III. Fabrication des puces en Silicium/Verre

Les puces microfluidiques présentent des canaux gravés dans un wafer de silicium, qui sont ensuite capotés par un wafer de verre. L'ensemble du procédé de fabrication se fait en environnement contrôlé, dit « propre », en salle blanche. Le processus de fabrication commence toujours par un nettoyage des wafers et des masques qui servent au transfert du motif des canaux sur le silicium. Le nettoyage complet comprend le passage dans un plasma O_2 pendant 5 minutes à 800 W de puissance pour un débit de dioxygène de 1000 ml/min et un bain de Piranha pendant 10 minutes. Ce bain est un mélange 1:1 de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'acide sulfurique H_2SO_4. En fin de nettoyage les substrats sont déshydratés au four pendant au moins

15 minutes. Ce procédé a été beaucoup utilisé pendant cette thèse, sans faire l'objet de réelle nouveauté par rapport aux travaux antérieurs du laboratoire. Je présenterai ici les grandes lignes du procédé sans entrer dans les détails, que l'on peut retrouver dans plusieurs travaux déjà cités précédemment *(Ranchon et al., 2015Malbec, 2018 ; Chami, 2019)*.

A. Photolithographie

1. Revêtement de la résine

Les plaquettes de silicium (Si) font 500 µm d'épaisseur pour 4 pouces de diamètre. Un promoteur d'adhérence peut être utilisé, l'HMDS (hexaméthyldisilazane), pour favoriser l'adhésion de la résine sur le substrat Si.

a. Premier niveau

Pour le premier niveau le revêtement de résine est fait par la technique de *spin-coating*. L'étalement d'une nappe de résine se fait par centrifugation à une vitesse de 5000 tr/min pendant 30 secondes, avec une accélération initiale de 5000 tr/min/s. Une épaisseur de résine AZ® ECI 3027 d'épaisseur 1.1 µm est ainsi déposée sur la plaquette de Si. L'enduction est suivit d'un recuit à 90° pendant 30 secondes.

b. Deuxième niveau

Le dépôt du second niveau de résine est différent de ce qui peut être trouvé dans les travaux antérieurs de µLAS. J'ai choisi un dépôt par la technique de *spray-coating*. La résine, dans ce cas-ci la AZ® 46666, est atomisée en micro-gouttes par ultrasons par un Altaspray (Suss Microtec), puis est déposée en couches minces sur le substrat. Les couches, portées par un flux de nitrogène, se combinent pour former un film de résine plus épais (~ 8 µm).

2. Insolation

Les wafers Si avec leur couche de résine ECI sont ensuite insolés par de la lumière UV à travers un masque positif en verre sur lequel se retrouve le motif des canaux. La dose qui irradie la résine est de 250 mJ/cm². Cela active la résine ainsi exposée, qui sera décollée à l'étape du développement.

3. Développement

Les wafers sont recuits encore une fois après l'insolation, c'est le PEB (pour Post-Exposure Bake), à 110° pendant 60 secondes. Puis un développeur, MF-CD-26 (hydroxyde de tétraméthylammonium) est utilisé pour décoller la résine activée par l'exposition. Cette étape est réalisée en 1 minute environ.

Le motif n'a été décalqué qu'à moitié sur le substrat après cette étape, il est imprimé sur la résine, il reste encore à le transférer dans le silicium. Le reste de la résine qui n'a pas été développée est gardée telle quelle pour protéger les parties qui ne doivent pas être gravées à la prochaine étape.

B. Gravure

Pour transférer le motif dans le silicium la technique de gravure sèche RIE (pour Reactive Ion Etching) est employée. Il s'agit d'un plasma de gaz ionisés (SF_6 et/ou CF_4) qui bombarde la surface du matériau avec des ions. Le plasma est plus réactif chimiquement avec le silicium qu'avec la résine, on parle de gravure sélective.

Le temps de gravure est adapté en fonction de la profondeur voulue, qui varie entre les deux niveaux. Après l'étape de développement, l'épaisseur de la résine est mesurée par un profilomètre. Après l'étape de gravure l'épaisseur de résine restante est mesurée de la même façon, ainsi que la profondeur de silicium gravée. Ces mesures nous donne les vitesses de gravure pour le substrat et la résine, respectivement v_s et v_r. Le rapport de ces deux vitesses caractérise la sélectivité de la gravure $S = \frac{v_s}{v_r} > 1$.

C. Perçage des trous

Des trous traversent le wafer de Si pour créer l'entrée et la sortie des motifs de la puce, ils sont réalisés par sablage. Les motifs qui ont été gravés sont protégés par un film sec Enthone® PH2040, laminé sur les deux faces du wafer. Des grains d'oxyde d'aluminium sont projetés à une pression ajustable et pendant un temps réglable, pour traverser le wafer de Si (~0.5 mm) sur un diamètre d'environ 1 mm. Le film sec est ensuite retiré pour préparer le substrat pour l'étape d'oxydation.

D. Oxydation

L'oxydation du silicium est nécessaire pour isoler électriquement les canaux. Cette étape est réalisée par croissance thermique du matériau en milieu humide menant à la croissance d'une couche de SiO_2 d'épaisseur 400 nm. L'épaisseur de cette couche peut être mesurée via un ellipsomètre.

E. Capotage

Un wafer de verre dopé au sodium d'épaisseur 500 µm est utilisé pour encapsuler la puce par soudure anodique. Des liaisons covalentes sont générées par migration des ions sodium qui se trouvent à la surface du verre. Ces ions sont mis en mouvement par le passage du courant dans les conditions dans lesquelles se passent la soudure, c'est-à-dire une haute tension (entre 600-800 V) et une haute température (370°C).

Après l'encapsulation, le wafer est découpé. Quelques dizaines de puces peuvent ainsi être fabriquées sur chaque wafer.

F. Récapitulatif

La figure 2.20 propose un récapitulatif de toutes les étapes qui composent le procédé de fabrication qui vient d'être décrit.

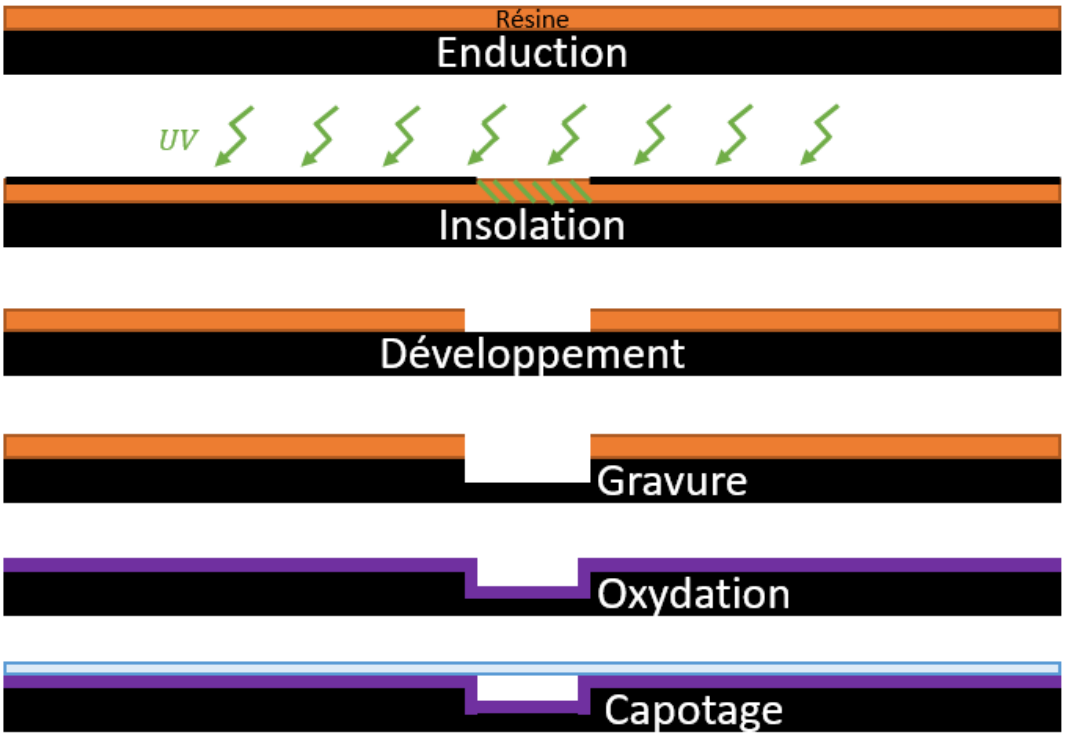


Figure 2.20 Récapitulatif du protocole de fabrication par photolithographie. **(1)** Enduction d'une couche de résine ECI (en orange) sur une plaque de silicium. **(2)** Insolation de la résine au travers d'un masque. **(3)** Développement, les parties spécifiquement insolées de la résine sont retirées. **(4)** Gravure du silicium ainsi mis à nu. **(5)** Oxydation du silicium pour isoler électriquement les motifs. **(6)** Capotage d'une plaquette de verre par soudure anodique pour compléter la puce et permettre l'observation.

IV. Procédé de fabrication de puces avec canaux en 2.5D

A. Les motivations

L'architecture générale et la géométrie des canaux microfluidiques ont une très grande incidence sur les procédés de séparation et les mécanismes mis en jeu. Nous avons vu que la géométrie en elle-même peut faire varier des grandeurs importantes comme les résistances hydrodynamique ou électrique dans le système.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu un procédé d'impression de deux profondeurs en deux étapes par la combinaison de photolithographie et de gravure sèche. Ce procédé classique a l'avantage d'être simple et rodé pour une réalisation dans une salle blanche. Néanmoins les deux profondeurs ainsi imprimées sur le substrat sont homogènes (un escalier composé de 2 marches). Pour graver une pente dans le substrat il devient nécessaire de mettre autant d'étapes supplémentaires que de profondeurs voulues. Ce qui peut être très laborieux, autant pour la fabrication que pour l'étape de conceptualisation des masques (autant de masque que d'étape) en amont. On peut aussi questionner les limites de résolutions atteignables pouvant être atteinte par un procédé de photolithographie. Celles-ci pouvant poser problème pour graver une pente la plus « lisse » possible et non pas une suite de marches très délimitées.

Pour transmettre de multiples profondeurs en une seule étape il est par exemple possible d'utiliser un masque optique en niveau de gris *(Stavis, 2009)* ou encore l'alternative de l'impression 3D. Nous avons choisi une autre alternative qui contrecarre 2 désavantages que présentent les technologies citées précédemment : la basse résolution de ces systèmes (~ 10 µm) et la nécessité d'utiliser des masques très spécifiques, ce qui bride l'exploration de nouveaux *designs*, géométries et agencements des canaux dans les puces. Nous nous sommes alors appuyés sur l'insolation d'une résine par passage successifs d'un laser.

B. Principe de fabrication à niveaux de gris

Pour le protocole de base et le principe de fabrication nous nous sommes inspirés des travaux alors réalisés dans l'équipe par A. Naillon et P. Joseph *(Naillon et al., 2017)* soutenus par la plateforme de fabrication en salle blanche par R. Courson. La machine que nous avons utilisée est la Dilase 750 commercialisée par Kloe. Ce système est hautement personnalisable, offrant de multiples possibilités de sources de lasers ou encore de tailles de faisceaux. L'écriture laser en direct, ainsi pilotée, peut être effectuée sur de nombreux types de substrats. La figure 2.21 A et B présente schématiquement l'objectif à réaliser : ajouter une pente de profondeurs dans la constriction de la puce. Dans les travaux cités précédemment *(Naillon et al., 2017)* les pentes étaient réalisées dans des canaux droits, générer les lignes d'écritures laser pour réaliser des motifs un peu plus sophistiqués représente le premier challenge. Ce point sera développé lors de la présentation des fichiers d'écritures lus par la machine Dilase 750. Le deuxième

challenge réside dans l'optimisation des différents et nombreux paramètres physique du laser en lui-même. Ces paramètres, illustrés dans la figure 2.21 B, sont :

- "v", la vitesse d'écriture, c'est la vitesse à laquelle se déplace la machine supportant le laser.
- "p", le pas de recouvrement, c'est la distance entre deux passages consécutifs de laser.
- "D", le diamètre du faisceau, c'est un paramètre intrinsèque au laser choisit dans la machine.
- "m", la modulation de la puissance du laser. Elle est contrôlée dans les fichiers de pilotage sous forme de pourcentage.

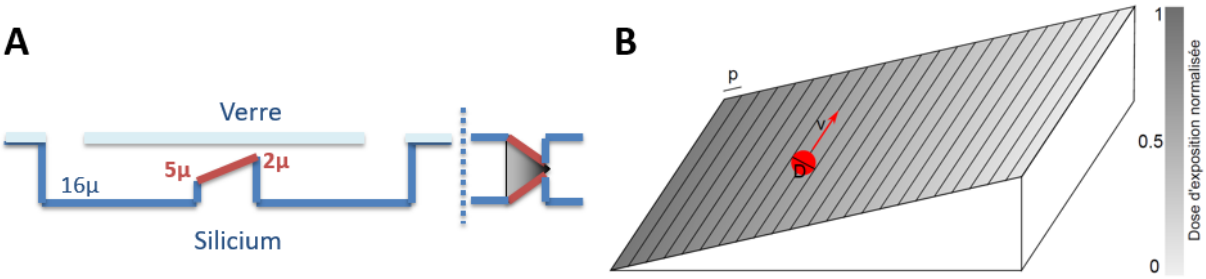


Figure 2.21 Schéma d'une puce microfluidique avec une profondeur en pente. **(A)** Représentation d'une puce vue en coupe (à gauche) et du dessus (à droite). Le canal profond (16 µm) présente une seule valeur de profondeur et peut être réalisée en une étape de photolithographie classique. La constriction (en orange) présente une pente de profondeur. **(B)** Illustration des différents paramètres relatifs à la lithographie laser à niveaux de gris, tiré de *(Naillon et al., 2017)*.

L'ensemble de ces paramètres régissent le principe d'insolation locale sur la résine. En effet, l'énergie ainsi transmise à la résine influe directement sur la vitesse de développement dans l'étape suivante. En modulant cette énergie transmise, via un paramétrage fin du principe, il est alors possible d'obtenir des épaisseurs de résine différentes sur le substrat en fonction des motifs voulus. Il est possible d'avoir une idée de la dose d'insolation (en J/m²) après un passage de laser en faisant l'hypothèse que la puissance du laser (P_0) est constante selon toute la section du faisceau :

$$E \sim \frac{mP_0T}{\pi D^2}\frac{D}{v} \tag{2.6}$$

Pour réaliser l'écriture d'un motif, il faut en remplir la surface par balayage du laser. Plus le balayage est serré (p petit) plus la dose d'exposition augmente, il y a passage du laser plusieurs fois au même point. Le pas de recouvrement p maximum est le rayon du faisceau, chaque point doit être balayé au moins une fois.

C. Génération des fichiers de contrôle du paterne d'écriture laser

1. *Organisation des fichiers entre eux*

La Dialse 750 lit des fichiers *.dfl* pour piloter l'écriture du laser. Ces fichiers *.dfl* sont des fichiers textes qui assemblent des géométries plus élémentaires. La géométrie élémentaire est la ligne, qui est décrite dans un fichier *.lwo*. Chaque fichier *.lwo* décrit une ligne dans l'espace en lui attribuant des coordonnées de départ et d'arrivée et doit inclure des longueurs de stabilisation, avant et après allumage du laser (Fig. 2.22 A/partie haute). A partir de ce fichier il est uniquement possible de paramétrer l'orientation de la ligne et les longueurs. Les paramètres de modulation, vitesse ou pas de recouvrement sont ensuite attribués à chaque *.lwo* via le fichier *.dfl* (Fig. 2.22 A/partie basse). La méthode d'attribution est effectuée par calcul via un programme Matlab et cette étape forme un véritable masque numérique qui peut être changé à souhait très aisément une fois le code correctement paramétré *(Annexes I.A&B, p. 187)*. Ce masque, bien entendu calqué sur le design voulu, peut prendre diverses formes dont 2 sont montrées en exemple dans la figure 2.22 B : un canal droit et une constriction.

Jusqu'ici les travaux antérieurs *(Naillon et al., 2017)* et les modèles intégrés dans le programme de conception *KLOE design* nous ont permis de mettre en place les parties simples de nos puces, les canaux droits. Mais les séparations µLAS font intervenir une constriction et intégrer les deux procédés doivent graver un entonnoir en 2.5D. Le canal droit (Fig. 2.22 B/partie haute) est plus facile à produire car la génération d'une seule ligne est nécessaire. Celle-ci, de longueur constante correspondante à la largeur du canal, est ensuite simplement translatée pour atteindre la longueur souhaitée pour le canal. Le nombre de ces translations est déterminé par $i = \frac{L}{p}$, le rapport entre la longueur du canal et le pas de recouvrement. Pour chacune de ces itérations une nouvelle modulation est alors attribuée.

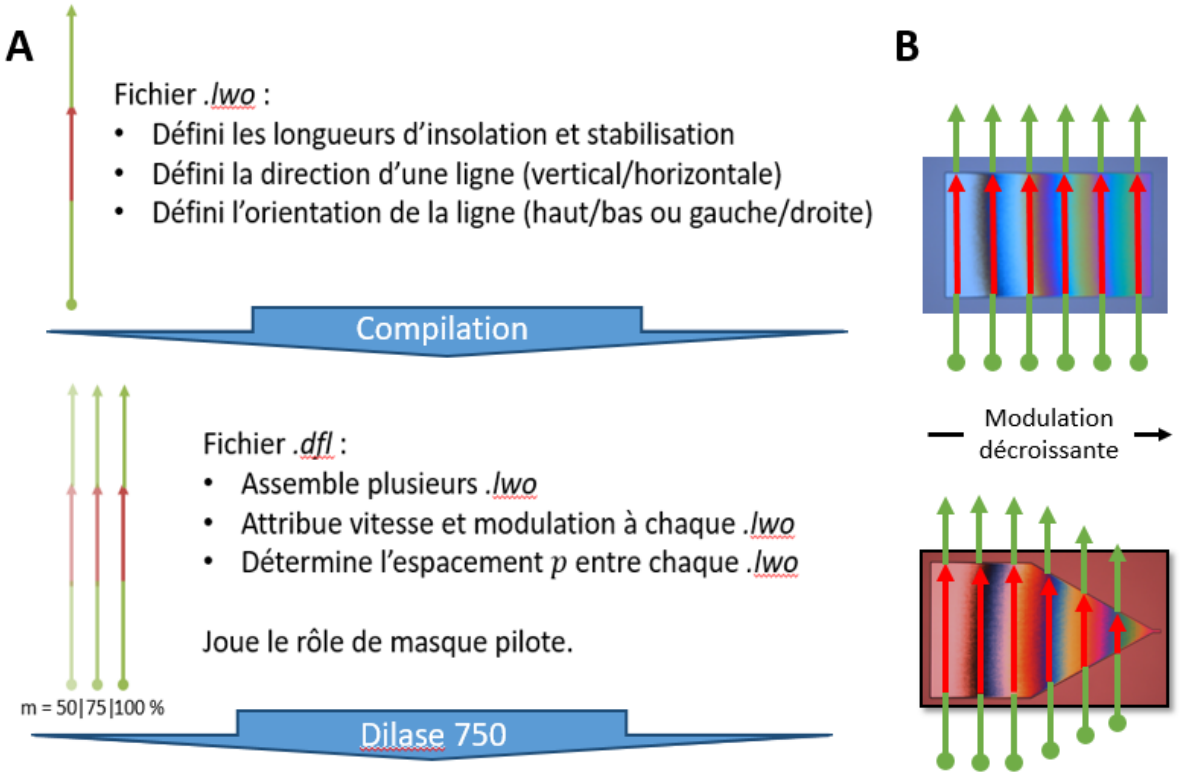


Figure 2.22 Organisation générale des fichiers nécessaires pour écriture laser direct, sans masque, par la machine Dilase 750. La première étape est la construction d'une ligne constituer de 3 longueurs : en vert les longueurs de stabilisation et en rouge la longueur d'insolation. Ces lignes sont compilées dans le fichier directement lu par la machine. A chaque ligne est attribué une modulation de puissance pour induire la pente.

Par contre, même si ce principe reste le même pour le deuxième design présenté (la constriction, Fig. 2.22 B/partie basse) il a fallu développer une méthode en adéquation avec la façon dont la machine lit les fichiers, mais qui reste simple à écrire. Pour chaque itération il faut calculer la longueur de ligne correspondante et générer le fichier *.lwo* ainsi qu'attribuer les bonnes coordonnées. La translation n'est plus si simple mais l'ensemble a été programmé d'abord pour servir l'objectif voulut. Nous verrons par la suite que ce système a été optimisé pour accélérer le processus d'écriture des lignes par la machine. Nous avons alors choisi d'implémenter un code qui génère les *.lwo* qui correspondent au design souhaité, qui peuvent être très nombreux en fonction du pas de recouvrement et de la longueur du motif *(Annexe I.C, p. 190)*. Il suffit pour cela de choisir la fonction mathématique correspondante aux contours du modèle de constriction. Cette partie du code génère ensuite toutes les lignes qui vont comme « remplir » la surface à insoler. Le nombre de lignes ainsi calculées dépend encore de la

longueur de la constriction et du pas de recouvrement. Chacune possède sa propre longueur pour s'ajuster à la forme choisie, elles sont ensuite centrées, translatées pour former le paterne final et enfin une modulation de puissance du laser est attribuée à chacune.

2. Écriture en des lignes en aller-retour

Nous avons optimisé la façon d'écrire les lignes par la machine. De façon naturelle le programme de base vise à générer les lignes de la manière la plus simple possible. Il tend à écrire par défaut des lignes avec des coordonnées de départ alignées (Fig. 2.23 à gauche). Bien que la puissance de calcul ou l'effort impliqué dans le code soit minime avec cette méthode, la contrepartie se retrouve dans le temps d'insolation bien plus rallongé. En effet le support mécanique du laser doit revenir à chaque fois s'aligner sur les points de départ, qui sont tous du même côté du paterne, ce qui engendre du temps où le laser n'est ni en stabilisation ni en écriture (Fig. 2.23 à gauche/flèche noire), c'est donc du temps mort inutile.

Nous avons opté pour une stratégie qui réduit les temps d'écritures beaucoup trop long pour nous permettre des essais de designs de puces et pour optimiser le procédé de fabrication. En alternant les orientations des lignes et donc les points d'origines de celles-ci, il est possible de drastiquement réduire le temps d'écriture (Fig. 2.23 à droite). Par contre la façon dont sont générées les lignes et comment elles sont agencées entre elles a nécessité une plus grande implication. La complication réside dans le fait que quand une ligne est générée dans son *.lwo* propre, un sens lui est attribué. Dans les faits, pour un canal droit, comme la longueur reste toujours la même de ligne en ligne, il faut juste générer une ligne supplémentaire, dans le sens opposé, et les intercaler lors de l'assemblage du paterne (Fig. 2.23 à droite). Encore une fois, pour la constriction rien n'est moins simple puisque à chaque itération et donc à chaque ligne la longueur change et est même très spécifique pour coller à la forme du modèle. La méthode que j'ai choisie est relativement est de générer le modèle en double, créant une série de lignes dans un sens comme expliqué précédemment et une autre série de lignes dans l'autre sens. Nous appellerons ces deux séries, respectivement, « paires » et « impaires » car c'est comme ça qu'elles sont choisies par le programme. En effet lors de l'assemblage du paterne le programme pioche un coup sur deux dans une série puis l'autre pour former le modèle final avec des points d'origines en quinconce.

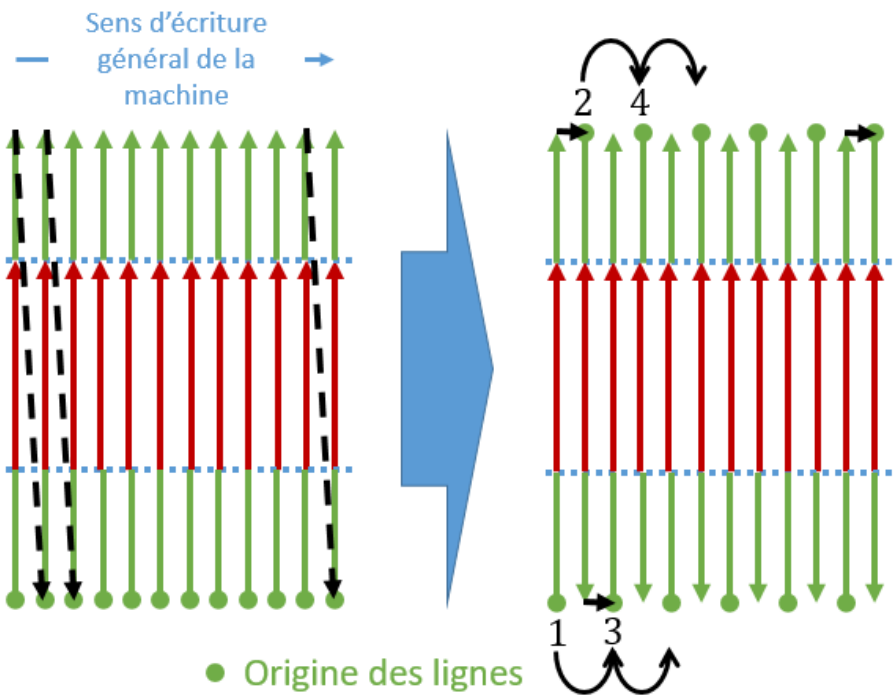


Figure 2.23 Optimisation de la génération des lignes. A gauche, la méthode d'écriture sans aller-retour, le temps d'écriture est long. A droite le temps d'écriture est environ divisé par 3 en implémentant une méthode d'écriture en aller-retour.

Cette modification peut paraître anodine pour la l'effort fournit mais elle renforce l'aspect pratique et polyvalent de cette méthode d'insolation. Sur un motif unique, elle n'a pratiquement pas d'intérêt, mais sur un wafer complet comprenant l'écriture de 30 puces constituées d'approximativement 144k lignes, la différence est énorme. D'après les tests que nous avons réalisés le temps d'écriture est environ divisé par 3, passant d'un temps d'écriture de 6h (sans aller-retour) à 2h (avec aller-retour). Des exemples de fichiers *.dfl* et *.lxo* sont disponibles en annexes I.D, p. 192.

D. Optimisation du protocole de fabrication

L'insolation est réalisée après revêtement du silicium par la même méthode déjà décrite en III.A.1.a du même chapitre. La largeur du faisceau est de 20 µm et le laser passe par un filtre de 405 nm et plusieurs pour en atténuer la puissance : un filtre de 1 % positionné sur le porte filtre et un filtre de 30 % positionné sur le porte objectif. Le protocole de développement a été modifié pour correspondre aux objectifs de qualité que nous nous étions fixés avec notamment

un recuit allongé à 115°C pendant 120 secondes. Le temps de développement est critique et doit être surveillé avec attention. Un temps de développement trop court ou trop long entraîne une pente très plate (voire inexistante) respectivement sous-développé au niveau de la résine ou sur-développé au niveau du silicium (Fig. 2.24). L'ensemble des mesures présentées sont effectuées au profilomètre mécanique.

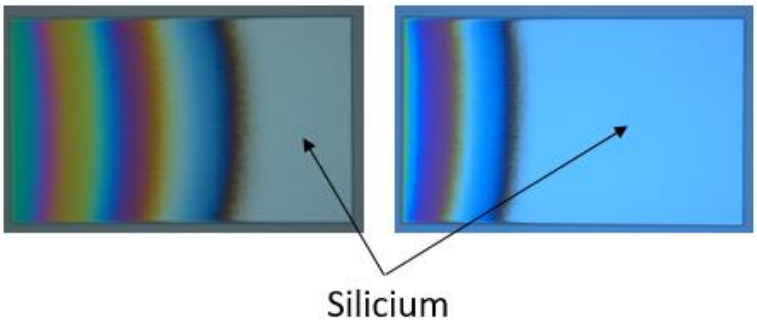


Figure 2.24 Deux exemples d'échantillons sur-développés. Ces deux rectangles (dimensions 1 mm x 1.665 mm) présentent 2 zones distinctes. Une région avec une pente (contrôle visuel grâce aux teintes de Newton) et une région avec le silicium à nu.

1. Gammes de tests et résultats généraux

Des gammes de tests sur l'ensemble des paramètres ont été réalisées afin d'optimiser le protocole de fabrication. L'ensemble de ces critères ont été testés de la manière qui nous semblait la plus efficace, si nous pouvions combiner les tests de plusieurs paramètres pour gagner du temps, nous l'avons fait. A noter qu'au début les temps d'insolations ont été très long, dès lors que l'écriture des lignes a été optimisée par la méthode explicitée précédemment (écriture en aller-retour) les tests ont été grandement accélérés. Une liste des paramètres et quelques-unes de leurs valeurs sont présentés ci-après :

- Lignes verticales vs lignes horizontales
- Pas de recouvrement : 3, 4, 5 µm
- Différentes vitesses d'écritures : 2, 4, 6 mm/s
- Différentes longueurs de stabilisations : 0.5, 1, 1.5 mm
- Différentes gammes de modulations et la discrétisation dans une gamme.

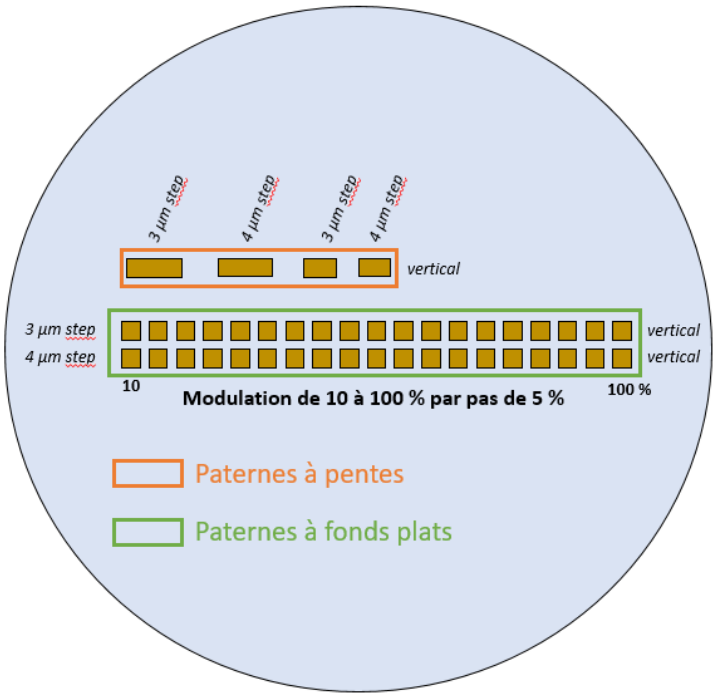


Figure 2.25 Exemple de design de calibration. Plusieurs paramètres sont testés en même temps ici comme le pas de recouvrement et les modulations de la puissance du laser. L'ensemble de ces carrés forment une échelle de calibration pour construire une loi : profondeur en fonction de la puissance.

Nous n'allons pas détailler l'ensemble des résultats mais seulement les résumer ci-après car la plupart découlent de nos observations empiriques. Néanmoins il peut être intéressant de noter les points suivants.

Nous n'avons par exemple pas remarqué de différence notable entre l'utilisation de lignes verticales ou horizontales. Pour la suite nous n'utiliserons plus que des lignes verticales. Les longueurs de stabilisation ont été graduellement augmentées alors que nous constations moins de rugosité et d'artefacts à la surface de la résine. Nous avons arrêté nos tests sur une longueur de stabilisation de 1.5 mm, ce qui présentait un bon compromis entre performance et temps de procédé supplémentaire. La vitesse d'écriture impacte directement la dose d'exposition, nous avons donc exploré une gamme assez large de vitesses pour baliser les profondeurs que nous souhaitions insoler. Plus la vitesse est importante et plus l'énergie transmise est faible. De plus, nous avons noté que des vitesses importantes imposaient des longueurs de stabilisation plus importante pour limiter l'impact des vibrations mécaniques dans le système. Nous avons donc opté pour une vitesse d'écriture faible (4 mm/s). Cette étape n'était pas guidée par l'objectif d'obtenir une profondeur particulière car nous pouvions moduler la

puissance du laser par la suite en fonction de celle-ci. Enfin le pas de recouvrement a été lui-aussi très largement testé car induisant une rugosité de surface sur la résine après insolation. Nous n'avons pas trouvé de pas de recouvrement idéal, nous avons arrêté notre choix sur celui qui présentait les meilleurs résultats vis-à-vis de l'objectif de profondeur désiré (1 µm). Néanmoins la rugosité de surface a été réduite par une méthode de défocalisation du laser qui sera plus amplement détaillée dans la partie IV.D.3 ci-après.

2. Gamme de modulation de la puissance du laser : limites et discrétisation

Les rectangles réalisés à puissance constante pour calibrer une gamme de modulation sont présentés en figure 2.26 A. Très rapidement nous avons vu une irrégularité dans la représentation de la profondeur en fonction de la modulation. L'énergie transmise ne semblait pas linéaire (Fig. 2.26 B).

Nous avons donc décidé de moduler la puissance du laser de 10 à 50 % pour éviter cette non-linéarité. Néanmoins nous constations toujours beaucoup d'irrégularité et un effet de « marches » dans les pentes (Fig. 2.27 en haut). Comme nous voulions réduire cet effet au maximum nous avons tenté de réduire le pas entre chaque modulation pour lisser la pente. Nous avons réduit ce pas au fur et à mesure de 5 % jusqu'à 0,1 %, tout en constatant une diminution des irrégularités dans la pente (Fig. 2.27 en bas).

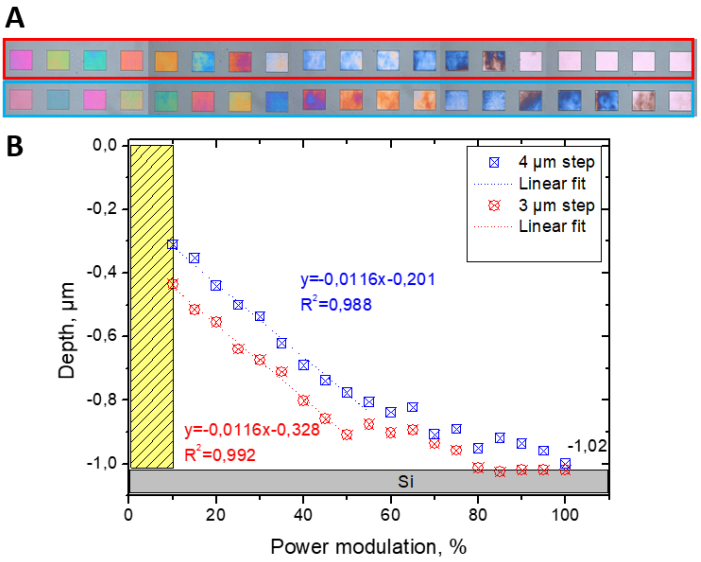


Figure 2.26 Calibration de la modulation de la puissance du laser. **(A)** Rectangles à puissance constante. Chaque rectangle représente une modulation de 10 à 100 % par pas de 5 %. **(B)** Représentation de la profondeur développée dans la résine en fonction de la modulation de l'énergie transmise.

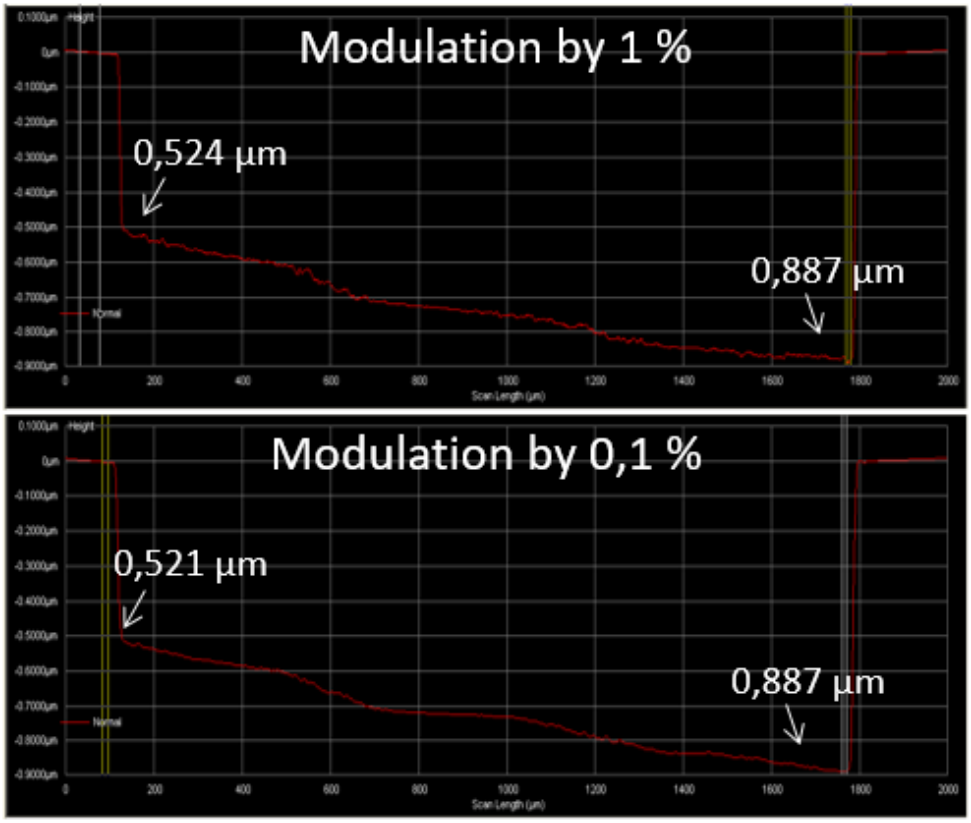


Figure 2.27 Différence entre des pentes réalisées avec un pas de modulation de 1 % et de 0,1 %.

3. Défocalisation du laser

Une autre piste que nous avons explorée en parallèle est la piste de la défocalisation du laser pour lisser la pente et réduire les irrégularités. Cette piste nous a été donné par R. Courson, alors responsable de la machine.

Lorsque nous avons décrit les coordonnées pour l'écriture des lignes nous n'avons pas détaillés lesquelles. Lorsqu'une ligne est appelée (pour rappel à travers un *.lwo*) un point d'origine doit être défini et ce point d'origine est ensuite modifié procéduralement en fonction de la méthode d'écriture et du design de la puce. Les coordonnées ainsi définies sont en x et y dans le plan du wafer. La dernière coordonnée ne peut être fixée à l'avance car la coordonnée z doit être mesurée précisément avant chaque écriture en faisant le focus du laser sur la surface de la résine. Cette valeur de focus ne change pas radicalement d'un procédé à un autre mais il doit être fait rigoureusement pour insoler la bonne dose dans la résine. Une fois le focus du laser effectué, il est possible de changer la cote automatiquement pour chaque ligne. Nous avons ainsi testé plusieurs coordonnées en z : focus, focus + 100 µm et focus – 100 µm.

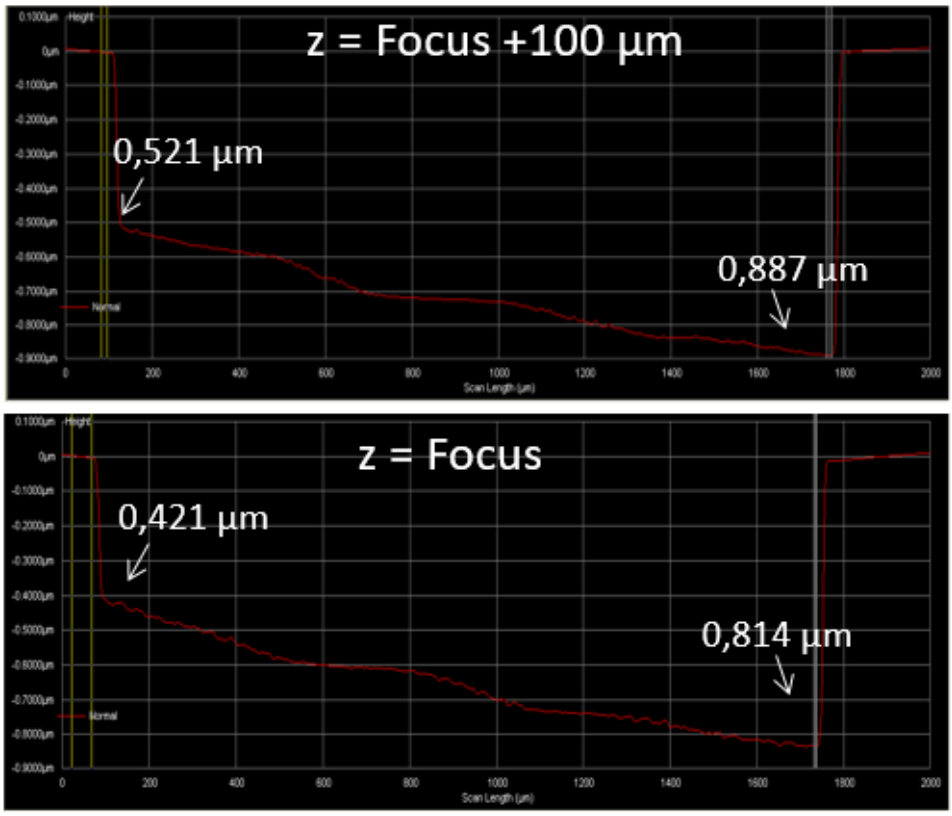


Figure 2.28 Différence entre des pentes réalisées avec ou sans défocalisation.

Nous avons constaté deux effets à la défocalisation du laser. Premièrement l'énergie transmise est plus importante lorsque le laser est légèrement hors-focus (+ ou – n'a pas d'importance). Deuxièmement nous avons constaté un effet de lissage et une diminution de la rugosité de surface sur la résine. Mais aussi une diminution de la transmission de la rugosité après gravure.

E. Gravure

Après l'optimisation du protocole d'écriture direct des designs par le laser mais aussi le dépôt de la résine et le développement il a été nécessaire de vérifier quelles profondeurs étaient transmises par gravure sèche. Le choix de la recette de gravure joue un rôle crucial ici. Pour rappel, la recette de gravure influe sur la vitesse de gravure du substrat et de la résine. Dans les cas classiques, comme décrit dans la partie Chapitre 2.III.B, on adapte sa recette et son temps de gravure à la profondeur finale voulue et à l'épaisseur de résine. La figure 2.29 illustre ce

qu'il peut se passer pour la pente en fonction de la sélectivité de la recette. Une sélectivité inférieure à 1 diminuera la pente et donc l'ensemble du protocole perd de son intérêt. Une sélectivité de 1 transmet la pente exactement. Le choix d'une sélectivité supérieure à 1 permet d'amplifier la pente (Fig. 2.29).

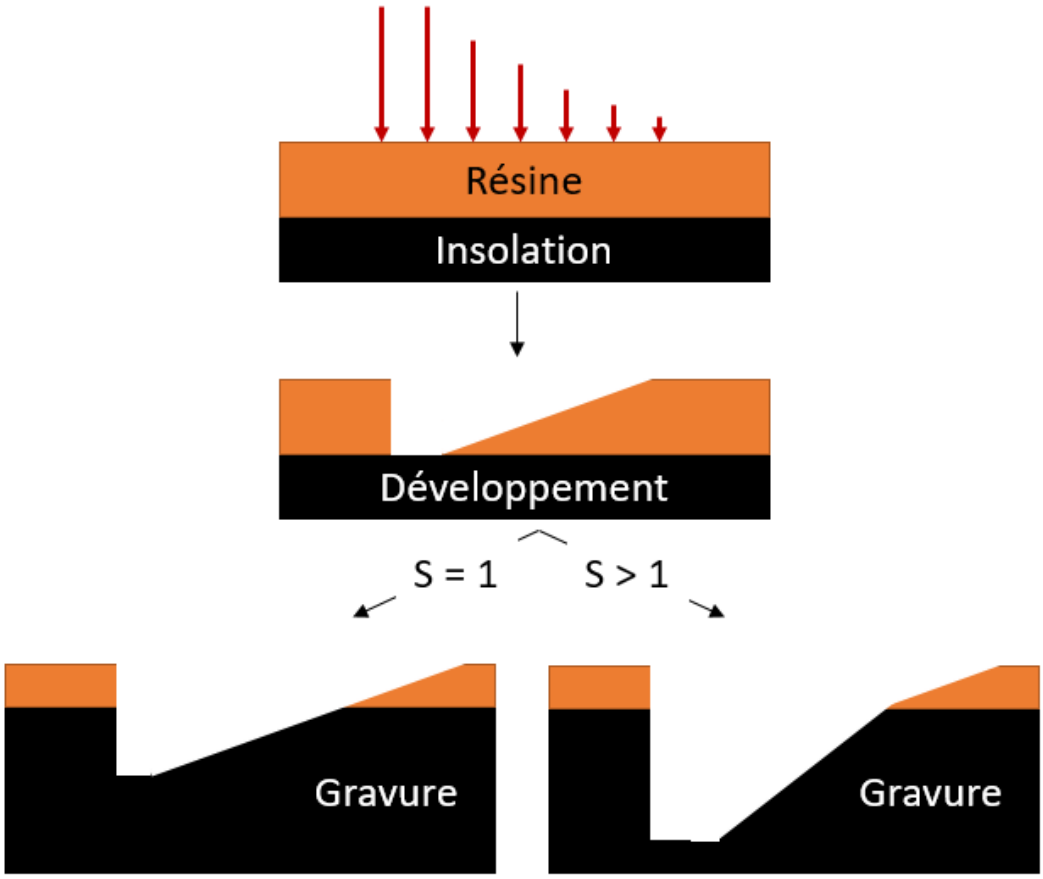


Figure 2.29 Récapitulatif des étapes de fabrication par écriture laser directe. **(1)** Enduction de la résine (en orange) sur une plaque de silicium (en noire). **(2)** La résine est insolée par passage successifs de lignes laser pour dessiner le paterne. **(3)** Développement de la résine, plus ou moins, en fonction des paramètres d'insolation. **(4)** Gravure du silicium. La sélectivité de la recette de gravure peut permettre de d'amplifier ou d'atténuer la pente ainsi induite.

Par la méthode décrite au Chapitre 2.III.B, nous avons noté une très bonne transmission de la pente dans le silicium, avec une sélectivité de 10 (Fig. 2.30), elle est même amplifiée. Il apparaît alors qu'il est possible de choisir et d'ajuster la bonne recette, et donc la bonne sélectivité, pour jouer autours de la pente. Cela donne encore plus de polyvalence à cette technique.

La technique ainsi mise au point permet l'intégration de pentes en 2.5D dans des processus de fabrication déjà bien établis. Nous avons élargi l'échelle de taille d'un tel processus, *(Naillon et al., 2017)* ont montré la réalisation de canaux de 400 µm de long pour des profondeurs de gravure de l'ordre de 0.5 µm. Nous avons également soulevé des problèmes de rugosité (Fig. 2.28 et Fig. 2.30 (3)). Nous avons caractérisé l'état de surface du silicium avant tout processus (juste après polissage) R_1, après le processus de gravure R_2 et enfin après l'oxydation R_3. Nous avons mesuré respectivement des valeurs de rugosité de $R_1 \cong 5$ Å, $R_2 \cong 60$ Å et $R_3 \cong 40$ Å. Nous avons noté que le processus de croissance d'une couche d'oxyde supérieure à 200 nm permettait de réduire la rugosité de surface après gravure.

Nous présenterons des résultats liés aux puces réalisées grâce à la technique de lithographie en niveau de gris, toutes intégrées, en perspective *(Chapitre 5 II., p. 166)*.

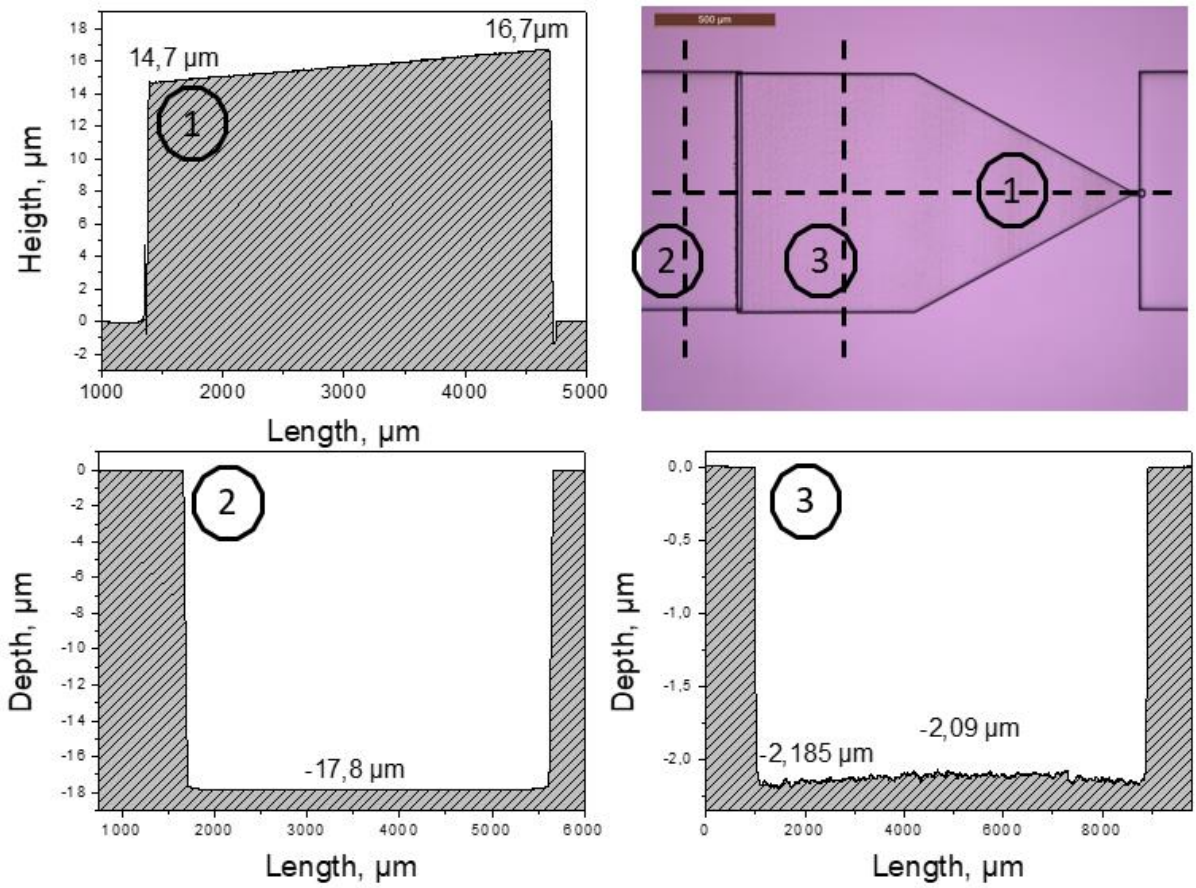


Figure 2.30 Résultat final de fabrication, observée en lumière blanche. Trois mesures de différentes coupes (1, 2 et 3) illustrent les différentes profondeurs, respectivement, parallèle à la pente dans la constriction, du grand canal et de la constriction perpendiculaire à la pente.

V. Conclusion

Nous avons introduit la technologie µLAS dans ce chapitre par les principes physique et technologique. Nous avons essayé d'établir le cheminement entre paramètres d'actionnement (pression/tension) et discrimination des molécules en taille via la génération d'une force transverse. Nous avons ensuite abordé les développements technologiques qui ont été réalisés, notamment sur la mise en place d'un mode de séparation temporel en format puce et le travail de formalisation des séquences d'actionnement pour µLAS pour préparer la présentation de la logique d'instrumentation qui sera faite dans le prochain chapitre. Nous avons également présenté une technique de lithographie laser pour graver des pentes dans du silicim. Nous avons essayé de mettre en évidence la polyvalence d'une telle technique, ainsi que la rapidité de mise en place que nous ont permis nos développements.

Chapitre 3

Instrumentation d'un banc expérimental et son automatisation

I. Instrumentation générale

A. Présentation et motivations

L'instrumentation puise son origine tout d'abord dans l'art, et plus particulièrement en musique. En sciences, l'instrumentation est une technique de mise en œuvre et d'interfaçage des systèmes de mesure, des capteurs et divers indicateurs, avec pour objectif d'aboutir à un système complet permettant l'acquisition d'un signal et son exploitation. Des instruments peuvent être trouvés dans de multiples domaines de la science et être appliqués à de nombreuses fins : dans les laboratoires, usines, moyens de transport mais aussi dans les foyers. Et les capteurs peuvent être aussi variés qu'il y a de grandeurs à mesurer : température, courant, tension, résistance, …

Mais pour arriver à cette l'étape de l'exploitation d'un signal, il est nécessaire de le rendre utile, ce qui peut être réalisé par le passage du pilotage via un ordinateur et une carte d'acquisition, qui constitue le maillon d'une chaîne d'instrumentation. Ces chaînes d'instrumentation peuvent servir de multiples objectifs comme l'observation de phénomènes, le contrôle qualité ou la surveillance. Mais il en est une qui motive directement l'intégration des différents systèmes régissant µLAS en une chaîne d'instrumentation : l'automatisation. Nous avons déjà parlé de séquences d'actionnement lors du précédent chapitre, lorsque nous décrivions la réalisation des concentrations/séparations par µLAS. Or une séquence d'actions prédéterminées peut être automatisée, car le dispositif doit toujours faire la même chose. Le système peut effectuer toujours la même séquence de tâches pour lesquelles il a été programmé ou répondre en fonction de ses propres mesures. Dans le domaine de l'automatique ce deuxième cas de figure est appelé *contre réaction*.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, l'automatisation des différents instruments pour µLAS n'était pas rentrée en ligne de compte lors des thèses précédentes et autres phases du projet. L'objectif défini est de réaliser un système d'acquisition de données, interfacé en un seul système de commandes, ayant la capacité de piloter l'ensemble des séquences µLAS. L'exception étant la thèse de N. Milon, qu'il a effectué en partenariat avec Adelis, dans laquelle l'utilisation de séquences automatisées par l'utilisation des machines

Agilent servait l'optimisation de séparation d'ADN de haut poids moléculaire. Mais aucun développement n'a été réalisé plus amplement jusqu'ici.

Plusieurs méthodes existent pour l'instrumentation des différents systèmes. Le simple signal *trigger*, un signal pulsé qui actionne une chaîne de commandes synchronisées sur l'ensemble des instruments. Les interfaces plus complètes sous LabVIEW ou C++, capables de faire simultanément la génération et la réception de multiples signaux.

Nous avons choisi d'utiliser LabVIEW car ce système a montré qu'il était un incontournable, depuis plus de 30 ans, des concepteurs de plateformes de contrôles *(Desnica, 2006 ; Keleshis, 2006 ; Fedak, 2003)*. Nous avons également installé un système d'actionnement par *trigger* dans un premier temps mais cette méthode a vite montré ses faiblesses, notamment avec le manque de contrôle sur les instruments. Enfin le C++ comme système de mesure et contrôle a été envisagé, mais les outils et instruments déjà en place (NI-DAQ multi I/O, MFCS-EZ, …) et les compétences déjà acquises ont fait pencher la balance en la faveur de LabVIEW.

1. Présentation de la chaîne d'instrumentation et de ses composants

La chaîne d'instrumentation est présentée schématiquement par la figure 3.1 et on distinguera 3 étapes dans la chaîne d'expérimentation mais deux seulement font partie de la chaîne d'instrumentation. L'étape A est l'étape de préparation d'échantillon qui ne fait pas partie de la chaîne d'instrumentation.

- Étape B : Cœur de la chaîne d'instrumentation, régit les commandes et contrôles lors de l'expérimentation. Les instruments sont pilotés par une application LabVIEW pour effectuer des séquences automatisées de commandes et des acquisitions de données vidéos.
- Étape C : Dernière étape de la chaîne d'instrumentation, c'est l'étape de traitement des données qui a été intégrée à la chaîne d'instrumentation de manière à automatiser le post-traitement des images.

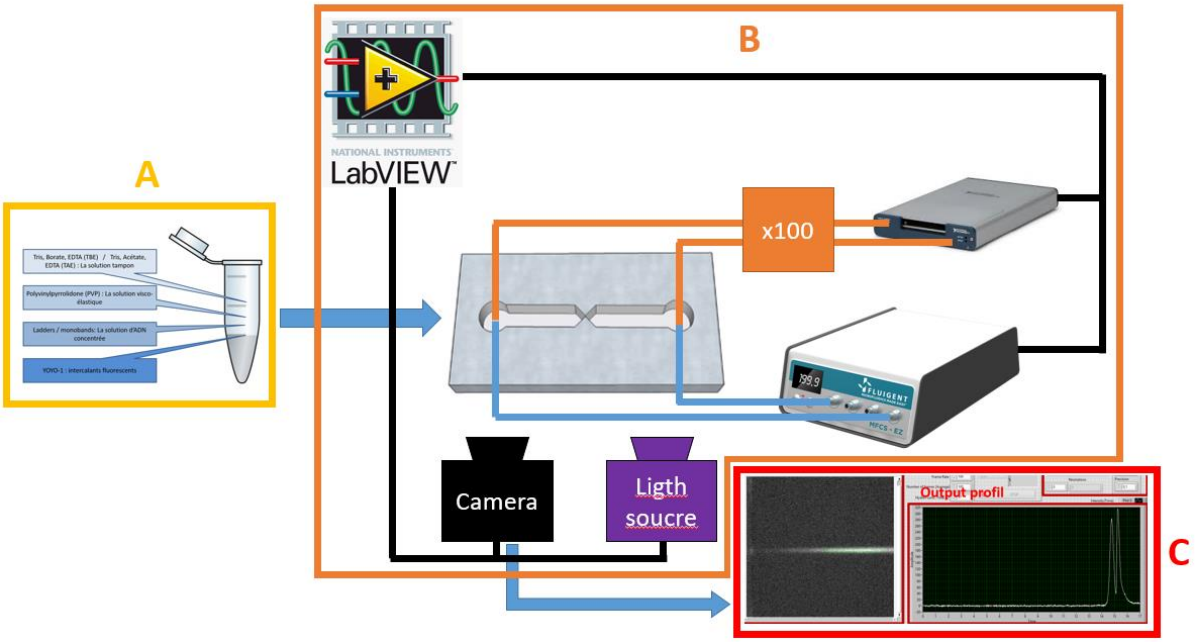


Figure 3.1 Schématisation de l'organisation du banc expérimental. **(A)** Préparation des échantillons, cette étape ne fait pas partie de la chaîne d'instrumentation. **(B)** L'ensemble des instruments sont piloté via une interface de mesure et de contrôle programmée sous LabVIEW. **(C)** Étape de post-traitement des données, effectuée sous LabVIEW de manière automatique.

2. Organisation du chapitre

Dans ce chapitre il est d'abord question de présenter l'outil qui permet la réalisation de l'application de contrôle des instruments : l'environnement de programmation LabVIEW. Cette partie consistera en la présentation des bases de programmation en langage G, le langage graphique utilisé dans LabVIEW. La présentation de ces bases du code en flot de données me semble essentiel pour comprendre les spécificités de la programmation par flot de donnée et pourquoi LabVIEW semblait être la meilleure solution pour réaliser cette plateforme toute automatisée.

La partie suivante présentera les outils ainsi développés pour réaliser les expériences avec un pilotage intégral par l'application. Il sera surtout question de présenter la vision du « plan d'expérience » intégré par programmation dans ces outils afin de réaliser une application complète, polyvalente et évolutive en fonction de nos besoins.

La dernière partie, enfin, présentera les calibrages et les tests qui ont été réalisés sur l'ensemble de la chaîne d'instrumentation afin de valider les différents maillons de la chaîne. Cette étape est nécessaire afin de nous assurer de la validité de nos résultats finaux.

B. Labview, un logiciel dédié à la programmation instrumentale

LabVIEW (pour *Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*) est un système de conception de systèmes de mesure et de contrôle d'instruments. Ce logiciel a été mis au point et commercialisé par la société National Instrument en 1986 *(Johnson, 1997)*. Les caractéristiques de l'environnement de programmation (que nous détaillerons ci-après) fait de ce logiciel un outil dédié à la programmation instrumentale. Le langage de programmation (appelé « G ») est dit de très haut niveau, notamment rendu accessible à des non-spécialistes grâce à une interface graphique omniprésente et une façon de coder que l'on pourrait qualifier de *What You See Is What You Get* (WYSIWYG) *(Travis, 2007)*.

Néanmoins on pourra noter que les particularités de cette façon de programmer ainsi que la subtilité de la programmation par flux de données peuvent entraîner des difficultés de maintenance pour les codes de ce type. Le langage G n'offrant pas d'équivalent textuel, il peut être très difficile de relire, de commenter et de réviser les différentes versions d'un code. Alors qu'il existe des outils de comparaison (côte-à-côte ou par différence) pour les codes sources textuels, ces moyens sont plus difficiles à mettre en place dans le cadre d'un code par schéma graphique *(Campisi, 2020)*. La mise en place et le démarrage de l'environnement *Run-time* pour LabVIEW est assez lourde, cela peut restreindre son utilisation à des applications plus grandes qu'un petit programme pour récupérer une seule valeur d'un système par exemple. Enfin on peut noter l'absence *(jusqu'à très récemment : « LabVIEW NXG 5.0 Manual – National Instruments », 2020)* de la possibilité de zoomer ou aggrandir le code sur l'interface graphique de programmation. Cela posait problème surtout pour les moniteurs de grande taille et/ou de haute résolution.

1. Le langage G, une programmation par flux de données

Tout programme exécute un schéma de commandes qui sont déterminées dans un code source. L'exécution d'un programme par flux de donnée suit un schéma graphique, appelé « diagramme » dans LabVIEW. Dans un diagramme l'organisation des icônes (fonctions ou nœuds) reliés par des fils colorés déterminent l'ordre dans lequel le code s'exécute. Ainsi la principale différence avec un langage à flot de commandes (Matlab, C++, Java, …) c'est que qu'un langage à flot de données supporte nativement la programmation multiprocessus. Chaque fil symbolise le passage des données. Les deux extrémités d'un fil sont une source, comme une valeur fixe ou le résultat d'une fonction précédente, et une cible, un paramètre ou l'entrée d'une fonction suivante.

Un langage par flot de commande s'ordonnance très naturellement du *haut du code* vers le *bas du code*, exécutant les commandes les unes à la suite des autres. Ce n'est pas le cas d'un langage par flot de données. Ce dernier, contrairement à ce que laisse penser la représentation graphique n'accorde aucune importance à l'emplacement spatiale des fonctions les unes par rapport aux autres pour leur attribuer un ordre d'exécution. Un fil ne transmet pas une donnée en continue mais seulement lorsque le nœud précédent se résout. Pour que le nœud précédent se résolve, toutes ses données d'entrée doivent être disponibles. Dans la figure 3.2, sur le diagramme, la fonction *multiplier* ne commencera son exécution que lorsque *l'addition* et *l'incrémentation de +1* n'auront mené à terme leur opération respective, rendant leur résultat disponible à la *multiplication*.

De cette règle découle une conséquence immédiate et très importante. Les nœuds qui n'ont aucun lien entre eux s'exécutent en parallèle. Si aucun fil ne relie deux fonctions, ils n'échangent pas de données et donc le code n'a aucune préférence à résoudre l'une ou l'autre avant. Toujours dans la figure 3.2, *l'addition* et *l'incrémentation* s'exécute en même temps ou en tout cas à une échelle macroscopique de temps il nous est impossible de déterminer quelle fonction prend la priorité. C'est une propriété qui facilite grandement le développement de codes nécessitant de gérer plusieurs processus en même temps *(Bress, 2013)*.

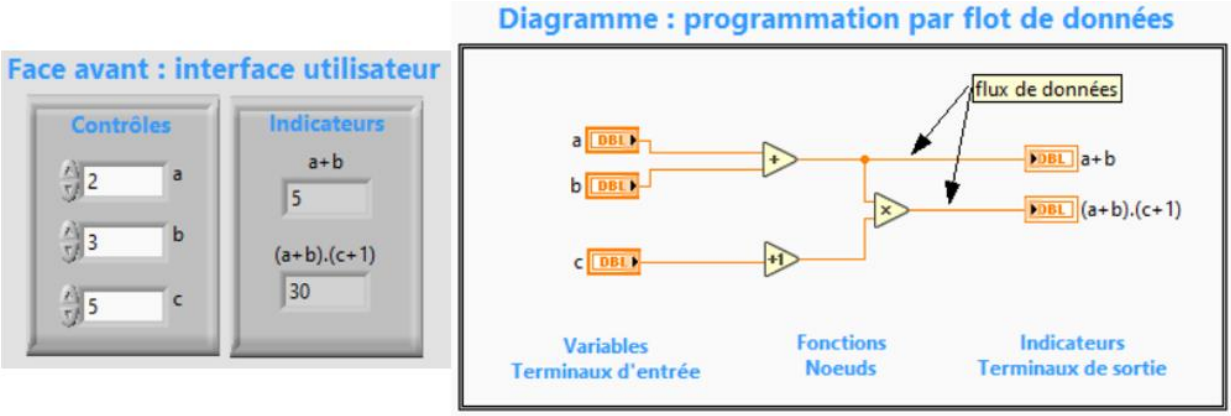


Figure 3.2 Face avant et Face arrière d'une machine virtuelle programmée sous l'environnement G de LabVIEW.

Cette manière d'aborder la programmation est très adaptée à l'instrumentation, mariant une conception procédurale à l'approche par flux de données. Pour µLAS l'exécution de plusieurs processus en même temps est un grand avantage. Cela peut être réalisé très facilement en juxtaposant des structures de contrôles *WHILE* (voir la prochaine section pour plus de détails).

2. Structures de bases

Comme dans les autres langages, à flux de commandes ou non, les structures de bases sont celles de l'algorithmique : les structures de contrôle. Ces dernières sont nombreuses et on en retrouvera des classiques comme les boucles (*WHILE*, *FOR*, …) ou les structures condition (*IF*) et d'autres moins comme les structures évènement ou séquence. L'objectif ici n'est pas de faire une description exhaustive de toutes ces structures, de leur fonction et de leur utilisation. Néanmoins il me semble nécessaire d'expliciter quelques-unes d'entre elles avant d'aller plus avant.

a. Les boucles

Les boucles *FOR* et *WHILE* sont des structures très classiques en algorithmique. Et elles sont à la base de beaucoup de code peu importe le langage, aussi bien par flot de commandes que de données.

La structure *FOR* exécute ce qu'il y a dans son diagramme un certain nombre (N dans la figure 3.3) de fois. La structure *WHILE* s'exécute quant à elle tant qu'elle ne reçoit pas l'ordre de s'arrêter. Il faut donc incorporer des moyens de contrôler cette structure. L'arrêt se fait via une commande utilisateur : un bouton. Un bouton est un contrôle booléen, c'est-à-dire qu'il ne peut prendre que deux valeurs, vrai ou faux. Ici par défaut le bouton renvoie la valeur « faux ». La boucle WHILE s'exécute donc indéfiniment tant que l'utilisateur n'actionne pas le bouton pour envoyer la valeur « vrai ».

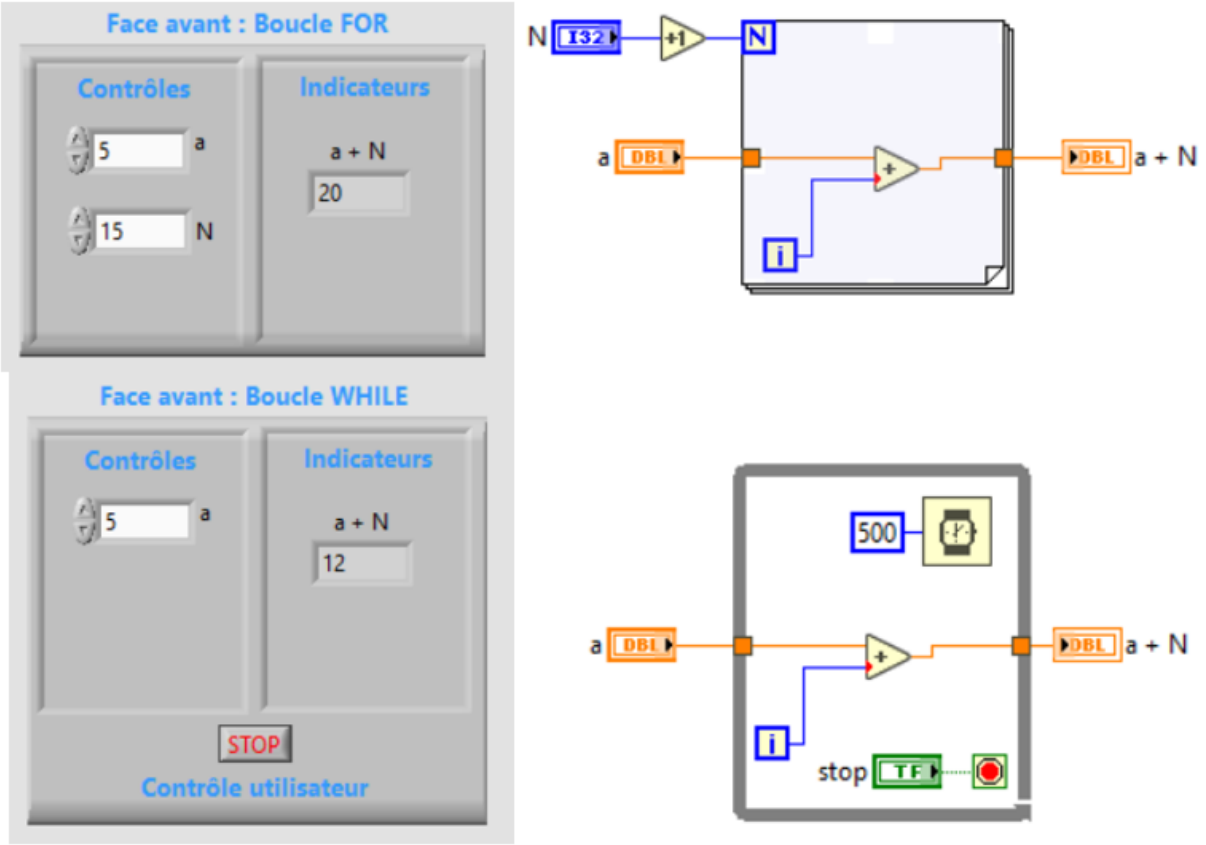


Figure 3.3 Face avant (interface utilisateur) et face arrière (diagramme ou code source) présentant une boucle FOR et une boucle WHILE.

Dans la figure 3.3, le diagramme de la boucle *FOR* s'exécute N fois au contraire la boucle *WHILE* s'exécute un certain nombre de fois qu'il n'est pas possible de déterminer immédiatement. La boucle *FOR* a besoin d'être déterminée par avance contrairement à la boucle *WHILE*. En effet, la première doit avoir en paramètre d'entrée N, le nombre d'exécutions. Que N soit déterminé par l'utilisateur ou calculé procédurale ment par avance, N

est toujours un paramètre d'entrée et ne plus être changé une fois la structure lancée. La structure *WHILE* est un peu plus souple car sa méthode d'arrêt étant dans la boucle, et donc peut être altérée en cours d'exécution. Ici c'est l'utilisateur qui choisit quand stopper la boucle mais cet arrêt peut être déclenché procéduralement via d'autres méthodes (par exemple par comparaison de valeur dans la figure 3.4).

b. ***Multiples processus nativement supportés : l'exécution des boucles en parallèle***

Pour exploiter la capacité native du langage G à la parallélisassions des tâches, plusieurs possibilités s'offrent au développeur. L'organiseur intégré au langage répartit et exploite au mieux les capacités de la machine sur laquelle le programme est exécuté. Il est possible de contrôler plus finement les priorités des fils d'exécutions (*Threads*) au sein des processeurs pour avantager telle ou telle opération au détriment d'une autre. Plus un ordinateur dispose de processeurs et de cœurs et plus les tâches peuvent être multiplexées.

La puissance de calcul d'une unité centrale se mesure en TFlop/s (le nombre d'opérations à la virgule flottante par seconde) que la machine est capable de réaliser. Par exemple la machine la plus puissante du monde *(top500 ranked systems, Novembre 2019)* est une machine mise au point par IBM *(Oak Ridge National Laboratory)* capable de raliser $148{,}6.10^{15}$ opérations à la virgule flottante par seconde. Ce système possède plus de 2 millions de cœurs et est dédié à la recherche dans les sciences informatiques.

Mais il n'est pas nécessaire de connaître tout cela dans les détails car mettre des tâches en parallèle est très intuitif en codant dans l'environnement de LabVIEW. Ce qui fait encore une force supplémentaire pour ce système. Juxtaposer deux boucles *WHILE* et s'assurer qu'elles n'ont aucun lien de type « maître-esclave » (c'est-à-dire qu'aucune ne dépend de l'autre) pour faire s'exécuter plusieurs commandes en même temps. La figure 3.4 propose un exemple de tâches s'exécutant en parallèle très simplement, ne nécessitant pas plus de connaissance que des notions de programmation de base en langage G. Faire quelque chose de similaire dans un langage tel que le C++ (par exemple) s'avère être bien plus gourmand en temps et connaissances à engager.

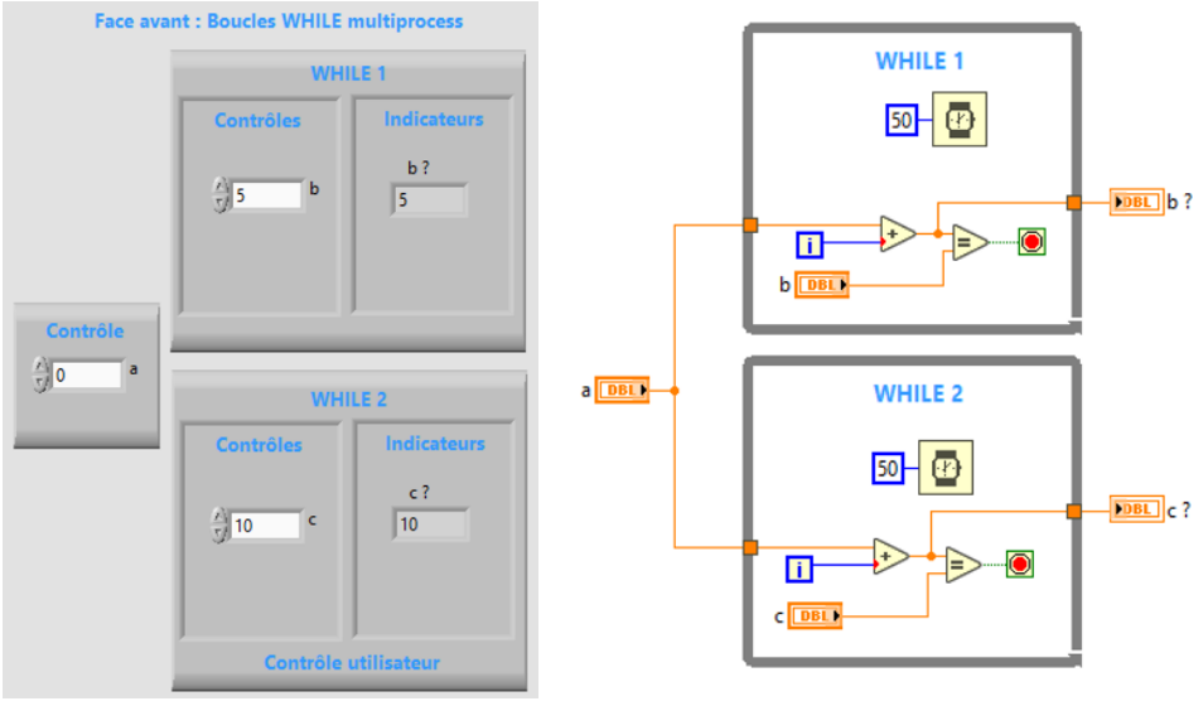


Figure 3.4 Code LabVIEW faisant s'exécuter deux boucles en parallèle. Les deux boucles ne dépendent pas l'un de l'autre.

La figure 3.5 propose un faux exemple de parallélisassions. La boucle WHILE 2 est asservie à la boucle WHILE 1. Les deux tâches s'effectuent l'une après l'autre et non en même temps.

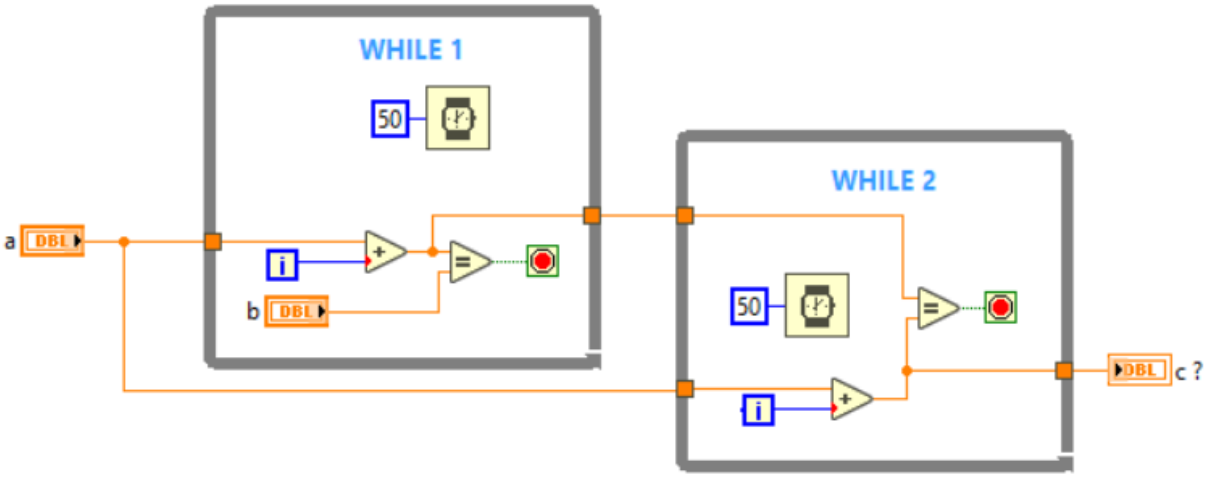


Figure 3.5 Schéma d'une relation de l'asservissement d'une boucle WHILE à une autre. La parallélisassions est impossible dans ce cas.

3. Structures avancées

De même que pour les structures de contrôle de base, il existe de nombreuses façons de programmer des structures plus complexes, plus à même à contrôler des applications plus grandes. Tous les langages ont leurs propres techniques de programmation, mais il en existe une qui se retrouve dans beaucoup de types d'environnement par sa flexibilité d'utilisation, sa lisibilité et sa polyvalence à être maintenue à jour : la machine à état *(whitepapers, 2011)*.

Toute machine à état tourne autour de trois concepts : l'état, l'événement et l'action. Les états sont les différentes positions ou statuts par lequel passe le système. Par exemple, dans la figure 3.6, il y a deux états : lumière allumée et lumière éteinte. Les évènements sont les déclencheurs qui ont un sens spécifique pour le système. Toujours dans la même figure, le déclencheur est le bouton *On/Off*. En dehors du programme, ce déclencheur n'a pas de sens, ce qui lui donne un sens c'est son lien avec le programme. Et pour cela, il faut introduire l'action. L'action est définie par la réaction du programme à l'évènement. Dans la figure 3.6, les actions sont les transitions 1 et 2. Tous ces concepts sont interconnectés dans la machine à état.

Le système passe d'état en état via des actions qui ont été déclenchées pas des évènements.

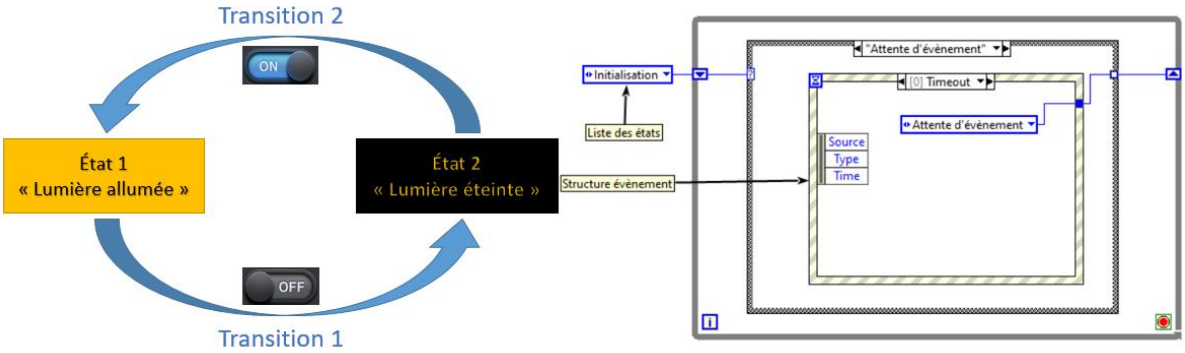


Figure 3.6 **Représentation d'une machine à état très simple d'une lumière.** La lumière s'allume et s'éteint (2 états) via l'actionnement d'un interrupteur (l'évènement).

En langage G la machine état est reflétée par un diagramme comprenant une structure condition et une boucle *WHILE* (Fig. 3.6 à droite). Les différentes conditions de la structure conditions sont les états de la machine. Dans l'exemple présenté en figure 3.6, une structure événement est comprise dans la machine à états. Une structure événement est capable d'attendre

et de détecter qu'un événement se produise et de réagir de façon appropriée. L'événement déclencheur peut être d'origine multiple, utilisateur ou provenir du programme en lui-même. L'événement en question peut aussi se présenter comme une valeur liée à l'actionnement d'un bouton de commande. La réaction peut être simple comme le calcul d'un nouveau paramètre ou plus élaborée comme une transition dans la machine à état.

Ici nous avons présenté la machine à état dans son appareil le plus simple. Nous développerons ce concept ainsi que tous les précédents dans la partie suivante pour présenter les outils développés.

II. Outils de séparation automatique intégrés

Au cours de ma thèse, plusieurs plateformes ont été développées séparément au fur et à mesure du temps en fonction des besoins. Puis ces dernières ont été regroupées au sein d'une seule et même plateforme afin de faciliter l'accès à toutes les fonctionnalités. La figure 3.7 présente l'interface utilisateur de la plateforme avec tous les outils développés. Il possible d'identifier les commandes de tous les instruments.

Il n'est pas question de présenter dans cette partie la face arrière correspondante de ce diagramme, il me semble plus pertinent de décomposer ce code, de le compartimenter en des parties plus petites, ce faisant facilitant la compréhension. Néanmoins une représentation schématique du diagramme du code source dans son ensemble est visible en figure 3.8.

Figure 3.7 Face avant de l'application. Interface utilisateur de la plateforme instrumentée et automatisée. Les différents éléments qui peuvent être identifiés sont les commandes pour le système de pression (en bleu), le système de tension (en orange), la source de lumière (en violet), la caméra (en jaune). En vert des indicateurs permettent à l'utilisateur de savoir en permanence ce que fait l'application et les différents instruments (en vert).

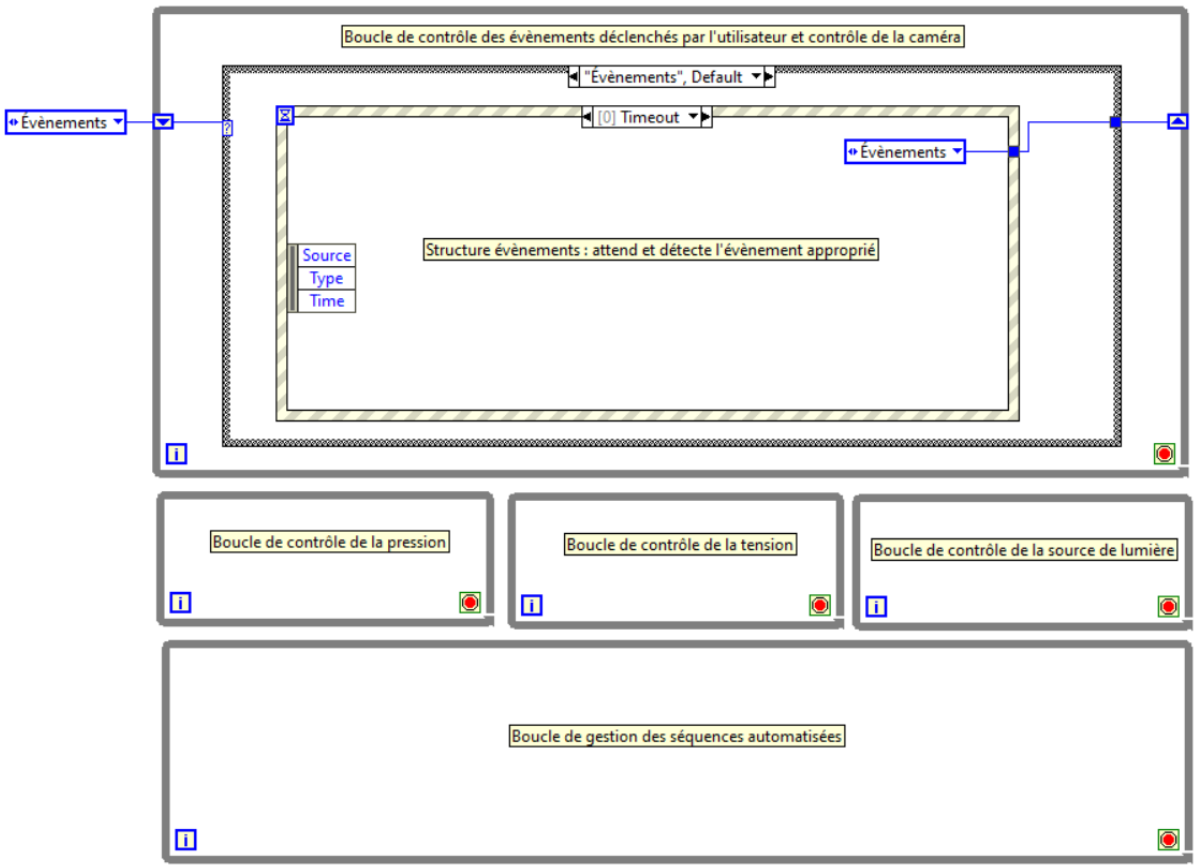


Figure 3.8 Diagramme schématique du mode de fonction de la face avant présenté dans la figure précédente. On peut constater cinq boucles WHILE indépendantes. Toutes les tâches décrites dans chacune de ces boucles sont donc exécutées en parallèle.

Le diagramme (Fig. 3.8) est découpé en cinq parties indépendantes, chacune représentée dans sa propre boucle WHILE. Cette compartimentation du système en sous-parties indépendantes permet une parallélisassions des tâches au sein de l'application. Les deux boucles les plus importantes sont la boucle de gestion des événements et la boucle de gestion des séquences automatisées. La première commande la machine à état, la caméra et la gestion de tous les paramètres de base des instruments. La deuxième exécute des séquences d'expérimentation en pression et en tension, en synchronisant tous les instruments au fur et à mesure du plan qui a été programmé dans la tâche. Cette boucle possède sa propre architecture en machine à état pouvant passer d'une séquence à une autre par un simple contrôle utilisateur. Des cases vides peuvent servir à implémenter (à la volée ou de façon définitive) d'autres séquences qui pourraient survenir en fonction des besoins ou de nouvelles applications.

Les trois autres boucles permettent de gérer en temps réel et en autonomie les autres instruments, respectivement, le contrôleur de pression, le générateur de tension et la source de lumière. Nous avons rapidement constaté les bénéfices d'une telle architecture.

Un petit système de mesure que nous avons mis en place permet à deux horloges de mesurer la cadence de fonctionnement hors de la boucle de contrôle de la caméra (Fig. 3.9 horloge (A)) et dans la boucle de contrôle de la caméra (Fig. 3.9 horloge (B)). Ces deux valeurs sont ramenées au nombre d'images traitées par la caméra puis comparées.

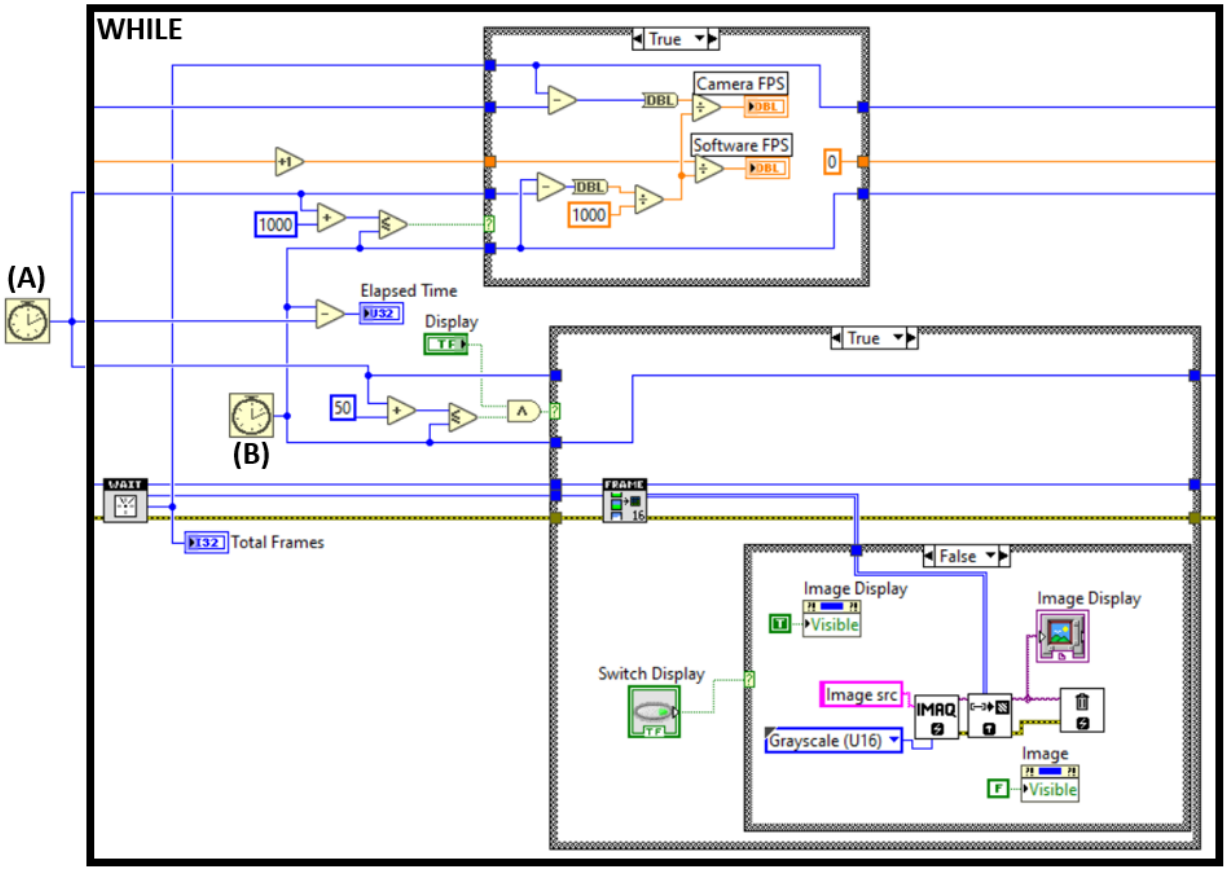


Figure 3.9 Boucle de fonctionnement de la caméra simplifiée. On peut distinguer deux parties. La partie du haut est un petit système de comparaison des cadences de fonctionnement. Celle-ci permet l'affichage du nombre d'images que l'application est capable de traiter ainsi que celle de la caméra. Dans le cas idéal ces deux valeurs doivent être strictement égales. La partie du bas récupère une image que la caméra vient de capturer et la convertie pour l'afficher dans un format spécial choisit par l'utilisateur au préalable (ici utilisant des fonctions de la bibliothèque IMAQ de LabVIEW).

Trois cas de figure peuvent se présenter alors. Si l'application est ralentie par une surcharge de tâches à traiter ou des données trop lourdes à sauvegarder, l'indicateur *Software FPS* sera inférieur à *Camera FPS*. Dans ce cas, la caméra continue à capturer des images qu'elle met en attente mais que l'application n'est pas en mesure de traiter. La boucle se *raye* et saute des images en quelque sorte. Le deuxième cas pouvant se présenter est une caméra ralentie, par des images trop lourdes à capturer puis à afficher en temps réel par exemple. Ce cas de figure est moins problématique car nous avons choisi de mettre la caméra au centre de l'architecture, c'est elle, au final, qui donne la cadence. Néanmoins, grâce à cette mesure, il nous est possible de contrôler la cadence d'acquisition de la caméra pour éventuellement vérifier l'origine des ralentissements. Le troisième cas de figure est tout simplement celui de deux mesures égales. C'est bien-sûr l'objectif visé.

A. Plateforme automatisée pour séparation temporelle

Les expériences de séparation par µLAS peuvent être découpées en 3 étapes : hydrodynamique, concentration et séparation. Chacune de ces étapes possède ses propres paramètres comme le temps de réalisation, la pression ou la tension. L'ensemble de ces paramètres d'actionnement forment une référence, véritable carte d'identité, d'un profil de séparation (Fig. 3.10, à droite). Pour couvrir la plus large gamme possible de paramètres, il est alors nécessaire de réaliser un plan d'expérience, associant des profils de séparation à des séquences d'expérimentation, nous permettant de guider notre réflexion, soit en terme d'optimisation ou encore analytiquement.

Les paramètres peuvent êtres fixes formant un ensemble de trois paramètres pour l'étape de concentration par exemple $[t_{conc}; P; V_{max}]$. Mais ils peuvent aussi varier au sein d'une étape, lors de la réalisation d'une rampe en tension par exemple. Alors, il y a démultiplication des paramètres d'actionnement qu'il faut tous définir. Nous avons choisi d'incorporer dans la plateforme un outil qui établit un plan d'expérience à partir d'un petit échantillon de paramètres. Le logigramme de ce programme est présenté en figure 3.10, et son interface utilisateur en figure 3.11.

La logique séquentielle permet de construire une gamme de test, composée de plusieurs expériences de séparation. Chaque expérience est alors différente, testant tour à tour différents paramètres d'actionnement. L'étape de réglage, la première, permet la mise en place du plan

d'expérience par une interface utilisateur. La logique passe ensuite par les différentes étapes d'expérimentation déjà décrites plus haut comme l'hydrodynamique, la concentration et la séparation. Ces dernières calculent et génèrent les paramètres d'actionnement comme la pression et la tension et pilotent les instruments correspondants.

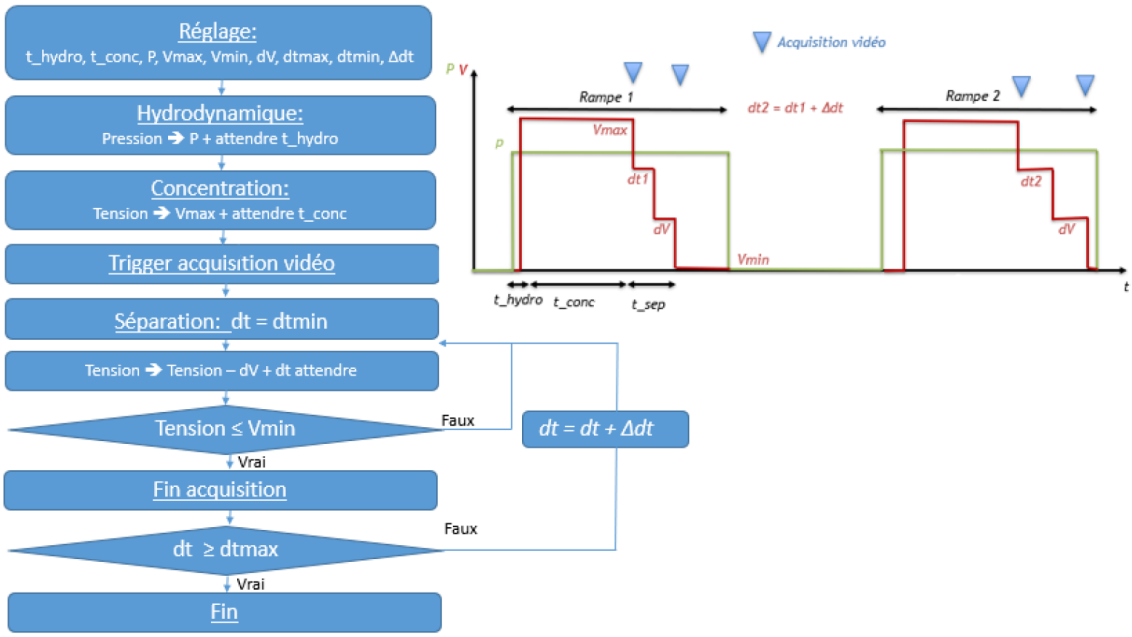


Figure 3.10 Logigramme des séquences de séparation en rampes linéaires (à gauche) ainsi que les profils d'expérimentations (à droite).

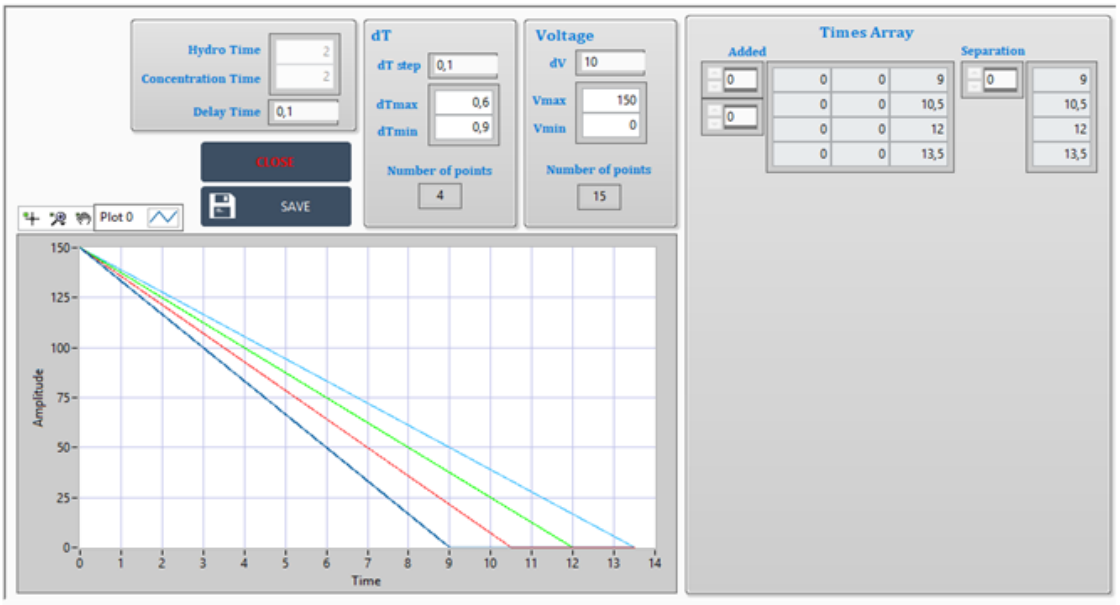


Figure 3.11 Face avant du programme de réglage des séquences de séparation automatisées.

Dans la figure précédente, 4 pentes sont générées procéduralement par le programme, selon des paramètres choisis par l'utilisateur en amont. Quatre expériences vont donc être réalisées, suivant chacune leur propre profil temporel. L'acquisition vidéo est synchronisée avec la séparation, permettant ainsi une récupération optimisée de l'information. Nous présentons ici l'interface qui génère des pentes linéaires en tension seulement. De telles interfaces ont été programmées pour tous les autres types de séquences que nous avons évoqués jusqu'à présent :

- Mode de séparation spatial et spatial *amélioré (Chapitre 2 II.C.2.c, Fig. 2.13 A&B, p. 74)*
- Mode séparation temporel pour séparation en puce *picolike (Chapitre 2 II.C.2.a, Fig. 2.10 B, p. 68)*
- Mode de migrations pour étude de la dispersion *(Chapitre 2 II.C.2.a, Fig. 2.11, p. 69)*

B. Contrôle de la caméra

La caméra utilisée et pilotée est une caméra de la marque Hamamatsu de la gamme ORCA Flash 4.0 lt+. C'est une caméra sCMOS présentant de bons avantages comme une connectivité simple et rapide (USB 3.0) et une très bonne sensitivité.

1. *Pilotage de la caméra via LabVIEW*

Le pilotage de la caméra a été une étape cruciale dans le développement de la plateforme. Nous avons développé plusieurs stratégies d'intégration avant de trouver celle qui convenait le mieux à nos applications. Le développement du système décrit dans la partie précédente (Fig. 3.9) nous a grandement aidé et guidé pour tirer le meilleur des performances offertes par cet outil d'acquisition d'images.

Malgré une cadence d'acquisition annoncée pouvant passer la barre des 30 FPS (pour *Frame Per Second*), nous n'avons dans un premier temps jamais pu la franchir. La caméra, connectée en USB 3.0 n'était même pas reconnue nativement par LabVIEW, via les bibliothèques IMAQ. Il nous a fallu reprendre certaines fonctions de contrôle de la caméra, avec les conseils du service Hamamatsu, pour se servir d'options de débridage « invisibles »

dans la SDK (pour *Software Development Kit*). Avec ce travail, nous avons eu la possibilité d'effectuer des acquisitions jusqu'à 1000 FPS et de mesurer cette cadence comme étant extrêmement stable. Ce dernier point peut sembler anodin, mais il simplifie grandement l'analyse d'image par la suite.

La synchronisation de la caméra est simple, des évènements viennent passer la boucle de contrôle de la caméra du statut « affichage » à celui de « affichage + sauvegarde ». L'acquisition est toujours lancée 1 s avant le début de la séparation et est arrêtée 1 s après. Pour des expériences complètes d'une durée de l'ordre de 35 s en moyenne seulement les 20 s de séparation sont acquises, ce qui réduit grandement la charge des données.

2. Données vidéo et structure d'acquisition

Une fois la synchronisation effectuée, nous fixons la cadence d'acquisition de la caméra à 100 images par secondes ce qui correspond à un intervalle de temps de 10 ms entre deux images consécutives, ce qui nous semble une performance acceptable pour l'ensemble de nos applications. En effet, cette valeur n'est critique que lorsque nous aborderons les études de dispersion dans le chapitre suivant. Ici le point clef est l'assurance que cette valeur reste fixe par le cadencement logiciel imposé à la caméra.

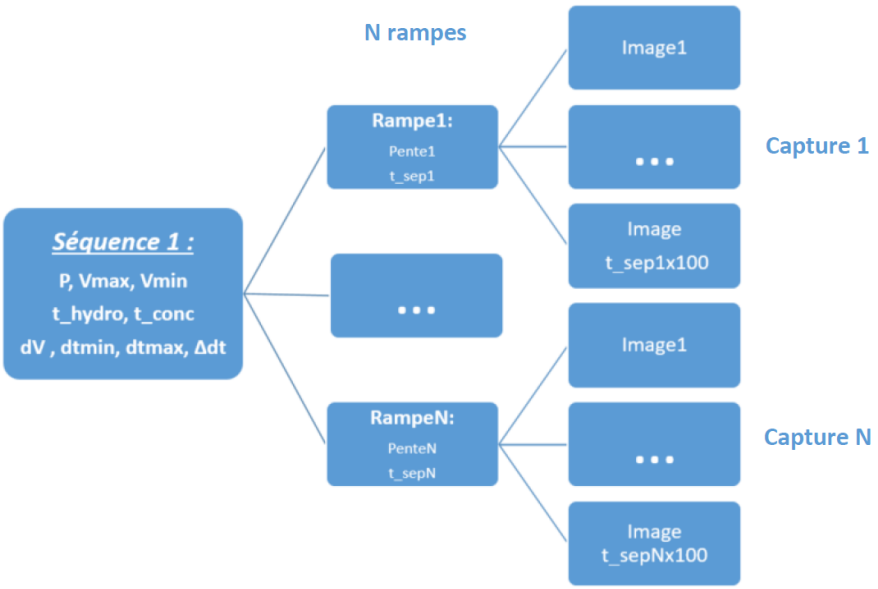


Figure 3.12 Arborescence des fichiers résultats après la réalisation de l'ensemble des expériences de séparation. Chaque dossier contient *n* images, dépendant du temps de séparation de la rampe correspondante. Il y a *N* dossiers représentant les *N* expériences réalisées lors du plan de tests.

Le résultat de l'acquisition vidéo est donc un dossier contenant $100.t_{sep}$ images au format *.tif* avec le temps de séparation t_{sep} en seconde calculé et fixé par le programme de réglage en fonction des paramètres de la rampe. La hiérarchisation des dossiers est présentée dans la figure précédente (Fig. 3.12).

C. Plateforme de post-traitement des données

1. Structure générale du sous-programme

Enfin le dernier maillon de la chaîne d'instrumentation permet le traitement des données vidéos acquises et de réaliser de multiples opérations. L'une d'entre elle est le *fitting* de plusieurs pics par des gaussiennes. Cette opération, réalisée normalement à la main via d'autres logiciels (IGOR par exemple), a été complètement intégrée à l'application et automatisée.

L'interface du programme de post-traitement est présentée dans la figure 3.13*)* et on notera dans un premier temps deux zones importantes. La zone 1 est l'affichage du traitement de l'image en cours. Toutes les images de toutes les séquences de séparation réalisées passent par cette zone. Une région d'intérêt (ROI pour *Region of Interest*, en jaune) est définie par l'utilisateur et le profil des intensités de pixel est tracé à partir de cette ROI. Le profil apparaît dans la zone 2 où il est possible de consulter l'ensemble des profils ainsi tracés.

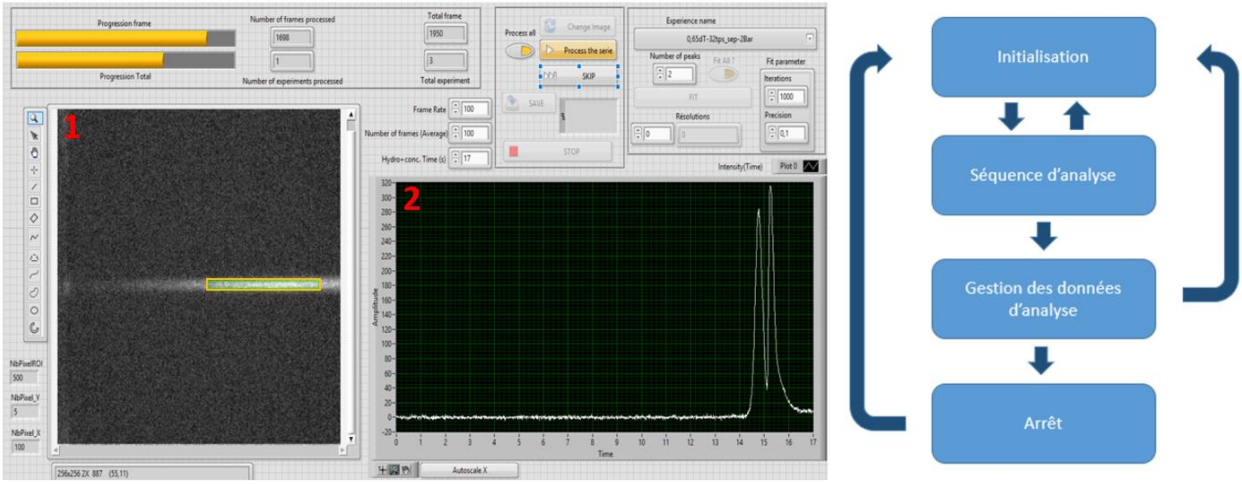


Figure 3.13 Face avant du programme d'analyse des images et structure en machine à état. **(1)** Images en traitement, la ROI somme les intensités des pixels. **(2)** Graphe de l'intensité de pixel en fonction du temps.

Le programme est constitué de plusieurs fonctions que nous ne détaillerons pas ici car ce sont des outils de conforts d'utilisation pour la plupart (comme la possibilité de pouvoir charger une séquence en particulier, une séparation seule ou la possibilité de pouvoir passer certaines étapes afin d'accélérer l'analyse) mais il est une fonction très importante qu'il faut aborder : la fonction de *fit* de multiples pics en simultané.

2. Fit de multiples pics

La fonction de gestion des données d'analyse permet un fit des profils d'intensités de chaque expérience de la séquence. La fonction au cœur de cette opération est délivrée au sein de LabVIEW directement par National Instrument : VI Nonlinear Curve fit.vi. Ce VI permet de réaliser un fit basé sur un modèle non linéaire qui compare des données en entrée (les profils d'intensités) à un modèle mathématique défini au préalable (ici des sommes de gaussiennes). Nous avons alors créé ces modèles comportant de 1 à 11 gaussiennes (amplitude, centre, largeur). Voici la forme du cluster décrivant le modèle général :

$$Y(t) = A_1 e^{-\frac{(t-t_{p1})^2}{2\sigma_1{}^2}} + \cdots + A_n e^{-\frac{(t-t_{pn})^2}{2\sigma_n{}^2}} \tag{3.1}$$

Le VI utilise la méthode de Levenberg-Marquardt pour calculer les paramètres du meilleur fit minimisant la moyenne pondérée de l'erreur au carrée entre le profil d'intensité obtenu expérimentalement et le modèle défini $Y(t)$.

En soit cette méthode suffit à des fins exploratoires tout en connaissant les tenant et les aboutissant d'un échantillon. Mais pour un échantillon dont le nombre de tailles d'ADN serait inconnu le procédé ne marcherait pas. Nous n'avons pas poursuivi le développement de ce logiciel plus avant, néanmoins il serait assez simple de l'adapter à des fins d'analyses d'échantillons inconnus. Deux méthodes peuvent alors être envisagées :

- Premièrement, la méthode force brute ne nécessitant que très peu de développement : le test de comparaison d'un profil de séparation avec tous les modèles de fit gaussiens développés. Le procédé serait ainsi très long mais aboutirait quoi qu'il advienne.

- Deuxièmement, une méthode plus astucieuse mais nécessitant plus de développement : il existe un autre sous-programme délivré par NI dans LabVIEW, peak detector.vi, capable de détecter des pics ou des creux dans un signal.

Enfin une étude de comparaison a été réalisée. Cette étude met en corrélation les résultats donnés par le programme de *fit* présenté ici et les résultats qui ont été fourni par l'outil de *multipeak fiting* du logiciel de traitement numérique IGOR.

III. Calibrage des différents instruments du banc expérimental

Plusieurs tests de calibrage ont été réalisés dans le but de s'assurer de la non dérive du système lors d'expérimentations prolongées. En effet, notre principal objectif est de réaliser des gammes de séquences tests dont la durée peut être grande. Or, les acquisitions vidéo de ces lots de manipulation peuvent très vite souffrir de multiples défauts liés à la mécanique et la physique du système, en particulier via les vibrations ou les écarts de températures. Une autre thématique comme la synchronisation des différents instruments a été approfondie par l'étude de leur temps de réponse.

A. Tests de dérive dans le temps

Nous avons présenté dans le chapitre 2 le banc d'instrumentation *(Chapitre 2 II.D.2, p. 76)*. Nous avons notamment introduit l'objectif 10X à forte ouverture numérique ainsi que les platines montées sur la base de microscope. L'objectif 10X à forte ouverture numérique est très pratique pour récupérer le maximum de signal, mais cela présente le défaut d'avoir une profondeur de champ plus faible, et donc des risques de dérives amplifiées.

Nous avons mesuré deux types de dérives, la dérive mécanique qui peut faire translater une région d'intérêt (en observation) et une dérive de l'intensité des pixels. Le premier cas de dérive pose le plus gros problème s'il est observé. En effet les zones acquises en vidéo lors des expérimentations sont des plans fixes et le traitement des données est dépendant de certaines balises pour mesurer les intensités de pixels toujours au même endroit. Si cette dérive est

importante, la région d'intérêt peut par exemple quitter le champ d'acquisition de la caméra. La deuxième dérive mesurée est une dérive des valeurs de pixels qui peut varier au cours du temps. Bien que cette dérive soit aussi importante il s'agit ici surtout de s'assurer que les valeurs mesurées aux temps courts soient cohérentes et stables.

Tous les tests de dérives ont été réalisés sur des temps bien plus longs que ceux prévus dans des conditions d'expérimentations réelles. Les résultats présentent ici l'évolution du montage sur des sessions de 96 heures. Nous avons choisi des puces incorporant des mires par commodité pour les mesures. Ainsi il devient plus simple de choisir des points fixes pour pister les dérives selon deux axes et intégrer les intensités de pixel toujours dans les mêmes zones. La compilation finale d'images comprend donc 96 images, chacune représentant l'évolution du système après une heure.

1. Tracking des zones

Nous avons donc des piles de 96 images et nous voulons marquer certaines zones notables et suivre les caractéristiques de ces régions d'intérêt au cours du temps. Dans le logiciel Fiji, nous avons réalisés le marquage des zones à la main et le *tracking* grâce à un plugin intégré Trackmate (Fig. 3.14). Les caractéristiques suivies sont les coordonnées du barycentre et la somme des intensités de pixels de chaque zone pour chaque image. Procéder ainsi nous permet d'avoir accès au mouvement du barycentre de chaque région au cours du temps.

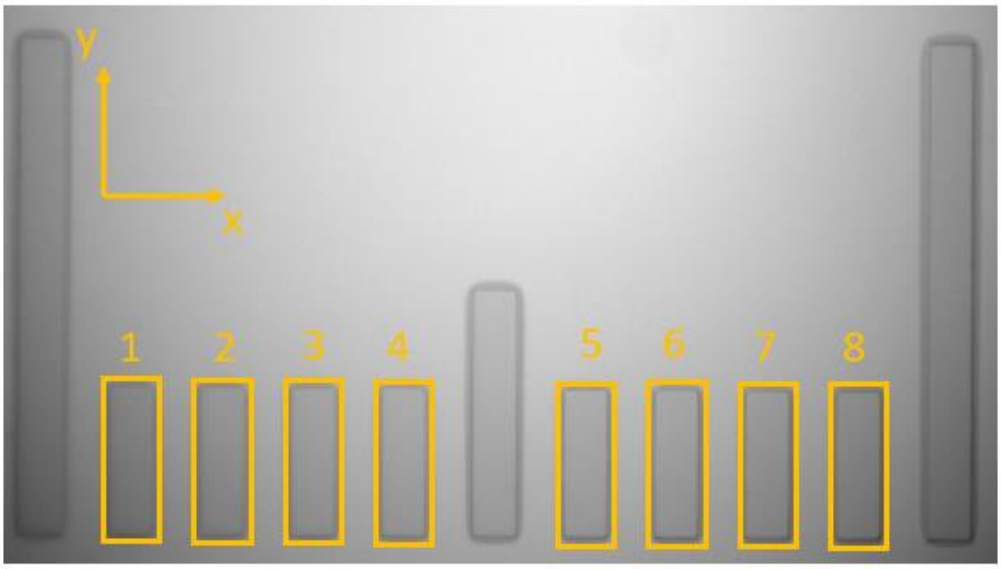


Figure 3.14 Zones marquées puis suivies via le plugin Trackmate. La dimension des régions est 50 µm x 150 µm.

2. Mesure de la dérive mécanique du système

Prenant la suite directe de la méthode mise en place dans la partie précédente, la figure 3.15 présente les données statistiques rassemblées pour une région au cours des 96 heures, groupées sous le format boîte à moustache. Cette figure montre clairement que le barycentre de la zone reste au même endroit en moyenne au pixel prêt, même après de très longs temps.

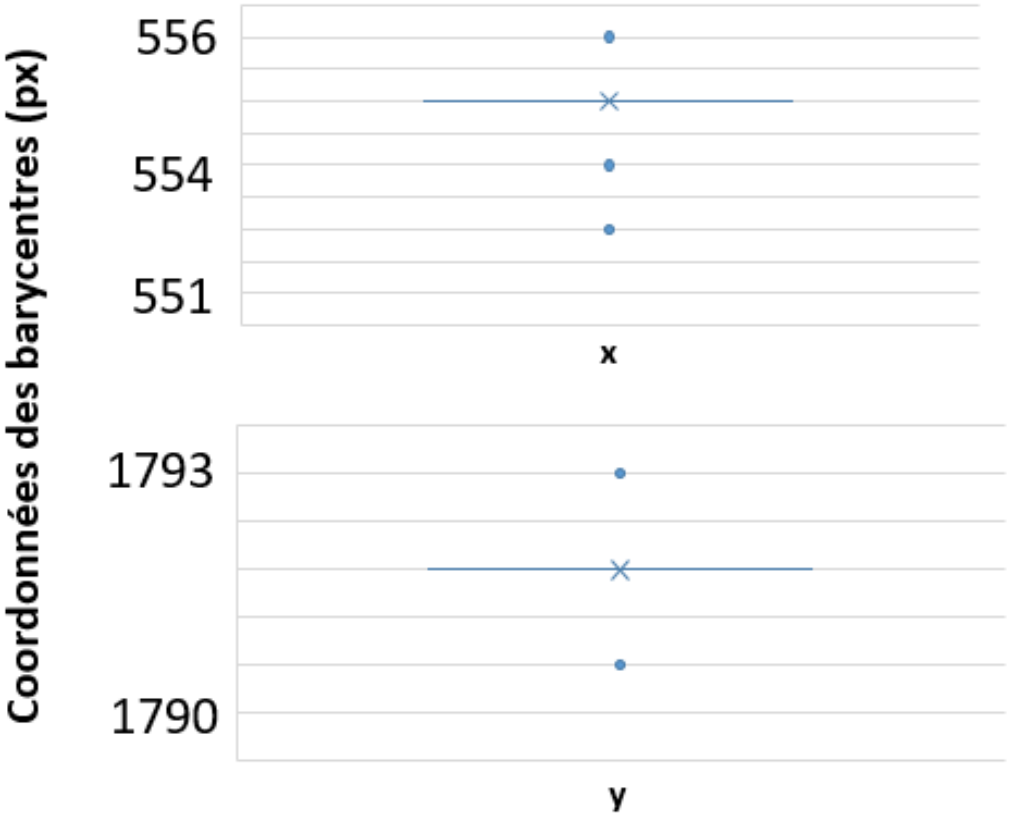


Figure 3.15 Coordonnées des barycentres en x et en y. L'écart à la moyenne est si faible que l'on peut considérer le barycentre de la région comme immobile.

3. Mesure de la dérive des intensités de pixels

Au cours du temps les intensités des pixels peuvent varier. Cette variation est en particulier liée à des dérives verticales du montage optique. De la même manière que décrit précédemment, une fois les zones marquées puis suivies, il est possible de mesurer la somme des intensités de pixels dans une même zone et de suivre la variation de cette valeur. Ces résultats sont présentés sous forme de boîte à moustache dans la figure 3.16. Nous notons donc une variation de l'intensité du signal de l'ordre de 3%, ce qui est largement adapté pour notre banc d'acquisition.

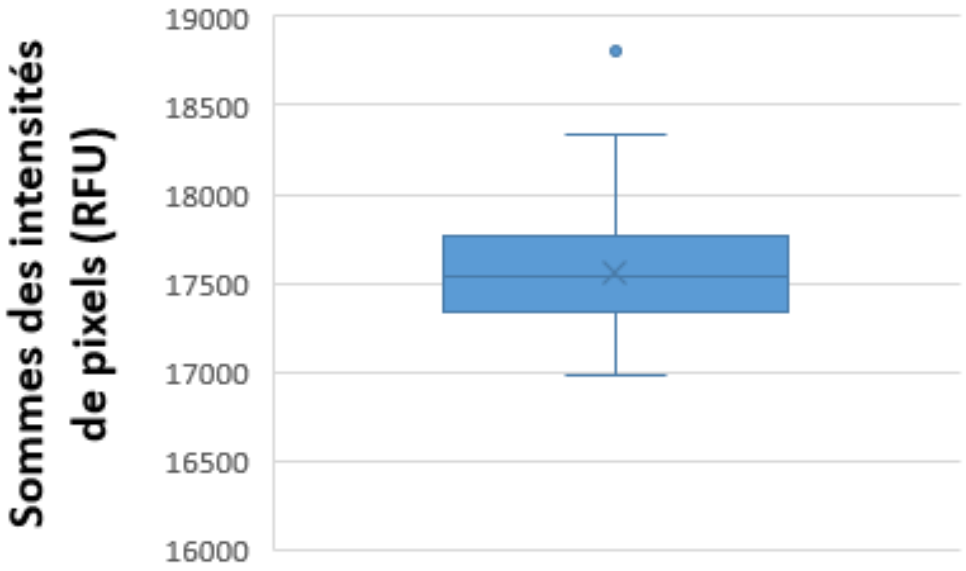


Figure 3.16 **Valeurs des intensités de pixels, sommées.** Au cours du temps cette intégrale varie mais ne s'éloigne pas significativement de la moyenne.

B. Calibration des temps de réponses des instruments

Nous avons très vite noté des désynchronisations temporelles entre certains instruments, menant à des séquences décalées et donc des artefacts dans les concentrations, séparations et acquisitions de données. Les outils de suivi de code intégrés à LabVIEW permettent de suivre en temps réel ou pas-à-pas l'exécution des commandes dans le code source. Cette fonctionnalité nous a permis d'identifier le problème associé au temps de réponse du contrôleur de pression Fluigent (MFCS-EZ). Nous avons procédé donc à un calibrage du temps de réponse de cet instrument ainsi que du générateur de tension (NI-DAQ USB). La documentation de ces appareils est très bien fournie mais le graphique faisant apparaître le temps de réponse pour le MFCS-EZ n'indique aucune valeur. La documentation du générateur de tension National Instrument présente un produit avec un temps de réponse de l'ordre de la dizaine de nanosecondes.

Nous avons établi le temps de réponse du couple générateur de tension et multiplicateur x100 en faisant des rampes de calibration indiquées par le constructeur, à l'aide d'un oscilloscope. Nous avons pu ainsi vérifier les valeurs qui nous avaient été possible de trouver. Pour le NI-DAQ nous avons aussi mesurer des temps de réponse entre 10 et 100 ns.

La méthode que nous avons employée pour la mesure du temps de réponse du MFCS-EZ est d'ordre logicielle. Un petit programme codé spécifiquement est capable d'appliquer une pression et de mesurer la pression appliquée ainsi, simultanément. Il est possible d'asservir la mesure du temps par un chronomètre à la pression mesurée. Si le temps de réponse logiciel n'est pas disponible, c'est le temps de stabilisation (Fig. 3.17) qui nous est accessible par cette méthode. Les mesures ainsi faites étaient très variables (entre 300 et 600 ms) donc nous avons choisi d'intégrer ce sous-système de calibration dans la plateforme. Le calcul du temps de stabilisation du MFCS est réalisée avant chaque début de séquence et le décalage est compensé par un retardateur pour l'actionnement du NI-DAQ USB.

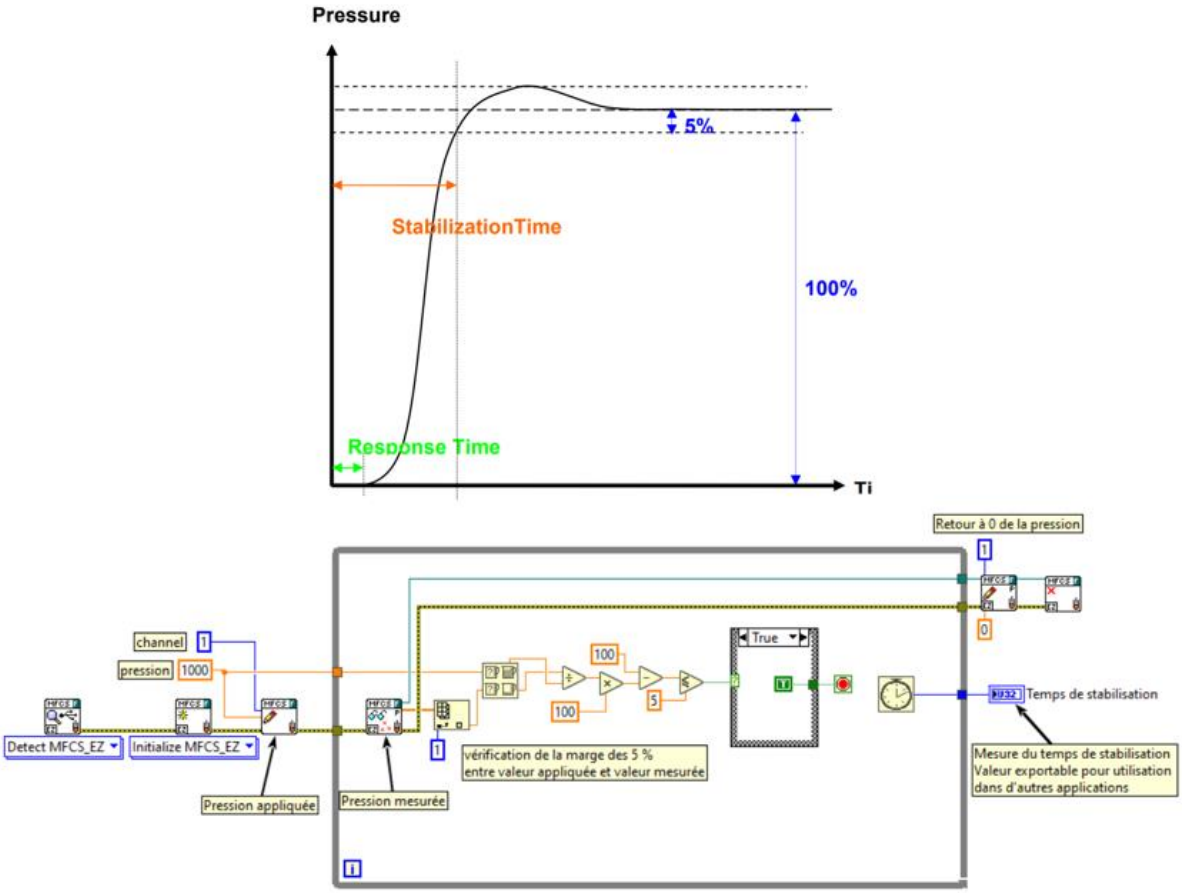


Figure 3.17 (En haut) Documentation du MFCS-EZ, graphique représentant le temps de réponse et le temps de stabilisation. (En bas) Sous-programme calculant à la volée le temps de stabilisation de l'instrument. La valeur ainsi mesurée peut être utilisée dans la plateforme générale pour synchroniser les appareils.

C. Calibrage de la fonction de *fitting* pour de multiples pics

Comme introduit dans la partie A.3.b il est question ici de la comparaison de nos résultats de *fit* par rapport à ceux réalisés à la main via le logiciel IGOR. Cette étude a été réalisée pour jauger de la fiabilité de ces résultats, car de ceux-ci dépendent les données finales, c'est-à-dire les résolutions.

On peut déduire des résultats présentés en figure 3.18 que les résultats sont très similaires par l'une ou l'autre méthode avec un facteur de corrélation très proche de 1. Ainsi les paramètres de *fit* (localisation, amplitude et largeur d'un pic) peuvent être calculés bien plus rapidement par la méthode développée sous LabVIEW, sans perte d'information.

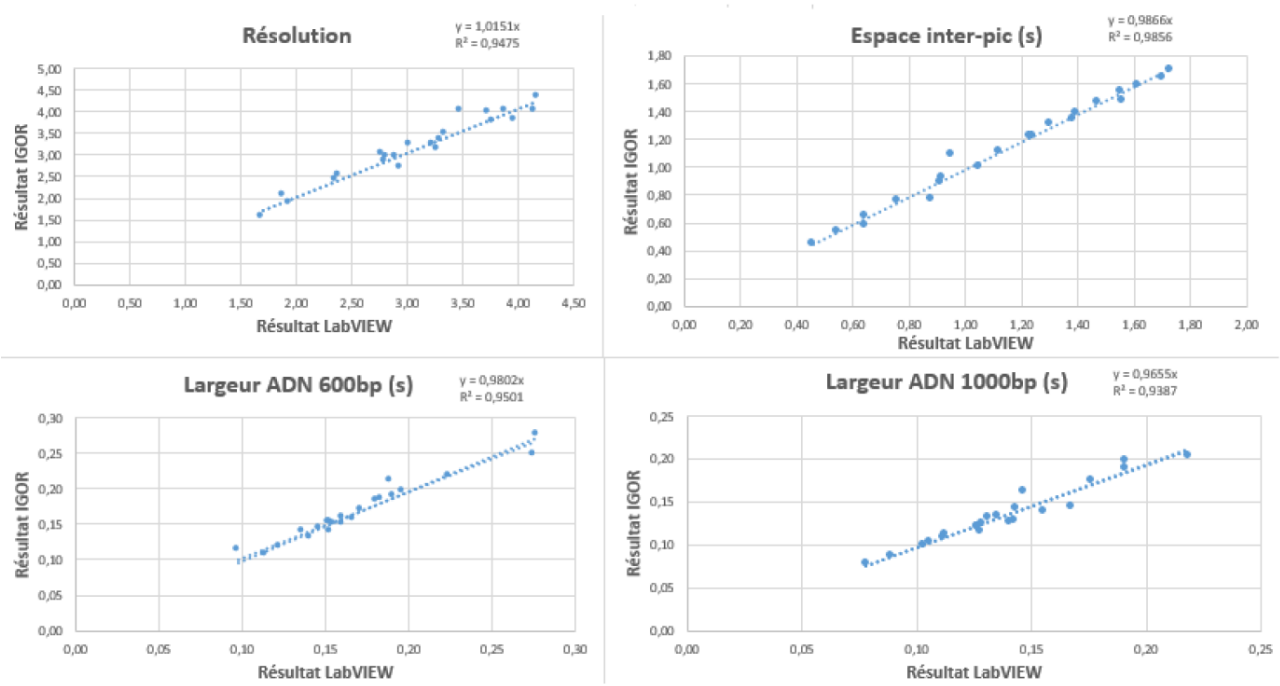


Figure 3.18 Étude de la corrélation entre l'outils développé sous LabVIEW et l'outil d'IGOR Pro.

IV. Conclusions

Nous avons présenté dans cette partie les bases de l'instrumentation pour arriver finalement à la conception d'une plateforme complète de prise en charge de séries d'expérimentations. Grâce à l'interface de paramétrage des séquences implémentées et une architecture de code polyvalente et évolutive, il est possible de réaliser n'importe quelle séquence d'actionnement des instruments pour µLAS, qu'elles existent déjà ou dans le futur. La plateforme, couplé à son banc expérimental, a été testée et présente des performances adéquates à nos attentes. Elle assure la fiabilité d'utilisation qu'une telle démarche motivait à la base et une simplification de la tâche pour réaliser des gammes d'expérimentation de grande ampleur. Nous voulons attirer l'attention du lecteur sur le fait qu'une telle plateforme simplifie et accélère en effet grandement l'expérimentation en elle-même. Mais qu'elle complexifie en contrepartie la maintenance de l'outils et du banc expérimental et que l'implémentation de séquences pas encore réfléchies nécessite tout de même de bonnes bases en programmation et en lecture de code. Et ceci, malgré tous les efforts qui ont été faits pour simplifier cette partie : un guide d'utilisation de la plateforme un guide de lecture du code la plateforme pour implémenter de nouvelles séquences sont en cours d'écriture pour assurer la continuité du projet.

Chapitre 4

Caractérisation et minimisation de l'élargissement des bandes pendant des migrations éléctro-hydrodynamiques

I. Introduction et motivations

Comme déjà évoqué précédemment dans ce manuscrit les techniques de séparation d'ADN peuvent être classées et présentées en fonction de leurs méthodes d'actionnement. Un autre classement possible est de répartir ces techniques en groupes en fonction du milieu dans lequel la séparation en taille s'effectue. On pourra donc distinguer grossièrement trois groupes, les techniques utilisant des matrices de polymères, celles qui utilisent des matrices artificielles technologiquement manufacturées et enfin celles qui ne mettent pas en jeu de matrice du tout.

Les mécanismes responsables de la migration de l'ADN ont fait l'objet de nombreuses recherches *(Duke, 1994 ; Slater G. W. ; 1985&1993&1995 ; Lumpkin, 1982 ; Lerman, 1982)*. Ces dernières ont eu pour objectif d'étudier la résolution de séparation et les sources d'élargissement des bandes en fonction de la taille des fragments *(Viovy, 2000 ; Dorfman, 2010)*. L'étude de ces mécanismes, adjoint à l'optimisation des matrices de séparation *(Guttman, 2003 ; Albarghouthi, 2000)* permet maintenant à ces techniques d'obtenir des pics bien séparés, résolus à leur base, ce qui est acceptable en vu d'applications comme le séquençage *(Dovichi, 2001)*.

L'intérêt porté aux techniques n'utilisant pas de matrices pour leurs séparations est assez récent *(Wang X. L., 2012)*, et il y a tout simplement moins d'études pour rapporter et caractériser les mécanismes entrant en jeu lors de ces séparations. Des séparations sans matrices ont été réalisées avec un champ de force comme moyen d'actionnement, hydrodynamique *(Liu, 2011 ; Duan, 2017)* ou électrophorétique *(Pennathur, 2007)*. Dans les deux cas le degré de confinement de l'ADN semble être critique, les études ayant été réalisées avec des canalisations de l'ordre du micromètre. La combinaison de ces deux champs, hydrodynamique et électrophorétique, appliqués dans des sens opposés, a permis des séparations dans des canaux de plus grandes dimensions, entre 2 et 50 µm en utilisant des fluides newtoniens *(Zheng, 2002&2003 ; Milon, 2019)* ou viscoélastiques *(Ranchon, 2016 ; Chami, 2018)*. Le mécanisme de séparation se base alors sur la force élastique transverse dépendante de la taille orientée vers les murs du canal, comme explicité dans le chapitre 2. Cette phénoménologie a été étudiée analytiquement et numériquement dans des fluides newtoniens pour l'ADN *(Butler, 2007)* et dans des fluides viscoélastiques pour l'ADN et des particules *(Chami, 2018 ; Lee, 2010)*. Certaines prédictions de modèles ont été testées expérimentalement et validées *(Chami, 2018 ; Socol, 2019 ; Montes, 2019)*. De plus, l'actionnement par deux champs de force en simultané

permet la concentration de l'ADN dans des géométries en entonnoir *(Arca, 2016 ; Montes R. J., 2019 ; Milon N., 2020)*.

Alors que la physique de la séparation de l'ADN pour des techniques utilisant des migrations électro-hydrodynamique en milieu viscoélastique a été étudiée expérimentalement *(Chami, 2018 ; Socol, 2019)*, le mécanisme d'élargissement de la bande reste plus difficile à cerner. Nous avons donc conçu une puce microfluidique *(Chapitre 2 II.C.2.b, p. 66)* et une plateforme d'expérimentation *(Chapitre 3 II, p. 108)* pour effectuer une étude systématique de la dispersion des bandes d'ADN dans l'espace des paramètres du champ de pression et du champ électrique. L'étude est basée sur un modèle d'élargissement de bande, lui-même reposant sur des arguments de type Taylor. Les expériences de séparation sont actionnées par un champ électro-hydrodynamique et elles sont ensuite motivées par un objectif de performances optimales lorsque l'élargissement de la bande est minime. Nous nous concentrons ensuite sur la caractérisation de la dispersion à l'aide d'une seule bande d'ADN de 600 pb avec trois schémas d'actionnement, à savoir électro-hydrodynamique, hydrodynamique et électrophorétique.

II. Modèle de transport et dispersion

Nous avons déjà explicité l'équation de transport (Chapitre 1 Équ. 1.1) qui modélise l'évolution de la concentration dans l'espace et dans le temps. Et une solution de cette équation a une forme gaussienne de la forme :

$$C(x,t) = C_0 exp - \frac{(x - \int_0^t U(w)dw)^2}{4\int_0^t D(w)dw} \tag{4.1}$$

Nous allons expliciter U(t) et D(t) dans les différents contextes : électrophorétiques, hydrodynamique et électro-hydrodynamique.

A. Modèles de transport et de dispersion pour les cas hydrodynamique et électrophorétique

En électrophorèse la vitesse de l'ADN est proportionnelle au champ électrique E avec $U_e = \mu_0 E$. Dans la limite de la disparition du champ électrique, l'élargissement des bandes est dicté par les fluctuations browniennes *(Viovy J. L., 2000)*, aussi bien que le coefficient de dispersion électrophorétique D_e est équivalent au coefficient de dispersion naturel D_0. À mesure que le champ électrique augmente et que les molécules s'orientent *(Slater G. W., 1995 ; Tinland, 1998)*, le coefficient de dispersion normalisé D_e/D_0 est caractérisé par une dépendance en loi de puissance associée à un exposant de 1 ou 1.5 avec la mobilité électrophorétique *(Viovy J. L., 2000)*.

La migration hydrodynamique est décrite par le modèle de Taylor-Aris *(Taylor, 1953 ; Aris, 1956)*. Pour des molécules plus petites que la dimension transversale du canal, la vitesse de migration est égale à la vitesse moyenne du flux U_h et le coefficient de dispersion augmente du fait du couplage de l'advection longitudinale avec la diffusion transversale à la direction du flux comme décrit dans le Chapitre 1 IV.A.2. Le processus de diffusion atteint un régime stationnaire une fois que l'échelle de temps d'advection du flux L/U_h (avec L la position du détecteur le long du canal) est supérieure au temps de diffusion H^2/D_0 le long de la hauteur du canal H. Pour un canal qui a la forme d'une fente, le coefficient de diffusion normalisé se lit alors:

$$D_h/D_0 = 1 + \frac{U_h^2 . H^2}{210 . {D_0}^2} \tag{4.2}$$

B. Physique de µLAS et prédiction du coefficient de diffusion

En migration électro-hydrodynamique, le transport de l'ADN dans un flux hydrodynamique U_h avec une force électrophorétique opposée caractérisée par la vitesse U_e est associé à une force transversale F_{VE} orientée vers les parois supérieure et inférieure du canal *(Ranchon, 2016)*. Près du mur, F_{VE} peut être modélisée par un ressort élastique dont la rigidité augmente linéairement avec U_h et U_e *(Chami et al., 2018 ; Socol et al., 2019)* :

$$F_{VE}(\varepsilon) \sim -\mu\tau \frac{a\mathrm{U}_h\mathrm{U}_\mathrm{e}}{H^2}\varepsilon = -k\varepsilon \tag{4.3}$$

avec a la taille de la chaîne, H la hauteur du canal, et ε la distance séparant la molécule des murs. L'utilisation de la statistique de Boltzmann nous permet de déduire la position moyenne de l'ADN par rapport aux murs, avec un comportement se rapprochant d'un ressort de raideur $k = \mu\tau a U_h U_e / H^2$ *(Chami, 2018 ; Socol, 2019)* :

$$\langle\varepsilon\rangle \cong \frac{\int_0^\infty \varepsilon e^{-k\varepsilon^2/2k_BT} d\varepsilon}{\int_0^\infty e^{-k\varepsilon^2/2k_BT} d\varepsilon} \cong \sqrt{\frac{2k_BT}{\pi k}} = \sqrt{\frac{2k_BT}{\pi}\frac{H^2}{a\mu\tau\mathrm{U}_h\mathrm{U}_\mathrm{e}}} \tag{4.4}$$

Près du mur et en négligeant les interactions hydrodynamiques, le flux de Poiseuille peut être linéarisé et la vitesse de l'ADN se lit donc:

$$U_{VE} = \frac{6\mathrm{U}_h}{H}\langle\varepsilon\rangle - \mathrm{U}_\mathrm{e} \tag{4.5}$$

La statistique de Boltzmann nous permet également de calculer l'écart type de la position verticale de l'ADN, qui est de l'ordre de $\sim\langle\varepsilon\rangle$ *(Chami, 2018 ; Socol, 2019)*. Nous supposons ensuite que la migration de l'ADN se produit dans un domaine spatial délimité verticalement entre $\varepsilon = 0$ et $2\langle\varepsilon\rangle$. Le coefficient de diffusion peut alors être estimé à l'aide d'arguments de type Taylor *(Bancaud, 2005)* :

$$\frac{D_{VE}}{D_0} = \frac{{U_h}^2 \times H^2}{210 \times {D_0}^2}\left\{64\left[\frac{2\langle\varepsilon\rangle}{H}\right]^6 - 126\left[\frac{2\langle\varepsilon\rangle}{H}\right]^5 + 63\left[\frac{2\langle\varepsilon\rangle}{H}\right]^4\right\} \tag{4.6}$$

Notez qu'en l'absence de confinement, c'est-à-dire pour $2\langle\varepsilon\rangle/H = 1$, cette expression est égale à l'équation 4.2. En présence de la force viscoélastique transversale, le terme prédominant en ordre de grandeur est celui de droite, permettant alors d'estimer le coefficient de dispersion en combinant l'équation 4.4 dans l'équation 4.6 :

$$\frac{D_{VE}}{D_0} \sim \frac{H^2}{\tau^2 {U_e}^2} \tag{4.7}$$

Avec un actionnement simultané hydrodynamique et électrophorétique en opposition, le coefficient de dispersion dépend donc principalement et au premier ordre de U_e mais pas de U_h.

III. Optimisation des résolutions de séparation

Afin d'évaluer l'impact de l'élargissement de la bande sur la qualité de la séparation électro-hydrodynamique, nous avons effectué une série d'expériences avec la concentration et la séparation de l'ADN en séquence en utilisant une puce microfluidique avec une géométrie en forme d'entonnoir (Fig. 4.1 A). Le mode opératoire par µLAS *(Andriamanampisoa, 2018 ; Malbec, 2019)* consiste en une première phase de concentration pendant 10 s utilisant un champ électrique élevé (courbe rouge sur la figure 4.1 B), ce qui nous permet d'arrêter et d'accumuler des molécules dans la constriction, c'est-à-dire en amont du canal de séparation *(voir Annexe A.III.1, p. 199)*. Dans cette région d'accumulation, les forces transversales ont pour effet de maintenir les molécules à une côte verticale $\langle\varepsilon\rangle$, ce qui correspond à des forces hydrodynamiques et électrophorétiques en équilibre (voir les équations 4.4 et 4.5). Plus éloignées de la constriction, les plus petites valeurs des vitesses hydrodynamiques et électrophorétiques U_h et U_e définissent une position verticale $\langle\varepsilon\rangle$ accrue. Le régime de migration est donc associé aux forces hydrodynamiques dominantes, et les molécules sont transportées en continu vers la position d'accumulation.

Au temps t_0, on diminue le champ électrique soit linéairement dans le temps, soit brusquement jusqu'à un deuxième plateau (figure 4.1 B), et la bande d'ADN commence à migrer dans le canal de séparation, comme le montre le *time lapse* de la figure 4.1 C. Après le passage complet de la bande d'ADN, le champ électrique est désactivé pour rincer la puce et commencer une autre expérience. Les bandes peuvent être caractérisées en mode temporel ou spatial. Le mode temporel consiste à enregistrer la variation du signal avec une région d'intérêt de 20x20 µm², situé à une distance de 1,3 mm de la constriction. Le mode spatial utilise toute la largeur du capteur de la caméra (rectangle jaune sur la figure 4.1 A) pour déterminer le profil de la bande au cours de sa migration (figure 4.1 D).

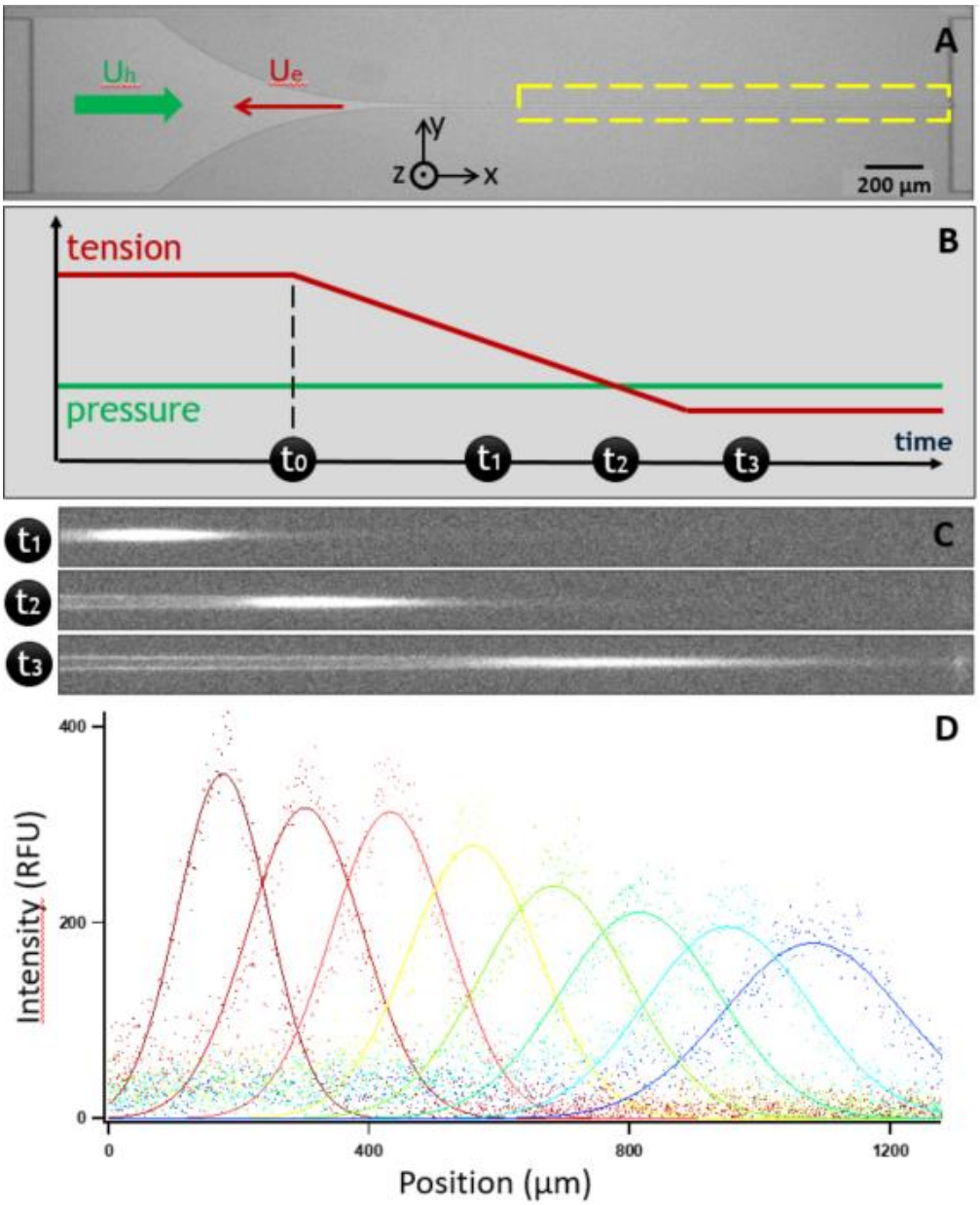


Figure 4.1 Banc expérimental pour la caractérisation de l'élargissement de bande. **(A)** Micrographe de la puce microfluidique avec des flèches vertes et rouges représentant respectivement les vitesses hydrodynamiques et électrophorétiques. Le rectangle jaune est le champ de vision de la caméra. **(B)** Le graphique esquisse la séquence temporelle des expériences de séparation d'ADN avec une première phase de concentration à haute pression et haute tension. A l'instant t_0, l'enregistrement vidéo démarre et le champ électrique est modulé dans le temps (courbe rouge). **(C)** Les trois instantanés de fluorescence représentent une seule bande au cours de sa migration à travers le canal de séparation. **(D)** Le graphique représente le profil d'intensité spatiale d'une bande d'ADN à huit moments consécutifs séparés par 500 ms. Les lignes pleines correspondent aux ajustements gaussiens.

A. Optimisation des résolutions de séparations

1. Introduction aux séparation et paramètres d'intérêt

À l'aide des outils présentés et développés dans le précédent chapitre il nous est possible de réaliser un grand nombre d'expériences de séparation afin d'explorer l'espace des paramètres d'actionnement. Les différents paramètres que nous avons choisi de faire varier dans un premier temps sont les suivants :

- Paramètres de concentration : la pression P et la tension maximale V_{max}. Ces derniers définissent principalement la vitesse à laquelle les bandes se concentrent dans la constriction et la largeur de celles-ci.
- Paramètres de séparation : les paramètres ayant une influence sur les vitesses de migration sont la discrétisation de la pente en tension dV et en temps dT, ainsi que la rampe en elle-même $a = dV/dT$.

Ces paramètres peuvent être retrouvés dans un profil d'expérience comme sur la figure 4.2.

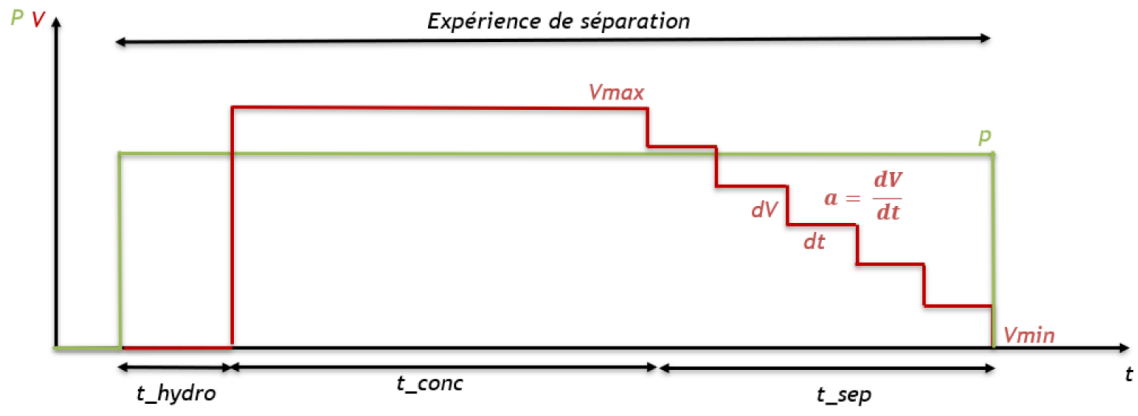


Figure 4.2 Schématisation d'une séquence de concentration et séparation pour un jeu de paramètres donnés. En faisant varier ces paramètres (P, V_{max}, V_{min}, dV, dt, a) on obtient un panel de séquences de séparations.

2. Plan d'expériences

La figure 4.3 présente un tableau récapitulatif du premier plan d'expériences réalisé avec pour objectif d'optimiser un grand nombre d'expériences de séparation de façon automatique. Ce tableau récapitule 360 séquences d'expérimentations. Ces 360 séquences sont l'aboutissement de 24 gammes de concentration démultipliées par 15 gammes de séparations. Sans compter le temps de préparation des échantillons l'ensemble de ce tableau a été réalisé en 4h30, soit un après-midi grâce au banc expérimental automatisé.

Paramètres	Vmax (V)	P (bar)	dV (V)	a (V/s)
Séquence1	150	2	5	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence2	150	2	10	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence3	150	3	5	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence4	150	3	10	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence5	150	4	5	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence6	150	4	10	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence7	150	5	5	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence8	150	5	10	allant de 4,5 à 10 (15 pentes)
Séquence9	200	2	5	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence10	200	2	10	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence11	200	3	5	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence12	200	3	10	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence13	200	4	5	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence14	200	4	10	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence15	200	5	5	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence16	200	5	10	allant de 5 à 13,5 (15 pentes)
Séquence17	250	2	5	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence18	250	2	10	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence19	250	3	5	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence20	250	3	10	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence21	250	4	5	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence22	250	4	10	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence23	250	5	5	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)
Séquence24	250	5	10	allant de 6 à 16,5 (15 pentes)

Figure 4.3 **Tableau récapitulatif du plan d'expériences ayant servi à la première optimisation complètement automatisée.** Les différents paramètres ont été explicités dans la partie précédente.

3. Traitement des données et résultats de séparation

L'ensemble des données vidéos a été analysé et caractérisé par la plateforme de traitement de donnée développée sous LabVIEW. Les profils d'intensités (Fig. 4.4) ainsi obtenus ont été analysés de manière complètement automatique, ils ont été *fit*, une résolution de séparation a été attribuée à chacune des expériences et enfin l'ensemble a été sauvegardé dans un rapport Excel pour résumer la totalité des résultats. Ici les résultats de sortie du plan d'expérience ne sont pas les profils d'intensités en eux-mêmes mais les données analysées comme la distance inter-pics, la largeur des pics et enfin la résolution. Ces données serviront à classer les influences des paramètres en entrée.

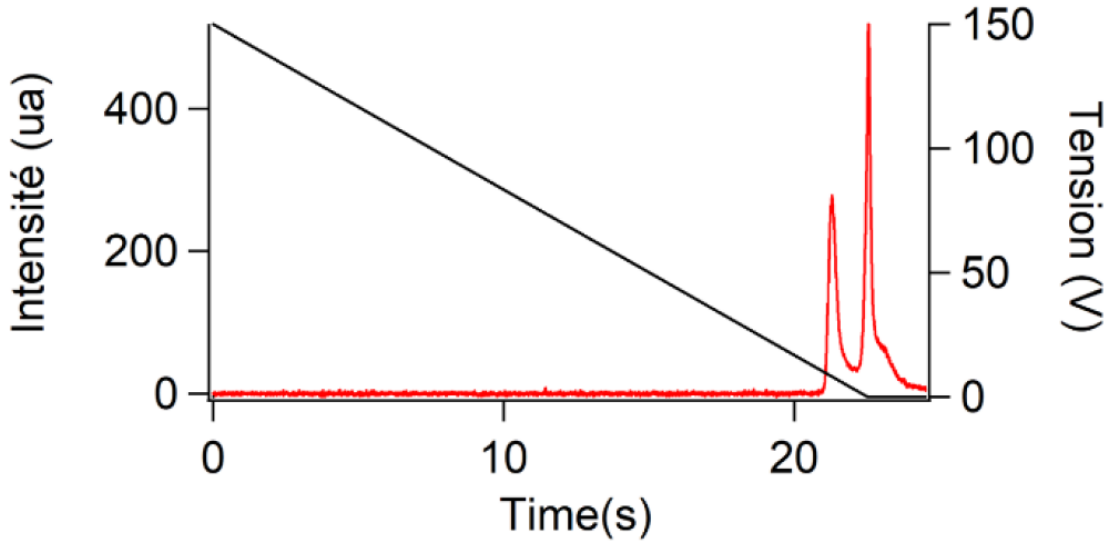


Figure 4.4 Profil d'intensité d'une séparation des bandes 600 bp et 1000 bp. Le champ électrique arrive à 0 en concomitance avec le passage des bandes devant le détecteur.

L'objectif est ensuite de trouver un moyen de caractériser l'influence des différents paramètres de contrôle du plan d'expérience sur la résolution de séparation. Tout d'abord nous nous sommes intéressés aux distances inter-pics et aux largeurs de ceux-ci en fonction des différents paramètres : la pression P et la rampe a.

La figure suivante (Fig. 4.5) présente en A un résumé des largeurs et distances inter-pics en fonction de la pression (à rampe constante). En B sont présentées les largeurs et distances inter-pics en fonction de la rampe (à pression constante).

Cette première analyse met en avant des mécanismes qui sont en compétition. Lorsque la pression augmente la distance inter-pics augmente aussi, ce qui va dans le sens d'une optimisation de la résolution. Mais il faut prendre en considération que la largeur des pics augmente elle aussi, ce qui ne va pas dans le sens d'une optimisation de la résolution. Le jeu de paramètre d'entrée varie de façon complexe et les résultats de sortie sont très interdépendants. Nous avons donc décidé de réaliser une interpolation linéaire de ces expériences que nous avons tracé en 3D via Matlab. Ces graphiques en 3D ont pour but de simplifier la lecture finale de toutes ces données.

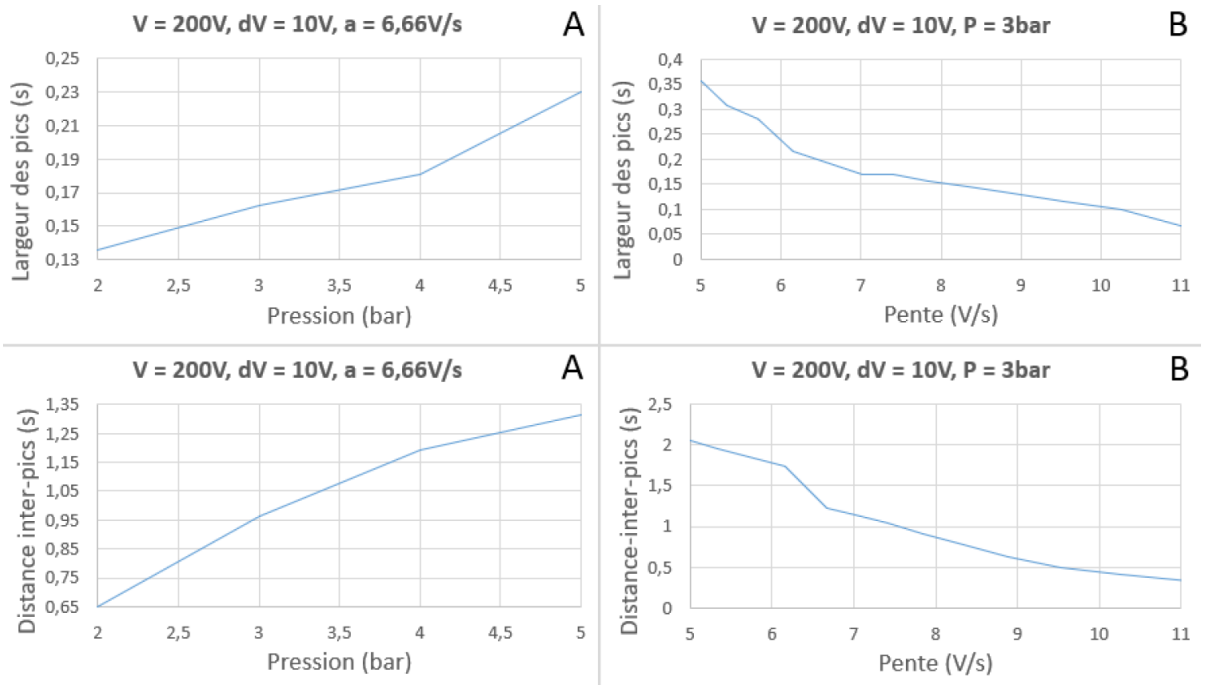


Figure 4.5 Graphiques 2D montrant la largeur et la distance entre les pics en fonction de la pente en tension et de la pression. Largeurs et distances inter-pics en fonction de **(A)** la pression et **(B)** la valeur de la pente en tension.

Faisant directement écho à la figure précédente, la figure suivante présente la combinaison des distances inter-pics et largeurs en fonction à la fois de la rampe a et de la pression P. Le maximum de la distance inter-pics est obtenu pour un pression de $P = 5\ bar$ et une rampe de $a = 5\ V/s$. Le minimum de la largeur du pic de 600 bp est obtenu pour une pression de $P = 3\ bar$ et une rampe de $a = 13\ V/s$.

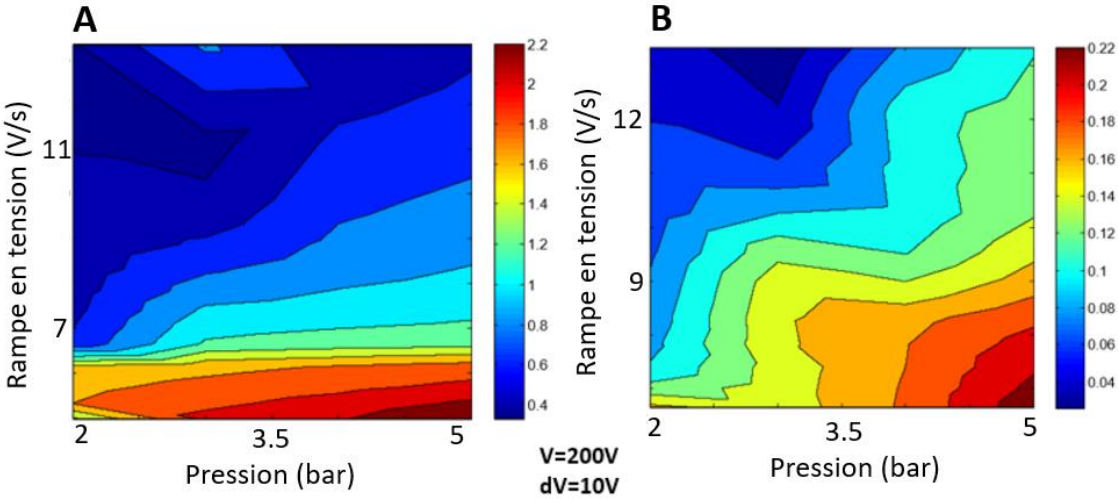


Figure 4.6 Matrices 3D présentant **(A)** la distance inter-pics et **(B)** la largeur du pic de 600 bp en fonction de la rampe en tension et de la pression.

La résolution étant proportionnelle au rapport entre ces deux grandeurs (largeur et distance entre les pics) il doit exister un maximum décrit dans cet espace de paramètre. La pression a été modulée entre 2 et 5 bar ce qui correspond à des vitesses hydrodynamiques de l'ordre de $U_h = 2.4$ à $6\ mm/s$. Les rampes linéaires en tension ont été appliquées d'un maximum de 80 V, équivalent à une vitesse électrophorétique $U_e = 0.46\ mm/s$ jusqu'à 0 V (en vert sur la figure 4.7 A). Nous avons noté une résolution maximum de 4.1 pour une pression de 3 bars et une rampe de -7 V/s (Fig. 4.7 B). De manière très intéressante ce maximum de résolution correspond aussi à un maximum de nombre de plateaux théoriques pour la bande d'ADN de taille 1000 bp de 1.5 10^6 plateaux/m (Fig. 4.7 C). Ce résultat montre déjà que la minimisation de l'élargissement de la bande est essentielle pour obtenir des séparations optimales, et a motivé notre étude suivante sur la dispersion dans la migration électro-hydrodynamique.

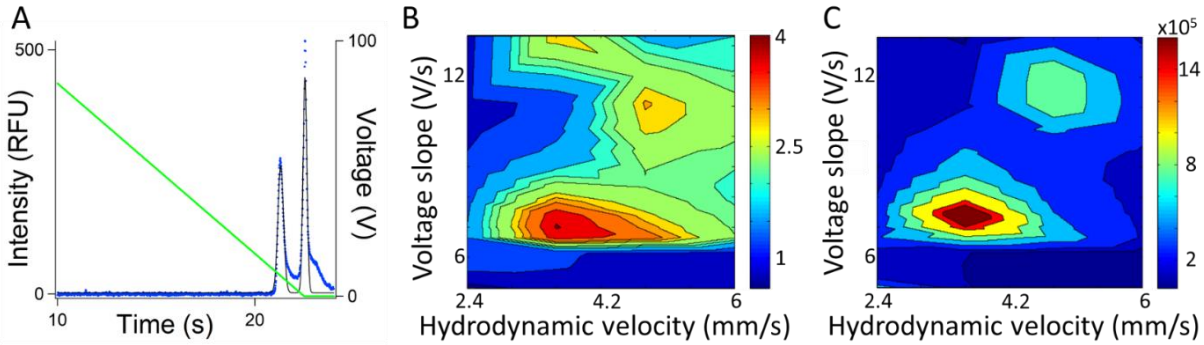


Figure 4.7 Séparations par µLAS des bandes de 600 bp et de 1000 bp. **(A)** Le graphique rapporte la séparation électro-hydrodynamique de l'ADN en utilisant une chute de pression constante de 3 bars et un champ électrique qui diminue linéairement dans le temps à partir de 80 V (ligne verte). L'ensemble de données bleu représente l'intensité de fluorescence, mesurée après 1.3 mm de migration dans le canal de séparation. Les deux bandes sont ajustées par des fonctions gaussiennes (ligne noire continue). **(B)** Le tracé 3D montre la résolution de la séparation en fonction de la chute de pression et de la valeur absolue de la pente en tension. **(C)** Le nombre théorique de plateaux pour la bande de 1000 pb est rapporté en fonction de la chute de pression et de la valeur absolue de la pente de tension.

B. Étude des modes de dispersion

Comme point de départ, nous avons testé le coefficient de diffusion dans le régime de référence de la diffusion libre en utilisant l'ADN de 600 pb comme sonde. Ces expériences ont commencé par une phase de concentration utilisant une pression de 2 bars et une tension de 150

V pendant 10 s, ce qui nous a permis de former une bande de FWHM ~ 55 µm dans la région de l'entonnoir (Fig. 4.8).

L'actionnement électro-hydrodynamique a ensuite été désactivé et la dispersion de la bande a été mesurée pendant 10 s. Le profil de la bande a été ajusté par une fonction gaussienne afin d'extraire sa largeur puis de déterminer le coefficient de diffusion D_0 de 0.075 ± 0.040 µm²/s en utilisant $D_{t_1} = \frac{w_{t_2}^2 - w_{t_1}^2}{4(t_2 - t_1)}$. Cette estimation semble être légèrement plus grande, mais comparable à la prédiction de la loi de Stokes-Einstein (Équ. 1.3) de 0.04 µm²/s en prenant 200 nm pour diamètre hydrodynamique de l'ADN (ce qui correspond approximativement à deux segments de Kuhn).

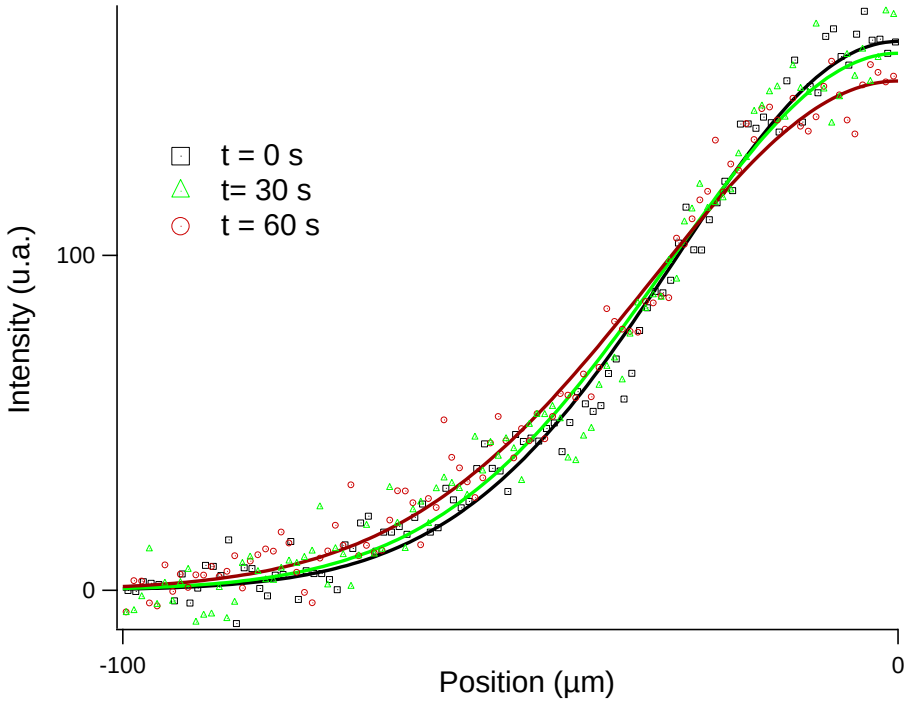


Figure 4.8 Le graphique présente la distribution d'intensité spatiale d'une bande d'ADN de 600 pb. Seulement la demi-gaussienne est représentée ici. Les écarts sont dus à la diffusion brownienne. Chaque jeu de données (différents temps de mesure de l'intensité) est ajusté par une gaussienne (lignes pleines).

1. Dispersion dans les régimes hydrodynamique et électrophorétique

Nous nous sommes ensuite concentrés sur la dispersion de la bande par actionnement hydrodynamique dans le régime de dispersion de Taylor (Fig. 4.9 A). Nous avons mesuré la largeur de la bande pour trois chutes de pression différentes de 2, 3 et 4 bars, ce qui correspond

à des vitesses de migration moyennes U_h de $1.7, 2.7$ *et* 3.4 mm/s *(voir Annexe A.III.2, p. 200).* Le ratio D_h/D_0 augmente avec la vitesse d'écoulement, et son amplitude de $\sim 10^6$ indique que le mixage est amélioré par l'hydrodynamique. L'augmentation du coefficient de dispersion au cours de la migration montre que l'état stationnaire pour le régime de dispersion de Taylor n'est pas atteint. En effet, la dispersion de Taylor nécessite une distribution uniforme des molécules à travers la section du canal, obtenue pour un temps de diffusion transversal beaucoup plus court par rapport au temps d'advection. Ici, le temps de diffusion dans la direction verticale H^2/D_0, de dizaines de secondes, est au contraire supérieur au temps de migration L/U_h de ~ 1 s. Néanmoins, nous avons noté que l'amplitude du coefficient de dispersion normalisé prédit par le modèle de Taylor de $\sim 10^7$ pour une vitesse d'écoulement de 2 mm/s (voir Équ. 4.2) est cohérente et légèrement supérieure à nos mesures.

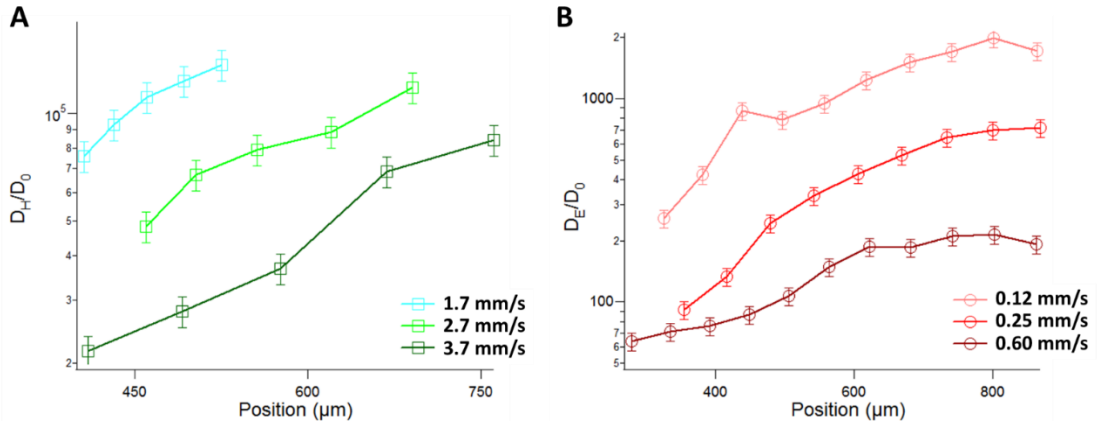


Figure 4.9 Dispersion en hydrodynamique et électrophorèse. Le coefficient de dispersion normalisé d'une bande d'ADN de 600 pb est tracé en fonction de sa position le long du canal de séparation pour trois réglages de **(A)** pressions ou **(B)** tensions différentes.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience, cette fois en utilisant un actionnement électrophorétique, en fixant la tension à 25, 50 et 100 V, ce qui correspond à des vitesses de migration V_e de $0.12, 0.25$ *et* 0.60 mm/s *(voir annexes A.III.3, p. 200)*. Nous avons noté que (i) le coefficient de dispersion électrophorétique normalisé D_e/D_0 est bien supérieur à 1 et dans la plage de 3000 à 40000, et (ii) D_e/D_0 augmente avec la vitesse électrophorétique de l'ADN (figure 4.9 B). Ce début de dispersion est qualitativement cohérent avec le processus d'élargissement de bande en électrophorèse sur gel, qui est caractérisé par une variation de la loi de puissance du coefficient de dispersion avec le champ électrique associé à un exposant de

1.5 pour un champ électrique élevé *(Slater, 1995 ; Tinland, 1998)*. En effet, en utilisant la valeur de plateau du coefficient de dispersion normalisé sur la figure 4.19 B, nous avons mesuré un exposant de mise à l'échelle de la loi de puissance de 1.47 pour la dispersion par rapport à la réponse du champ électrique (Fig. 4.10). Notez que des mécanismes supplémentaires, y compris par exemple le chauffage par effet joule, ont probablement contribué à l'élargissement de la bande, mais leur étude ne faisait pas partie des objectifs de la présente étude. Au contraire, notre comparaison de l'élargissement de la bande en électrophorèse, en hydrodynamique et en diffusion libre a montré un coefficient de dispersion qui s'étale sur plus de six ordres de grandeurs et qui suggère l'existence d'un large domaine de jeux de paramètres pour la dispersion dans le régime de migration électro-hydrodynamique.

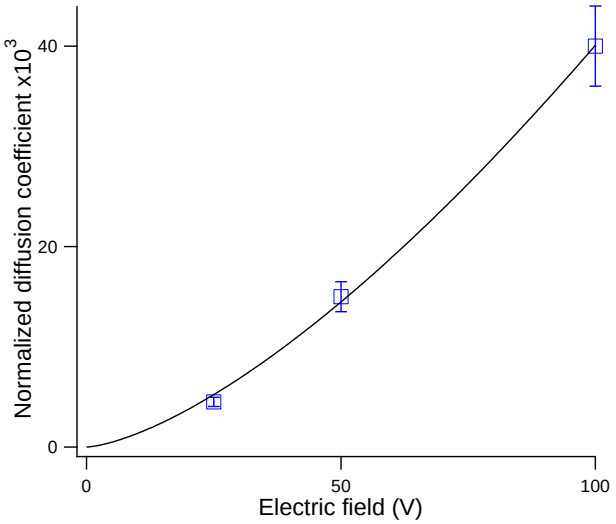


Figure 4.10 Le tracé présente la valeur stable du coefficient de dispersion électrophorétique normalisé, déduit de la figure 4.9, en fonction du champ électrique. La ligne continue est un ajustement des données associées à une réponse d'échelle de loi de puissance de 1.47, étant donné que le coefficient de dispersion normalisé est fixé à 1 pour un champ électrique nul.

2. *Dispersion dans un régime d'actionnement électro-hydrodynamique constant*

Nous nous sommes ensuite concentrés sur la migration électro-hydrodynamique et avons monitoré la largeur de la bande de taille 600 pb après ~ 600 µm de migration dans le canal de séparation. Nous avons d'abord effectué un ensemble d'expériences à un champ électrique constant associé à une tension de 20 V (équivalent à $V_e = 0.1$ mm/s) après une phase

de concentration de 10 s. La pression a été modulée dans la plage de 1, 2 et 3 bars, correspondant à des vitesses de migration moyennes U_h de $0.8, 1.7$ et 2.7 mm/s, respectivement. Nous avons d'abord mesuré la vitesse de la bande d'ADN $U_{VE} = 0.36, 0.66$ et 1.04 mm/s pour les trois réglages de pressions respectifs (le profil spatial de la bande à deux moments consécutifs est indiqué dans le panneau de droite de la figure 4.11 A), et nous avons remarqué que le rapport U_{VE}/U_h passait de 0.45 à 0.38 à mesure que le débit augmentait. Ce résultat a été expliqué par l'augmentation de la force transversale viscoélastique avec U_h (Équ. 4.3), qui a conduit à un confinement accru près des murs. Au contraire, le coefficient de dispersion normalisé semble être à peu près constant et égal à 10^5 pour les trois réglages de pressions (panneau de gauche de la figure 4.11 A). Cette valeur est en effet limitée entre nos mesures électrophorétiques et hydrodynamiques de 10^3 et 10^6, respectivement. De plus, la valeur constante du coefficient de dispersion est en excellent accord avec la prédiction de notre modèle de migration électro-hydrodynamique (Équ. 4.7), dans lequel l'étalement de bande est principalement piloté par le champ électrique.

En particulier, contrairement à nos mesures avec seulement l'actionnement hydrodynamique (Fig. 4.9 A), nous avons mesuré un coefficient de dispersion constant dans l'espace. Ce résultat implique que malgré l'utilisation de l'écoulement hydrodynamique, le processus diffusif est dans un état stationnaire. Ce résultat pourrait s'expliquer par le confinement des molécules près des parois, présentant alors des conditions valables pour le régime de dispersion de Taylor. En effet, le temps de migration L/U_{VE} est de l'ordre de 1 s pour $L = 1$ mm et $U_{VE} = 0.7$ mm/s. L'échelle de temps de diffusion transversale correspond à la diffusion moléculaire dans une région confinée, délimitée entre $z = 0$ et $z = 2\langle\varepsilon\rangle$ (voir définition dans l'équation 4.4). En prenant les valeurs de U_h, U_{VE} et U_e (pour 2 bars et 20 V) de $1.7, 0.7, 0.1$ mm/s, respectivement, nous avons déduit que $\langle\varepsilon\rangle$ est de l'ordre de 0,2 µm (par l'équation 4.5), et que le temps de diffusion transverse $\langle\varepsilon\rangle^2/D_0$ est de l'ordre de quelques dizaines de ms. Par conséquent, l'échelle de temps de la fluctuation transversale est beaucoup plus courte que le temps de migration, confirmant que les conditions d'un régime de dispersion de Taylor stable sont respectées.

Nous avons finalement mesuré le coefficient de dispersion normalisé à une pression constante de 1 bar et en utilisant cette fois trois réglages différents pour le champ électrique, associés à des tensions de 10, 20 et 50 V (figure 4.11 B). Nous avons à nouveau noté que la vitesse de bande $U_{VE} = 0.55, 0.36$ et 0.12 mm/s, respectivement pour les trois réglages de

tensions, a diminué davantage que la simple soustraction de $U_h - U_e$ de 0.65, 0.6 et 0.45 mm/s , respectivement, en raison de l'accumulation de force viscoélastique transverse avec l'actionnement électrophorétique (voir Équ. 4.3).

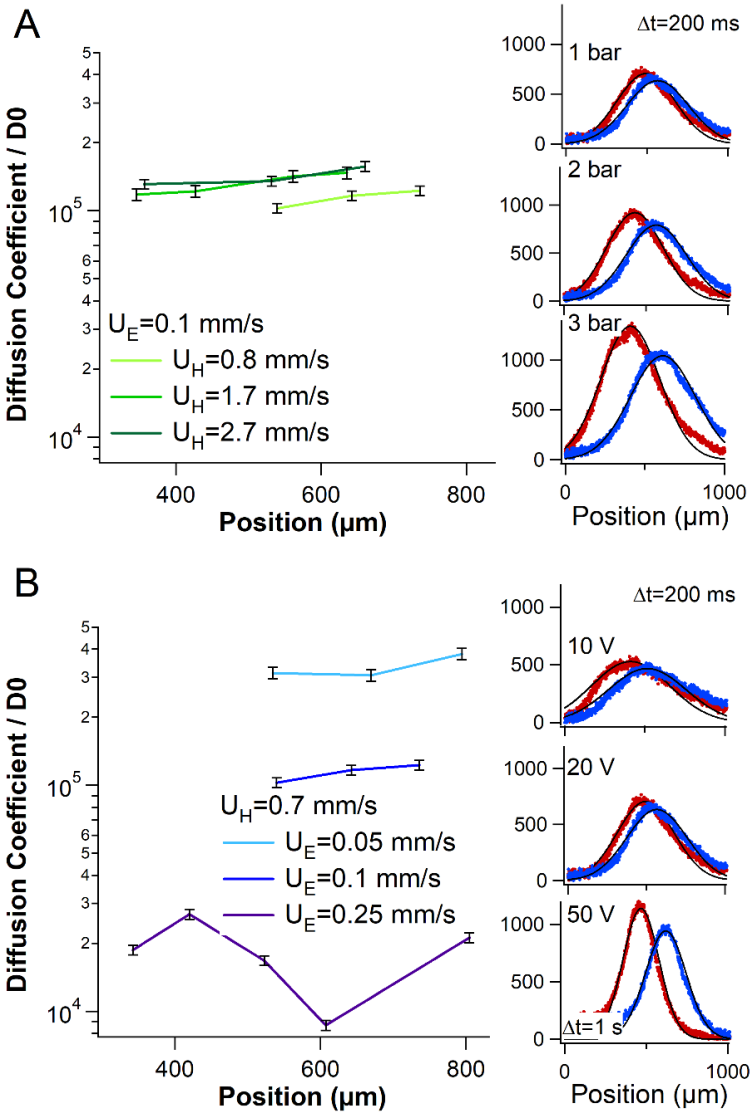


Figure 4.11 Dispersion électro-hydrodynamique avec réglages d'actionnement constants. Le graphique de gauche montre le coefficient de dispersion normalisé à D_0 en fonction de la position de la bande le long du canal. Les trois graphiques à droite correspondent à des ensembles de données brutes de la distribution d'intensité spatiale d'une bande d'ADN imagée à deux moments consécutifs séparés par 200 ms. Notez que l'intensité du pic augmente avec la pression car la masse d'ADN accumulée pendant la phase de concentration s'accumule avec le débit *(Ranchon et al, 2016)*. **(A)** La valeur de la tension est gardée constante et pour différents réglages en pression. **(B)** Même jeu de données qu'en (A) avec une pression constante et différents réglages pour la tension, comme indiqué dans la légende. Pour les graphiques bruts de distribution d'intensité à droite, nous utilisons le même intervalle de temps de 200 ms pour les deux graphiques en haut, mais le changeons à 1 s pour celui du bas.

De plus, comme dans l'expérience précédente, le coefficient de dispersion est à peu près stationnaire dans l'espace, mais au contraire, il semble changer radicalement avec le champ électrique. Il a en effet été divisé par un facteur 18 de 3.3×10^5 à 1.8×10^4 pour des valeurs de tension réglées sur 10 et 50 V, confirmant ainsi la forte dépendance du coefficient de dispersion avec la force électrophorétique prédite par l'équation 4.7. Nous avons mesuré un exposant de loi d'échelle du coefficient de dispersion en fonction de la vitesse électrophorétique de ~ -1.6, en accord qualitatif avec l'exposant de -2 dérivé de notre modèle. Par conséquent, nos données ont corroboré notre modèle analytique de dispersion lors de la migration électro-hydrodynamique, et ont également montré que la dispersion des bandes est réglable et contrôlée par le champ électrique.

3. Minimisation du phénomène d'élargissement des bandes par la modulation temporelle du champ électrique

Parce que les expériences de séparation ont été effectuées avec un champ électrique qui diminuait linéairement avec le temps (Fig. 4.2, 4.4 et 4.7), nous avons finalement testé l'élargissement de la bande en appliquant différentes rampes de champ électrique, pour des pentes s'étendant de -10 à -5 V/s. Dans ces conditions, le coefficient de dispersion varie au cours du temps de la migration, nous avons donc choisi de rapporter la largeur de la bande après 1.3 mm de migration (Fig. 4.12). La largeur de bande est 3 fois plus étroite pour une pente de -10 V/s par rapport à celle de -5 V/s pour la même vitesse hydrodynamique de $U_h = 1.5\ \mathrm{mm/s}$ (Fig. 4.12 A). Inversement, décliner les vitesses hydrodynamiques pour trois réglages pour une pente donnée de -6.5 V/s a mené à une altération marginale de la largeur de bande (Fig. 4.12 B). D'un point de vue analytique, cette étude démontre qu'une diminution rapide du champ électrique est appropriée pour réduire l'élargissement de la bande. De plus, nos données confirment que le processus de dispersion est principalement piloté par le champ électrique, comme indiqué dans la section précédente (Fig. 4.11). Cette affirmation est renforcée en comparant l'étendue de la bande dérivée de notre modèle avec une solution numérique. En effet, nous avons extrait la vitesse de migration (Équ. 4.5) et le coefficient de dispersion (Équ. 4.7), et les avons intégrés pour obtenir la solution de l'équation de Fick (Équ. 4.1, voir partie suivante pour plus de détails). La prédiction résultante, tracée par les lignes en pointillés sur les figures 4.12 A et 4.12 B, sont en accord avec les données expérimentales.

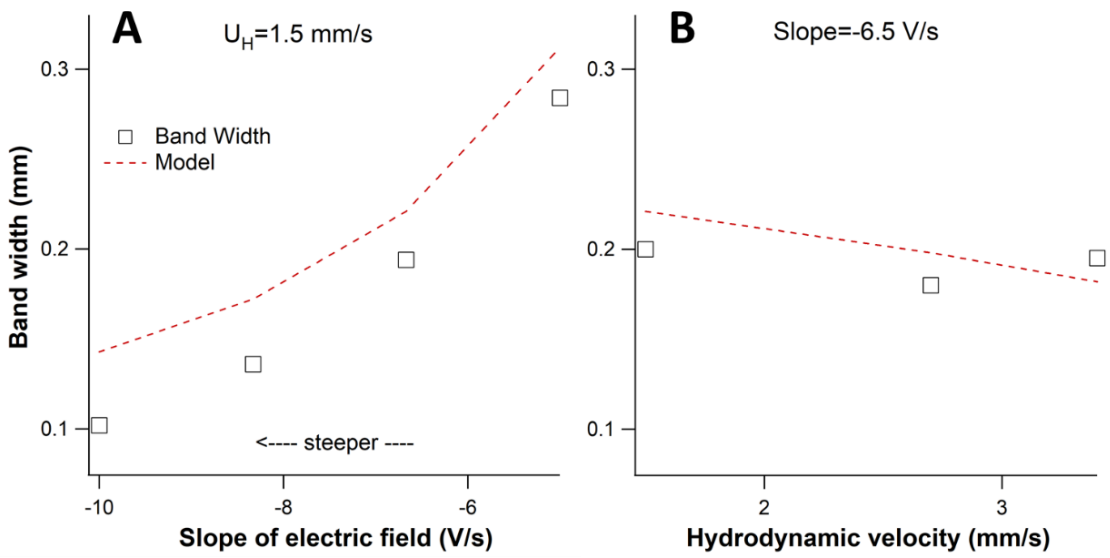


Figure 4.12 **Dispersion électro-hydrodynamique avec rampe linéaire en champ électrique.** **(A)** Le graphique montre la FWHM de la bande de 600 pb après 1.3 mm de migration en utilisant quatre pentes différentes pour le champ électrique et en réglant la vitesse d'écoulement sur 1.5 mm/s. La ligne en pointillés correspond à la solution numérique du modèle, comme décrit ci-après. **(B)** Le graphique représente la FWHM de la bande de 600 pb pour une pente donnée de -6.5 V/s et trois réglages de pression, ainsi que la prédiction du modèle.

La même analyse a ensuite été effectuée avec une deuxième bande de 1000 pb *(voir Annexe A.III.3, p. 202)*. L'analyse présente les deux sets de données pour 2 poids moléculaires différents côte à côte et montre que l'élargissement est apparemment indépendant de la vitesse hydrodynamique dans cet ordre de grandeur de poids moléculaire, toujours en bon accord avec notre modèle. Enfin la variation de la largeur de bande avec la pente du champ électrique n'est pas bien reproduite par notre modèle, sauf pour des pentes raides. L'incohérence du modèle pour les molécules de plus haut poids moléculaire reste à clarifier bien-sûr

4. Modèle numérique de comparaison

Il nous faut tout d'abord évaluer le temps de passage t_p de la bande devant le détecteur. Pour cela, nous inversons la vitesse de migration, connaissant la longueur parcourue L_p jusqu'à la région d'observation :

$$L_p = \int_0^{t_p} U_{VE}(u).du \tag{4.8}$$

La vitesse électro-hydrodynamique est donnée par l'équation 4.5 et nous définissons la pente α que suit la diminution du champ électrique :

$$U_e(t) = U_0 - \alpha.t$$
$$U_{VE}(t) = \frac{6U_h}{H}\langle\varepsilon\rangle(t) - U_e(t) = \frac{6U_h}{H}\sqrt{\frac{2k_BT}{\pi}\frac{H^2}{a\mu\tau U_h U_e(t)}} - U_e(t) \tag{4.9}$$

Les équations précédentes nous conduisent à l'équation polynomiale suivante, qui peut être résolue numériquement pour déterminer t_p :

$$L_p = \frac{{U_0}^2}{2\alpha}\left(1 - \alpha.t_p/U_0\right)^2 - \frac{2K\sqrt{U_0}}{\alpha}\sqrt{1 - \alpha.t_p/U_0} - \frac{{U_0}^2}{2\alpha} + \frac{2K\sqrt{U_0}}{\alpha}$$
$$K = \frac{6U_h}{H}\sqrt{\frac{2k_BT}{\pi}\frac{H^2}{a\mu\tau U_h}} = \sqrt{\frac{72}{\pi}}\sqrt{\frac{k_BTU_h}{a\mu\tau}} \tag{4.10}$$

La largeur de la bande est finalement déterminée en utilisant l'équation 4.7 de telle manière :

$$w_p = w_0 + \sqrt{2 \times 44 \times \frac{H^2}{\tau^2} \times \int_0^{t_p} \frac{dt}{(U_0 - \alpha.t)^2}} \tag{4.11}$$

Ces équations ont été numériquement résolues *(voir annexes III.C, p. 201)* avec le jeu de paramètre suivant : $k_B = 6\,10^{-23}$ J/K ; $T = 300$ K ; $a = (N_{bp}/300) * l_k = 200$ nm ; $\tau = 0.5\,10^{-3}$ s ; $\mu = 30\,10^{-3}$ Pa.s ; $H = 2\,10^{-6}$ m ; $L_p = 1.3$ mm ; $U_h = 1.7\,10^{-3}$ m/s ; $w_0 = 0.05$ mm. La valeur de U_0 est calculée à partir des conditions d'arrêt à $t = 0$ (Équ. 4.9), donnant $U_0 = 0.8$ mm/s.

IV. Discussions sur les différentes stratégies d'actionnement du champ électrique

Nous avons enfin souhaité comparer l'élargissement de bande à l'aide de champs électriques constants ou temporellement variables. Notre objectif était (i) d'identifier les stratégies d'activation optimales pour la réduction de la dispersion lors des expériences de séparation, et (ii) de récapituler les données de séparation de l'ADN présentées sur la figure 4.6. Nous avons caractérisé le profil de la bande de taille 600 pb après 1 mm de migration avec quatre réglages d'actionnement basés sur l'électro-hydrodynamique ou l'hydrodynamique (Fig. 4.14). La migration à 2 bars est associée à une vitesse de $U_h \sim 1.0\ \mathrm{mm/s}$ dans le canal de séparation (jeu de données vert sur la figure 4.14). La propagation dans cette situation est attendue à son maximum, comme déduit de la largeur de la bande de ~ 500 µm après 1 s. Nous avons ensuite combiné l'hydrodynamique à un champ électrique constant associé à une tension de 20 V (de manière équivalente $U_E \sim 0.1\ \mathrm{mm/s}$, jeu de données rouge sur la figure 4.14). Cette stratégie d'actionnement ralenti la migration de la bande caractérisée par une vitesse de $U_{VE} \sim 0.16\ \mathrm{mm/s}$, ainsi que sa largeur réduite à ~ 110 µm. On peut noter l'asymétrie du profil, de la bande, qui semble due aux conditions aux limites hydrodynamiques près des parois latérales du canal de séparation rectangulaires (Fig. 4.13).

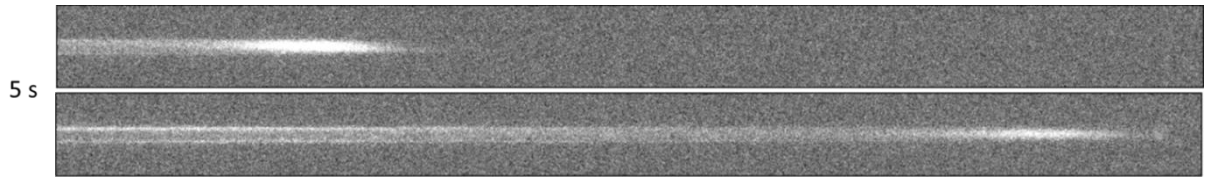


Figure 4.13 **Les deux micrographies de fluorescence présentent la migration d'une bande d'ADN avec un champ électrique constant de 20 V et une pression de 2 bars.** L'intervalle de temps entre les deux images est de 5 s. La bande semble "fuir" près des parois latérales. Ce résultat est dû aux conditions aux limites pour un canal rectangulaire de 10 µm de largeur et 2 µm de hauteur. Le champ de vitesse d'écoulement est ralenti près des parois sur une distance d'environ 1 µm. Le champ électrique est donc comparativement plus élevé dans cette région, et la migration de bande est encore ralentie.

Nous avons ensuite testé l'élargissement de la bande avec un champ électrique variable dans le temps en utilisant une forte pente de -15 V/s à partir d'une tension de 150 V (jeu de

données cyan sur la figure 4.14). La convection sur une distance de 1 mm a pris 11 s. Pourtant, étant donné la pente de -15 V/s, le champ électrique est nul pendant la dernière seconde de la migration, ce qui explique la migration hydrodynamique rapide de la bande au cours des 1.5 dernières secondes (la bande a parcouru plus de ~ 600 µm en 1.5 s contre 200 µm en utilisant un champ électrique constant). Fait intéressant, alors que le profil de la bande a atteint un pic après 9.5 s avec une FWHM de 95 µm, la prévalence de l'hydrodynamique a rapidement augmenté sa largeur jusqu'à ~ 300 µm après 11 s. Cette observation a clarifié nos données de séparation montrées sur la figure 4.6, et plus spécifiquement la forte dépendance du nombre de plateaux théoriques avec la pente du champ électrique (Fig. 4.6 C). En effet, des séparations optimales ont été obtenues lorsque le passage de la bande devant le détecteur était concomitant à la disparition du champ électrique, comme le montre le chromatogramme de la figure 4.6 A. Gardant à l'esprit que l'élargissement de la bande diminue à mesure que la pente du champ électrique augmente (Fig. 4.12 A), la minimisation de l'élargissement de la bande semble alors être un compromis entre la pente la plus forte et un champ électrique qui ne disparait pas lorsque la bande atteint le détecteur.

Enfin, nous avons cherché à montrer que l'actionnement électro-hydrodynamique permet de contrôler finement l'élargissement de la bande. Nous avons choisi d'utiliser la même pente linéaire de -15 V/s et l'avons arrêtée à 20 V afin de maintenir les forces viscoélastiques transversales tout au long de la migration (jeu de données violet sur la figure 4.14). A noter que cette stratégie a déjà été testée avec succès pour la séparation d'ADN à haut poids moléculaire en format capillaire *(Milon et al., 2019)*. Le temps de passage a été significativement été étendu à 16 s, correspondant à un décalage de ~ 8 s. Pendant cette période de ~ 8 s il y a diminution du champ électrique suivie d'une migration lente de ~ 8 s sous des paramètres électro-hydrodynamiques maintenus constants. Étant donné que l'actionnement électro-hydrodynamique est identique au cours des 1.5 dernières secondes, la vitesse de migration et l'étalement de la bande sont vraisemblablement comparables avec ou sans pente (comparer le déplacement et l'augmentation de la largeur des jeux de données violet et rouge). Il est important de noter que cette stratégie d'actionnement a donné la largeur de bande la plus nette associée à une FWHM de 79 µm, c'est-à-dire une augmentation de 24 µm par rapport à la largeur initiale de 55 µm de la phase de concentration (voir l'étalonnage de D_0 figure 4.8). Dans l'ensemble, cette étude expérimentale démontre que le contrôle temporel du champ électrique fournit une solution efficace pour régler et réduire l'élargissement de la bande pendant la migration électro-hydrodynamique.

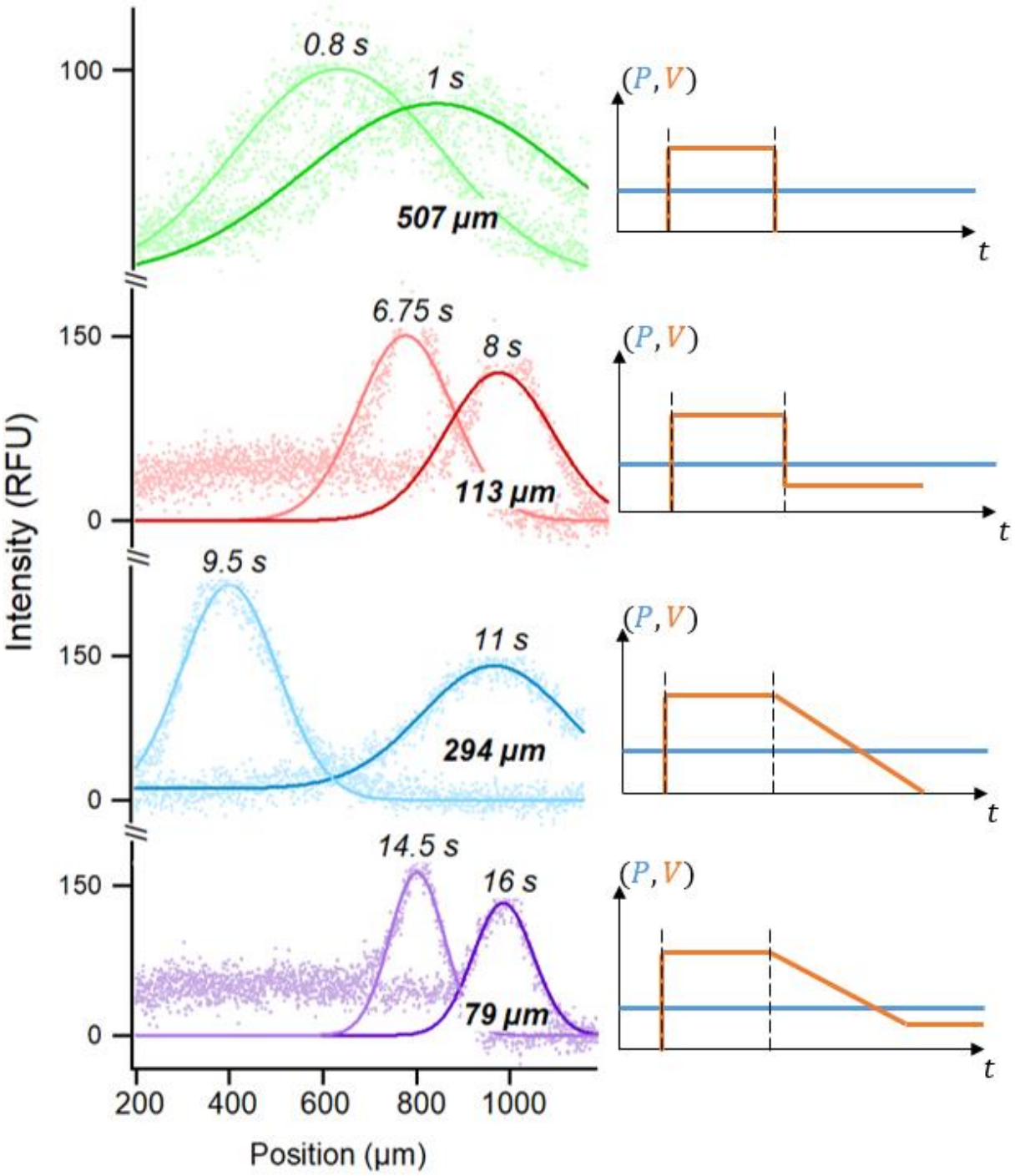


Figure 4.14 **Contrôle de l'élargissement de bande dans la migration électro-hydrodynamique.** Les quatre graphiques représentent la distribution spatiale d'une bande d'ADN de 600 pb au cours de sa migration avec actionnement hydrodynamique associé à $U_h \sim 1.0$ mm/s (jeu de données vert) ou actionnement électro-hydrodynamique avec un champ électrique constant de 20 V ($U_e \sim 0{,}1$ mm/s, jeu de données rouge) ou pente linéaire de -15 V/s à partir de 150 à 0 V (jeu de données bleu) et une pente linéaire de -15 V/s de 150 à 20 V (jeu de données violet). Dans chaque graphique, deux profils consécutifs sont signalés avec leurs temps respectifs notés en encart. Le nombre en gras correspond à la FWHM de la bande après ~ 1 mm de migration.

V. Conclusion

Dans cette étude, nous avons voulu caractériser l'élargissement de la bande dans la migration électro-hydrodynamique de l'ADN et confronter nos données à un modèle de dispersion basé sur des arguments de type Taylor. Nos principales conclusions sont que la dispersion est principalement contrôlée par le champ électrique et, par conséquent, un réglage fin du champ électrique au fil du temps permet de réduire l'élargissement de la bande. Ces données fournissent également des conseils pour une explication rationnelle des conditions optimales pour les expériences de séparation d'ADN. Ces résultats contribuent donc à améliorer les performances des plateformes de séparation d'ADN basées sur l'actionnement électro-hydrodynamique. Les futurs axes de recherche incluent l'intégration des modèles de migration de l'ADN *(Chami et al., 2018* par exemple*)* à l'élargissement des bandes pour obtenir une boîte à outils in silico complète qui peut être testée et validée pour des optimisations de séparation. Avec cet outil, nous pourrions clarifier si une variation linéaire du champ électrique dans le temps est une stratégie optimale pour améliorer les performances analytiques, pour cela nous avons développé un outil de simulation numérique qui pourrait permettre de mettre au point ce type de prédictions. Nous aborderons cet outil et présenterons quelques résultats supplémentaires dans le prochain chapitre, en perspective. Il convient également de préciser si ce modèle peut être adapté à d'autres types de cibles sous la forme d'acides nucléiques simple brin, par exemple des ARN ou particules. Dans ce dernier cas, de nombreuses études ont abordé la physique de la focalisation des particules dans les écoulements de Poiseuille *(D'Avino et al., 2017 ; Yuan et al., 2018)*, et un intérêt récent est apparu pour la séparation des micro-organismes *(Nam et al., 2019)*, mais la dispersion reste à étudier et à modéliser, potentiellement avec des arguments similaires de type Taylor. Enfin et surtout, notre modèle peut s'avérer utile pour analyser l'élargissement de la bande pendant le fractionnement de flux de champ *(Giddings et al., 1976 ; Schure et al., 1989)*, une technique de séparation qui s'appuie par exemple sur forces magnétiques, gravitationnelles ou hydrodynamiques perpendiculaires à la direction de l'écoulement. Avec une expression explicite de la force transversale, l'étendue de la couche de confinement peut être prédite et exploitée pour minimiser l'élargissement de la bande et améliorer les performances de séparation.

Chapitre 5

Perspectives

L'objectif de cette partie est de mettre en avant certains travaux qui ne sont pas assez aboutis pour constituer une partie à part entière, en particulier pour le modèle de simulation numérique que nous aborderons juste après. Il s'agit aussi de résultats qui ne sont pas entièrement miens comme le travail effectué sur la détection, présenté en II., en collaboration avec Inga Tijunelyte, post-doctorante dans l'équipe. Ses spécialités étant la biologie et la chimie il nous semblait évident qu'elle s'occupe des expérimentations de détection alors que le travail d'optimisation et de développement autour de nouveaux procédés de fabrication semblait plus correspondre aux miennes.

I. Construction d'un modèle numérique de séparation

Jusqu'ici nous avons évoqué des objectifs de nos travaux comme étant l'optimisation des séparations et l'augmentation des performances générales de la technologie µLAS. L'établissement d'un modèle de migration *(Chami, 2018)* et les différentes études analytiques de la phénoménologie dans µLAS ouvrent la voie à la construction d'un modèle numérique pour la prédiction de résultats expérimentaux voire même la prédiction de réponses dans des gammes de paramètres plus rapidement. Cette stratégie est l'homologue numérique de l'instrumentation mise en place via le banc d'expérimentation automatisé présenté au Chapitre 3. En effet, ce banc permet une exploration rapide et fiable des espaces de paramètres Tension/Pression avec en lecture de sortie la résolution de séparation idéalement. Un modèle de simulation numérique permettrait d'explorer d'autres gammes de paramètres comme le couple viscosité/élasticité. Nous décrirons dans cette partie l'établissement préliminaire de ce modèle numérique et les questionnements qu'il soulève.

A. Mise en place

1. *Mode de séparation temporel en format capillaire : Biabooster*

Le mode de séparation temporel, pour rappel, sépare les espèces en fonction de leurs tailles au cours du temps lors de leur migration dans un canal droit. Les étapes de concentration et séparation µLAS en capillaire se font dans un système présenté en figure 5.1. Pas de constriction ici comme en format puce mais un emmanchement de plusieurs capillaires de

diamètres différents. Le plus gros agit comme une chambre de concentration avec une force élastique transverse faible pour conserver le matériel génétique.

Le capillaire de petit diamètre qui lui fait suite constitue la région de séparation, la force élastique transverse y est élevée, ce qui plaque les molécules près de la paroi. La concentration se fait à pression et tension constantes (10 bars et 25 kV), puis la tension est diminuée pour laisser certaines tailles s'échapper de la zone de concentration et commencer leur migration dans le capillaire de petit diamètre, jusqu'au détecteur.

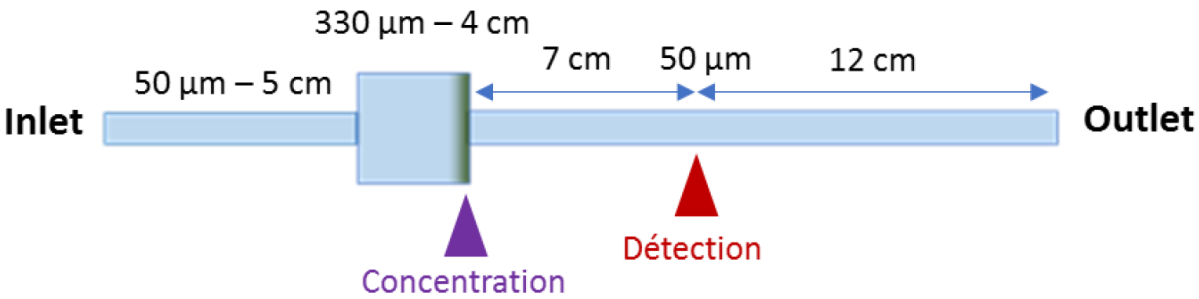


Figure 5.1 Schéma et dimensions du dispositif permettant d'effectuer les concentrations et les séparations par µLAS en mode temporel dans des capillaires. Le dispositif est un emmanchement de deux capillaires de 50 µm dans un capillaire de 330 µm. Le capillaire de 330 µm correspond à la chambre d'injection et de concentration et le capillaire de 50 µm permet d'effectuer la séparation. La détection est effectuée à 7 cm de la zone de concentration.

La figure 5.2 présente deux résultats de séparation réalisées dans ces conditions pour deux *ladders*, deux gammes de tailles différentes. Le premier *ladder* de plus petit poids moléculaire présente les tailles 100-1500 pb tandis que le deuxième présente les tailles 3000-50000 pb. Les tensions et donc les champs électriques sont modulés dans le temps spécifiquement en fonction de la gamme à séparer (lignes rouges). Nous nous servirons de ces résultats de séparation comme base d'ajustement de données à inclure dans notre modèle de simulation numérique.

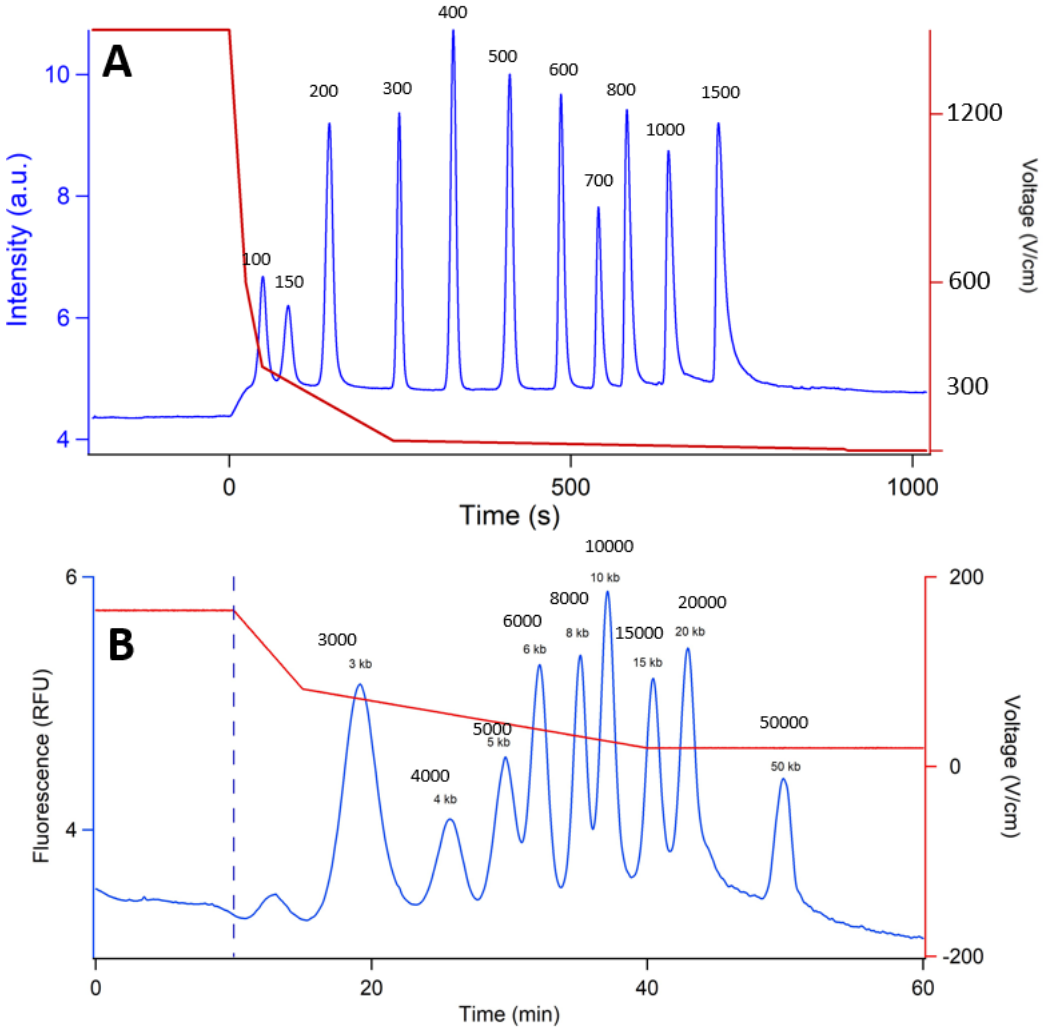


Figure 5.2 Analyse de deux *ladder* d'ADN via Biabooster µLAS. La courbe rouge représente l'évolution du champ électrique au cours du temps et la courbe bleu l'intensité de fluorescence détectée. **(A)** *Ladder* de bas poids moléculaire. **(B)** *Ladder* de haut poids moléculaire.

2. Équation advection-diffusion et une solution

L'objectif est de rapporter au cours du temps la variation de la concentration (Figure 5.2, courbes bleues) de ces espèces en fonction de leur position dans le canal, en fonction du temps et, implicitement, en fonction des paramètres d'actionnement. Ce phénomène est décrit par l'équation d'advection/diffusion :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D(t)\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - U(t)\frac{\partial c}{\partial x} \tag{5.1}$$

Nous avons déjà présenté l'équation précédente, C est la concentration de l'espèce et elle est décrite dans l'espace et dans le temps. D est son coefficient de diffusion et U sa vitesse.

Une solution de cette équation peut être de forme gaussienne comme présentée par l'équation 4.1. Or, dans un premier temps la description de la concentration en tout point de l'espace ne nous intéresse pas. C'est pourquoi l'expression de l'équation 5.2 fait intervenir L et non x. Le système (Fig. 5.1) détecte le passage des bandes après une longueur de migration $L = 7cm$:

$$C^a(L,t) = C_0^a exp - \frac{(L - \int_{t_0^a}^{t} U(w)dw)^2}{4\int_{t_0^a}^{t} D_{VE}(w)dw} \tag{5.2}$$

avec t_0^a le temps initial auquel l'espèce a commence sa migration et donc la séparation. Cette donnée est difficilement accessible dans ce système et nous n'avons que quelques valeurs de références pour certaines tailles spécifiques.

3. Temps initial

Néanmoins il est possible, à partir du modèle analytique, d'estimer numériquement ce temps. En effet, à l'équilibre :

$$U(t < t_0^a) = \sqrt{\frac{U_h k_B T}{K'\eta\tau\pi^2\mu_0 E(t)}} - \mu_0 E(t) = 0 \tag{5.3}$$

avec μ_0 la mobilité électrophorétique de l'ADN, $E(t)$ le champ électrique dépendant du temps (ici défini par partie), K' un paramètre adimensionnel apparaissant dans le modèle numérique *(Chami, 2018)*, η la viscosité et τ le temps caractéristique de relaxation de la matrice polymère.

Numériquement, on effectue le test de l'équation 5.3 en faisant passer le temps et donc le champ électrique jusqu'à ce que $U(t_0^a) > 0$.

4. Temps de passage

Une première donnée accessible pour un ajustement est le temps de passage d'une bande devant le détecteur. La simulation numérique peut être faite par le calcul de la vitesse intégrée au cours du temps jusqu'à ce que cette intégrale égale la longueur de migration :

$$L^a(t) = \int_{t_0^a}^{t} U(w)dw \tag{5.4}$$

$L^a(t)$ est la longueur parcourue par l'espèce a au cours du temps et de la décroissance du champ électrique. L'espèce migre dans le petit capillaire jusqu'à arriver au niveau du détecteur $L^a(T^a) = L$ au bout d'un certain temps T^a. C'est le temps de passage.

5. Coefficient de dispersion

On peut définir un coefficient de diffusion effectif D_{VE} pour un cisaillement plan dans la tranche de fluide comprise en 0 et $2\langle z\rangle$. $\langle z\rangle$ est la hauteur moyenne de la molécule dans le capillaire (Équ. 4.4) et intégrée avec l'équation 4.6 on peut écrire :

$$D_{VE}(t) = D\frac{63}{210}Pe^2(2/H)^4\left(\sqrt{\frac{2k_BT}{\pi}\frac{H^2}{aK'\eta\tau U_h\mu_0E(t)}}\right)^4 \tag{5.5}$$

avec $Pe = U_h a/D$ et $D = k_BT/3\pi\eta a$.

6. Résolution de séparation

Enfin on s'intéressera à la recherche d'une résolution maximale en faisant varier certains paramètres intrinsèques au système ou au fluide dans un but prospectif. Dans ce cas on calculera la résolution de séparation entre 2 bandes :

$$R_s = 2\frac{T^{a_2} - T^{a_1}}{2.355\left(\sqrt{2D_{VE}(T^{a_2})} + \sqrt{2D_{VE}(T^{a_1})}\right)} \tag{5.6}$$

En faisant varier plusieurs paramètres d'intérêt sur de larges domaines il serait possible d'explorer de nouveaux horizons pour une application expérimentale par la suite ou encore dans un but purement analytique.

B. Paramétrage du modèle

Après l'introduction du calcul numérique, nous souhaitons rappeler que l'objectif du modèle est d'arriver à finalement simuler une séparation complète de toutes les tailles pour un système donné qui possède ses propres propriétés *(Annexe IV.A, p. 203)*. Dans la mesure où ce modèle repose sur de nombreux phénomènes physiques, il doit être paramétré. Nous

connaissons (viscosité, temps de relaxation et géométrie du système) ou pouvons estimer (taille du fragment $a = (N_{pb}/300)l_k$) grands nombre de ces paramètres. Nous attirerons l'attention notamment sur K', qui est un paramètre adimensionnel du modèle. Pour une certaine taille de molécule a, la molécule est maintenue près du mur avec une réponse analogue à celle d'un ressort de raideur k. Cette information est contenue dans K'. Ce paramètre sortant donc du modèle, nous allons explorer la gamme de valeur qu'il peut prendre dans nos simulations et l'ajuster. Le deuxième paramètre qu'il reste à estimer pour compléter le modèle est la mobilité électrophorétique μ_0, qui correspond à une valeur de migration électrophorétique en régime électro-hydrodynamique donc difficile à mesurer.

Nous avons fait varier ces deux paramètres K' et μ_0 sur de larges gammes, respectivement $[10^{-1}..10^{-8}]$ et $[10^{-10}..10^{-4}]$. Pour chaque couple de valeurs les temps initiaux et temps de passages sont calculés pour une taille unique: 300 bp pour le *ladder* de bas poids moléculaire, 3000 bp pour le *ladder* de haut poids moléculaire. Puis l'erreur aux valeurs expérimentales (Fig. 5.3) est évaluée par :

$$Err = log_{10}\left[\left(t_{0,mod}^{300} - t_{0,exp}^{300}\right)^2 + \left(T_{mod}^{300} - T_{exp}^{300}\right)^2\right] \tag{5.7}$$

Parmi cette gamme de variation un minima sort à chaque fois. Pour ces couples de K' et μ_0 les temps initial et de passage des tailles 300 et 3000 bp sont très proches de l'expérimentation. Ces résultats, présentés dans des graphiques 3D, peuvent être retrouvés en figures 5.3 et 5.5.

Ensuite nous voulons faire varier K' et μ_0 en fonction de la taille pour ajuster les temps initial et de passage au reste des tailles dans les *ladder* respectifs. Nous montrons dans les figures 5.4 et 5.6 les résultats ainsi obtenus.

1. Résultats pour la gamme de bas poids moléculaire

Nous résumons dans cette partie l'ensemble de l'ajustement des données qui a été réalisé pour le set d'expérimentation à bas poids moléculaire. Nous commençons par présenter la matrice 3D montrant une évaluation de l'erreur des temps de passages et initial ainsi calculé par le modèle (Fig. 5.3) par rapport à l'expérimentation. Dans la gamme de variation de K' et μ_0 un minimum est trouvé, qui ajuste très bien les temps de passage et initial pour la taille 300

bp. Il est possible alors de remonter à la valeur de la raideur $k = K'l/h$, avec l la longueur typique d'influence de la force viscoélastique transverse. Pour 300 bp $k = 2\ 10^{-3}\ pN/\mu m$.

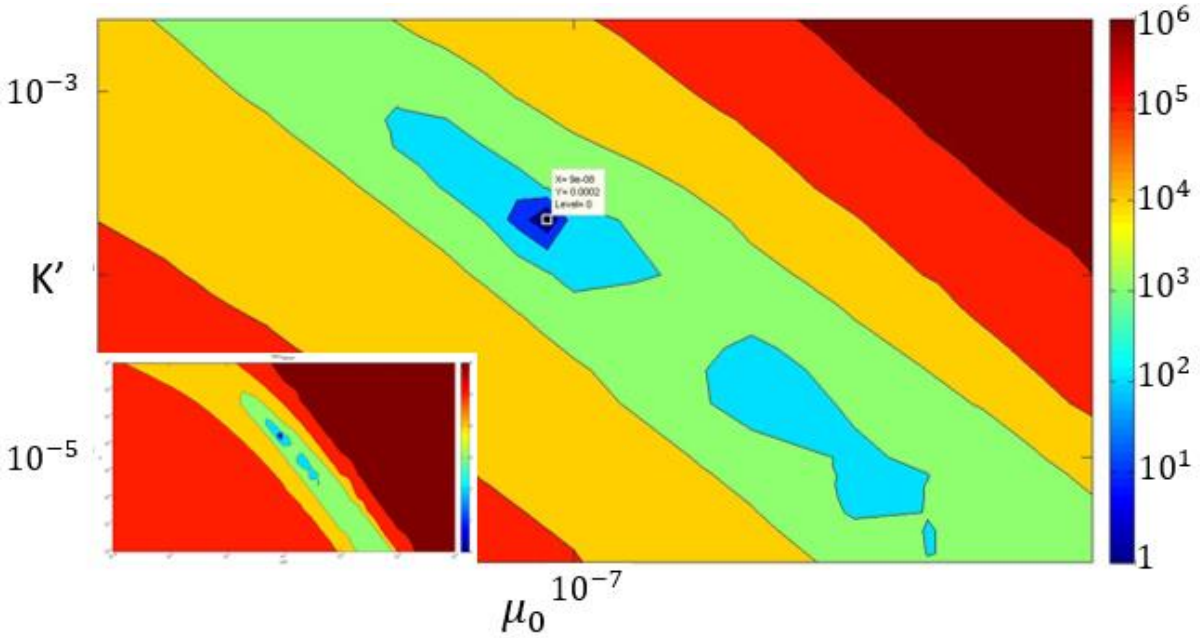


Figure 5.3 **Matrice présentant l'écart du modèle à l'expérimentation pour 300 bp.** Sont représentés en abscisse et ordonnée K' et μ_0 sur une gamme de variation zoomée pour attirer l'attention sur les minima. Le minima pour le *ladder* de bas poids moléculaire présente $K'^{300} = 2.10^{-4}$ et $\mu_0^{300} = 9.10^{-8}\frac{m^2}{V.s}$.

Ensuite nous ajustons le reste des données en faisant varier $K'^a = K'^{300}a^p$ et $\mu_0^a = \mu_0^{300}$ (Fig. 5.4 A) et $K'^a = K'^{300}a^1$ et $\mu_0^a = \mu_0^{300}a^p$ (Fig. 5.4 B). Dans les deux prochaines figures nous montrons l'ajustement des données pour les temps de passages pour le *ladder* entier. L'ajustement pour les temps initiaux a été réalisé mais peut difficilement être comparé à l'expérimentation par manque de données sur ce point-là spécifiquement *(Annexes IV.B, p. 208)*. L'objectif est de voir s'aligner tous les temps de passage, pour toutes les tailles, sur la courbe noire qui sont les données expérimentales.

Les données ne s'ajustent pas très bien : l'ordre de grandeur est respecté mais la précision n'est pas suffisante pour espérer faire de la prédiction. Il s'avère que μ_0^a est très dépendant de la taille à bas poids moléculaire (ce qui n'était pas vraiment attendu pour la mobilité, qui dépend normalement peu de la taille des chaînes).

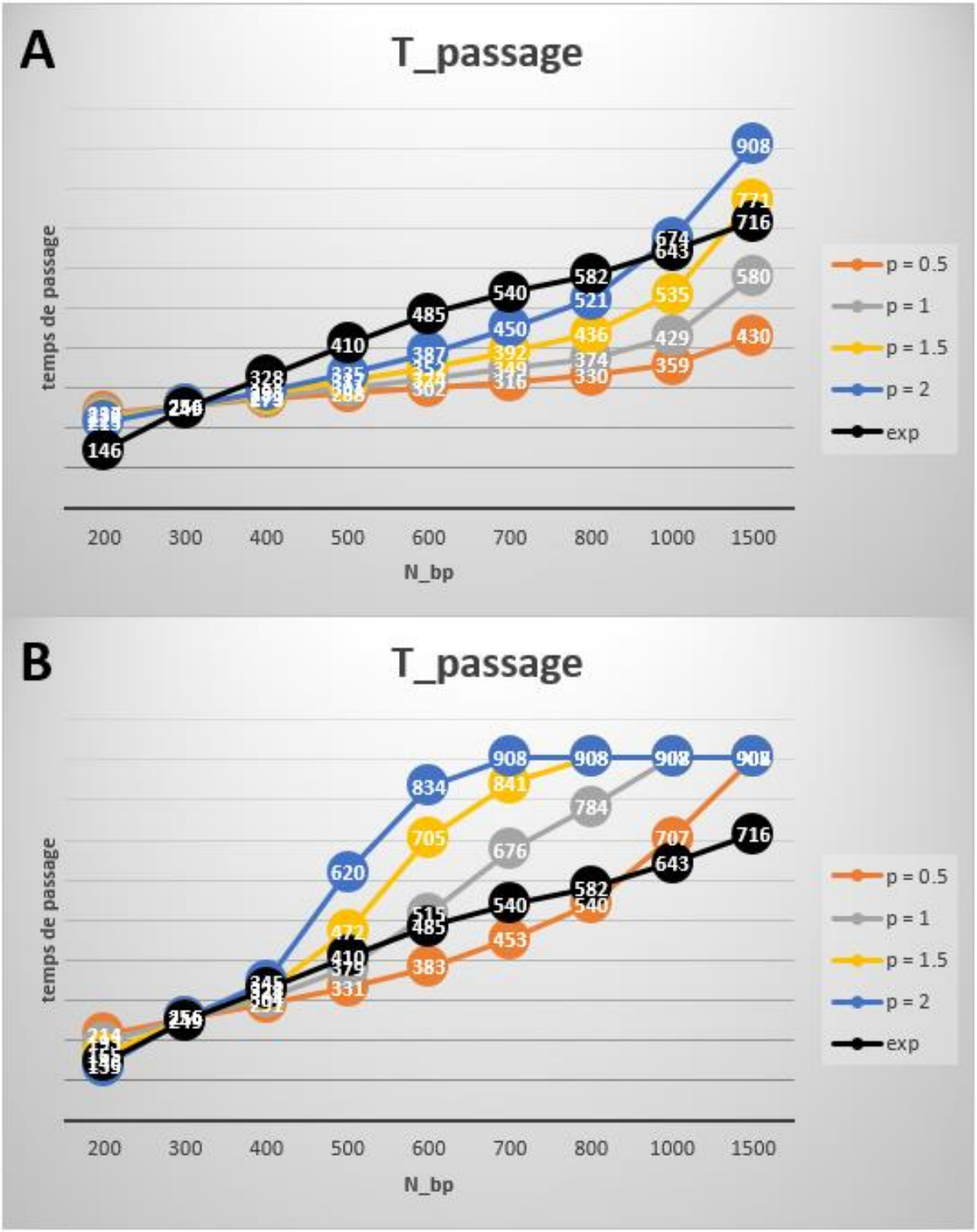


Figure 5.4 Temps de passages par les variations des paramètres d'ajustement en fonction de la taille de la molécule (bas poids moléculaire). **(A)** $K'^{a} = K'^{300}a^{p}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{300}$. **(B)** $K'^{a} = K'^{300}a^{1}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{300}a^{p}$.

La figure 5.5 illustre certains des tests effectués pour trouver une loi de dépendance en taille pour la mobilité, guidés par la seule volonté de chercher à ajuster les données expérimentales. En faisant varier p, l'exposant de la dépendance en la loi de puissance en taille (Fig. 5.4 B) nous nous sommes aperçu que grossièrement plus p est grand et mieux les petites tailles sont ajustées et plus p est petit et mieux les grandes tailles sont ajustées. La figure 5.5 A présente le résultat d'ajustement pour $p \equiv fct.(a^2)$, une décroissance parabolique de p. La figure 5.5 B présente une décroissance asymptotique $p \equiv fct.(1/a)$. La figure 5.5 C présente quant à elle un ajustement reconstitué par partie des tests qui minimisent l'écart par gamme de taille. La dépendance de la mobilité en la taille n'est toujours pas tirée au claire mais nous tenons à souligner les valeurs jalons de p qui doit décroitre de ~ 2 à ~ 0.5, il reste à déterminer comment, et comprendre pourquoi.

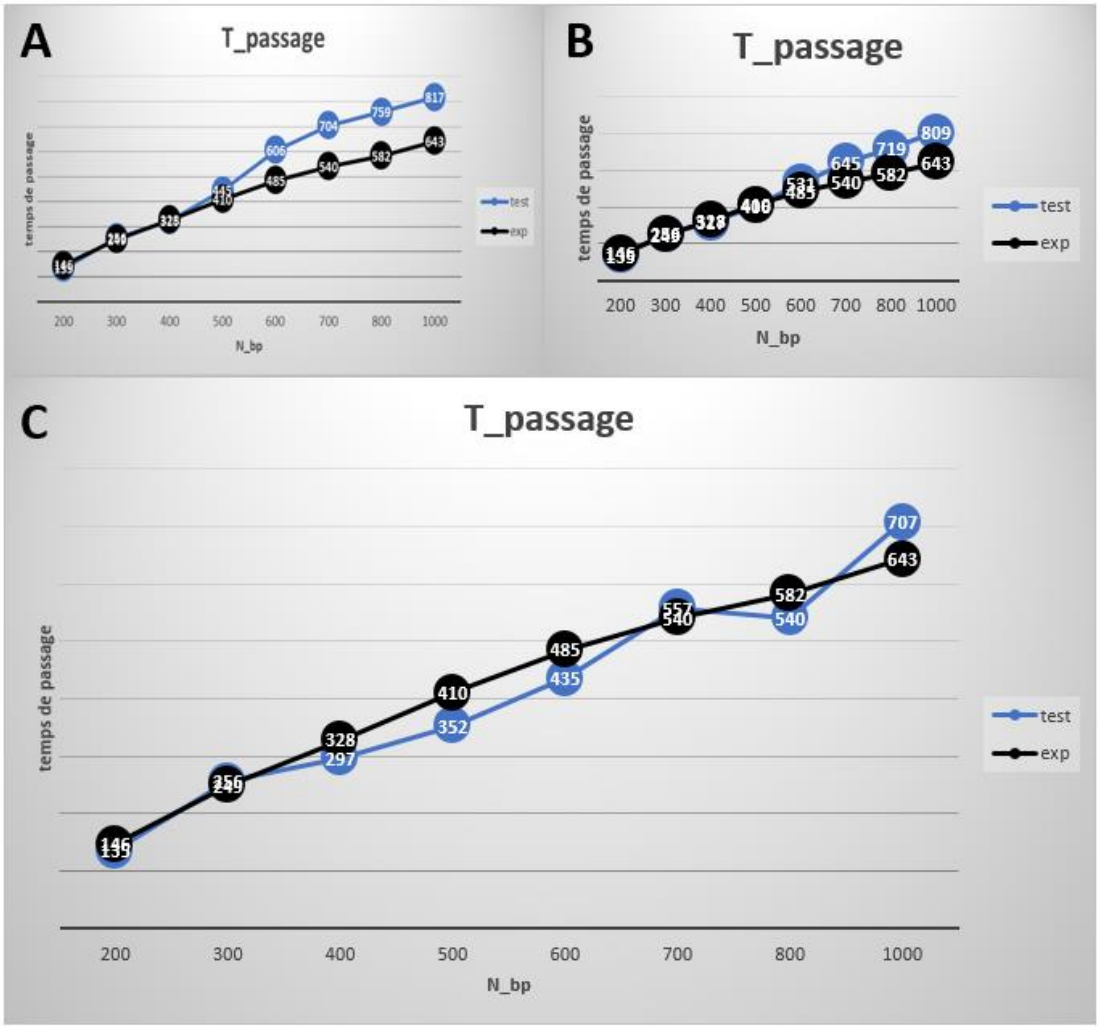


Figure 5.5 Temps de passages par des variations de la mobilité en loi de puissance dépendante de la taille. Plus la taille est petite et plus la mobilité varie, et inversement avec l'augmentation en taille. $K'^{a} = K'^{300}a^{1}$ **(A)** $\mu_0^a = \mu_0^{300}a^{A.a^2+B.a+C}$. **(B)** $\mu_0^a = \mu_0^{300}a^{1/A.a+B}$. **(C)** la mobilité est définie ici comme dépendante par partie.

2. Résultats pour la gamme de haut poids moléculaire

Dans cette partie l'ensemble des résultats pour le *ladder* de haut poids moléculaire est résumé., en commençant par la matrice 3D d'erreur en figure 5.6. Puis ce sont les ajustements sur les temps de passages pour le reste des tailles, réalisé comme expliqué plus haut, en faisant varier K' et μ_0 en fonction de la taille (Fig. 5.7). De la même manière nous pouvons remonter à la raider pour 3000 bp cette fois $k = 0.7\ 10^{-6}\ pN/\mu m$, bien inférieur à la valeur de la raideur pour 300 bp.

On peut remarquer une tendance sur la figure 5.7 B qui prédirai un μ_0 qui dépend très peu de la taille à plus haut poids moléculaire. En effet sur cette figure on peut apercevoir une tendance dans l'exposant, plus celui-ci est petit et plus les temps semblent s'aligner sur l'expérimentation. Sur cette figure la variation en taille descend jusqu'à $\mu_0^a = \mu_0^{3000}\sqrt{a}$. Nous avons alors essayé de pousser plus loin l'idée d'ajuster les données en diminuant encore la dépendance en taille et donc diminuer p. Ces résultats *fit* très bien les données expérimentales (Fig. 5.8) pour $p = 0.1$, la variation de la mobilité est donc très faible (contrairement à la figure 5.5).

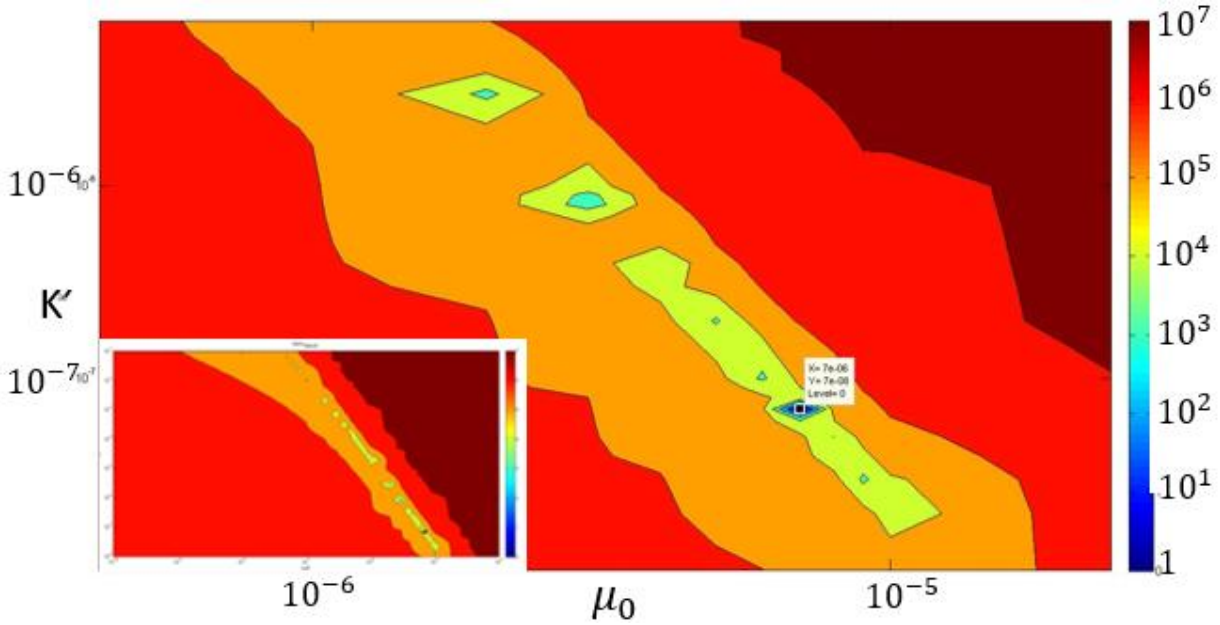


Figure 5.6 Matrice présentant l'écart du modèle à l'expérimentation pour 3000 bp. Sont représentés en abscisse et ordonnée K' et μ_0 sur une gamme de variation zoomée pour attirer l'attention sur les minima. Le minima pour le *ladder* de haut poids moléculaire présente $K' = 7.10^{-8}$ et $\mu_0 = 7.10^{-6}\frac{m^2}{V.s}$.

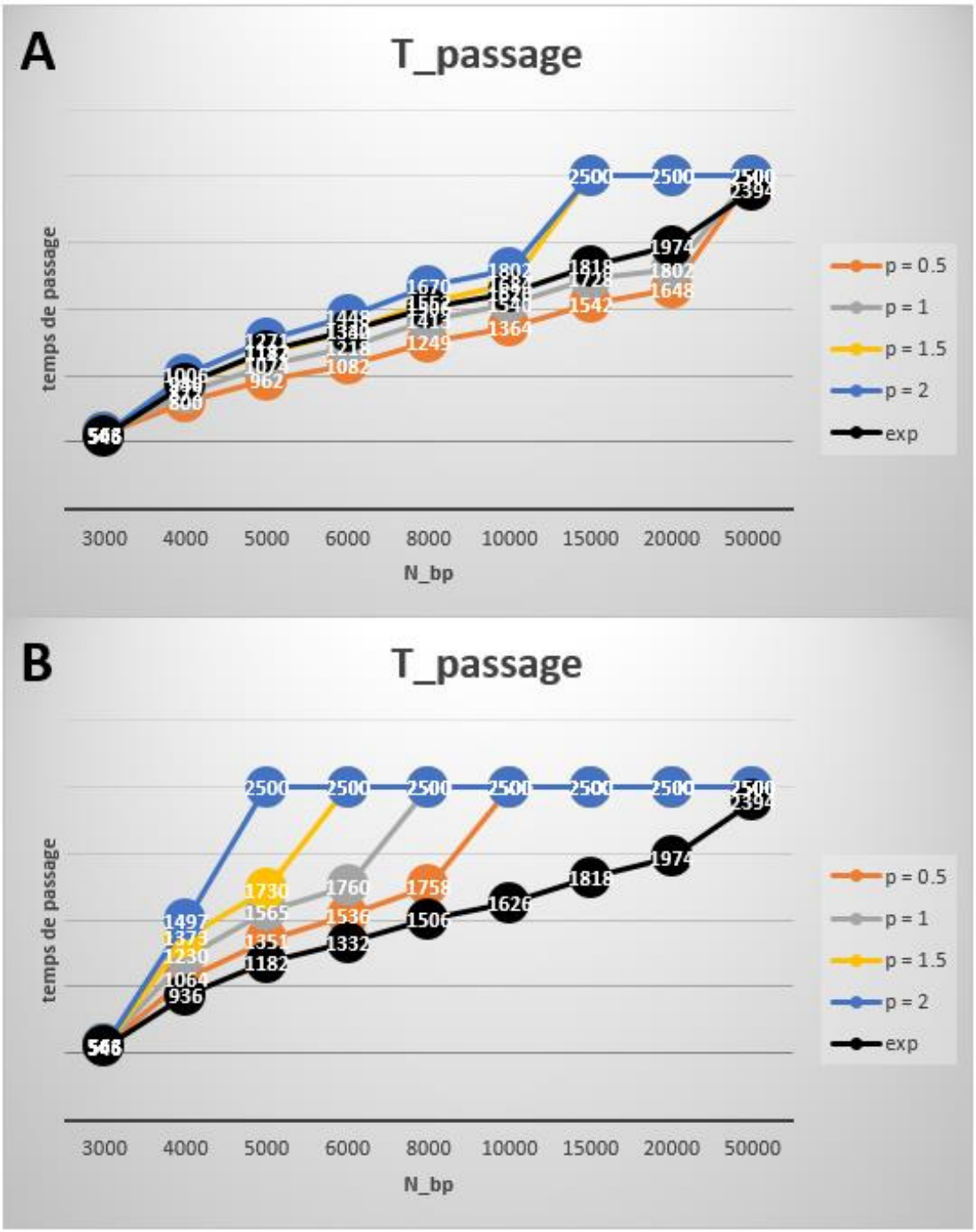


Figure 5.7 Temps de passages par les variations des paramètres d'ajustement en fonction de la taille de la molécule (haut poids moléculaire). **(A)** $K'^{a} = K'^{3000}a^{p}$ et $\mu_0^a = \mu_0^{3000}$. **(B)** $K'^{a} = K'^{3000}a^{1}$ et $\mu_0^a = \mu_0^{3000}a^{p}$.

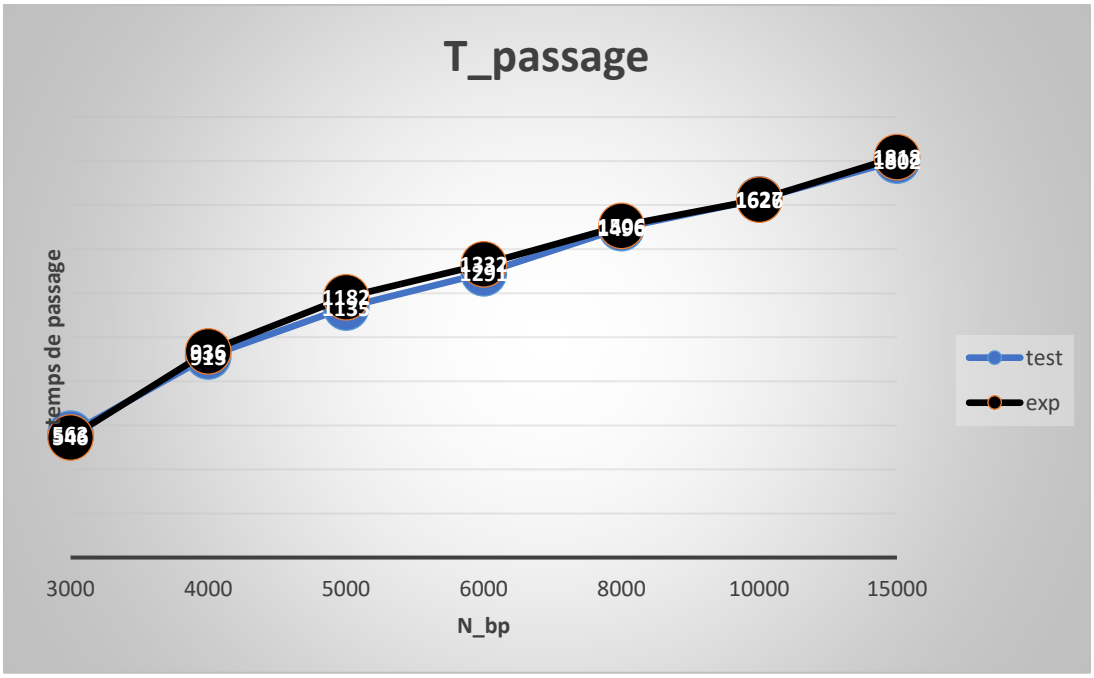


Figure 5.8 Temps de passages pour $K'^{a} = K'^{3000}a^{1}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{3000}a^{0.1}$. L'écart entre les données expérimentales et de simulation est de l'ordre de 2%.

C. Coefficient de diffusion effectif

Les calculs des coefficients de diffusion que nous avons réalisés ont pu permettre de confirmer la dépendance claire du processus de diffusion en la taille (Fig. 5.9).

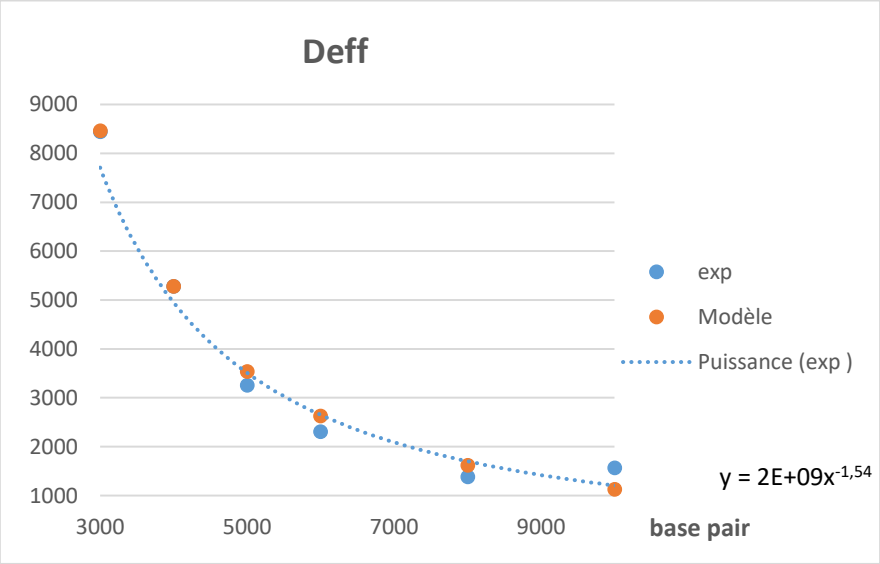


Figure 5.9 Graphique présentant le calcul du coefficient de diffusion effectif en fonction de la taille.

En recombinant l'ensemble de tous ces éléments dans le calcul de l'équation 5.1 nous obtenons des profils de concentration dépendante de la taille et du paramétrage du modèle effectué en amont. Nous présenterons ces profils dans la partie suivante ainsi que d'autres résultats prospectifs dans l'étude de l'influence des autres paramètres du système cette fois-ci.

D. Quelques résultats prospectifs

Dans la figure 5.10 est présenté un profil qui met en évidence les 7 bandes de 3000 à 15000 bp en fonction du temps. Les concentrations sont différentes car chaque taille dans le *ladder* vient avec sa propre concentration C_0^a qui pondère donc les amplitudes. On notera que le modèle en l'état ne prend pas en compte les largeurs initiales w_0^a de chaque tailles à la concentration *(voir Annexe A.IV.3, p. 210 pour un test préliminaire)*. Cette information n'est pas accessible pour le jeu de données Biabooster. L'intérêt serait ici d'aller compléter le modèle en incorporant cette information et en complétant l'étude grâce au format *picolike* qui rend ce type de mesure possible.

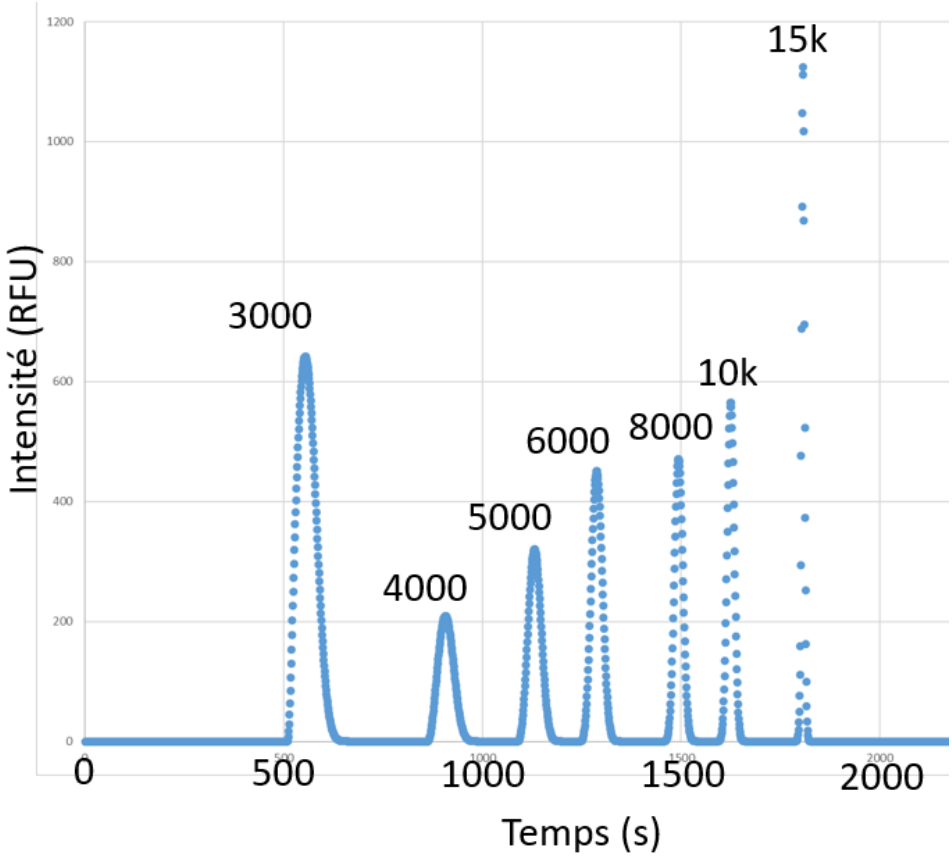


Figure 5.10 Profil de haut poids moléculaire calculé par le modèle de simulation numérique. Les bandes de 3000 à 15000 bp sont présentées.

Dans un but prospectif nous avons cherché à calculer la résolution de séparation entre les tailles 3000 et 4000 bp tout en faisant varier cette fois d'autres paramètres de contrôles comme la vitesse hydrodynamique (Fig. 5.11 A), la longueur de détection (Fig. 5.11 B). Le processus est long car pour chaque changement de paramètre il faut paramétrer à nouveau le modèle, c'est-à-dire refaire l'ajustement du K' et du μ_0. Et les temps de calculs peuvent considérablement varier et s'allonger, par exemple pour une vitesse hydrodynamique plus faible ou une distance jusqu'au détecteur plus importante, car les bandes migrent moins rapidement dans un cas ou la distance à parcourir est tout simplement plus importante dans l'autre.

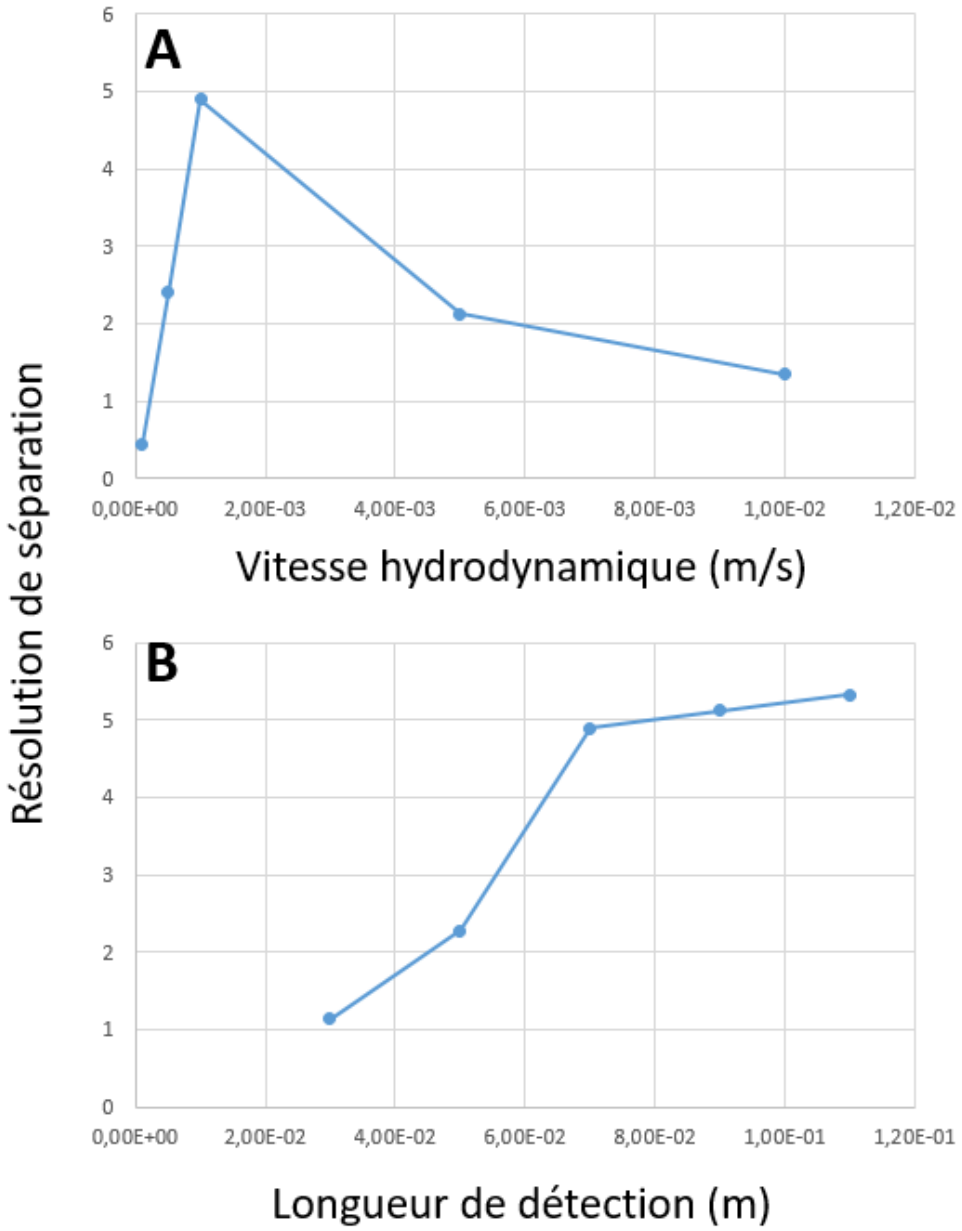


Figure 5.11 Calcul prospectif d'optimisation de la résolution. Les graphiques représentent la résolution de séparation entre les tailles 3000 et 4000 bp en fonction de **(A)** la vitesse hydrodynamique et **(B)** de la longueur de détection.

L'espace de variation ainsi exploré est très large (2 ordres de grandeur de variation pour la vitesse hydrodynamique dans la figure 5.11 A) et pourrait servir principalement à confirmer des tendances expérimentales. Dans la Fig. 5.11 A, la vitesse hydrodynamique de 1 mm/s donne la meilleure résolution (~ 4.9) et cela est normal car elle concorde avec l'optimisation qui a été réalisée sur Biabooster en amont. Néanmoins en raffinant autours de ce point, un maximum local pourrait être trouvé.

La figure 5.11 B montre que la résolution pourrait être augmenté en éloignant le détecteur et donc en augmentant la distance de migration. Ce type de résultats peut donc guider vers une amélioration physique d'un système ou de sa géométrie, ce qui minimise les coûts et temps de développement. La figure 5.12 présente des graphiques 3D de la résolution en fonction des caractéristiques de la matrice polymère, la viscosité pour les deux gammes de tailles (bas et haut poids moléculaire). C'est le résultat final escompté au début de cette étude.

E. Conclusions et perspectives

À l'heure actuelle le modèle n'a tout simplement pas été assez éprouvé et confronté à l'expérimentation. Il faudrait du temps pour tester l'ensemble des paramètres et les comparer à la réalité de ce qui a été réalisé en laboratoire. Il faudrait beaucoup de temps pour réaliser cette tâche pour des *ladder* entiers. Cependant cette tâche pourrait être automatisée complètement.

La perspective d'une plateforme informatique µLAS de simulation basée sur un modèle solide permettrait dans le futur de passer outre un grand nombre d'étapes de tests et d'optimisations sur les bancs d'expérimentations, sauvant à la fois du temps de manipulation, du temps d'utilisation des instruments et du matériel. Poussé encore plus loin le modèle de simulation pourrait offrir un outil analytique pour aider dans la compréhension de certains phénomènes dont le fonctionnement reste bien vague.

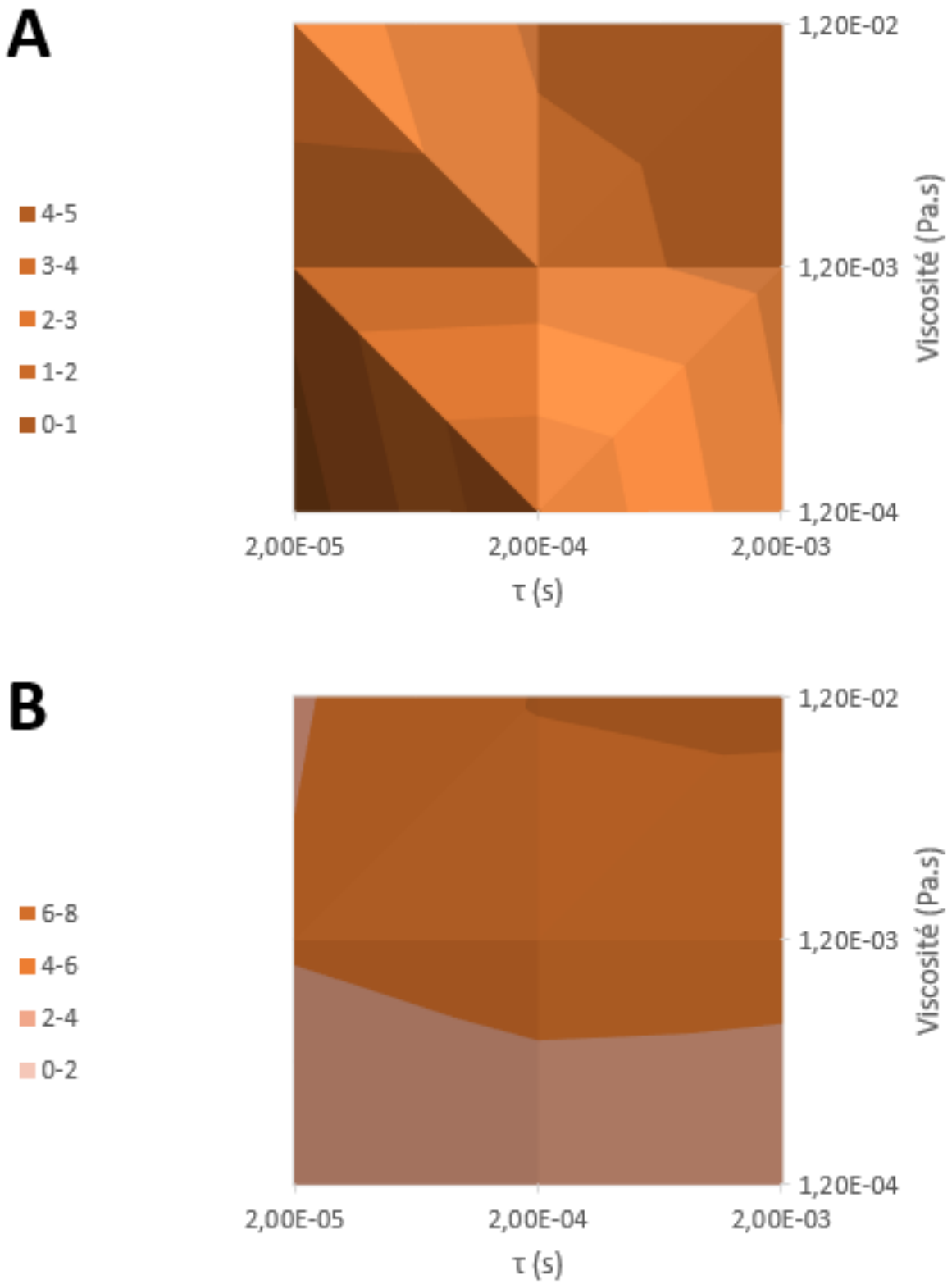


Figure 5.12 Optimisation de la résolution en fonction des paramètres du polymère. η et τ varient sur 3 ordres de grandeur, la résolution de séparation est calculée entre **(A)** 300 et 400 bp et **(B)** 3000 et 4000 bp.

II. Application des puces avec pentes gravées par le processus de fabrication « greyscale »

Jusqu'ici nous avons montré que µLAS peut concentrer et séparer selon la taille de l'ADN. Nous pouvons utiliser ces propriétés pour détecter selon la taille aussi. Utiliser ces fonctions pour développer un outil d'analyse pour détecter des séquences spécifiques serait intéressant. Néanmoins il est très important de viser une sensibilité très élevée si l'application vise la génomique, notamment l'ADN tumoral circulant et la détection de mutations.

Dans cette partie nous présenterons brièvement dans un premier temps comment la technique de détection sonde-cible se met en place, ses tenants et ses aboutissants. Puis nous expliquerons comment µLAS peut et a déjà été développée pour effectuer ces détections. Enfin nous présenterons dans un dernier temps des résultats liés à des tests effectués avec des pentes 2.5D intégrées au dispositif de séparation. La technique de fabrication et les développements inhérents ont été présentés au Chapitre 2 IV, p. 81.

A. Principe de détection d'un complexe sonde-cible avec µLAS

Nous avons beaucoup évoqué la recherche d'un facteur discriminant pour séparer les espèces en fonction de leur taille. Pour µLAS c'est l'application de la force transverse élastique qui plaque plus ou moins les molécules en fonction de leurs tailles et qui les *sépare*. On s'intéressera ici à la détection d'une séquence cible, généralement courte (entre 20 et 50 paires de bases). Et on utilisera une sonde complémentaire à cette séquence pour mettre en application une interaction et donc initier un changement. De là il ne reste plus qu'à détecter.

µLAS offre une solution pour concentrer (et donc enrichir un signal) et séparer les espèces en fonction de leurs tailles. Le principe de base est de faire ressortir la séquence ciblée du lot en « l'alourdissant ». Pour l'application des micro-ARN (miARN) par exemple tous les fragments sont très petits (longueur moyenne de 22 bases). Si un fragment est ciblé en particulier par une séquence complémentaire beaucoup plus longue (une partie complémentaire courte + une partie spécifique très longue), le miARN ciblé sera, une fois hybridé avec la sonde, d'une taille bien supérieure au reste (Fig. 5.13).

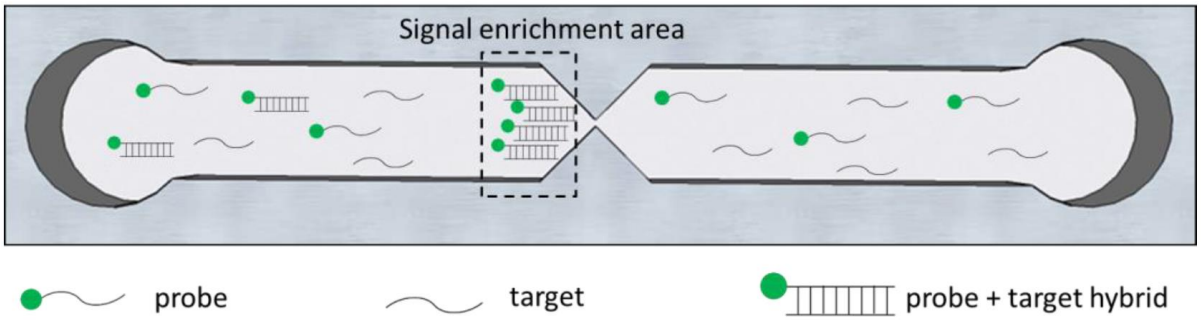


Figure 5.13 Principe d'enrichissement du signal par rapport au reste du bruit de fond.

µLAS a déjà été utilisé pour la détection, notamment pour l'analyse de l'ADN résiduel circulant dans le sang. Cette application a permis de mettre en place un protocole pour le diagnostic de la maladie de Huntington *(Malbec, 2018)*. La technologie µLAS a été utilisée pour cette application en format puce en mode de séparation spatial. La puce présente une particularité qui n'a pas été présentée dans ce manuscrit, deux canaux comme sur la figure 5.14 A. Les puces sont en silicium-verre et sont faite de manière à ce que l'on puisse appliquer des conditions d'actionnement différentes dans chacun d'eux et observer les deux zones d'intérêt en même temps.

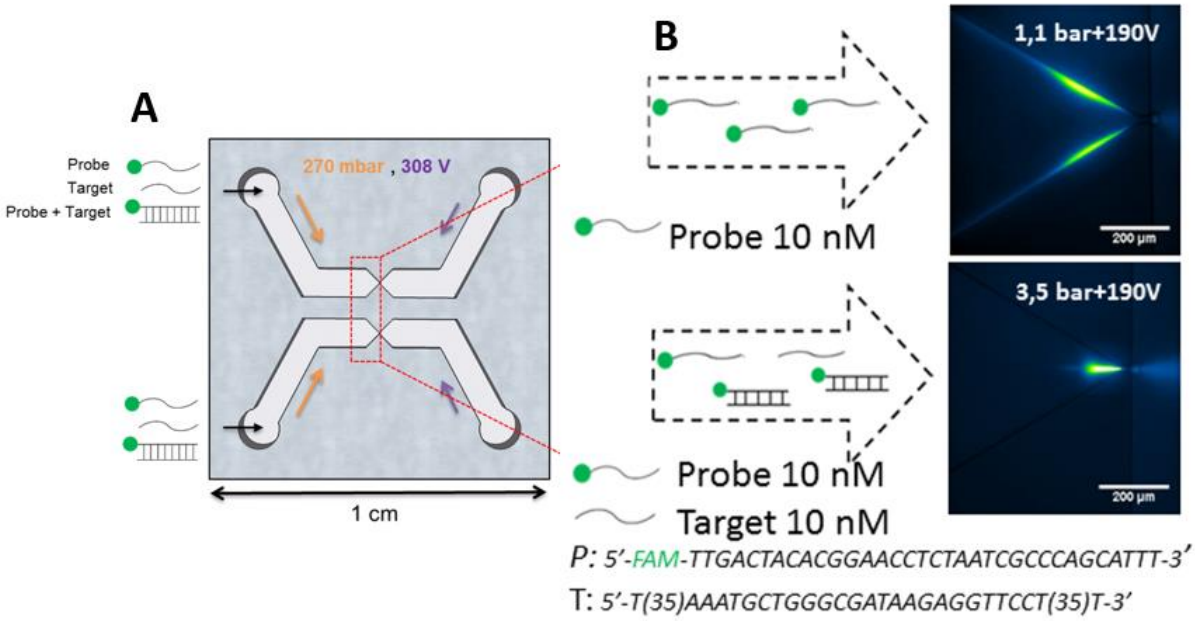


Figure 5.14 Détection des complexes cible-sonde avec µLAS. **(A)** Puce double canaux utilisés pour la détection. **(B)** Les conditions d'actionnement différentes dans les deux canaux permettent d'arrêter les deux tailles différentes.

L'application de deux conditions d'arrêt en même temps permet de s'assurer que ce sont bien deux tailles différentes qui sont séparées. Dans la figure 5.14 B est présentée le procédé, avec dans le canal du haut seule la sonde est injectée alors que dans le canal du bas un mélange constitué de la cible, de la sonde et donc bien-sûr de l'hybride sonde-cible, est injecté. Les conditions d'arrêt sont bien différentes pour ce dernier complexe comme sa taille est bien supérieure.

B. Application et résultats préliminaires en format puce 2.5D

Ce procédé présente déjà de très bonnes performances, reproductibles et en très peu de temps. La détection de miARN-21 (21 bases) se fait en moins d'une minute avec une limite de détection de 2 pM *(Tijunelyte, à paraître)* dans des puces en silicium sans pente. En parallèle les puces qui présentent une pente dans la constriction ont été testées. Comme mentionné plus haut, le travail de détection nécessite de pouvoir concentrer beaucoup et vite et le système en 2.5D avec une constriction et une pente permet d'amplifier encore plus la vitesse hydrodynamique et le champ électrique à l'endroit le plus étroit de la puce. Les tests suivant ont été guidés par cette intuition par I. Tijunelyte, post-doctorante travaillant sur la détection des miARN avec qui j'ai collaboré pour la mise en place des designs des premières puces.

La figure 5.15 présente les tests qui ont été réalisés avec une puce 2.5D et présentant une géométrie non linéaire en guise de constriction. Les conditions d'actionnement pour la concentration sont une pression de 3 bars et une tension de 190 V. Comme présenté en Fig. 5.15 B la limite de détection pratique (46 pM) ainsi mise en place n'est pas catastrophique mais ne supplante pas de qui a déjà été fait avec des puces sans pente.

Les mêmes tests ont été conduits avec une puce 2.5D présentant une constriction linaire pour des concentrations en cible de 2, 20 et 200 pM (Fig. 5.16 A). Les conditions d'actionnement pour la concentration sont cette fois-ci de 5 bars et de 190 V. Ces données n'offrent pas de nette amélioration de la limite de détection pratique mais permettent une extrapolation de limite de détection théorique qui n'est pas accessible avec les puces normales sans pente. Cette limite de détection théorique est estimée à 8.7 fM, ce qui serait très encourageant pour développer une technique de détection sensible.

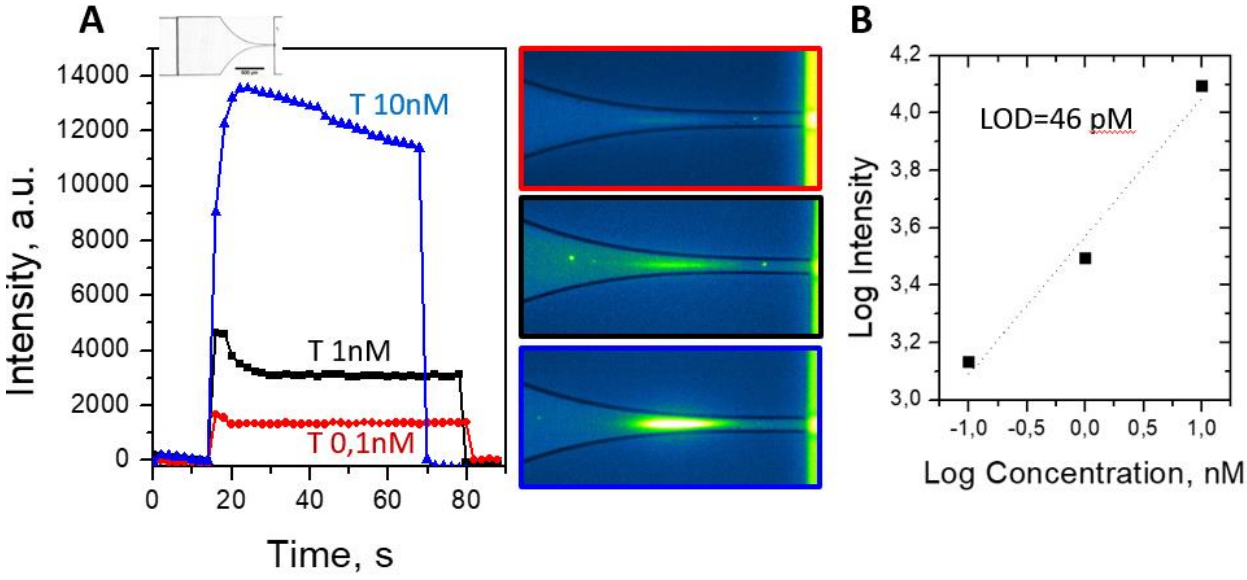


Figure 5.15 Détection des miARN en format puce 2.5D x^3. **(A)** Graphique représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. **(B)** Graphique de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration (0.1, 1 et 10 nM) en miARN.

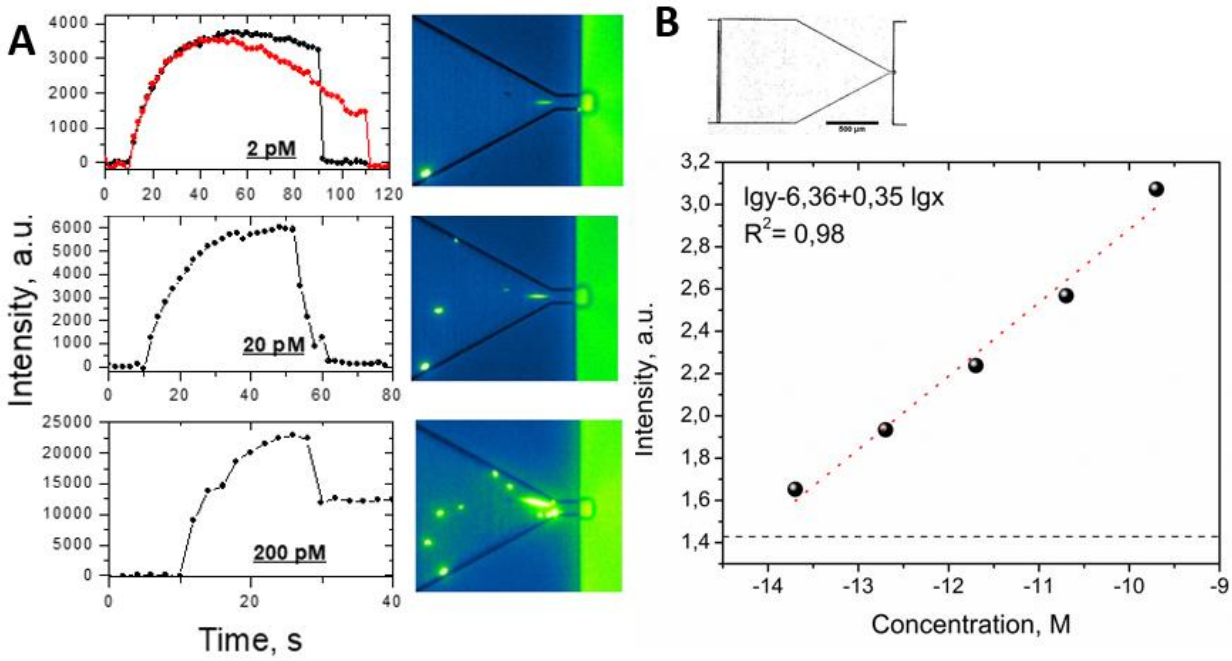


Figure 5.16 Détection des miARN en format puce 2.5D linéaire. **(A)** Graphiques représentant les intensités de fluorescence en fonction du temps pour chaque concentration. **(B)** Graphique de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration (2, 20 et 200 pM) en miARN.

C. Conclusions et perspectives d'amélioration

Le système µLAS offre une technique de détection sensible avec déjà des limites de détection à l'état de l'art. De plus, le procédé en flux continu, répétable et fiable, avec une mise en place de la détection en moins d'une minute offre un ensemble analytique très varié.

L'utilisation des puces en 2.5D semble présenter une amélioration drastique du taux de concentration de par l'architecture du système. Néanmoins cette voie n'a pas encore été confirmée et des calculs et simulations des vitesses hydrodynamiques et du champ électrique seront effectués pour justifier cette option technologique. Tout le système de fabrication avec lithographie en niveau de gris est opérationnel pour l'exploration de nouveaux designs, géométries et pentes, guidés par la physique de µLAS.

Bilan et conclusions sur l'ensemble du travail effectué

Dans cette partie, nous souhaitons dresser un bref bilan sur le travail de développement effectué, des études réalisées et sur la cohérence globale de l'ensemble.

Nous avons réalisé **un banc expérimental** en partant d'une carcasse de microscope qu'il a fallu réhabilité. Dans la réalisation de ce banc nous avons essayé de toujours garder en tête les objectifs d'amélioration et d'optimisation des performances de µLAS en se basant sur les travaux gravitant autour de ce projet *(Malbec, 2018 ; Milon, 2019 ; Chami, 2019)*. La polyvalence d'un tel banc nous a toujours aussi semblé être un objectif secondaire primordial pour délivrer un outil complet qui puisse servir de liant au sein du projet µLAS à l'avenir. Dans cette optique, nous avons simplifié l'utilisation du logiciel, simplifié sa relecture et mis à disposition des guides d'utilisation. Dans le cadre de cette réflexion nous avons **repensé l'ensemble des séparations µLAS et formalisé les séquences d'actionnement** déjà existantes. Mais nous avons aussi poussé l'implémentation des instruments et l'exploitation de leurs performances au maximum pour ne pas limiter l'utilisation d'une telle plateforme à la simple application réalisée et présentée dans ce manuscrit.

Cette application est **l'étude de l'élargissement des bandes d'ADN** et la caractérisation de ces largeurs pendant des migrations réalisées en séparation µLAS. Cette étude a impliqué la réalisation et **le développement d'un nouveau format de puce, géométrie *picolike***, qui vient enrichir une gamme déjà bien fournie. Cette étude a permis de mettre à l'épreuve le banc expérimental instrumenté et automatisé, pour sortir des résultats de séparation en grande quantité (360+ expériences) en très peu de temps (< 5 h). Ces expériences sont prises en charge à partir de l'injection jusqu'au post-traitement des données. Et dans l'ensemble, avec l'architecture du banc expérimental et de son logiciel, il est possible d'étendre le champ d'application à d'autres formats ou modes de séparation.

Un modèle numérique de séparation a été mis en place. Dans un premier temps ce dernier doit servir à comparer les données numériques et les données expérimentales. Les résultats sont prometteurs bien-sûr mais de nombreux trous dans la compréhension des phénomènes mériterai une attention toute particulière. L'aboutissement d'un tel projet viendrait consolider l'ensemble, lui donnant une cohérence toute particulière. Cet outil permettrait d'explorer des espaces de paramètres vastes, qui peuvent être vérifiés et comparés par la plateforme automatisée, son analogue expérimental.

Le développement et l'optimisation d'un protocole de fabrication en lithographie en niveau de gris pour réaliser des pentes dans du silicium a été mené à bien. Ces tâches ont impliqué aussi bien de la fabrication technologique (nouveaux procédés de développement de la résine et de gravure du silicium) que du génie logiciel (optimisation du temps d'insolation). Ce développement étoffe encore le paysage µLAS d'un outil polyvalent, simple et rapide pour tester des géométries et des architectures nouvelles pour de futurs formats de puces. D'ailleurs les premières puces sortant de ce procédé de fabrication ont été mises à l'épreuve dans une étude de détection de miARN et propose des résultats préliminaires plus qu'encourageant.

Bibliographie

"Customizing Mouse Wheel Behavior - LabVIEW NXG 5.0 Manual - National Instruments". (2020, 04 28). Récupéré sur www.ni.com

Ahlrichs, P., Everaers, R., & Dünweg, B. (2001). Screening of hydrodynamic interactions in semidilute polymer solutions: A computer simulation study. *Physical Review E, 64(4), 040501*.

Albarghouthi, M. N., & Barron, A. E. (2000). Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS: An International Journal, 21(18)*, 4096-4111.

Andriamanampisoa, C. L., Bancaud, A., Boutonnet-Rodat, A., Didelot, A., Fabre, J., Fina, F., ... & Henaff, D. (2018). BIABooster: online DNA concentration and size profiling with a limit of detection of 10 fg/µL and application to high-sensitivity characterization of circulating cell-free DNA. *Analytical chemistry, 90(6)*, 3766-3774.

Angell, J. B., Terry, S. C., & Barth, P. W. . (1983). Silicon micromechanical devices. *Scientific American, 248(4)*, 44-55.

Arca, M., Ladd, A. J., & Butler, J. E. (2016). Electro-hydrodynamic concentration of genomic length DNA. *Soft matter, 12(33)*, 6975-6984.

Aris, R. (1956). On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 235(1200)*, 67-77.

Baba, M., Sano, T., Iguchi, N., Iida, K., Sakamoto, T., & Kawaura, H. (2003). DNA size separation using artificially nanostructured matrix. *Applied physics letters, 83(7)*, 1468-1470.

Bachelier, L. (1900). *Théorie de la spéculation.* In Annales scientifiques de l'École normale supérieure (Vol. 17, pp. 21-86).

Bancaud, A., Wagner, G., Dorfman, K. D., & Viovy, J. L. (2005). Measurement of the surface concentration for bioassay kinetics in microchannels. *Analytical chemistry, 77(3)*, 833-839.

Barker, P. R., & Wright, L. N. (1966). *U.S. Patent No. 3,240,207.* Washington, DC: US: Patent and Trademark Office.

Barooah, A., Sun, C. K. J., & Chen, S. H. (1986). Translational diffusion of polystyrene in 1, 4-dioxane at infinite dilution determined with the extended Taylor dispersion method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 24(4)*, 817-825.

Bello, B., Horard, B., & Couble, P. (1994). The selective expression of silk-protein-encoding genes in Bombyx mori silk gland. *Bulletin de l'Institut Pasteur, 92(2)*, 81-100.

Bird, R. B. (2002). *Transport phenomena.* Appl. Mech. Rev., 55(1), R1-R4.

Bird, R. B., Stewart, W. E., & Lightfoot, E. N. (1960). *Transport Phenomena.* New York: Wiley.

Bress, T. (2013). *Effective LabVIEW Programming: (* new file uploaded 02/19/15).* Nts Press.

Bristow, P. A., & Knox, J. H. (1977). Standardization of test conditions for high performance liquid chromatography columns. *Chromatographia, 10(6)*, 279-289.

Brown, R. (1828). XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine, 4(21)*, 161-173.

Buel, E., LaFountain, M., Schwartz, M., & Walkinshaw, M. (2001). Evaluation of capillary electrophoresis performance through resolution measurements. *Journal of Forensic Science, 46(2)*, 341-345.

Butler, J. E., Usta, O. B., Kekre, R., & Ladd, A. J. (2007). Kinetic theory of a confined polymer driven by an external force and pressure-driven flow. *Physics of Fluids, 19(11)*, 113101.

Campisi, S. (2020). *Development of control system in LabVIEW environment for the study of the random fatigue behavior of metallic materials* . Doctoral dissertation, Politecnico di Torino.

Chami, B. (2019). *Développement de Technologies µLAS pour le séparation des Acides Nucléiques.* Toulouse: (Doctoral dissertation).

Chami, B., Socol, M., Manghi, M., & Bancaud, A. (2018). Modeling of DNA transport in viscoelastic electro-hydrodynamic flows for enhanced size separation. *Soft matter, 14(24)*, 5069-5079.

Chen, B., Jiang, H., Zhu, Y., Cammers, A., & Selegue, J. P. (2005). Monitoring the growth of polyoxomolybdate nanoparticles in suspension by flow field-flow fractionation. *Journal of the American Chemical Society, 127(12)*, 4166-4167.

Chen, H. C., & Chen, S. H. (1985). Taylor dispersion measurement of the diffusivities of polymethylenes in dilute solutions. *Chemical engineering science, 40(3)*, 521-526.

Contado, C., Dalpiaz, A., Leo, E., Zborowski, M., & Williams, P. S. (2007). Complementary use of flow and sedimentation field-flow fractionation techniques for size characterizing biodegradable poly (lactic acid) nanospheres. *Journal of Chromatography A, 1157(1-2)*, 321-335.

Cottet, H., Martin, M., Papillaud, A., Souaïd, E., Collet, H., & Commeyras, A. . (2007). Determination of dendrigraft poly-L-lysine diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis. *Biomacromolecules, 8(10)*, 3235-3243.

Coxon, M., & Binder, M. J. . (1974). Radial temperature distribution in isotachophoresis columns of circular cross-section. *Journal of Chromatography A, 101(1)*, 1-16.

D'Avino, G., Greco, F., & Maffettone, P. L. (2017). Particle migration due to viscoelasticity of the suspending liquid and its relevance in microfluidic devices. *Annual Review of Fluid Mechanics, 49*, 341-360.

De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics.* Cornell university press.

Desnica, V., & Schreiner, M. (2006). A LabVIEW-controlled portable x-ray fluorescence spectrometer for the analysis of art objects. *X-Ray Spectrometry: An International Journal, 35(5)*, 280-286.

Doi, M., Edwards, S. F., & Edwards, S. F. (1988). *The theory of polymer dynamics (Vol. 73).* oxford university press.

Dorfman, K. D. (2010). DNA electrophoresis in microfabricated devices. *Reviews of Modern Physics, 82(4)*, 2903.

Dovichi, N. J. (2001). DNA sequencing by capillary array electrophoresis. *In Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids (pp. 85-94).* , Humana Press.

Duan, L., & Yobas, L. (2017). On-chip hydrodynamic chromatography of DNA through centimeters-long glass nanocapillaries. *Analyst, 142(12),*, 2191-2198.

Duke, T., Viovy, J. L., & Semenov, A. N. (1994). Electrophoretic mobility of DNA in gels. I. New biased reptation theory including fluctuations. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 34(2)*, 239-247.

Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen . *Annalen der physik, 322(8)*, 549-560.

Einstein, A. (1906). On the theory of the Brownian movement. *Ann. Phys, 19(4)*, 371-381.

Erlandsson, P. G., & Robinson, N. D. (2011). Electrolysis-reducing electrodes for electrokinetic devices. *Electrophoresis, 32(6-7)*, 784-790.

Fedak, W., Bord, D., Smith, C., Gawrych, D., & Lindeman, K. (2003). Automation of the Franck–Hertz experiment and the Tel-X-Ometer x-ray machine using LABVIEW. *American Journal of Physics, 71(5)*, 501-506.

Foley, J. P., & Dorsey, J. G. (1983). Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks. *Analytical Chemistry, 55(4)*, 730-737.

Folley, J. P. (1987). Systematic errors in the measurement of peak area and peak height for overlapping peaks. *Journal of Chromatography A, 384*, 301-313.

Giddings, J. C. (1969). Generation of variance,“theoretical plates”, resolution, and peak capacity in electrophoresis and sedimentation. *Separation Science and Technology, 4(3)*, 181-189.

Giddings, J. C., Kucera, E., Russell, C. P., & Myers, M. N. (1968). Statistical theory for the equilibrium distribution of rigid molecules in inert porous networks. Exclusion chromatography . *The Journal of Physical Chemistry, 72(13)*, 4397-4408.

Giddings, J. C., Yang, F. J., & Myers, M. N. . (1976). Flow-field-flow fractionation: a versatile new separation method. *Science, 193(4259)*, 1244-1245.

Gobie, W. A., & Ivory, C. F. . (1990). Thermal model of capillary electrophoresis and a method for counteracting thermal band broadening. *Journal of Chromatography A, 516(1)*, 191-210.

Grayson, A. C. R., Shawgo, R. S., Johnson, A. M., Flynn, N. T., Li, Y., Cima, M. J., & Langer, R. . (2004). A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proceedings of the IEEE, 92(1)*, 6-21.

Grushka, E. &. (1974). Extension of the chromatographic broadening method of measuring diffusion coefficients to liquid systems. I. Diffusion coefficients of some alkylbenzenes in chloroform . *The Journal of Physical Chemistry, 78(22)*, 2297.

Grushka, E., McCormick, R. M., & Kirkland, J. J. (1989). Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations. *Analytical Chemistry, 61(3)*, 241-246.

Guttman, A. (2003). Gel and polymer-solution mediated separation of biopolymers by capillary electrophoresis. *Journal of chromatographic science, 41(9)*, 449-459.

Han, J., Fu, J., & Schoch, R. B. (2008). Molecular sieving using nanofilters: past, present and future. *Lab on a Chip, 8(1)*, 23-33.

Hecker, R., & Riesner, D. (1987). Chromatographic separation of DNA restriction fragments. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 418*, 97-114.

Heller, C. (1999). Separation of double-stranded and single-stranded DNA in polymer solutions: I. Mobility and separation mechanism. *ELECTROPHORESIS: An International Journal, 20(10)*, 1962-1976.

Heller, C. (2001). Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *Electrophoresis, 22(4)*, 629-643.

Heller, C. D. (1994). Electrophoretic mobility of DNA in gels. II. Systematic experimental study in agarose gels. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 34(2)*, 249-259.

Hertén, S. (1967). *Chromatogr. Rev., 9*, P. 122.

Hinkley, J. (1975). *J. Chromatogr., 109*, p. 218.

Johnson, G. W. (1997). *LabVIEW graphical programming.* Tata McGraw-Hill Education.

Jorgenson, J. W., & Lukacs, K. D. (1983). Capillary zone electrophoresis. *Science, 222*, 266-274.

Keleshis, C., Ionita, C., & Rudin, S. (2006). SU-FF-I-45: Labview Graphical User Interface for Micro Angio-Fluoroscopic High Resolution Detector. *Medical Physics, 33(6Part3)*, 2007-2007.

Langevin, P. (1908). Sur la théorie du mouvement brownien. *Compt. Rendus, 146*, 530-533.

Lee, E. F. (2010). Cross-stream forces and velocities of fixed and freely suspended particles in viscoelastic Poiseuille flow: Perturbation and numerical analyses. *Journal of non-newtonian fluid mechanics, 165(19-20)*, 1309-1327.

Lerman, L. S., & Frisch, H. L. (1982). Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 21(5)*, 995-997.

Leshansky, A. M., Bransky, A., Korin, N., & Dinnar, U. (2007). Tunable nonlinear viscoelastic “focusing” in a microfluidic device. *Physical review letters, 98(23)*, 234501.

Lévy, P., & Loeve, M. (1965). *Processus stochastiques et mouvement brownien (pp. 299-304).* Paris: Gauthier-Villars.

Liu, K. J., Rane, T. D., Zhang, Y., & Wang, T. H. (2011). Single-molecule analysis enables free solution hydrodynamic separation using yoctomole levels of DNA. *Journal of the American Chemical Society, 133(18)*, 6898-6901.

Long, D., Viovy, J. L., & Ajdari, A. (1996). Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte: Motion and deformation. *Physical review letters, 76(20)*, 3858.

Lumpkin, O. J., & Zimm, B. H. (1982). Mobility of DNA in gel electrophoresis. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 21(11)*, 2315-2316.

Malbec, R. (2018). *Système microfluidique µLAS pour l'analyse de l'ADN résiduel: Application au diagnostic de la maladie de Huntington et à l'analyse de l'ADN circulant dans le sang.* Toulouse: (Doctoral dissertation).

Malbec, R., Chami, B., Aeschbach, L., Buendía, G. A. R., Socol, M., Joseph, P., ... & Dion, V. (2019). µLAS: Sizing of expanded trinucleotide repeats with femtomolar sensitivity in less than 5 minutes. *Scientific reports, 9(1)*, 1-13.

Manning, G. S. (1978). The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Quarterly reviews of biophysics, 11(2),*, 179-246.

Manz, A., Graber, N., & Widmer, H. Á. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B: Chemical, 1(1-6)*, 244-248.

Mes, E. P. C., Kok, W. T., Poppe, H., & Tijssen, R. . (1999). Comparison of methods for the determination of diffusion coefficients of polymers in dilute solutions: the influence of polydispersity. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 37(6)*, 593-603.

Messaud, F. A., Sanderson, R. D., Runyon, J. R., Otte, T., Pasch, H., & Williams, S. K. R. (2009). An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science, 34(4)*, 351-368.

Milon, N. (2019). *Technologie µLAS pour l'analyse et la purification d'ADN de haut poids moléculaire*. Toulouse: (Doctoral dissertation, INSA).

Milon, N., Chantry-Darmon, C., Satge, C., Fustier, M. A., Cauet, S., Moreau, S., ... & Boutonnet, A. (2019). µLAS technology for DNA isolation coupled to Cas9-assisted targeting for sequencing and assembly of a 30 kb region in plant genome. *Nucleic acids research, 47(15)*, 8050-8060.

Milon, N., Rojas, J. L. F., Castinel, A., Bigot, L., Bouwmans, G., Baudelle, K., ... & Ginot, F. (2020). A tunable filter for high molecular weight DNA selection and linked-read sequencing. *Lab on a Chip, 20(1)*, 175-184.

Montes, R. J., Butler, J. E., & Ladd, A. J. (2019). Trapping DNA with a high throughput microfluidic device. *Electrophoresis, 40(3)*, 437-446.

Montes, R. J., Ladd, A. J., & Butler, J. E. (2019). Transverse migration and microfluidic concentration of DNA using Newtonian buffers. *Biomicrofluidics, 13(4)*, 044104.

Moon, M. H., Kang, D., Jung, J., & Kim, J. (2004). Separation of carbon nanotubes by frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of separation science, 27(9)*, 710-717.

N., Duke T. Viovy J. L. & Semenov A. (1994). Electrophoretic Mobility of DNA in Gels. I. New Biased Reptation Theory Including Fluctuations. *Biopolym. Orig. Res. Biomol. 1994, 34 (2)*, 239–247.

Naillon, A., de Loubens, C., Chèvremont, W., Rouze, S., Leonetti, M., & Bodiguel, H. (2019). Dynamics of particle migration in confined viscoelastic Poiseuille flows. *Physical Review Fluids, 4(5)*, 053301.

Naillon, A., Massadi, H., Courson, R., Bekhit, J., Seveno, L., Calmon, P. F., ... & Joseph, P. (2017). Quasi-static drainage in a network of nanoslits of non-uniform depth designed by grayscale laser lithography. *Microfluidics and Nanofluidics, 21(8)*, 131.

Nam, J., Jee, H., Jang, W. S., Yoon, J., Park, B. G., Lee, S. J., & Lim, C. S. (2019). Sheathless Shape-Based Separation of Candida Albicans Using a Viscoelastic Non-Newtonian Fluid. *Micromachines, 10(12)*, 817.

Nguyen, N. T., Huang, X., & Chuan, T. K. (2002). MEMS-micropumps: a review. *J. Fluids Eng.*, *124(2)*, 384-392.

Noel, R. J., Gooding, K. M., Regnier, F. E., Orr, C., & Mullins, M. E. (1978). Capillary hydrodynamic chromatography. *Journal of Chromatography A, 166(2)*, 373-382.

Ogston, A. G. (1958). The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Transactions of the Faraday Society, 54*, 1754-1757.

Ouano, A. C. (1972). Diffusion in liquid systems. I. A simple and fast method of measuring diffusion constants. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals, 11(2)*, 268-271.

Paegel, B. M., Hutt, L. D., Simpson, P. C., & Mathies, R. A. (2000). Turn geometry for minimizing band broadening in microfabricated capillary electrophoresis channels. *Analytical chemistry, 72(14)*, 3030-3037.

Pennathur, S., Baldessari, F., Santiago, J. G., Kattah, M. G., Steinman, J. B., & Utz, P. J. (2007). Free-solution oligonucleotide separation in nanoscale channels. *Analytical chemistry, 79(21)*, 8316-8322.

Probstein, R. F. (1994). Solutions of Uncharged Molecules. *Physicochemical Hydrodynamics; John Wiley & Sons, Inc.: New York*, 53-107.

Ranchon, H. P. (2015). Metrology of confined flows using wide field nanoparticle velocimetry. *Scientific reports, 5,*, 10128.

Ranchon, H., Malbec, R., Picot, V., Boutonnet, A., Terrapanich, P., Joseph, P., ... & Bancaud, A. (2016). DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab on a Chip, 16(7)*, 1243-1253.

Rebscher, H., & Pyell, U. (1994). A method for the experimental determination of contributions to band broadening in electrochromatography with packed capillaries. *Chromatographia, 38(11-12)*, 737-743.

Richter, D., Binder, K., Ewen, B., & Stühn, B. (1984). Screening of hydrodynamic interactions in dense polymer solutions: a phenomenological theory and neutron-scattering investigations. *The Journal of Physical Chemistry, 88(26)*, 6618-6633.

Rodbard, D., & Chrambach, A. (1970). Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 65(4)*, 970-977.

Rouse Jr, P. E. (1953). A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers. *The Journal of Chemical Physics, 21(7)*, 1272-1280.

Salieb-Beugelaar, G. B., Dorfman, K. D., van den Berg, A., & Eijkel, J. C. (2009). Electrophoretic separation of DNA in gels and nanostructures. *Lab on a Chip, 9(17)*, 2508-2523.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., ... & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. *nature 265(5596)*, 687-695.

Sano, T., Iguchi, N., Iida, K., Sakamoto, T., Baba, M., & Kawaura, H. (2003). Size-exclusion chromatography using self-organized nanopores in anodic porous alumina. *Applied physics letters, 83(21)*, 4438-4440.

Schure, M. R., Barman, B. N., & Giddings, J. C. (1989). Deconvolution of nonequilibrium band broadening effects for accurate particle size distributions by sedimentation field-flow fractionation. *Analytical Chemistry, 61(24)*, 2735-2743.

Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. . (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *cell, 37(1)*, 67-75.

Seo, K. W., Byeon, H. J., Huh, H. K., & Lee, S. J. . (2014). Particle migration and single-line particle focusing in microscale pipe flow of viscoelastic fluids. *RSC advances, 4(7)*, 3512-3520.

Shimadzu. (2020). *Formula for Calculating the Number of Theoretical Plates*. Récupéré sur Shimadzu: https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/34/34tec.html

Slater, G. W. (1993). Theory of band broadening for DNA gel electrophoresis and sequencing. *Electrophoresis, 14(1)* , 1-7.

Slater, G. W. (1995). Diffusion, Joule heating, and band broadening in capillary gel electrophoresis of DNA . *Electrophoresis, 16(1)*, 75-83.

Slater, G. W. (2009). DNA gel electrophoresis: the reptation model (s). *Electrophoresis, 30(S1)*, S181-S187.

Slater, G. W., & Noolandi, J. (1985). New biased-reptation model for charged polymers. *Physical review letters, 55(15),*, 1579.

Slater, G. W., Desruisseaux, C., & Hubert, S. J. (2001). DNA separation mechanisms during electrophoresis. *In Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids (pp. 27-41)*, Humana Press.

Socol, M., Ranchon, H., Chami, B., Lesage, A., Victor, J. M., Manghi, M., & Bancaud, A. (2019). Contraction and Tumbling Dynamics of DNA in Shear Flows under Confinement Induced by Transverse Viscoelastic Forces. *Macromolecules, 52(4)*, 1843-1852.

Stavis, S. M., Strychalski, E. A., & Gaitan, M. (2009). Nanofluidic structures with complex three-dimensional surfaces. *Nanotechnology, 20(16)*, 165302.

Stellwagen, N. C. (1998). DNA gel electrophoresis. In Nucleic acid electrophoresis (pp. 1-53). *Springer, Berlin, Heidelberg*.

Stephen Williams, P., KOCH, T., & Calvin Giddings, J. (1992). Characterization of near-wall hydrodynamic lift forces using sedimentation field-flow fractionation. *Chemical Engineering Communications, 111(1)*, 121-147.

Strain, H. H., & Sherma, J., M. Tswett. (1967). Adsorption analysis and chromatographic methods: Application to the chemistry of chlorophylls. *Journal of Chemical Education, 44(4)*, 238.

Sun, T., Chance, R. R., Graessley, W. W., & Lohse, D. J. (2004). A study of the separation principle in size exclusion chromatography. *Macromolecules, 37(11)*, 4304-4312.

Sutherland, W. (1905). LXXV. A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 9(54)*, 781-785.

Taylor, G. I. (1953). Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. . *Mathematical and Physical Sciences, 219(1137)*, 186-203.

Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., ... & Bebas, P. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of insect physiology, 57(2)*, 231-245.

Terry, S. C., Jerman, J. H., & Angell, J. B. (1979). A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE transactions on electron devices, 26(12)*, 1880-1886.

Tijssen, R., Bos, J., & Van Kreveld, M. E. (1986). Hydrodynamic chromatography of macromolecules in open microcapillary tubes. *Analytical Chemistry, 58(14)*, 3036-3044.

Tinland, B., Pernodet, N., & Pluen, A. (1998). Band broadening in gel electrophoresis: scaling laws for the dispersion coefficient measured by FRAP. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 46(4)*, 201-214.

top500. (2019, 11). *Top-ranked systems - Novembre 2019*. Récupéré sur top500: https://top500.org/lists/2019/11/

Travis, J., & Kring, J. (2007). *LabVIEW for everyone: graphical programming made easy and fun.* Prentice-Hall.

Usta, O. B., Butler, J. E., & Ladd, A. J. . (2007). Transverse migration of a confined polymer driven by an external force. *Physical review letters, 98(9)*, 098301.

Van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., & Klinkenberg, A. V. (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science, 5(6)*, 271-289.

Viovy, J. L. (1996). Reptation theories of electrophoresis. *Molecular biotechnology, 6(1)*, 31-46.

Viovy, J. L. (2000). Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics, 72(3)*,, 813.

Viovy, J. L., & Duke, T. (1993). DNA electrophoresis in polymer solutions: Ogston sieving, reptation and constraint release. *Electrophoresis, 14(1)*, 322-329.

Wahlund, K. G., & Litzen, A. (1989). Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae. *Journal of Chromatography A, 461*, 73-87.

Wang, X., Liu, L., Guo, G., Wang, W., Liu, S., Pu, Q., & Dasgupta, P. K. (2012). Resolving DNA in free solution. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 35*, 122-134.

Wang, Y., Teraoka, I., Hansen, F. Y., Peters, G. H., & Hassager, O. (2010). A theoretical study of the separation principle in size exclusion chromatography. *Macromolecules, 43(3)*, 1651-1659.

Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature, 171(4356)*, 737-738.

whitepapers, N. I. (2011, 09 08). *Application Design Patterns: State Machines*. Récupéré sur http://www.ni.com/tutorial/3024/en/

Williams, P. S., & Giddings, J. C. . (1994). Theory of field-programmed field-flow fractionation with corrections for steric effects. *Analytical chemistry, 66(23)*, 4215-4228.

Xue, Y., & Yeung, E. S. (1994). Characterization of band broadening in capillary electrophoresis due to nonuniform capillary geometries. *Analytical Chemistry, 66(21)*, 3575-3580.

Yamaguchi, Y., Li, Z., Zhu, X., Liu, C., Zhang, D., & Dou, X. (2015). Polyethylene oxide (PEO) and polyethylene glycol (PEG) polymer sieving matrix for RNA capillary electrophoresis. *PloS one, 10(5)*.

Ye, F. X. F., Stinis, P., & Qian, H. (2018). Dynamic looping of a free-draining polymer. *SIAM Journal on Applied Mathematics, 78(1)*, 104-123.

Yuan, D., Zhao, Q., Yan, S., Tang, S. Y., Alici, G., Zhang, J., & Li, W. (2018). Recent progress of particle migration in viscoelastic fluids. *Lab on a Chip, 18(4)*, 551-567.

Zheng, J., & Yeung, E. S. (2002). Anomalous radial migration of single DNA molecules in capillary electrophoresis. *Analytical chemistry, 74(17)*, 4536-4547.

Zheng, J., & Yeung, E. S. (2003). Mechanism for the separation of large molecules based on radial migration in capillary electrophoresis. *Analytical chemistry, 75(15)*, 3675-3680.

Zimm, B. H. (1945). Molecular theory of the scattering of light in fluids. *The Journal of Chemical Physics, 13(4)*, 141-145.

Zimm, B. H. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics, 16(12)*, 1093-1099.

Annexes

I. Codes Matlab pour la génération des fichiers pour la lithographie en niveau de gris

A. Code pour générer le .dfl, compilation des lwo

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
Script qui permet d'écrire un fichier dfl à partir de fichiers .lwo
Ce Code lance la génération des .lwo (generation_lwo.m, les lignes qui
seront utilisées pour toutes les puces. Ensuite on attribue à chaque puce
une coordonnée d'origine pour commencer l'écriture à un endroit spécifique
du wafer.Enfin les calculs de puissance et d'orientation se font dans
Génération_pente_v.m
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

fid_n=fopen('Wafer_design_sans_grooves_15.dfl','w');

% Chemin du dossier comportant les fichiers lwo sur la machine d'écriture
% (Attention, il faut doubler les backslash pour qu'il soit détecté comme
% un caractère)
Chemin='"D:\\FICHIERS LITHO\\Inga\\';

%% Quelques constantes
N = 8; % Nombre de Puces
L = 1665; % Longueur totale de la pente
dL = 900; % Longueur de la partie constriction de la pente
w = 1000; % largeur du canal (longueur des lignes) (default = 1mm)
c = 15; % Largeur à la constriction
pas_laser = 3; % Pas de recouvrement entre 2 passage du laser (par defaut =
3)
k = floor(dL/pas_laser); % Calcul du nombre de .LWO nécessaires pour
construire la constriction
V = 4; % Vitesse du laser en mm/s
L_ouv = 42; % Longueur ouverture après constriction
L_recouv = 25; % longueur de la zone de recouvrement avant et après


%% Forme de la constriction
% linéaire F = A*n + B
A = (c-w)/k; % Constante A
B = w; % Constante B
% picolike shape


%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
/!\ Don't modify under this line /!\ %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
%% Calcul et génération des LWO
generation_lwo; % Générations des .LWO (longueurs de lignes différentes)
pour la constriction

fprintf(fid_n,...
   ['"DflVersion" "4" \r\n']);


%% Écriture de la puce 1
    dx_P=-8480 ; dy_P=34850; z=33333;
    % Ecriture .dfl
    dx=dx_P-L_recouv; Pmin=50; Pmax=50;
    zone_recouvrement_constante;

    Generation_pente_v;

    dx=dx_P+L+pas_laser; Pmin=12 ; Pmax = 12;
    zone_recouvrement_constante_2;

%% Écriture de la puce 2
    dx_P=6520 ; dy_P=34850; z=33333;
    % Ecriture .dfl
    dx=dx_P-L_recouv; Pmin=50; Pmax=50;
    zone_recouvrement_constante;

    Generation_pente_v;

    dx=dx_P+L+pas_laser; Pmin=12 ; Pmax = 12;
    zone_recouvrement_constante_2;

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
L'écriture des puces 3 à 30 est sauté pour raison de place.
Des exemples sont laissés (1/2 et 31/32), la seule différence est la
coordonnée d'origine de la puce.
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

%% Écriture de la puce 31
    dx_P=-8480 ; dy_P=-35350; z=33333;
    % Ecriture .dfl
    dx=dx_P-L_recouv; Pmin=50; Pmax=50;
    zone_recouvrement_constante;

    Generation_pente_v;

    dx=dx_P+L+pas_laser; Pmin=12 ; Pmax = 12;
    zone_recouvrement_constante_2;

%% Écriture de la puce 32
    dx_P=6520 ; dy_P=-35350; z=33333;
    % Ecriture .dfl
    dx=dx_P-L_recouv; Pmin=50; Pmax=50;
    zone_recouvrement_constante;

    Generation_pente_v;

    dx=dx_P+L+pas_laser; Pmin=12 ; Pmax = 12;
    zone_recouvrement_constante_2;
```

B. Code pour générer les pentes

```
%%  Pente horizontale fait de segments verticaux de 1mm
    dx=0+dx_P;
% Offset X
    dy=0+dy_P;
% Offset Y
    Pmin=50;
    Pmax=10;

%% Calcul des vecteurs de position X[n] / P[n] puissance et le nombre de
lignes
[x, Puissance, Nb_ligne ] = Parametre_dfl_pente(L-L_ouv, pas_laser, Pmin,
Pmax);

x=(x+dx)/1000; y=dy/1000; % Scaling

%% Boucle for n=1:Nb_ligne
        if le(n,(L-dL-L_ouv)/pas_laser)
            if mod(n,2) == 0
                fprintf(fid_n,...
                [strcat(Chemin,'l_n_',num2str(w/1000),'mm.lwo"
"',num2str(Puissance(n)),'" "',num2str(V),'" "',num2str(x(n)),'"
"',num2str(y),'" "',num2str(z),'"\r\n')]);
            else
                fprintf(fid_n,...
                [strcat(Chemin,'l_i_',num2str(w/1000),'mm.lwo"
"',num2str(Puissance(n)),'" "',num2str(V),'" "',num2str(x(n)),'"
"',num2str((w+dy)/1000),'" "',num2str(z),'"\r\n')]);
            end

        else
            dw = w/1000;
            F = A*(n-((L-dL-L_ouv)/pas_laser+1))+B;
            dF = F/1000;
%             if (n-((L-dL-L_ouv)/pas_laser+1)) == 76 || (n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)) == 150 || (n-((L-dL-L_ouv)/pas_laser+1)) == 226
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_n_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'" "',num2str(z),'"\r\n')]);
%
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_i_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)+5),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'" "',num2str(z),'"\r\n')]);
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_n_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)+5),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)-0.003),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'"
"',num2str(z),'"\r\n')]);
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_i_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)+5),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)-0.006),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'"
"',num2str(z),'"\r\n')]);
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_n_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)+5),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)-0.009),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'"
```

```
"',num2str(z),'"\r\n')]);
%                 fprintf(fid_n,...
%                     [strcat(Chemin,'l_i_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)+5),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)-0.012),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'"
"',num2str(z),'"\r\n')]);
%             else
                if mod(n,2) == 0
                    fprintf(fid_n,...
                    [strcat(Chemin,'l_n_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)),'" "',num2str(y+(dw-dF)/2),'" "',num2str(z),'"\r\n')]);
                else
                    fprintf(fid_n,...
                    [strcat(Chemin,'l_i_#',num2str(n-((L-dL-
L_ouv)/pas_laser+1)),'.lwo" "',num2str(Puissance(n)),'" "',num2str(V),'"
"',num2str(x(n)),'" "',num2str((w+dy)/1000-(dw-dF)/2),'"
"',num2str(z),'"\r\n')]);
                end
%             end
        end

   end
```

C. Code pour générer les .lwo en fonction du design

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%% Script qui permet d'écrire des lwo en fonction d'une forme %%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%


L_stab = 1.5;
% Longueur de stabilisation
% k=dL/pas_laser % k=longueur de constriction/pas_laser
% L(n)=(A*n+B)/1000 // longueur d'une ligne à l'indice n de ligne (en .mm)

%% Boucle de génération des .LWO
for n=1:k
% n tours de boucles de 0 à k
    if mod(n,2) == 0
% Si n est pair
        file_name = sprintf('l_n_#%d.lwo',n);
        file = fopen(file_name, 'w');

        fprintf(file,...
            [strcat('[FPP]','\r\n','1vv10','\r\n')]);
% Première/Deuxième lignes
        fprintf(file,...
            [strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str(-(L_stab)),'\r\n')]);
% Ligne d'initialisation (default 1.5 mm)
        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n','mm0','\r\n','[END]','\r\n')]);
% Milieu
        fprintf(file,...
            [strcat('Start Y',32,num2str(0.0),'\r\n')]);
% Origine de la ligne
        fprintf(file,...
```

```
            [strcat('End Y 1',32,num2str((A*n+B)/1000),'\r\n')]);
% fin de la ligne == longueur

        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n','1vv3','\r\n')]);
% Milieu fin
        fprintf(file,...
            [strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str((A*n+B)/1000),'\r\n')]);
% Ligne de stabilisation finale
        fprintf(file,...

[strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str((A*n+B)/1000+L_stab),'\r\n')]);   %
Ligne de stabilisation finale
        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n')]);
% Fin

        fclose(file);
% Fermer le fichier /!\ IMPORTANT /!\

    else
% Si n est impair
        file_name = sprintf('l_i_#%d.lwo',n);
        file = fopen(file_name, 'w');

        fprintf(file,...
            [strcat('[FPP]','\r\n','1vv10','\r\n')]);
% Première/Deuxième lignes
        fprintf(file,...
            [strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str(L_stab),'\r\n')]);
% Ligne d'initialisation (default 1.5 mm)
        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n','mm0','\r\n','[END]','\r\n')]);
% Milieu

        fprintf(file,...
            [strcat('Start Y',32,num2str(0.0),'\r\n')]);
% Origine de la ligne
        fprintf(file,...
            [strcat('End Y 1',32,num2str(-(A*n+B)/1000),'\r\n')]);
% fin de la ligne == longueur

        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n','1vv3','\r\n')]);
% Milieu fin
        fprintf(file,...
            [strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str(-(A*n+B)/1000),'\r\n')]);
% Ligne de stabilisation finale
        fprintf(file,...
            [strcat('1cp1,1ma0.00000,2ma',num2str(-((A*n+B)/1000)-
L_stab),'\r\n')]);% Ligne de stabilisation finale
        fprintf(file,...
            [strcat('[END]','\r\n')]);
% Fin

        fclose(file);
% Fermer le fichier /!\ IMPORTANT /!\

    end
end
```

D. Quelques exemples de fichiers terminés

1. Exemple d'une ligne dans un .lwo

Lwo générant une ligne verticale de longueur 0.99672 mm et avec une longueur de stabilisation de 1.5 mm.

```
[FPP]
1vv10
1cp1,1ma0.00000,2ma1.5
[END]
mm0
[END]
Start Y 0
End Y 1 -0.99672
[END]
1vv3
1cp1,1ma0.00000,2ma-0.99672
1cp1,1ma0.00000,2ma-2.4967
[END]
```

---

2. Exemple d'un fichier .dfl qui appel un ensemble de .lwo pour créer un design

Un échantillon seulement est présenté ici pour attirer l'attention sur la lecture générale d'un tel fichier. Le fichier original fait 350 pages, 128k mots.

La première partie de la ligne est l'appel au fichier .lwo spécifique. On peut en remarquer dans cet exemple de toute sorte, d'abord une ligne de longueur constante de 1 mm (n et i sont les deux orientations vers le haut ou vers le bas pour l'écriture en aller-retour). Puis on appel des lignes qui ont une numérotation croissante, chaque ligne a une longueur différente pour former la constriction.

Ensuite on a les coordonnées sur le wafer en mm, puis la puissance attribuée à chaque ligne pour former la pente en 2.5D. La dernière partie « 33333 », commune à que ligne, est le focus en z. Cette valeur est attribuée de cette façon qu'elle puisse être changée rapidement et facilement pour toutes les lignes en même temps une fois la vraie valeur de focus mesurée.

```
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_1mm.lwo" "32.5" "4" "-7.769" "34.85" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_i_1mm.lwo" "32.4" "4" "-7.766" "35.85" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_1mm.lwo" "32.3" "4" "-7.763" "34.85" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_i_1mm.lwo" "32.3" "4" "-7.76" "35.85" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_#0.lwo" "32.2" "4" "-7.757" "34.85" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_i_#1.lwo" "32.1" "4" "-7.754" "35.8484" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_#2.lwo" "32" "4" "-7.751" "34.8533" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_i_#3.lwo" "32" "4" "-7.748" "35.8451" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_#4.lwo" "31.9" "4" "-7.745" "34.8566" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_i_#5.lwo" "31.8" "4" "-7.742" "35.8418" "33333"
"D:\FICHIERS LITHO\Inga\l_n_#6.lwo" "31.7" "4" "-7.739" "34.8599" "33333"
```

II. Codes de la plateforme instrumentée

A. Plateforme instrumentée générale

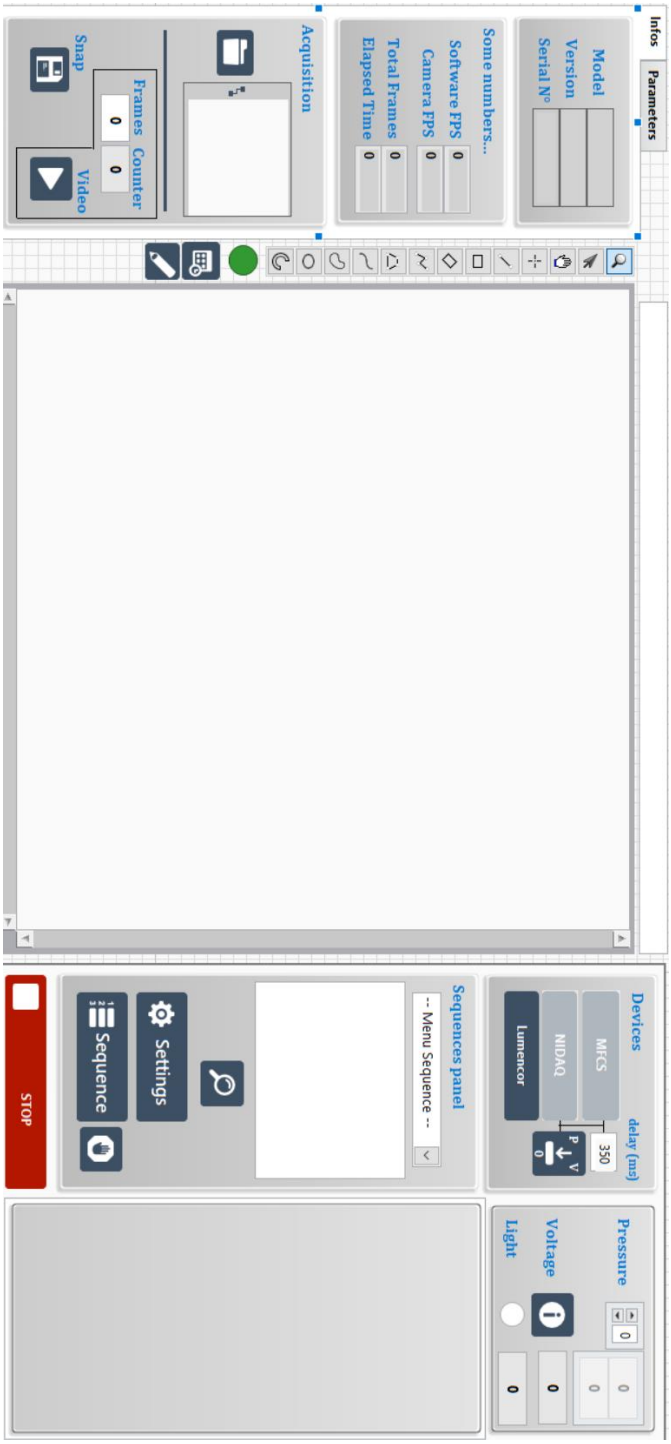


Figure A.II.1 Face avant de la plateforme instrumentée finalisée.

B. Gestion des instruments

Dans cette partie seront présentés les faces avant de tous les codes qui permettent de contrôler les instruments via une interface utilisateur. Ces codes sont fait de manière à pouvoir communiquer entre eux et avec d'autres parties du programme pour que certains paramètres soient modifiés procéduralement par des mesures ou des calculs.

1. *Contrôleur de pression*

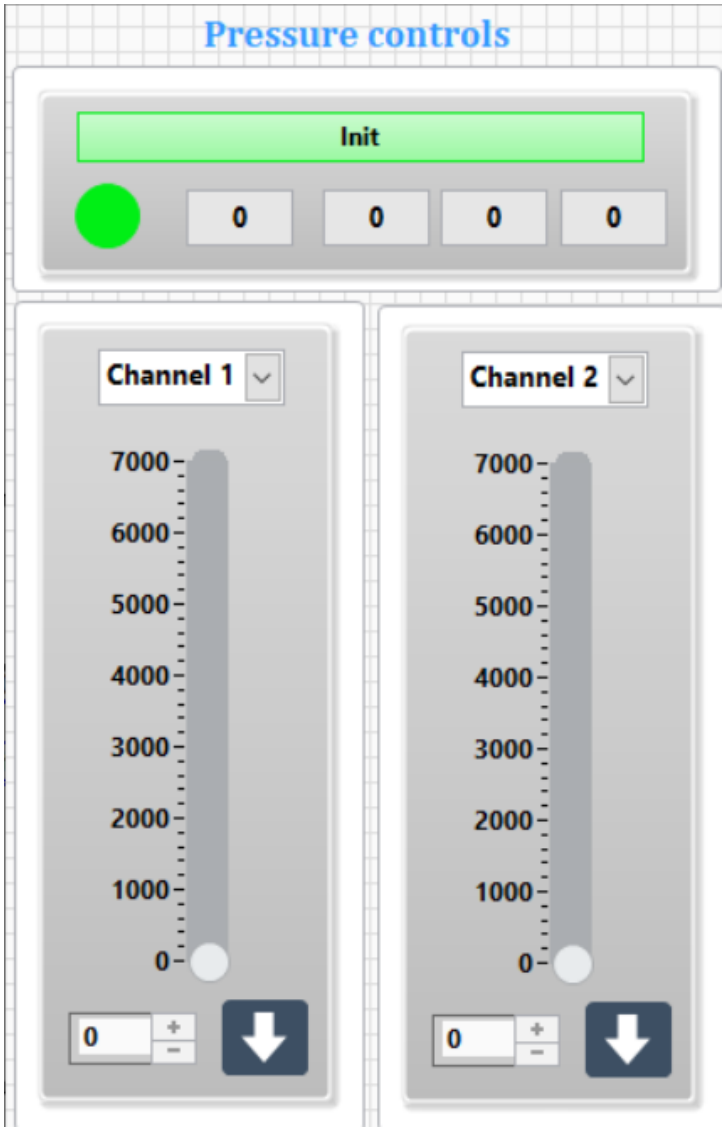


Figure A.II.2 **Face avant de l'interface avec le MFCS, contrôleur en pression.** L'utilisateur peut modifier la pression sur 4 canaux en même temps et avoir une mesure en temps réel en retour.

2. Générateur de tension

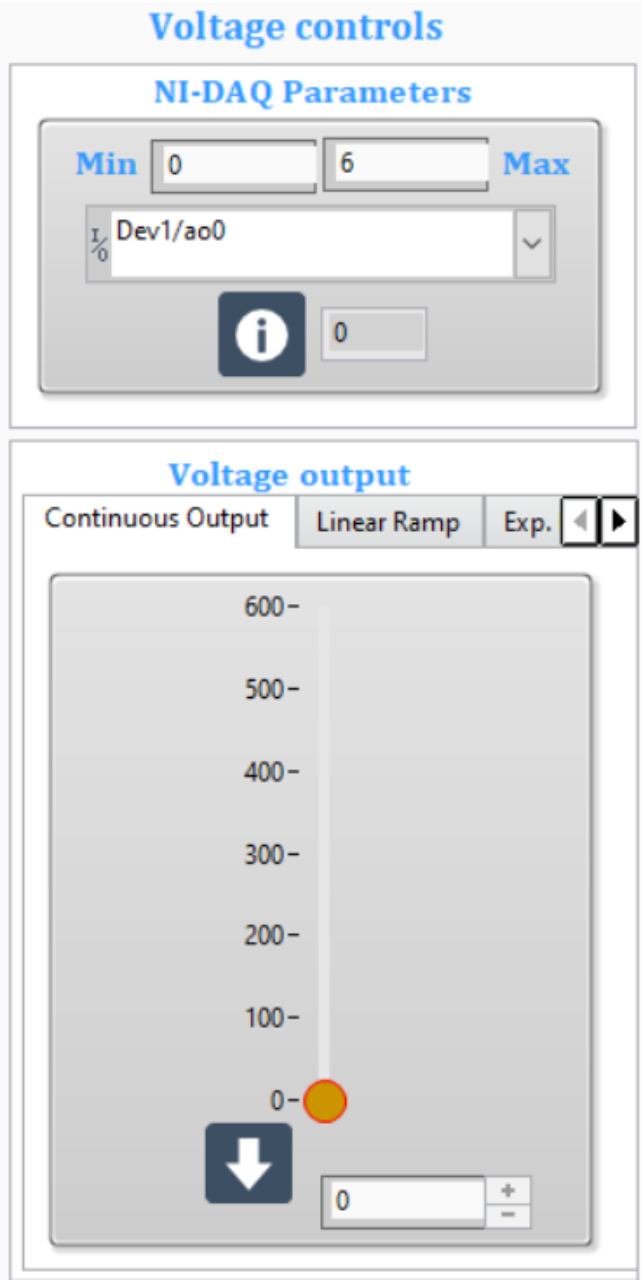


Figure A.II.3 Face avant de l'interface avec le NI-DAQ, générateur de tension. L'utilisateur peut modifier la tension en temps réel, essayer des rampes à la volée avant de paramétrer des séquences plus longues.

3. Contrôleur de la source de lumière

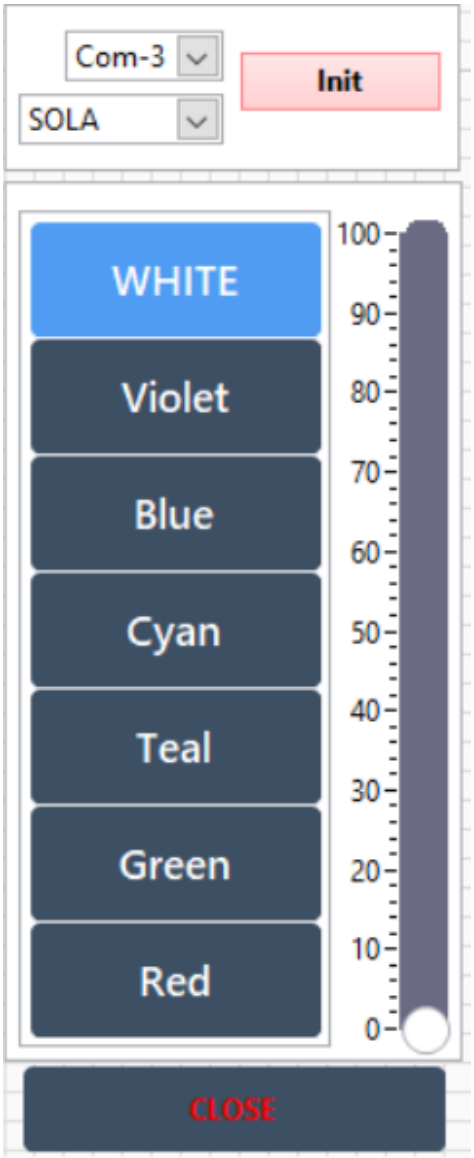


Figure A.II.4 Face avant de l'interface le contrôleur de la source de lumière. L'utilisateur peut modifier la luminosité et changer le spectre si besoin.

C. Génération de profils

1. Pentes linéaires en tension

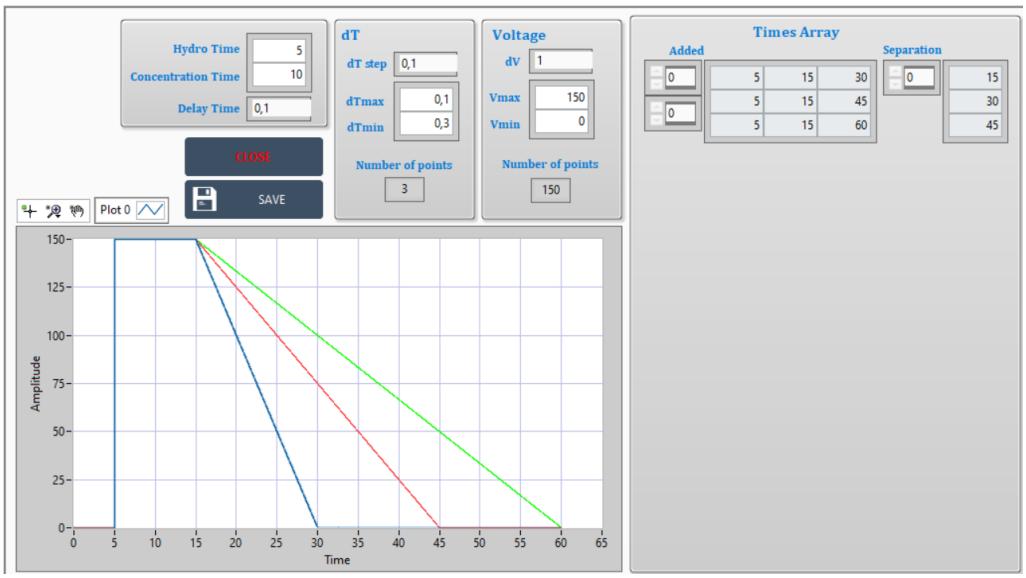


Figure A.II.5 **Face avant de l'interface avec un code de paramétrage pour générer des profils de pentes linéaires en tension.** Le code peut générer plusieurs profils et attribuer à chacun une séquence d'exécution pour effectuer l'automatisation de la concentration à la séparation avec la synchronisation vidéo. Sur cet exemple on peut voir 3 pentes différentes qui effectue une concentration à 150 V et ensuite une décroissance jusqu'à 0 V.

2. Pentes exponentielles en tension

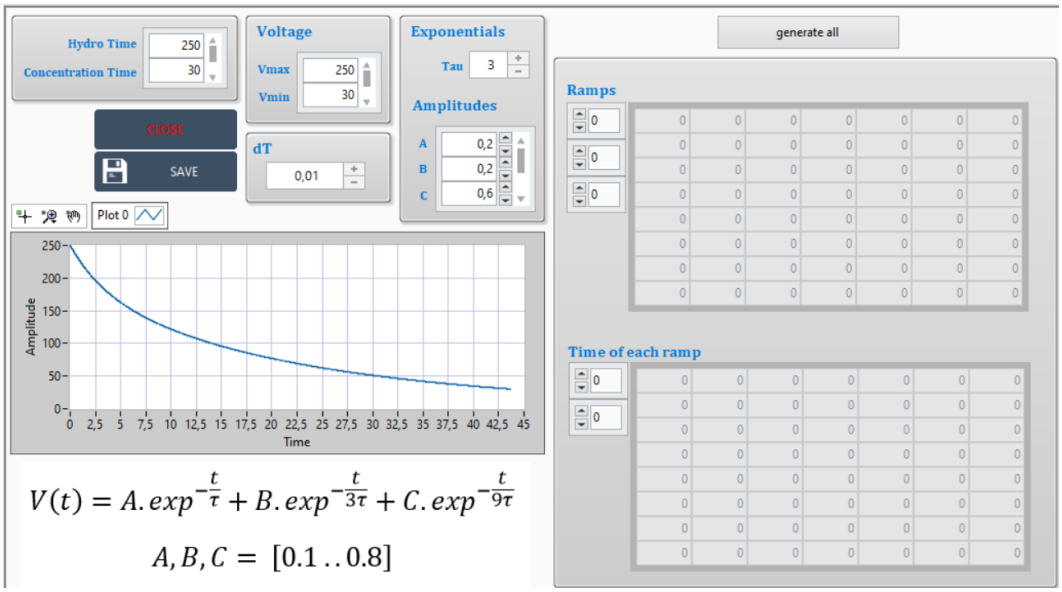


Figure A.II.6 **Face avant de l'interface avec un code de paramétrage pour générer des profils de formes exponentiels.** Le code peut générer plusieurs profils et attribuer à chacun une

séquence d'exécution pour effectuer de la concentration à la séparation avec la synchronisation vidéo.

D. Séquence automatisée pour explorer rapidement les espaces de paramètres

Ce code est surtout utilisé pour le mode de séparation spatial mais il peut être utiliser pour parcourir rapidement de façon automatisé et fiable les gammes de tensions/pression.

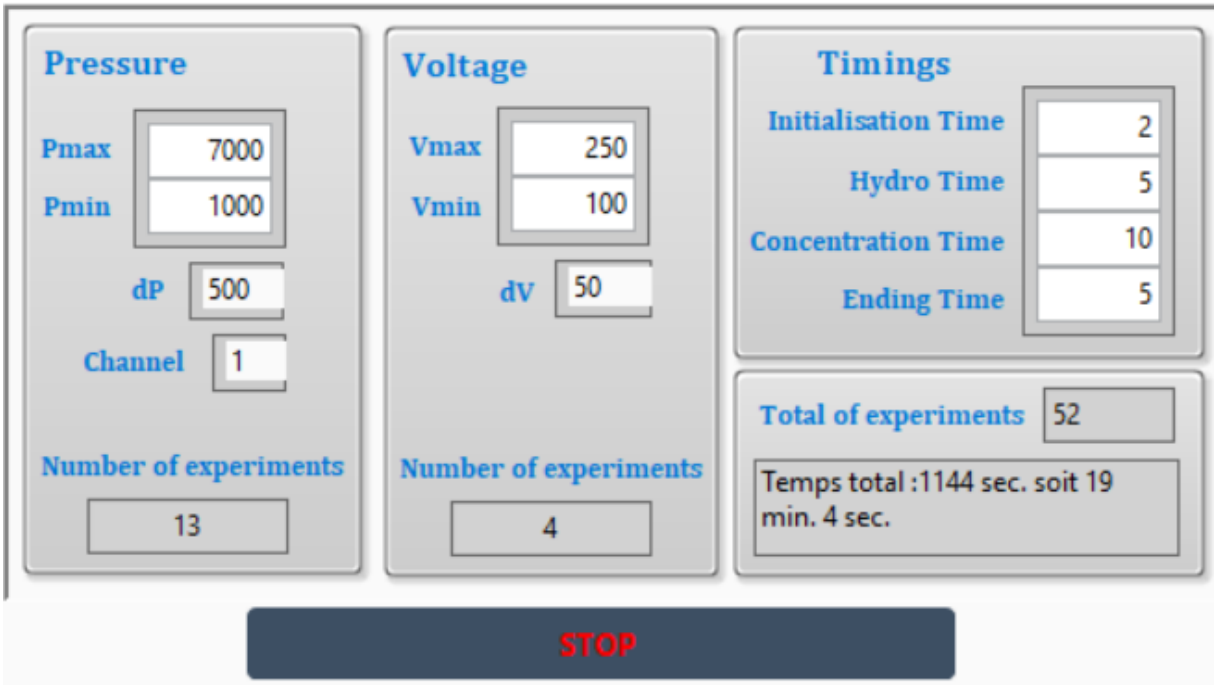


Figure A.II.7 Code d'exploration en pression/tension avec séquence complète. Dans cet exemple le programme génère 52 séquences d'expérimentation, de P = 1 bar à P = 7 bar par pas de 500 mbar et de V = 100 V à V = 250 V par pas de 50 V. Ici la tension est gardée constante c'est pourquoi ce code est privilégié pour le mode de séparation temporel.

III. Résultats subsidiaires pour l'optimisation de la séparation des bandes

A. Tension/champ

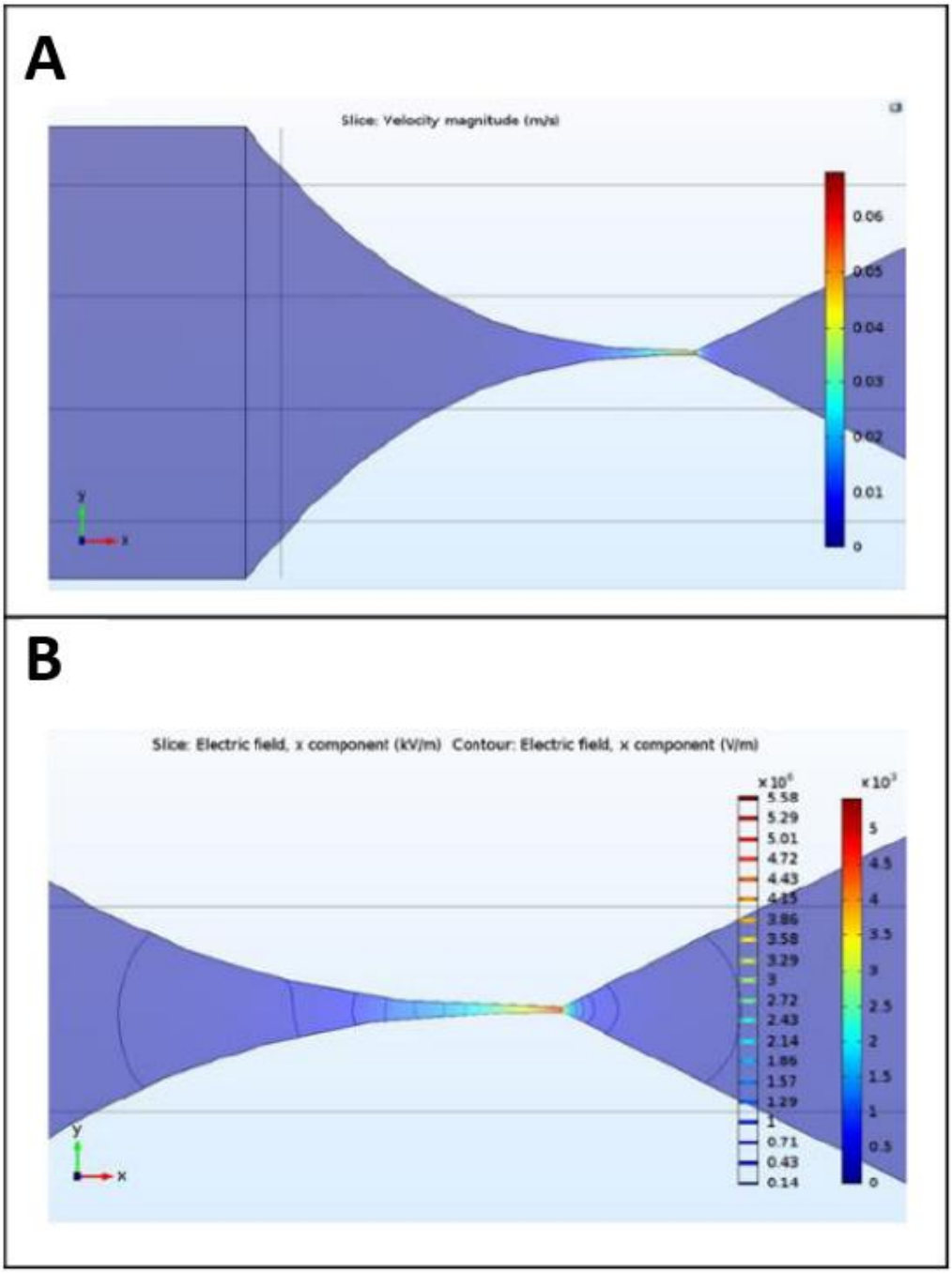


Figure A.III.1 Simulations Comsol *(Chami, 2019).* (A) Simulation Comsol de la vitesse hydrodynamique dans la constriction mettant en évidence une vitesse plus importante dans la partie la plus étroite. (B) Simulation Comsol du champ électrique dans la gamme 5 à 60 V/cm pour une tension de 300 V appliquée à une distance de 200 µm de la constriction.

B. Vitesses

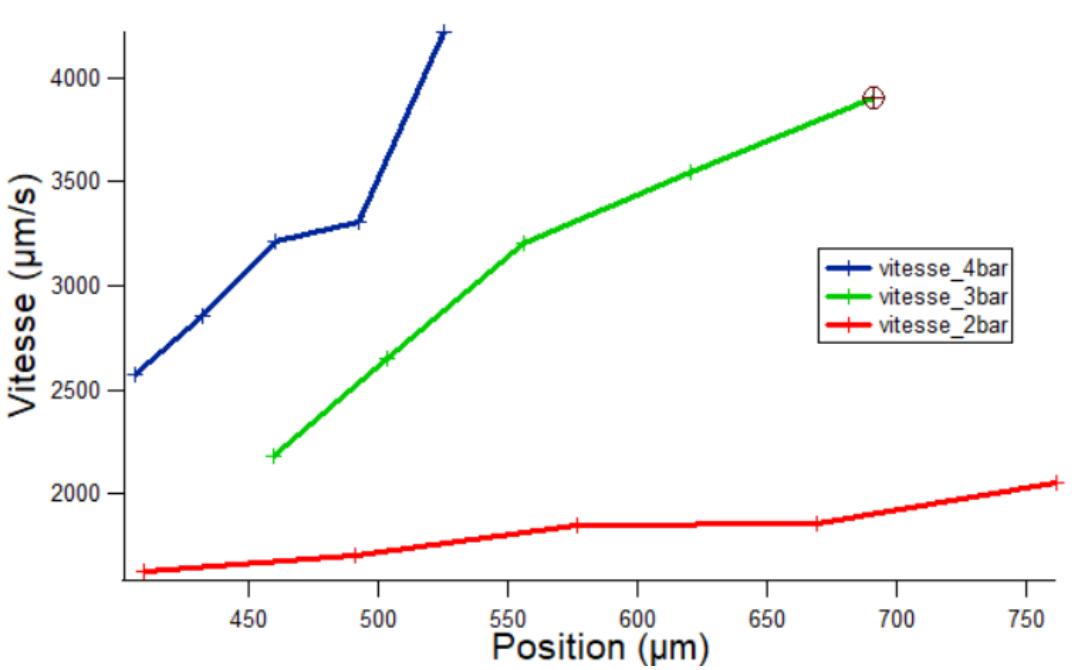


Figure A.III.2 Vitesses hydrodynamiques pour un jeu de 3 pressions : 2, 3 et 4 bar. On peut remarquer que les vitesses n'atteignent pas un plateau de régime stationnaires, le régime où la dispersion de Taylor est atteinte. Le temps de migration est trop court et le régime reste transitoire.

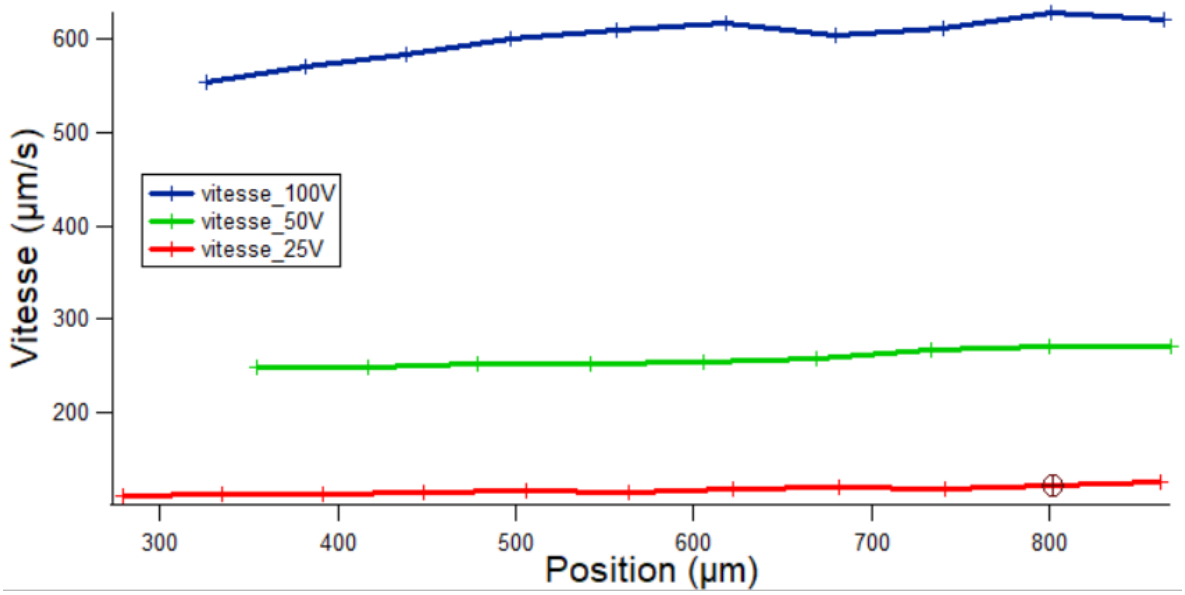


Figure A.III.3 Vitesses électrophorétiques pour un jeu de 3 tensions : 25, 50 et 100 V. Contrairement à la figure précédente on peut remarquer que les vitesses sont stables et constantes.

C. Code pour calcul du modèle numérique de comparaison

```
        %% Paramètres généraux %%
        kB = 6E-23;                                         % Constante de
Boltzman                    [J][K]-1
        T = 300;                                            % Température
[K]
    %%%
    %% Paramètres DNA %%
        lk = 100E-9;                                        % Longueur de
Khun (plutôt 2 fois qu'Khune) [m]
        N_bp = 1000;                                         % Taille DNA
en paires de bases
        a = (N_bp/300)*lk;                                  % "Taille" DNA
Longueur de contour          [m]
    %%%
    %% Paramètres solution %%
        tau = 0.5E-3;                                         % Temps carac
relax matrice polymère        [s]
        mu = 30e-3;                                       % Viscosité
[Pa][s]
    %% Paramètres géométrie / système %%
        H = 2E-6;                                          % Hauteur du
canal                          [m]
        Lp = 800E-6;                                          % Longueur
jusqu'au détecteur               [m]
        Uh = 1.5E-3;                                         % Vitesse
hydro max set up                  [m][s]-1
        %U0 = 2.5E-3;                                            % Vitesse
Electro

syms t
tpf=zeros(2,1);
D=zeros(2,1);
wp=zeros(1,1);
U0_calc=zeros(1,1);

C1 = 6*sqrt((2*kB*T*Uh)/(pi*a*mu*tau));

disp('Constantes :')
disp(['C1 =',32,num2str(C1)])
disp(' ')

    %% Intégrale de Lp de 0 à tp
    i=0;
    %[-10 -8.33 -7.69 -7.14 -6.67 -6.25 -5.88 -5.56 -5.26 -5 100 75 50 25
10 7.5 5 2.5 1 0.75 0.5 0.25 0.1]
    for alpha = [-10 -8.33 -6.67 -5]
        %alpha = -6.5;
        i=i+1;

        %% Cherchons le U0 %%
        U0_calc(i)=solve(C1/sqrt(t) == t, t);

        Lpt = int((C1/sqrt(U0_calc(i)-alpha*t))+alpha*t-U0_calc(i), [0 t]);

    % Inversion et résolution équation tp
        tpf(i) = solve(Lpt - Lp, t);
        tpf(i) = abs(tpf(i));
```

```
        DD(i) = int(1/(U0_calc(i)-alpha*t)^2, [0 tpf(i)]);
        D(i) = (44*H^2/tau^2)*DD(i);
        %D(i) = abs(D(i));

        wp(i) = sqrt(2*D(i));
    end
```

D. Ajout d'une bande de 1000 bp

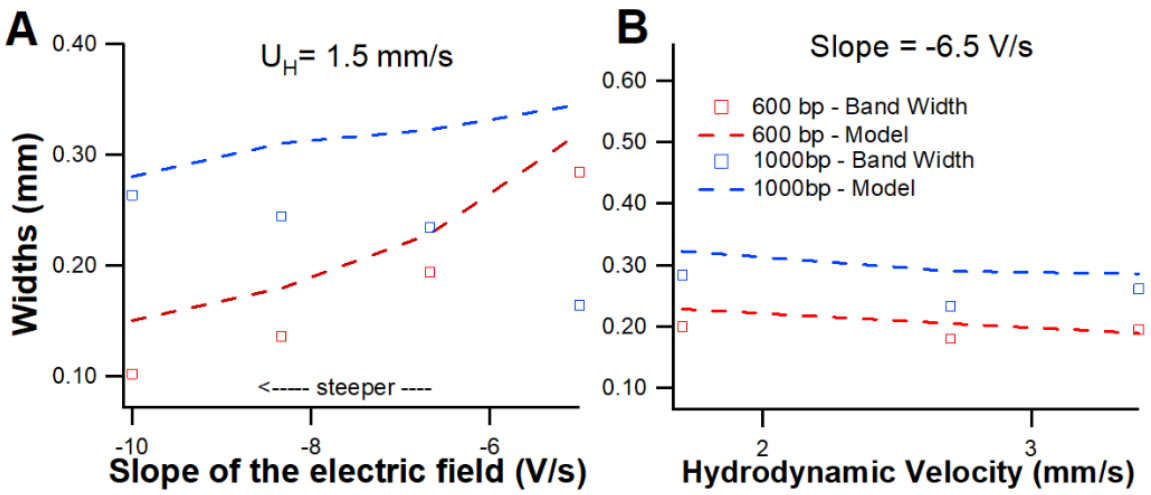


Figure A.III.3 **Diffusion électro-hydrodynamique avec une rampe linéaire en champ électrique.** **(A)** Le graphique montre la FWHM des bandes de 600 et 1000 pb après 1,3 mm de migration en utilisant quatre pentes pour le champ électrique et en réglant la vitesse d'écoulement sur 1,5 mm / s (ensembles de données rouge et bleu, respectivement). La ligne en pointillés correspond à la solution numérique du modèle, comme décrit dans la documentation supplémentaire. **(B)** Le graphique représente la FWHM des bandes 600 et 1000 bp pour une pente donnée de -6,5 V / s et trois réglages de pression, ainsi que la prédiction du modèle.

IV. Modèle de simulation numérique

A. Code

```
                %% Paramètres %%
    disp(' ')
    %% Paramètres généraux %%
        kB = 6e-23;                                         % Constante de
Boltzman                    [J][K]-1
        T = 300;                                            % Température
[K]
    %%%
    %% Paramètres DNA %%
        lk = 100e-9;                                        % Longueur de
Khun (plutôt 2 fois qu'Khune) [m]
        N_bp = 3000;                                         % Taille DNA
en paires de bases
        a = (N_bp/300)*lk;                                  % "Taille" DNA
Longueur de contour          [m]
        %Na = 1;                                            % Nombre de
bandes
    %%%
    %% Paramètres solution %%
        K = 0.001;                                              % Constante
K' ajustable                    [J][m]-3[Pa]-1
        tau = 2e-4;                                         % Temps carac
relax matrice polymère        [s]
        eta = 1.2e-3;                                        % Viscosité
[Pa][s]
        %D = kB*T/(3*pi*eta*a);                              % Coeeficient
de diffusion théo             [m]2[s]-1
%         disp('Coefficient de diffusion :')
%         disp(['D =',32,num2str(D)])
%         disp(' ')
    %%%
    %% Paramètres géométrie / système %%
        h = 40e-6;                                          % Hauteur du
canal                           [m]
        Ltot = 26.5e-2;                                        % Longueur
totale                            [m]
        Ld = 7e-2;                                          % Longueur
jusqu'au détecteur                [m]
        dP = 10e5;                                          % Différence de
pression                     [Pa]
        Vp0 = 1.3e-3;                                         % Vitesse
hydro max set up                  [m][s]-1
        %Vp0 = ((h/2).^2*dP)/(4*eta*L);                     % Vitesse max
hydro théorique               [m][s]-1
        %disp('Vitesses Hydro et Électro :')
        %disp(['Vp0 =',32,num2str(Vp0)])
        %mu0 = 20e-9;                                         % Mobilité
electrophorétique                 [m]2[V]-1[s]-1
        %E0 = 150.5e3;                                         % Champ
electrophorétique                    [V][m]-1
        %Ve0 = mu0*E0;                                       % Vitesse max
electro                       [m][s]-1
```

```
        %disp(['Ve0 =',32,num2str(Ve0)])
        %tau0 = 40;                                          % Temps
caractéristique de décroissance     [s]
        %alpha = 2;                                         % Coeff profil
decroissance eletro
        %Pe = Vp0*a/D;
        %disp(['Pe =',32,num2str(Pe)])

    %%%
    disp([' '])

    %% Deff & U %%
%% Paramètres intégrale %%
    %%tmin = tau0*power((kB*T*Vp0)/(K*eta*tau*a*(pi.^2)*Ve0.^3),-
1/(3*alpha));            % Temps "0" départ
    %%tmin = round(tmin);
    tmax = 5000;
% Temps "max"
    dt=1;
% Pas de temps

%% Intégrales %%
    L=zeros(tmax,1);
    zcanal=zeros(tmax,1);
    E=zeros(tmax,1);
    V=zeros(tmax,1);
    tstart=zeros(7,2);
    DELTA = zeros(tmax,1);
    Deff=zeros(tmax,7);

    C=zeros(tmax,7);
    syms t

%% V, Deff et C - Intégrés - %%
%K = [0.1 0.09 0.08 0.07 0.06 0.05 0.04 0.03 0.02 0.01 0.009 0.008 0.007
0.006 0.005 0.004 0.003 0.002 0.001 0.0009 0.0008 0.0007 0.0006 0.0005
0.0004 0.0003 0.0002 0.0001 0.00009 0.00008 0.00007 0.00006 0.00005 0.00004
0.00003 0.00002 0.00001 0.000009 0.000008 0.000007 0.000006 0.000005
0.000004 0.000003 0.000002 0.000001 0.0000009 0.0000008 0.0000007 0.0000006
0.0000005 0.0000004 0.0000003 0.0000002 0.0000001 0.00000009 0.00000008
0.00000007 0.00000006 0.00000005 0.00000004 0.00000003 0.00000002
0.00000001];
%mu0 = [1e-10 2e-10 3e-10 4e-10 5e-10 6e-10 7e-10 8e-10 9e-10 1e-9 2e-9 3e-
9 4e-9 5e-9 6e-9 7e-9 8e-9 9e-9 10e-9 20e-9 30e-9 40e-9 50e-9 60e-9 70e-9
80e-9 90e-9 100e-9 200e-9 300e-9 400e-9 500e-9 600e-9 700e-9 800e-9 900e-9
1000e-9 2000e-9 3000e-9 4000e-9 5000e-9 6000e-9 7000e-9 8000e-9 9000e-9
10000e-9 20000e-9 30000e-9 40000e-9 50000e-9 60000e-9 70000e-9 80000e-9
90000e-9 100000e-9];

C0(1)=100;
C0(2)=26;
C0(3)=33;
C0(4)=40;
C0(5)=33;
C0(6)=33;
C0(7)=45;

m=0;
for Ld = [3e-2 5e-2 7e-2 9e-2 11e-2]
m=m+1;
```

```
i=0;
for mu0 = [7e-6]
    %i=i+1;

    %j=0;
    for K = [7e-8]
        %j=j+1;

        for Bandes = [3000 4000]
            i = i + 1;
            p = 0.1;
            %Nb = (Bandes/300)+1;
            K_prime = K*(Bandes/3000)^1;
            %K_prime = K;
            mu0_prime = mu0*(Bandes/3000)^p;
            %mu0_prime = mu0;
            a = (Bandes/300)*lk;

        %tstart(i,1) =
(power((kB*T*Vp0)/(K_prime*eta*tau*a*(pi.^2)*mu0_prime^3),1/3)-
16.5e3)/(((8.3e3-16.5e3)/(300)));            % Temps "0" départ
        %tstart(i,1) = round(tstart(i,1));

         V(1,1)=-1;
         for y = 2:dt:5000
            if y<=300
                E(y,1) = (((8.3e3-16.5e3)/(300))*y + 16.5e3);
            elseif y<=1800
                E(y,1) = 2.0e3-(6.3e3*1800)/(300-1800)+6.3e3*y/(300-1800);
            else
                E(y,1) = ((1990-2000)/(10000-1800))*y+(2000-((1990-
2000)/(10000-1800))*1800);
            end

            if V(y-1,1)<0
                V(y,1) =
sqrt((Vp0*kB*T)/(mu0_prime*E(y,1)*K_prime*eta*tau*a*pi^2)) -
(mu0_prime*E(y,1));
            else
                break
            end
        end
        tstart(i,1) = y;

            L=zeros(tmax,1);

             clock = waitbar(0, '1', 'Name', sprintf('%12.1f %%', ((9*(i-
1)+1))*100), 'CreateCancelBtn', 'setappdata(gcbf,''canceling'', 1)');
             setappdata(clock,'canceling',0)

            for x = tstart(i,1):dt:5000

                %u = sqrt((Vp0*kB*T)/(Ve*K*eta*tau*a*pi.^2))-Ve; forme
générale

                if getappdata(clock, 'canceling')
                    break
                elseif L(x-1,1)<Ld
                    if x<=300
                        Ve = mu0_prime*(((8.3e3-16.5e3)/(300))*t+16.5e3);
                        A = mu0_prime*((8.3e3-16.5e3)/(300));
```

```
                        B = mu0_prime*16.5e3;
                    elseif x<=1800
                        Ve = mu0_prime*((6.3e3/(300-1800))*t+(2.0e3-
(6.3e3*1800)/(300-1800)));
                        A = mu0_prime*(6.3e3/(300-1800));
                        B = mu0_prime*(2.0e3-(6.3e3*1800)/(300-1800));
                    else
                        Ve = mu0_prime*((0.1e3/(1800-4000))*t+(1.9e3-
(0.1e3/(1800-4000))));
                        A = mu0_prime*((1990-2000)/(10000-1800));
                        B = mu0_prime*(2000-((1990-2000)/(10000-
1800))*1800);
                    end
                    %u = sqrt((Vp0*kB*T)/(Ve*K*eta*tau*a*pi.^2))-Ve;
                    %L(x,1) = L(x-1,1) + int(u, [x-1 x]);
                    L(x,1) =
sqrt((Vp0*kB*T)/(K_prime*eta*tau*a*pi.^2))*(2/A)*(sqrt(A*x+B)-sqrt(A*(x-
1)+B))-((A/2)*((x.^2)-(x-1).^2)+B)+L(x-1,1);

                else
                    break
                end
                waitbar(x/tmax, clock, sprintf('%12.1f %%', (x/tmax)*100))
            end
            tstart(i,2) = x;
            delete(clock)



            clock = waitbar(0, '1', 'Name', sprintf('%12.1f %%', i),
'CreateCancelBtn', 'setappdata(gcbf,''canceling'', 1)');
             setappdata(clock,'canceling',0)

            L=zeros(tmax,1);

            for x =2:dt:5000

                if getappdata(clock, 'canceling')
                    break
                else
                    if x<=300
                        Ve = mu0_prime*(((8.3e3-16.5e3)/(300))*t+16.5e3);
                        A = mu0_prime*((8.3e3-16.5e3)/(300));
                        B = mu0_prime*16.5e3;
                    elseif x<=1800
                        Ve = mu0_prime*((6.3e3/(300-1800))*t+(2.0e3-
(6.3e3*1800)/(300-1800)));
                        A = mu0_prime*(6.3e3/(300-1800));
                        B = mu0_prime*(2.0e3-(6.3e3*1800)/(300-1800));
                    else
                        Ve = mu0_prime*((0.1e3/(1800-4000))*t+(1.9e3-
(0.1e3/(1800-4000))));
                        A = mu0_prime*((1990-2000)/(10000-1800));
                        B = mu0_prime*(2000-((1990-2000)/(10000-
1800))*1800);
                    end

                    D = kB*T/(3*pi*eta*a);
                    Pe = Vp0*h/D;
                    zcanal(x,1) =
h*sqrt((2*kB*T*h^2)/(32*(pi.^2)*K_prime*tau*eta*a*Vp0*(A*x+B)));
```

```
                    zcanalt =
h*sqrt((2*kB*T)/(32*(pi.^2)*K_prime*tau*eta*a*Vp0*Ve));
                    deff = D*(63/192)*(Pe^2)*(2.25*zcanalt/h)^4;

                    if x < tstart(i,1)
                        L(x,1) = 0;
                        Deff(x,i) = 0;
                    else
                        L(x,1) =
sqrt((Vp0*kB*T)/(K_prime*eta*tau*a*pi.^2))*(2/A)*(sqrt(A*x+B)-sqrt(A*(x-
1)+B))-((A/2)*((x.^2)-(x-1).^2)+B)+L(x-1,1);
                        Deff(x,i) = Deff(x-1,i)+int(deff, [x-1 x]);
                    end

                    C(x,i) = (1/sqrt(pi*Deff(x,i)))*exp((-(Ld-
L(x,1))^2)/(Deff(x,i)^2));

                end
                waitbar(x/tmax, clock, sprintf('%12.1f %%', (x/tmax)*100))
            end
            delete(clock)


        end  % end For Bandes
    end % end For K
end % end For mu0

R(m) = 2*(tstart(2,2)-
tstart(1,2))/(2.35*sqrt(2*Deff(tstart(2,2),2))+2.35*sqrt(2*Deff(tstart(1,2)
,1)));

end
% K = [0.1 0.09 0.08 0.07 0.06 0.05 0.04 0.03 0.02 0.01 0.009 0.008 0.007
0.006 0.005 0.004 0.003 0.002 0.001 0.0009 0.0008 0.0007 0.0006 0.0005
0.0004 0.0003 0.0002 0.0001 0.00009 0.00008 0.00007 0.00006 0.00005 0.00004
0.00003 0.00002 0.00001 0.000009 0.000008 0.000007 0.000006 0.000005
0.000004 0.000003 0.000002 0.000001 0.0000009 0.0000008 0.0000007 0.0000006
0.0000005 0.0000004 0.0000003 0.0000002 0.0000001 0.00000009 0.00000008
0.00000007 0.00000006 0.00000005 0.00000004 0.00000003 0.00000002
0.00000001];
% mu0 = [1e-9 2e-9 3e-9 4e-9 5e-9 6e-9 7e-9 8e-9 9e-9 10e-9 20e-9 30e-9
40e-9 50e-9 60e-9 70e-9 80e-9 90e-9 100e-9 200e-9 300e-9 400e-9 500e-9
600e-9 700e-9 800e-9 900e-9 1000e-9 2000e-9 3000e-9 4000e-9 5000e-9 6000e-9
7000e-9 8000e-9 9000e-9 10000e-9 20000e-9 30000e-9 40000e-9 50000e-9
60000e-9 70000e-9 80000e-9 90000e-9 100000e-9];
% %4 4.025 4.05 4.075 4.1 4.125 4.15 4.175 4.2 4.225 4.25 4.275 4.3
% Contours =[4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 5 5.1 5.2];
% figure (1)
% contourf(K,mu0,log10(X),Contours);
% title('T0_SIM - T0_EXP')
% set(gca, 'YScale', 'log')
% set(gca, 'XScale', 'log')
% xlabel('K')
% ylabel('mu0')
% caxis auto
% colorbar
```

B. Temps initiaux pour le bas poids moléculaire

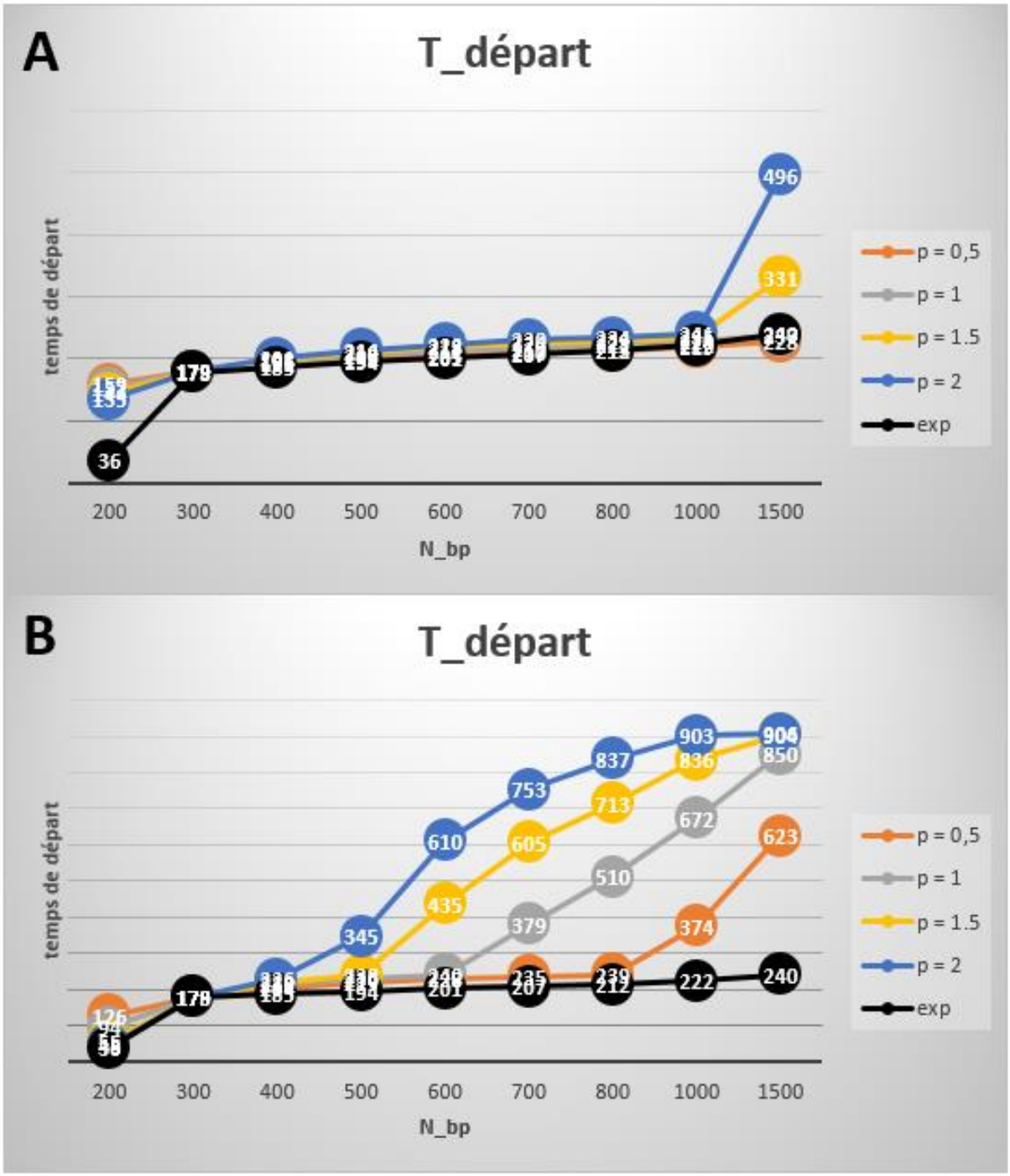


Figure A.IV.1 Temps intiaux par les variations des paramètres d'ajustement en fonction de la taille de la molécule (bas poids moléculaire). **(A)** $K'^{a} = K'^{300}a^{p}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{300}$. **(B)** $K'^{a} = K'^{300}a^{1}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{300}a^{p}$.

C. Temps initiaux pour le haut poids moléculaire

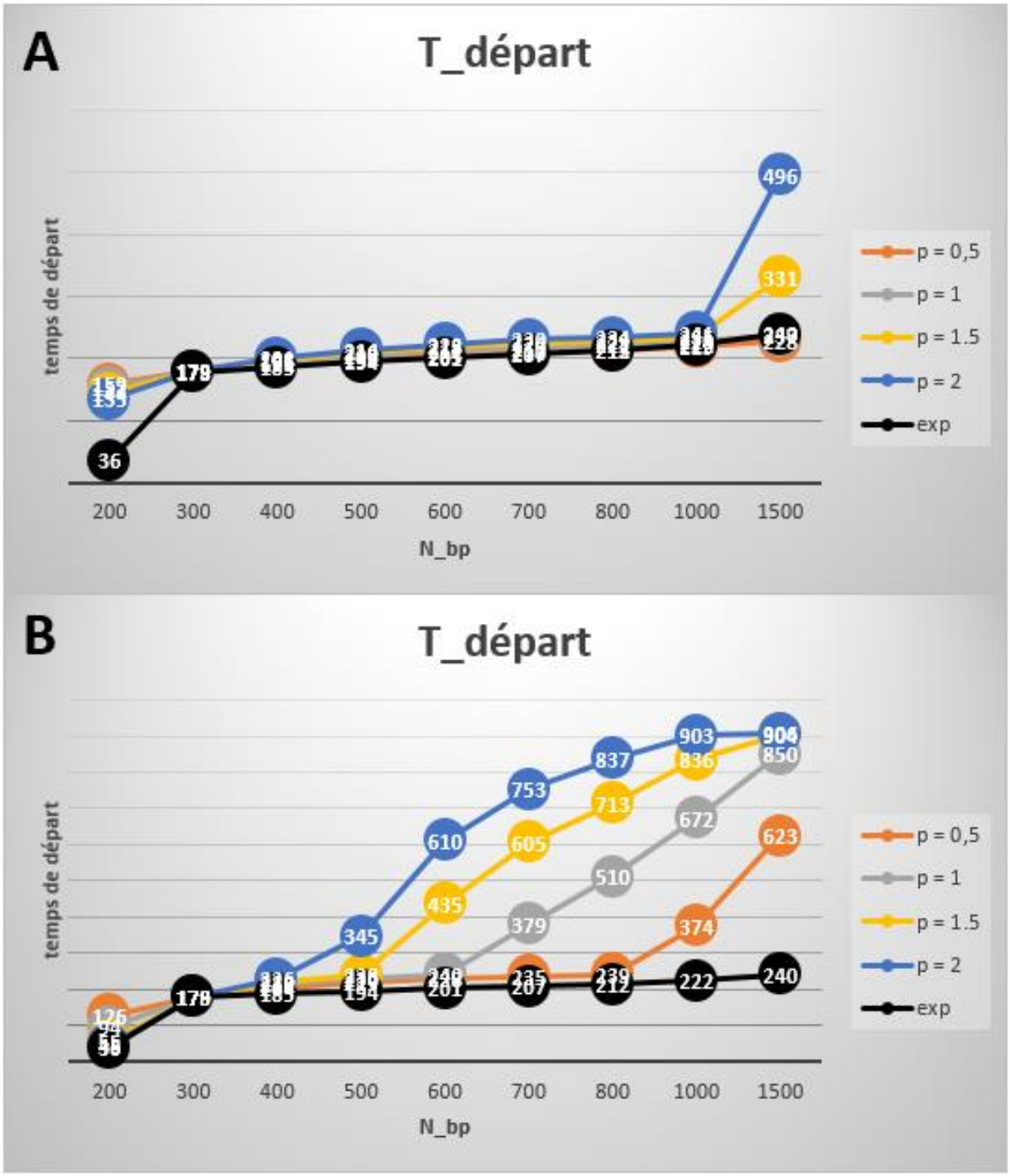


Figure A.IV.2 Temps initiaux par les variations des paramètres d'ajustement en fonction de la taille de la molécule (haut poids moléculaire). **(A)** $K'^{a} = K'^{3000}a^{p}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{3000}$. **(B)** $K'^{a} = K'^{3000}a^{1}$ et $\mu_0^{a} = \mu_0^{3000}a^{p}$.

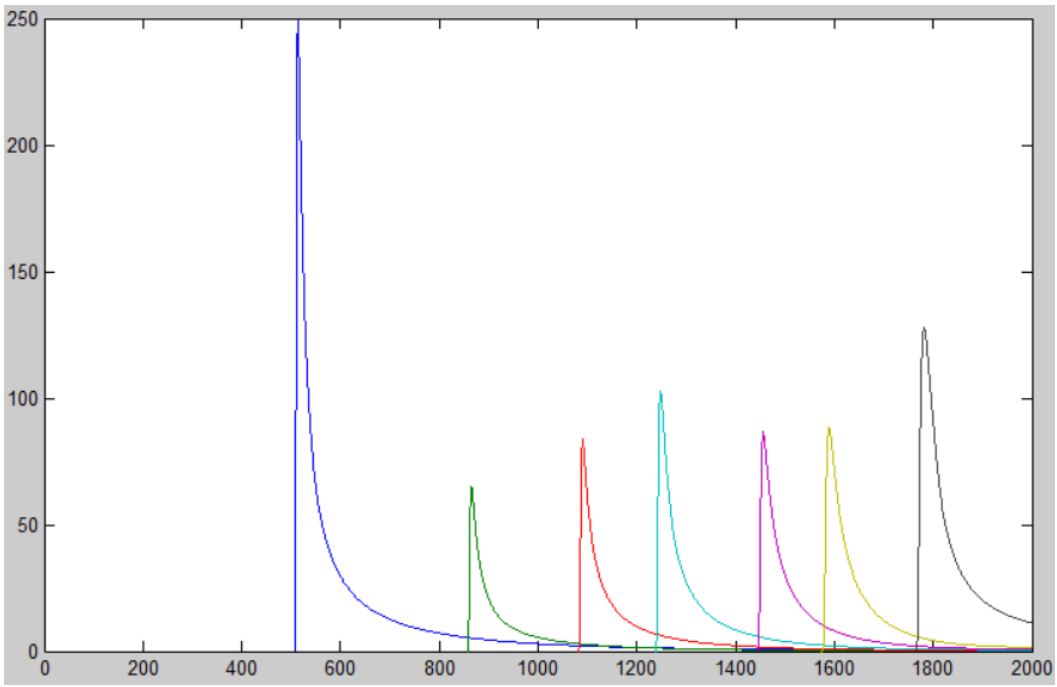


Figure A.IV.3 **Profils d'intensité pour les 7 premières bandes du *ladder* de haut poids moléculaire.** Contrairement à la figure 5.10 il y a eu un ajout de largeur initiale w_0^a. Les bandes sont clairement asymétriques. Néanmoins on peut remarquer une tendance des largeurs plus importantes avec des tailles plus grandes, ce qui correspond mieux à l'expérimentation.